



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTANDARIZACION BIOLOGICA DE EXTRACTOS
ALERGENICOS DE Dermatophagoides pteronyssinus Y
Dermatophagoides farinae PARA INMUNOTERAPIA.

TRABAJO MONOGRAFICO DE
ACTUALIZACION
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
PRESENTA:
TERESITA MILDRED MENDEZ CAPDEVILLE



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES 1999
FACULTAD DE QUIMICA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

279282



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).

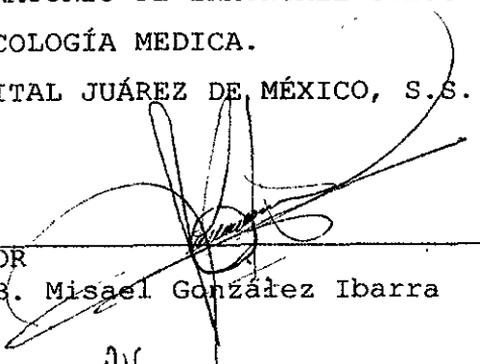
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Jurado asignado:

Presidente Prof. GUTIERREZ RAMOS ABEL
Vocal Prof. BONIFAZ TRUJILLO JOSE ALEXANDRO
Secretario Prof. GONZALEZ IBARRA MISAEL
1er. suplente Prof. AGUILAR CARDENAS ANA ESTHER
2do. suplente Prof. HERNANDEZ GOMEZ LUCIANO

Sitio donde se desarrolló el tema:

LABORATORIO DE INMUNOALERGOLOGÍA
Y MICOLOGÍA MEDICA.
HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO, S.S.



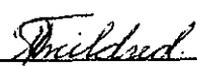
ASESOR

Q.F.B. Misael González Ibarra



SUPERVISORA TECNICA

Q.F.B. Karina Elvira López Valladares



SUSTENTANTE

Teresita Mildred Méndez Capdeville

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de vivir y superarme.

A mis padres Gloria y Manuel por el apoyo, cariño, confianza y comprensión incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida.

A Sylvia y a Lidigy por los momentos compartidos.

A Bertha, Marina, Yara, Yadis, Miriam, Graciela, Chucho., Marisa, Javier, José Luis, Víctor, Domingo, Toika, Simón y Aída por su amistad e invaluable apoyo a lo largo de mis estudios en la Facultad.

A Paty, Gaby, Tere, Julio, Manuel, Dra. Aguilera y Dra. Angeles por brindarme su amistad y ayuda en la elaboración del presente trabajo.

A Misael y Karina por su grandiosa amistad, y enseñanza brindada durante el desarrollo de este trabajo.

A Carlos por enseñarme una nueva forma de vida.

A la UNAM, por ser mi máxima casa de estudios

A todas aquellas personas que creyeron en mí y que han dejado huella en mi vida.

INDICE

INTRODUCCION	8
ANTECEDENTES HISTORICOS	11
CAPITULO I	
1. REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD	18
1.1. HIPERSENSIBILIDAD TIPO I	19
1.1.1. MEDIADORES QUIMICOS Y REGULADORES	21
1.1.2. FACTORES PREDISPONENTES	32
1.1.3. CELULAS INVOLUCRADAS	34
1.1.4. INMUNOGLOBULINA E	38
CAPITULO II	
2. ENFERMEDADES ALERGICAS	45
2.1. ATOPIA	45
2.2. RINITIS ALERGICA	46
2.3. ASMA EXTRINSECO	54
2.4. DERMATITIS ATOPICA	58
CAPITULO III	
3. ALERGENOS	65
3.1. CALSIFICACION	67
3.1.1. ACAROS	67

3.1.2. POLVO DOMESTICO	71
3.2. EXTRACTOS ALERGENICOS	72
3.2.1. MATERIALES DE ORIGEN	76
3.2.2. EXTRACTOS ALERGENICOS DE ACAROS	76
3.2.3. EXTRACTOS ALERGENICOS DE REFERENCIA	78
CAPITULO IV	
4. ESTANDARIZACION DE EXTRACTOS ALERGENICOS	81
4.1. ESTANDARIZACION <i>IN VITRO</i>	85
4.1.1. METODOS CUALITATIVOS	86
4.1.2. METODOS CUANTITATIVOS	88
4.2. ESTANDARIZACION <i>IN VIVO</i>	95
4.2.1. POTENCIA RELATIVA	96
4.2.2. DOSIS BIOEQUIVALENTES	98
4.2.3. DIFERENCIAS DE COMPOSICION	99
4.2.4. OPTIMIZACION DE LOS ENSAYOS <i>IN VIVO</i>	101
4.2.5. PRUEBA DE PINCHAZO PARA EQUIVALENTE DE HISTMAINA (HEP)	110
4.2.6. UNIDAD DE ALERGIA, POR EL METODO DE LA DILUCION INTRADERMICA PARA LA SUMA DE 50mm DE ERITEMA (ID ₅₀ EAL)	112

CAPITULO V

5. PROTOCOLO PROPUESTO

5.1. TITULO	120
5.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	121
5.3. DESCRIPCION DEL PROBLEMA	122
5.4. JUSTIFICACION	123
5.5. HIPOTESIS	124
5.6. VARIABLES	125
5.7. OBJETIVOS	126
5.8. CRITERIOS	127
5.9. INFORMACION Y LINEAMIENTOS SOBRE LOS BENEFICIOS QUE OBTENDRA EL PACIENTE QUE ACEPTA INGRESAR AL PROTOCOLO DE INVESTIGACION	129
5.10. CARTA DE CONSENTIMIENTO	131
5.11. METODOLOGIA	132
5.11.1. MATERIAL	132
5.11.2. REACTIVOS	132
5.11.3. MATERIAL BIOLÓGICO	132
5.11.4. BOTIQUIN	133
5.11.5. REGISTRO DE RESULTADOS	135
5.11.6. INTERPRETACION DE RESULTADOS	147
CONCLUSIONES	150
BIBLIOGRAFIA	152

INTRODUCCION

INTRODUCCIÓN

La administración de extractos alérgicos en la inmunoterapia de enfermedades alérgicas, fue 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 conocimientos escasos que se tenían sobre su naturaleza y características antigénicas, así como los mecanismos sobre los cuales actúan y su capacidad para inducir otras patologías^{53, 68}.

La mayor parte de los extractos alérgicos son mezclas complejas de proteínas, carbohidratos, enzimas, pigmentos y otras sustancias, sólo pocas de éstas son las que funcionan como alérgenos. Además diferentes fabricantes pueden emplear métodos diversos, así como diferentes materiales de origen para producirlos, sin embargo, se etiquetan de igual forma⁵³.

La estandarización y caracterización de los extractos alérgicos se presenta como un tema de primordial resolución. A principios de siglo, Noon introdujo el primer sistema de estandarización relacionando peso/volumen. Posteriormente propuso el uso de las Unidades de Nitrógeno Proteico (PNU), sin embargo, no reflejaban actividad alérgica, sino su naturaleza química^{20, 68, 85}.

Debido a los avances recientes en el campo inmunológico, se han obtenido grandes logros sobre la estandarización de extractos alérgicos y se trata de conocer la verdadera actividad alérgica de los mismos. De ello han surgido las unidades biológicas (UB/ml Europa) y unidades alérgicas (UA/ml EUA), con las cuales se han obtenido un mayor significado clínico. Para comprobar esta actividad se han utilizado métodos *in vivo* (pruebas cutáneas: intradermorreacción, punción equivalente de histamina) e *in vitro* (degranulación de basófilos, IgE específica)^{20,53,85,95}.

La aplicación de extractos alérgicos estandarizados en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades alérgicas (rinitis, asma, dermatitis atópica) ha dado mejor resultado en la respuesta clínica cuantitativa, que los extractos no estandarizados²⁰, pues los primeros tienen como finalidad proveer resultados reales, reproducibles, sin variación entre lotes y fabricantes. Entonces, para tener un buen diagnóstico de alergia y un tratamiento seguro para pacientes es necesario que los extractos alérgicos utilizados tengan una potencia y composición consistente, lo cual se logra con la estandarización.

ANTECEDENTES
HISTORICOS

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Las reacciones alérgicas eran conocidas desde la antigüedad, el primer reporte de lo que hoy en día se conoce como anafilaxia fue en el año 2640 A.C. con la muerte de un faraón egipcio por piquete de abeja. En este período Hipócrates y Galeno describieron la alergia clásica a la leche con manifestaciones clínicas en la piel y aparato gastrointestinal. En el siglo I, Lucrecio hizo mención de reacciones con vómito y diarrea causadas por alimentos, lo que en la actualidad corresponde a una respuesta alérgica.

En siglos posteriores se reportaron aisladamente respuestas de esta naturaleza, sin embargo, en 1819 Bostock y Gimán describieron clínicamente la fiebre de heno (hoy rinitis alérgica). Aplicaron polen de toda clase de hierbas y plantas sobre la mucosa conjuntival y demostraron su eficacia para producir ataques de catarro. Años después John Ellioston sugirió la etiología del polen, la cual fue probada por Charles Harrison Blackley en 1859 con pólenes de pastos y cereales en 16 pacientes con fiebre de heno, esto fue el comienzo de las pruebas por inhalación y cutáneas²⁰.

Por otro lado, Erlich, Wright y Pasteur, buscaron métodos profilácticos por medio de la

vacunación para evitar algunas enfermedades infecciosas. Con el mismo fin en 1810 Von Behring descubrió el uso profiláctico del antisuero contra la toxina diftérica. En 1902 buscando otros sueros profilácticos Portier y Richet (premio Nobel en 1913 por este estudio), notaron una reacción inmediata semejante al choque (vómito, diarrea, convulsiones y en ocasiones hasta la muerte por paro respiratorio), en un perro sensible a la toxina de una anémona marina, denominaron a esta reacción nociva antifilaxia o anafilaxia (sin protección) para distinguirla de la profilaxia (con protección)^{71,79,85}. Arthus, en 1903 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 lesión⁷⁹. Un año más tarde, Smith confirmó la posibilidad de reproducir el fenómeno anafiláctico con productos carentes de toxicidad.

En 1906 Clements Von Piquet introdujo el término alergia (*allos*: otro y *ergos*: respuesta), cuando se refería a cualquier perjuicio²⁰ y 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^{20,71,72,79}. Una vez descrito el concepto

de alergia, se aplicó en la práctica diaria en los años siguientes. Park en 1908 citó dos casos semejantes entre 50,000 personas que habían recibido inyecciones de suero antidiftérico en Nueva York, los que murieron pocos minutos después con síntomas parecidos al choque anafiláctico agudo^{72,79}.

A su vez en 1907 Nicolle, Otto y Friedman, probaron en conejos que esta susceptibilidad podía transferirse de un animal a otro, mediante el suero sanguíneo. La fisiopatología de este fenómeno fue motivo de estudio de Aver y Lewis en 1910, quienes confirmaron que la congestión intestinal, los movimientos peristálticos, las hemorragias frecuentes en la parte inferior del diafragma y la distensión pulmonar producida por la contracción de los bronquiolos, se debían al choque anafiláctico.

En 1911 Cooke introdujo las pruebas cutáneas con alergenos proteicos para diagnóstico de las enfermedades alérgicas. En este mismo año Freeman y Noon contribuyeron al conocimiento de la hiposensibilización específica y de las polinosis, también introdujeron el primer sistema de estandarización de los alergenos (Unidades Noon), posteriormente obtuvieron un gran logro con el advenimiento de las Unidades de Nitrógeno Proteico (UNP)^{68,72}.

Widal en 1913 demostró que el asma y la urticaria son fenómenos del mismo orden anafiláctico

resultante de una sensibilización del enfermo a una sustancia.

Un paso decisivo en la comprensión del fenómeno alérgico se realizó en 1921 cuando Pruznitz y Kustner descubrieron que algún elemento del suero a lo que llamaron reagina, podía transferir la inmunidad o la alergia de un individuo a otro en forma transitoria y momentánea. 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 alergeno en el mismo sitio donde se había inyectado el suero del donador, producía inmediatamente eritema y edema^{53, 72, 79, 85}.

En 1923 Coca y Cooke introdujeron el término de atopia (*atopos*: no común) para describir las características clínicas de hipersensibilidad tipo I que incluyen: Asma, eccema (dermatitis atópica), (rinitis alérgica) y urticaria en personas con historia familiar de trastornos similares y que muestran positividad a las reacciones cutáneas inmediatas⁷¹.

Posteriormente en 1925, el mismo Coca junto con Grove, trabajaron con el factor sensibilizante cutáneo contenido en el suero de pacientes sensibles a la ambrosía, acuñando el término de reagina atópica, que posteriormente por múltiples estudios se demostró que era diferente a la IgM o IgG.

Durante cierto tiempo se pensó que podrían pertenecer a la clase IgA, pero dos hechos demostraron que no era así; el primero, el suero de pacientes alérgicos al polen no contenía cantidades significativamente altas de IgA en relación con la población normal y por otra parte carecía de poder de sensibilización cutánea. Ante estos hechos se hipotetizó que la reagina pertenecía a una nueva clase de inmunoglobulina.

Dale en 1929 propuso que en el shock anafiláctico, la reacción antígeno-anticuerpo originaba la liberación de histamina de los tejidos en donde tenía lugar tal evento⁵³.

En 1932 Feldberg, Bartosh y Ángel, aislaron la histamina de una perfusión pulmonar proveniente de un animal sensibilizado⁷⁹.

Hasta la década de los 50's, se contempló la descripción clínica y alergológica, sin embargo con los estudios de Sanger en 1956 se inició la era de la inmunología y correspondió a Teruko Ishizaka y Kimishige Ishizaka en 1967 (EUA), Johojanson y Benich en 1968 (Suecia), aislar e identificar el anticuerpo responsable de la anafilaxia; la IgE^{71,79,85}.

En 1965 Lowel y Franklin dieron a conocer la eficacia y especificidad de la inmunoterapia con ambrosia²⁰.

1969 fue un año crucial para la inmunología clínica ya que Gell y Coombs propusieron la clasificación (ahora clásica) de las enfermedades por hipersensibilidad inmunológica en cuatro categorías; en las que las mediadas por IgE, fueron agrupadas en la hipersensibilidad tipo I o anafiláctica.

En 1968, Wide, Bennich y Johanson desarrollaron la prueba de radioalergoabsorbancia (RAST) que fue la primera técnica para medir la IgE total y la IgE específica *in vitro*.

La especificidad de la inmunoterapia fue demostrada en 1978 por Norman y Lichtenstein²⁰.

Actualmente por acuerdo general, a las sustancias causantes de enfermedad atópica que estimulan la producción de la IgE, se les conoce como alergenos.

CAPITULO I

1. 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.

La hipersensibilidad es la manifestación debida a la interacción de un antígeno, exógeno o endógeno con anticuerpos o linfocitos T específicos. Esta respuesta inmunológica se produce en forma exagerada, poniéndose de manifiesto al segundo contacto o posteriores con el antígeno que la provoca, originando fenómenos inflamatorios y lesiones tisulares.

Gell y Coombs (1969) clasificaron los mecanismos de las lesiones inmunológicas en cuatro tipos distintos de reacción, lo que permitió comprender mejor la inmunopatogénesis de estas enfermedades^{41,71,79,85}.

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

* Tipo II: Hipersensibilidad citotóxica o citolítica, mediada por anticuerpos 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, opsonización por anticuerpos o complemento.

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

* Tipo IV: Hipersensibilidad tardía o celular mediada por linfocitos T sensibilizados por antígenos o haptenos, donde éstos liberan linfocinas después de un contacto secundario con él mismo. Las linfocinas inducen reacciones inflamatorias, activan y atraen a los macrófagos que liberan mediadores^{71,79}.

Esta se puede presentar en cuatro formas:

- a) Reacción de Jones Mote.
- b) Dermatitis de contacto.
- c) Reacción tuberculínica.
- d) Reacción granulomatosa.

1.1. HIPERSENSIBILIDAD INMEDIATA (TIPO I)

La hipersensibilidad inmediata se inicia con una dosis sensibilizante de alérgeno inhalado, ingerido

o inyectado, induciendo la producción de anticuerpos IgE séricos circulantes, los cuales se unen a las células cebadas mediante sus receptores para Fc al contacto con los mismos (alergenos: polínicos, fúngicos, ácaros, fármacos, y alimentos), al entrar en contacto con dosis subsecuentes de alergenos, éstos forman un enlace cruzado con los componentes Fab de moléculas de IgE adyacentes en la superficie de mastocitos y basófilos. La subsiguiente aproximación de los respectivos receptores para el Fc de la IgE estimulan una serie de procesos de membrana y citoplasmáticos que culminan con la degranulación y la liberación de mediadores. Produciendo así una reacción inflamatoria aguda con síntomas alérgicos como la rinitis y el asma. Su manifestación depende del órgano de choque⁷¹.

La interacción IgE-alergeno produce modificaciones en la membrana celular, que facilitan el transporte de Ca^{++} , en el interior de mastocitos y basófilos haciendo que una porterasa se transforme en esterasa. Esta última estimula la liberación de histamina por exocitosis de los gránulos. El influjo de iones Ca^{++} es lo que lleva a la activación de la fosfolipasa C, que al actuar sobre el ácido araquidónico liberado de los lípidos de membrana da lugar a la síntesis de los mediadores de *novo*. En este proceso participa el AMPc; Cuando hay

liberación de histamina, en los mastocitos disminuye el AMPc y aumenta el GMPc, lo cual está siempre en equilibrio para el mantenimiento de los controles homeostáticos de la activación celular, regulado a su vez por el sistema nervioso simpático y parasimpático.

Los anticuerpos pueden ser univalentes. Los haptenos monovalentes no desencadenan el fenómeno. Después de la liberación de los mediadores químicos las células degranuladas no mueren, se recuperan, lo que significa una diferencia fundamental con las reacciones citotóxicas inducidas por otros tipos de anticuerpos.

La intensidad de respuesta depende en gran parte de la vía utilizada para desencadenarlo. Por las vías, subcutánea e intramuscular, la respuesta es más rápida, mientras que en las vías respiratorias es más lenta.

1.1.1. MEDIADORES QUÍMICOS Y REGULADORES

Los mediadores químicos se liberan en la respuesta alérgica y se dividen en preformados o primarios y neoformados o sintetizados durante el proceso^{47, 53, 84}.

PREFORMADOS

Son liberados después de la interacción IgE-alergeno en los primeros minutos dando origen a la reacción inmediata, siendo responsables de la reacción alérgica clásica, como son: Histamina, heparina, enzimas, factor quimiotáctico de eosinófilos de la anafilaxia (FQE-A) y factor quimiotáctico de neutrófilos de la anafilaxia (FQN-A)^{47,53}.

✓ Histamina

Es un producto resultante de la decarboxilación de la histidina, que produce contracción del músculo liso, vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar. Es liberada de 5min a 4h después de la exposición al alergeno.

Existen subclases definidas de receptores para histamina. El H₁ (Ashy Shilo 1966) y el H₂ (Black y cols. 1972).

El primer tipo se encuentra en piel; mucosa nasal, intestinal y bronquial, actúa sobre el músculo liso y los vasos⁵³. Es bloqueado selectivamente por antihistamínicos como epinefrina, terfenadrina, astemizol, cetiriazina y otros⁴⁷.

El receptor H₂ se localiza en mucosa gástrica, participa en los fenómenos que aumentan la

frecuencia cardiaca y la secreción gástrica. Es bloqueada por cimetidina y ranitidina entre otros.

En el organismo la histamina es rápidamente inactivada por oxidación, mecanismo en el que participa la histaminasa. La metilación también la inactiva⁴⁷.

Efectos como la broncoconstricción y la contracción del intestino estan 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 esta mediada por ambos.

✓ Heparina

La heparina y la histamina se encuentran combinadas a un complejo proteico⁵³.

La propiedad altamente ácida de la heparina, junto a su capacidad hidrofóbica le confiere la propiedad de inactivar otros mediadores preformados almacenados y de agruparlos de una forma ordenada. Cuando se ponen en contacto con el medio extracelular, triptasa y sus carboxipeptidasas correspondientes permanecen íntimamente asociadas a la heparina en la superficie de mastocitos, mientras la histamina se libera rápidamente de la matriz granular.

Otras funciones biológicas son⁵³:

- * Anticoagulante; inhibiendo la trombina y factor XII.
- * Inhibe la fibrinólisis.
- * Modula la actividad de proteasas de mastocitos y de otras proteasas (quimasa, triptasa, elastasa granulocitaria, fosfolipasa A₁).
- * Estimula la migración de células endoteliales.
- * Inhibe la citotoxicidad de eosinófilos, así como sus proteínas catiónicas.

✓ Factores quimiotácticos

Estos factores estimulan la migración directa de células desde una zona de baja concentración del mediador a otra de elevada concentración⁵³. Son los que estimulan preferentemente el influjo de neutrófilos y eosinófilos a la zona inflamatoria. Después de una respuesta inmediata, con frecuencia aparece un segundo episodio de inflamación que empieza de 3-6h después de la exposición, que es más prolongado y se asocia al influjo de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y eosinófilos, predominando en las reacciones alérgicas más crónicas, como el asma, dermatitis atópica y la urticaria.

Los factores quimiotácticos también activan los leucocitos, intensificando la expresión de receptores celulares específicos de superficie, como

el C3b y los receptores para el Fc de la IgG, reduciendo así el umbral al que estas células responderán a otros estímulos inductores de la secreción de mediadores preformados y de nueva síntesis.

Los factores que ejercen una acción quimiotáctica sobre eosinófilos (FQE-A) son de bajo peso molecular y en neutrófilos (FQN-A) de alto peso molecular. Los eosinófilos reclutados ejercen: acción fagocítica sobre los complejos IgE-alergeno, regulación a través de la arilsulfatasa liberada por éstos, que inactiva leucotrienos, histaminasa que inactiva histamina, e induciendo un aumento de receptores para C3b en los eosinófilos.

✓ Enzimas

Las proteasas neutras liberadas son similares a la tripsina, y quimiotripsina; actúan sobre las proteínas plasmáticas generando quininas vasoactivas. Su liberación comienza 30min después del reto, y el pico más alto se alcanza 6h después.

NEOFORMADOS

Estos se sintetizan a partir de las membranas celulares de mastocitos y basófilos de 6-8 horas y en algunos casos de uno a dos días después de la fase inmediata⁴⁷.

✓ Derivados del ácido araquidónico

El ácido araquidónico es un ácido graso no saturado. En presencia de fosfolipasa A₂ y Ca⁺⁺ se libera y puede ser metabolizado a través de dos vías, la de la lipooxigenasa, que origina leucotrienos, y la de la ciclooxigenasa que origina prostaglandinas y tromboxanos.

* Leucotrienos

Cuando el ácido araquidónico es metabolizado a través de la 5-lipooxigenasa, se origina el ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico (5-HPETE), producto inestable que por reducción da el ácido 5-hidroxeicosatetraenoico (5-HETE), o convertirlo por acción de una dehidrasa en leucotrieno A₄ (LTA₄). Por acción de epoxidohidrolasa, el LTA₄ se convierte en leucotrieno B (LTB₄); Y a su vez el LTA₄ por acción de la glutathion-S-transferasa se convierte en leucotrieno C₄ (LTC₄). Por acción de γ -glutamyl transpeptidasa, el LTC₄ libera ácido glutámico y origina el cistenil-glicil-leucotrieno LTD₄. Este leucotrieno puede ser escindido por varias peptidasas liberando glicina y originando el cistenil-leucotrieno LTE₄. De los productos originados, el LTB₄ constituye uno de los quimiotácticos de neutrófilos más potentes que se conoce; en tanto que LTC₄, LTD₄ y LTE₄ inducen una

acentuada contractura de la musculatura lisa, en especial del tejido pulmonar, su efecto es 100 (LTC₄) y 1,000 (LTD₄) veces superior al de la histamina.

El LTC₄ alcanza su pico más alto de 2-4h después del contacto con el alergen. Los leucotrienos, aplicados vía intradérmica inducen un eritema caliente con roncha, y la reacción persiste por arriba de 4h, con centro pálido característico, causada por constricción arteriolar. El LTB₄ aplicado por vía intradérmica induce una roncha transitoria o pasajera seguida de una reacción de fase tardía, que da lugar a un influjo de PMN y un poco de depósito de fibrina. Hay mínimas concentraciones de LTB₄ en el organismo y su pico más alto se alcanza 5-6h después del reto.

A partir de la 15-lipooxigenasa se origina el 15-HETE, que se encuentra principalmente en eosinófilos, células endoteliales y células epiteliales.

* Prostaglandinas y tromboxanos

Los tromboxanos son compuestos no prostaglandínicos derivados del ácido protanoico. Algunos de éstos tienen vida media muy corta, la PGI₂ o prostaciclina (5min. a 37°C); El tromboxano A₂ (TXA₂) que produce agregación de plaquetas y vasoconstricción es inestable, tiene una vida media

inferior al minuto y se transforma en TXB_2 más estable pero menos activo.

En la anafilaxia, los mastocitos producen grandes cantidades de PGD_2 broncoconstrictora. La PGE_2 puede inhibir la degranulación del mastocito, es un relajador muscular e inhibidor de la liberación de mediadores químicos. Parecería que más que mediadores químicos algunos de ellos fueran potenciadores de la acción de la histamina. Teniendo en cuenta que hay prostaglandinas con acción antagónica (PGD_2 vasoconstrictora; PGE_2 vasodilatadora), hay quienes suponen que podrían jugar un papel muy importante como reguladores. La prostaglandina PGI_2 , por su actividad desagregante de plaquetas, y los tromboxanos TXA_2 y TXB_2 , favorecedores de la agregación plaquetaria, podrían ser reguladores homeostáticos de la coagulación sanguínea.

La liberación del tromboxano B_2 y la PGD_2 , comienza 30min después del reto, y el pico más alto se alcanza 6h después¹⁹. La PGD_2 inyectada causa edema y dilatación de vasos con una subsecuente infiltración de neutrófilos comenzando 2h después del reto y dura por las siguientes 4h.

✓ Factor de agregación plaquetaria (PAF)

Es uno de los mediadores de la anafilaxia activa. Además de generar la agregación de plaquetas, es un potente vasoconstrictor. Es producido por eosinófilos estimulados, plaquetas, neutrófilos, macrófagos, monocitos, basófilos y células endoteliales³³.

La aplicación vía intradérmica de éste tiene ambos efectos, respuesta aguda y retardada, con roncha que desaparece de 30-60min y es seguida por una reacción de fase tardía (RFT) que persiste por varias horas, es rápidamente metabolizado *in vivo* por fluidos de fase y fosfolipasas asociadas a células. Es el mediador eosinofilotáctico más potente, de la inflamación¹⁹.

✓ Citocinas

Son glucoproteínas sintetizadas y secretadas por varias células, se unen a receptores específicos regulando la inflamación alérgica a través de la activación, proliferación, diferenciación, adhesión celular y como mediadores de la liberación.

En el siguiente cuadro se muestran los efectos y células que liberan las citocinas en la hipersensibilidad tipo I:

Citocinas	Efecto	Fuentes
IL-1	Activación de linfocitos T, estimulación de macrófagos	Linfocitos B, macrófagos, fibroblastos, células epiteliales
IL-2	Reduce la activación de Th ₁ , incremento en la producción de Th ₂ , activación de linfocitos citotóxicos y macrófagos	Linf. Th ₁
IL-3	Crecimiento y activación de eosinófilos, crecimiento de basófilos	Linf. Th ₁ y Th ₂ , eosinófilos
IL-4	Regulación y síntesis de IgE, sobre-regulación de VCAM-1, crecimiento de basófilos, activa, amplifica y mantiene la respuesta alérgica por células Th ₂	Linf. Th ₂ , mastocitos
IL-5	Crecimiento, quimiotaxis y activación de eosinófilos	Linf. Th ₂ , eosinófilos
IL-6	Diferenciación de células B, síntesis de IgE	Linf. Th ₂ , linfocitos B, macrófagos, fibroblastos, eosinófilos
IL-7	Diferenciación temprana de células B	
IL-8	Quimiotaxis de neutrófilos y células T	Linf. T, Neutrófilos, macrófagos, células epiteliales
IL-10	Crecimiento de mastocitos, bajo-regulación de células Th ₁ , inhibición de síntesis de citocinas.	Linfocitos T
IL-13	Efectos similares a IL-4	Linf. Th ₂

Citocinas	Efecto	Fuentes
GM-CSF	Crecimiento y activación de eosinófilos	Linf. Th ₁ y Th ₂ , eosinófilos, macrófagos
TNF- α	Sobre-regulación de moléculas de adhesión de células endoteliales, activación de macrófagos	Linfocitos T, macrófagos, mastocitos
IFN- γ	Antagoniza muchas acciones de IL-4, activación de eosinófilos y macrófagos	Linfocitos Th ₁

✓ Neuromediadores

La piel tiene fibras nerviosas, la mayoría son ramificaciones periféricas de neuronas primarias sensoriales involucrando reflejos axonales en las arborizaciones terminales de las fibras-C que contienen sustancia P, neuroquinina A, y calcitocina. La sustancia-P libera histamina de los mastocitos de la piel y produce una roncha. La neuroquinina-A induce una roncha y es menos potente que la sustancia-P, la calcitonina induce la roncha y es menos potente que la sustancia-P, también induce vasodilatación intensa, la cual persiste por varias horas y esta asociada con el infiltrado de leucocitos, ésta es una respuesta que no se ve con la sustancia-P. La posibilidad de que la histamina y los mastocitos jueguen un papel inflamatorio neurogénico en la piel, está todavía en estudio¹⁹.

* Bradicinina

Es un neuropéptido compuesto por aminoácidos de tipo L. Existe como precursor en forma de bradixininógeno y es liberado como bradixinina activa cuando los anticuerpos fijos reaccionan con sus correspondientes antígenos. Es muy activa, y provoca marcada contracción de la musculatura lisa, vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar. Es destruida por peptidasas, y cininasas.

1.1.2. FACTORES PREDISPONENTES

El desarrollo de una respuesta de hipersensibilidad inmediata, depende de la conjugación de diversos factores; desencadenantes (Alergenos) y predisponentes tales como:

- * Predisposición genética; se presenta en un 15-20% de la población general. Esta característica se hereda de manera poligénica (no mendeliana), siendo la probabilidad de expresión:
 - * 80% cuando ambos padres son atópicos
 - * 50% si sólo uno lo es
 - * 25-35% con un hermano alérgico
 - * 5-15% ninguno de los padres es alérgico

El parámetro mejor estudiado para predecir la posible aparición de enfermedad alérgica es la cifra de IgE en sangre del cordón umbilical, por medio del

cual se ha detectado que el riesgo de padecer alergia es 5-10 veces mayor en aquellos niños cuyo nivel de IgE sea superior al de la media prevista normal, que cuando es inferior siendo aún más grande cuando existen antecedentes alérgicos en los progenitores.

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 dominante.

b) Respuesta inmunitaria ligada al HLA.

c) Capacidad de respuesta general aumentada.

Otros factores involucrados son:

- * Permeabilidad de las mucosas.
- * Edad, sexo, raza.
- * Infecciones virales.
- * Intensidad, duración y frecuencia de exposición a factores ambientales.
- * Naturaleza y cantidad del alérgeno.

Factores ambientales: Se ha calculado que se tiene contacto anualmente con $1\mu\text{g}$ de polen, sin embargo los síntomas aparecen sólo 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 virales en tracto respiratorio alto, la disminución de la actividad supresora o la deficiencia transitoria de la IgA.

Las infecciones virales exacerban los síntomas alérgicos, probablemente se deba a que algunos virus como el Herpes simple, aumenta la liberación de histamina por los basófilos. Además, pueden facilitar la entrada de alérgenos a través de las superficies epiteliales dañadas e incrementar la respuesta de los órganos de choque a la histamina^{71,85}.

1.1.3. CÉLULAS INVOLUCRADAS

La identificación de receptores químicamente distintos de baja afinidad para la IgE en la superficie de eosinófilos, macrófagos, monocitos, basófilos y plaquetas nos ha permitido considerar a estas células como efectoras primarias en la respuesta alérgica. La capacidad de éstas, así como de mastocitos y basófilos activados, para secretar mediadores ha ampliado el concepto de reacción de hipersensibilidad inmediata al de una inflamación más crónica, angiogénesis y reparación histica⁵³.

✓ Fagocitos mononucleares

Los macrófagos actúan como células accesorias a los linfocitos en inmunidad específica, liberando mediadores pro-inflamatorios (IL-1, TNF, PAF, compuestos de complemento, leucotrienos). En su superficie tiene receptores para IgE, IgG, moléculas MHC clase II, entre otros.

Sus lisosomas contienen: proteinasas, glicosidasas, fosfatasas, sulfatasas, colesterol, esterases, triglicérido lipasas.

Su función es la de atrapar, ingerir y destruir antígenos alergénicos. Posteriormente presenta el alérgeno a linfocitos T en asociación con la MHC clase II en la superficie del fagocito.

✓ Linfocitos

La función más importante del linfocito es reconocer péptidos pequeños por medio de su receptor de antígeno, pues no pueden unirse al antígeno directamente sino por medio de la célula presentadora.

Expresan en superficie receptores y marcadores celulares.

En cuanto los linfocitos T reconocen al antígeno, liberan:

- * Citocinas pro-inflamatorias: IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , TNF- β , IL-3, IL-4, IL-5, IL-8.

- * Citocinas que causan diferenciación y proliferación de linfocitos: IL-2, IL-4 por linfocitos T; IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 por linfocitos B.

Los linfocitos B secretan inmunoglobulinas y son los responsables de la respuesta aumentada de IgE característica en la atopia. Cada célula B secreta un anticuerpo de estructura uniforme y específica.

✓ Eosinófilos

Los eosinófilos presentan receptores para IgE, IgA, IgG, factores de crecimiento y componentes de complemento en superficie.

Su función especializada es la de regular el proceso inflamatorio.

Los eosinófilos liberan: una fosfolipasa D que degrada al PAF liberado por los neutrófilos y una histaminasa que degrada la histamina liberada por los basófilos, proteínas catiónicas con efectos destructivos potentes que conducen a la necrosis tisular.

- * MBP (proteína básica mayor), ECP (proteína catiónica eosinofílica), NDE (neurotoxina derivada de eosinófilo); Las cuales producen separación de la célula epitelial, exocitosis, daño nervioso y daño radical libre.

* EPO (peroxidasa eosinofílica), LTC₄;
Broncoconstricción, secreción de glándulas,
vasodilatación, permeabilidad vascular.

Los eosinófilos son células móviles y responden a estímulos de quimiocinesis y quimiotáxis. Cuando son activados por histamina, PAF, IL-5, IL-3, GM-CSF, TNF y sustancia P hay un incremento en: la producción de LTC₄ y metabolitos tóxicos de radicales libres, degranulación, expresión de receptores Fc.

✓ Células cebadas:

a) Basófilos:

Los basófilos se asemejan en muchos aspectos a las células mastoideas. Sus gránulos son la fuente principal de histamina basal plasmática.

Los basófilos migran por quimiotáxis, bajo la influencia de estímulos químicos liberados por el tejido dañado.

b) Mastocitos:

Existen al menos dos subpoblaciones de mastocitos: los de las mucosas (MMC), y los del tejido conjuntivo (CTMC), que están asociados con nervios, vasos sanguíneos y tumores. Las MMC se asocian con infecciones por helmintos parásitos y posiblemente, con reacciones alérgicas. Con respecto a las CTMC, las MMC son más pequeñas, de vida más

corta, dependientes de las células T y tienen más receptores para Fc de superficie e IgE intracitoplásmica.

Los mastocitos liberan IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 y TNF, los cuales son responsables de la iniciación de inflamación crónica.

1.1.4. INMUNOGLOBULINA E

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; éstas son glucoproteínas compuestas de 82-96% de polipéptidos y de 4-18% de carbohidratos, el componente polipeptídico posee casi todas las propiedades biológicas. La IgE es el anticuerpo primario involucrado en la iniciación de respuestas alérgicas inmediatas y tiene un peso molecular de aprox. 190,000d comprende sólo el 0.004% del total de las inmunoglobulinas séricas. Se subdivide en dos regiones funcionales; la región Fc la cual se liga las células cebadas y la Fab que es responsable de la interacción con el alérgeno. Tiene dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, cada una con regiones variables y constantes organizadas en dominios globulares, las cuales están estabilizadas por uno o

más uniones bisulfuro intra-cadena. El peso molecular más alto de la cadena pesada es de 72,500d 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 de 16 semanas, 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 cantidades⁸⁵.

Hay dos tipos de receptores de superficie específicos para la interacción con la región Fc de la IgE.

Mastocitos y basófilos tienen el receptor de alta afinidad Fc₁R1, el cuál los sensibiliza para que se degranulen y liberen histamina, citocinas, leucotrienos, tromboxanos y prostaglandinas.

Las células inflamatorias (macrófagos, eosinófilos, plaquetas, linfocitos T y B, células de Langerhans, células dendríticas) tienen receptor de baja afinidad Fc₂R2 y esta implicado en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Este receptor induce el crecimiento y la diferenciación de células B, actúa como cofactor

para la IL-4 induciendo un cambio en la cadena pesada para la expresión de IgE.

La reexposición a un antígeno provoca generalmente la aparición de anticuerpos de la clase IgG, sin embargo la reexposición a alérgenos, provoca en individuos atópicos reacciones de tipo I. No activa el complemento, ni atraviesa barrera placentaria, su concentración varía con la edad y es del orden de 0.0003mg/ml.

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.

✓ Regulación de la síntesis de IgE

Las clonas de células Th₁ y Th₂ de la subpoblación CD₄⁺ poseen diferentes propiedades en cuanto a la producción de citocinas que les permiten regular la síntesis de IgE en humanos. Las células Th₁ producen TNF- β , IFN- γ , e IL-2; las células Th₂ producen IL-4, IL-5. Ambas secretan IL-3, IL-6, IL-10, TNF- α , y GM-CSF.

En pacientes atópicos se ha demostrado que la producción de IL-4 e IL-5 se incrementa en contraste con la disminución de IFN- γ e IL-2 en ellos, así mismo se ha demostrado que la elevada y constante

producción de IgE en pacientes con alergias esta regulada por la IL-4, IL-3 e IL-5 con un efecto antagónico del IFN- γ .

✓ 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 20KU/L, mientras que los pacientes alérgicos presentan generalmente valores muy elevados.

La sensibilidad varía con la edad; el 22% de los niños menores de 5 años tienen pruebas cutáneas positivas a aeroalergenos, el porcentaje se incrementa a un 44% entre las edades de 5-13 años, y el punto más alto de sensibilidad se alcanza a las edades de entre 20-45 años⁴¹. En otro estudio se encontró que la concentración de IgE en niños atópicos es de 45 veces mayor que los no atópicos⁸⁵.

La diferencia entre pacientes 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.

En resumen, la determinación de IgE es de mucho valor en el diagnóstico de pacientes con varios síntomas clínicos de enfermedades atópicas^{75,85}.

VALORES NORMALES DE IgE TOTAL⁸⁵

EDAD	UI/mL
0 días	0.22 - 0.53
6 semanas	0.69 - 2.05
6 meses	2.68 - 6.60
12 meses	3.49 - 7.29
2 años	3.03 - 9.46
3 años	1.80 - 5.51
4 años	8.58 - 24.31
7 años	12.59 - 45.60
10 años	23.66 - 116.00
14 años	20.07 - 62.58
adultos	50.00 - 150.00

Cabe mencionar que existe una serie de patologías en las que hay un aumento en la concentración de IgE total en suero sin tener ninguna relación con atopia o fenómenos alérgicos, tal es el caso de:

- * Inmunodeficiencias: Síndrome de Wiskott-Aldrich, síndrome de hiper IgE, síndrome de Di George, síndrome de Nezelof, etc.

- * Neoplasias: Mieloma de IgE, enfermedad de Hodgkin.
- * Varios: Fibrosis quística, dermatitis de contacto.

CAPITULO II

2. ENFERMEDADES ALÉRGICAS

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

2.1. ATOPIA

Coca y Cooke en 1923 proponen el término de atopia y asientan que la sensibilización no es pasivamente transferible ni tampoco análoga a la anafilaxis en animales de experimentación, sino un estado anormal de hipersensibilidad determinado genéticamente. También dicen que la tendencia es del 10-15% en la población susceptible a las enfermedades alérgicas⁶².

Es caracterizada por un incremento en la producción de anticuerpos IgE y una alta incidencia de rinitis, asma, dermatitis atópica, urticaria y alergia a los alimentos en comparación con la población normal. Las personas atópicas están predispuestas a desarrollar síntomas alérgicos después de la exposición a alérgenos domésticos^{41, 62, 71}. Esta hipersensibilidad implica un nivel elevado de anticuerpo sensibilizador

específico, y persiste a pesar de interrumpir la exposición al alérgeno, las respuestas de IgE normales frente a los alérgenos no duran más de algunas semanas después de desaparecer el estímulo; En cambio, es característico que la sensibilidad atópica dure años⁵³.

Coca y Cooke observaron una historia familiar de tales problemas y reacciones cutáneas positivas de pápula y eritema frente a alérgenos inhalados comunes. 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.

2.2. RINITIS ALÉRGICA

✓ Definición

Es una inflamación crónica de la mucosa nasal debida a la exposición a alérgenos del medio ambiente, la cual puede ser estacional o perenne, caracterizada por rinorrea hialina, obstrucción nasal, estornudos en salva y prurito nasal⁸⁴.

La rinitis alérgica es la más frecuente y no tiene relación con la edad, sexo o raza. Depende de

tres factores: predisponente (atopia), desencadenante (alergeno) y medio ambiente.

✓ Causa

1. Pólenes estacionales
2. Hongos
3. Ácaros del polvo casero principalmente: Dermatophagoides pteronyssinus y Dermatophagoides farinae.
4. Caspas y saliva de mascotas

✓ Clasificación

1. Rinitis alérgica estacional
2. Rinitis alérgica perenne

✓ Epidemiología

Es una enfermedad muy común, pues afecta aproximadamente al 15% de la población⁷¹, aun así se sabe muy poco de su epidemiología, puede deberse al hecho de que el diagnóstico se basa en el reconocimiento de síntomas complejos de severidad variable. Puede presentarse en cualquier etapa de la vida, pero tiene una mayor incidencia de los 15-25 años de edad.

El cambio en el comportamiento del paciente, el diagnóstico y métodos de investigación pueden

explicar mucho de la variación en la prevalencia de rinitis en poblaciones y en el tiempo.

✓ Patogenia

La rinitis alérgica estacional así como la perenne, se inicia por una sensibilización cuando alérgenos inhalables contactan el epitelio de la mucosa en la parte anterior de la cavidad nasal, donde se liberan componentes alérgénicos hidrosolubles dentro de la capa basal del moco. En respuesta al alérgeno, las células B maduras producen anticuerpos IgE específicos que se unen a receptores de mastocitos y basófilos. Una reexposición al alérgeno promueve un entrecruzamiento entre las IgE adyacentes causando que los mastocitos y eosinófilos liberen mediadores inflamatorios dando lugar a una reacción alérgica de fase temprana o inmediata (15min. a 2h. después de la exposición). Los pacientes pueden también experimentar una respuesta de fase tardía o retrasada (6-8h. después de la exposición) caracterizada por un influjo continuo de eosinófilos, basófilos, neutrófilos y células mononucleares en tejido nasal^{42,71,83}.

La liberación *in situ* de mediadores químicos provoca las manifestaciones fisiopatológicas: 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 (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, rinorrea 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 y el pliegue nasal transversal resultante del rascado crónico.

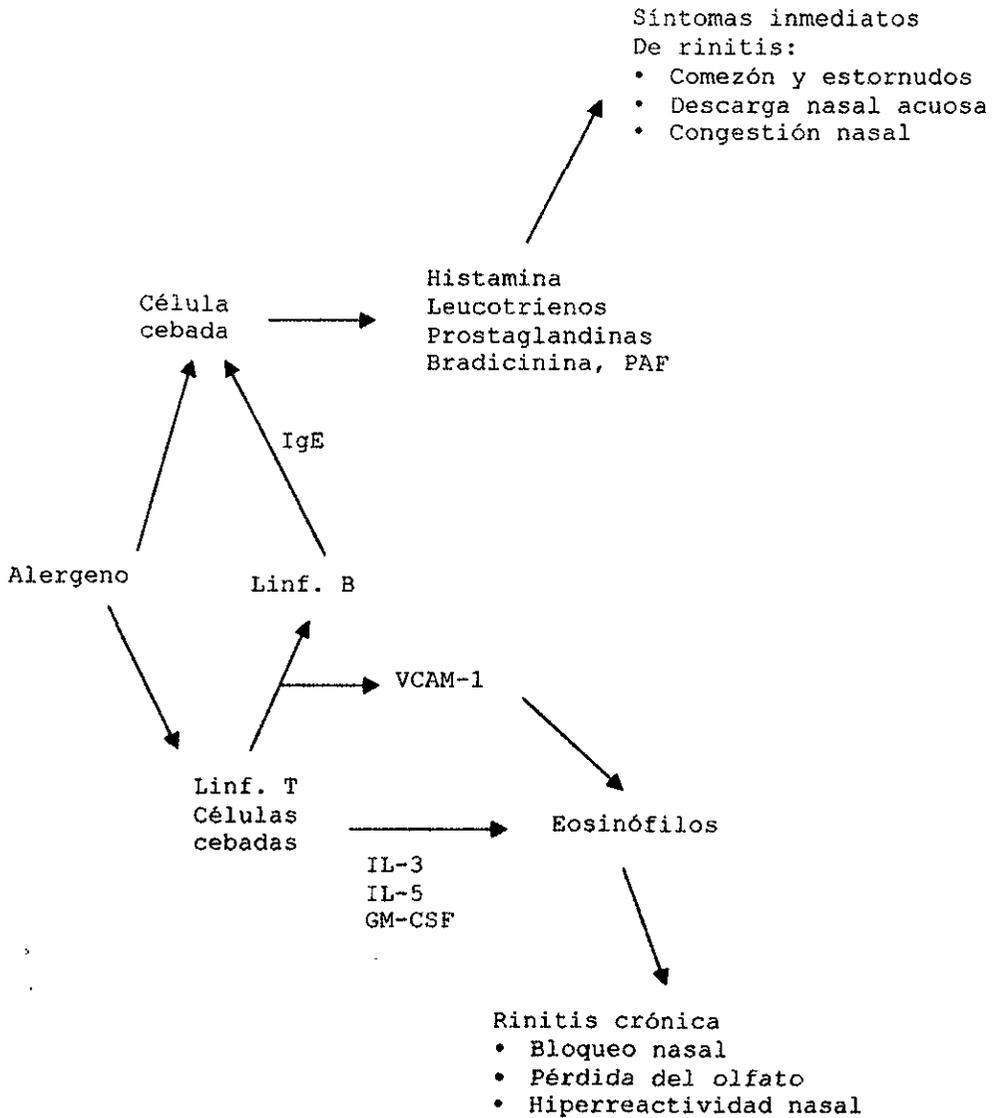
En pacientes con rinitis alérgica existe una elevada frecuencia de conjuntivitis. En la exploración física se observa la mucosa nasal pálida, azulada, húmeda y edematosa.

La rinitis alérgica puede estar asociada con otras enfermedades como infecciones virales o bacterianas del tracto respiratorio alto, o anomalías estructurales primarias relacionadas a pólipos nasales.

✓ Mecanismo

Los mediadores liberados pueden ser: preformados o derivados de gránulos (histamina y triptasa), y formados de novo o derivados de membrana (leucotrienos; LTB_4 , y LTC_4 , prostaglandinas; PGD_2). Un mediador derivado de lípidos es un factor activante de plaquetas (PAF). Las propiedades biológicas de estos mediadores incluyen vasodilatación y un incremento en la permeabilidad vascular, la cual puede causar bloqueo nasal. Un incremento en la secreción glandular da lugar a la rinorrea. Una estimulación de nervios aferentes pueden provocar comezón nasal y estornudos. Los nervios aferentes estimulados por mediadores, principalmente histamina, pueden también promover un reflejo axón el cual libera neuropéptidos (sustanciaP, bradicininas) las cuales tienen el potencial de provocar degranulación aumentada de células cebadas¹⁸.

Durham propone el siguiente mecanismo para la rinitis alérgica¹⁸:



✓ Diagnóstico

Para ser considerada como fenómeno clínico importante deben presentarse dos o más síntomas por más de 1h en varios días. Los síntomas incluyen: descarga nasal, bloqueo y estornudos, comezón nasal o ambos. La rinitis alérgica crónica puede dar lugar a la pérdida del olfato u otras complicaciones.

El estudio completo del paciente incluye:

1. Historia clínica y exploración física completa.
2. Biometría hemática completa, en donde se encuentra eosinofilia periférica mayor de 300.
3. Estudio coproparasitológico en serie de 3.
4. Citología de moco nasal, con eosinófilos mayor de 30%.
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 los siguientes tipos de rinitis; vasomotora o idiopática, infecciosa, medicamentosa, hormonal, ocupacional, así como: mastocitosis nasal, alteraciones anatómicas, poliposis nasal y cuerpos extraños.

✓ Tratamiento

1. Profiláctico; son medidas ambientales, las cuales consisten en evitar los agentes desencadenantes.
2. Medicamentos; profilácticos como el cromoglicato de sodio y ketotifeno, y sintomáticos como antihistamínicos, vasoconstrictores orales y esteroides tópicos.
3. Inmunoterapia; está indicada en pacientes con pruebas cutáneas positivas y consiste en la administración a concentraciones crecientes de alérgenos sensibilizantes para mejorar los síntomas producidos por estos alérgenos.

✓ Pronóstico

La rinitis alérgica es una enfermedad recurrente y crónica, sus síntomas dependen de la exposición al medio ambiente y la respuesta intrínseca del huésped, los síntomas fluctúan a través de la edad y se dice que de 3-10% de los niños con rinitis alérgica desarrollarán asma⁸⁴. Sin embargo, un tratamiento integral elimina los síntomas clínicos.

2.3. ASMA EXTRÍNSECO

✓ Definición

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 paroxísticos de disnea, tos productiva y sibilancias.

Estos síntomas están asociados con la atopia a alérgenos comunes del medio ambiente.

✓ Epidemiología

Es reconocido como un problema global serio de enfermedad. 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.

El 50% de los asmáticos son alérgicos⁷¹.

Estudios epidemiológicos sugieren que el asma está bajo diagnosticado, esto puede deberse a la naturaleza no específica de síntomas o el hecho de que los pacientes intentan tolerar estos síntomas.

✓ Patogenia

Los pacientes presentan con frecuencia una historia familiar de asma y atopia, tienen un número

incrementado de eosinófilos y mediadores en el esputo, IgE sérica elevada, y sensibilidad linfocitaria ante la supresión histamínica.

En la mayor parte de los individuos atópicos, se presentan alteraciones inmunológicas, fisiológicas, neuroendocrinas que provocan hiperreactividad bronquial, debido a la respuesta excesiva β -adrenérgica, colinérgica y α -adrenérgica.

El asma es un desorden inflamatorio de las vías aéreas caracterizado por infiltración celular al tejido, activación de células y alteraciones en la estructura de vías aéreas.

Los cambios estructurales incluyen:

- * Displasia epitelial con aumento de fragilidad epitelial asociada con hendimiento de células epiteliales ciliadas de la capa basal celular.
- * Deposición aumentada de colágeno debajo de la membrana verdadera.
- * Promoción de miofibroblastos.
- * Hiperplasia del músculo liso.

Estos cambios estructurales que contribuyen a repuestas bronquiales y obstrucción crónica de la corriente de aire, son provocados por exposición a un alérgeno al cual el paciente está sensibilizado.

Aproximadamente 90% de los individuos con asma, son atópicos; Frecuentemente reaccionan a los ácaros (D. pteronyssinus y D. farinae).

✓ Mecanismo

Un mecanismo propuesto para el asma extrínseco es el mismo que se ha propuesto para la rinitis alérgica, sólo que en esta enfermedad los mediadores de la inflamación generan:

- * Daño en epitelio.
- * Estimulación de nervios.
- * Hinchazón.
- * Secreción de moco.
- * Contracción del músculo liso de vías aéreas.

✓ 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. Pruebas de funcionamiento pulmonar.
7. Examen coproparasitológico en serie de 3.
8. Estudio radiológico de tórax y senos paranasales.
9. Exudado nasal y/o faríngeo.

Los síntomas deben incluir; falta de respiración episódicos, silbido de pecho, estornudos que se empeoran en la noche y en las primeras horas de la mañana.

El paciente puede tener una historia de exacerbaciones recurrentes que son provocadas por alérgenos, irritantes, ejercicio o agentes infecciosos.

✓ Diagnóstico diferencial

Tiene importancia fundamental diferenciar 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

Las exacerbaciones son tratadas tradicionalmente con corticoesteroides.

1. Profiláctico; son medidas ambientales, las cuales consisten en evitar los agentes desencadenantes.
2. Medicamentos; profilácticos como el cromoglicato de sodio y ketotiofeno, y sintomáticos como antihistamínicos, vasoconstrictores orales y esteroides tópicos.
3. Inmunoterapia; esta indicada en pacientes con pruebas cutáneas positivas y consiste en la administración a concentraciones crecientes de alérgenos sensibilizantes para mejorar los síntomas producidos por estos alérgenos.

4. Inhaloterapia.

2.4. DERMATITIS ATÓPICA (DA)

✓ Definición

Es una dermatosis eczematosas exudativa y eritematosa que puede presentarse en individuos con historia personal o familiar de atopia. Esta dermatitis es fundamentalmente una enfermedad de la infancia y la niñez, su prevalencia e intensidad disminuyen con la edad.

La dermatitis se clasifica generalmente como exógena, implicando una causa externa (dermatitis de contacto; alérgica, irritante, o fotosensible) o endógena, donde no hay causa externa evidente (dermatitis; atópica, seborreica, varicosa)³³.

A diferencia de la mayoría de las dermatosis, la DA no tiene una lesión cutánea fundamental, pero se identifica por un espectro de rasgo clínico.

✓ Epidemiología

Es una enfermedad frecuente en los lactantes y los niños. Es considerada como la tercer enfermedad de la tríada de enfermedades atópicas.

A pesar de que la prevalencia de la DA disminuye con la edad, el impacto socioeconómico de la

enfermedad puede ser considerable. Sulzberger calculó que este padecimiento es responsable de una tercera parte de las bajas del servicio militar por una enfermedad cutánea⁵³. También estimó que el 10-15% de las bajas por todas las enfermedades son causadas por enfermedad cutánea, y que la DA era responsable de hasta el 3-5% de estas bajas. Estas cifras concuerdan con la incidencia estimada de enfermedad cutánea en la población civil.

✓ Patogenia

Mientras otras manifestaciones atópicas como: asma, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica y alergia a alimentos, están relacionadas a mecanismos mediados por anticuerpos IgE; en esta enfermedad no se observa esto. Histológicamente en este padecimiento se presenta microvasicación en la epidermis y un infiltrado linfocítico en la dermis, sin degranulación de mastocitos o infiltración de eosinófilos.

Generalmente se encuentra asociada con asma y rinitis, aunque ocasionalmente se presenta sola o con rinitis alérgica. Los pacientes con DA severa generalizada tienen niveles de IgE más elevados que cualquier paciente con otra enfermedad atópica. Cuando hay niveles normales de IgE y pruebas

cutáneas negativas, los pacientes tienen afecciones mínimas en las partes flexoras³³.

La causa de la DA no esta muy clara aun, pero hay evidencia de que leucocitos mononucleares de pacientes con este padecimiento muestran un incremento en la actividad de la monofostato adenosin fosfodiesterasa, la cual esta asociada con niveles elevados de IL-4 y respuesta elevada de IgE.

Los infantes con esta enfermedad tienen lesiones eritematosas, predominantemente en mejillas, conforme el bebé crece, los sitios afectados se extienden a manos, cuello y pies. En el niño mayor las lesiones se observan en las zonas flexoras de brazos y piernas así como en la cara. En los adultos se tiene una distribución mas generalizada, comúnmente se observa en la parte superior del tronco, lesiones individuales que son eritematosas, escoriadas y frecuentemente liquenificadas en ocasiones con infección bacteriana secundaria.

Una proporción grande de pacientes con dermatitis atópica crónica tienen piel húmeda, la cual es frecuentemente hipersensible y pruriginosa.

La relación entre esta enfermedad y los ácaros del polvo casero es controversial, aproximadamente el 75% de los pacientes con DA severa producen concentraciones muy altas de IgE específica a ácaros principalmente D. pteronyssinus y D. farinae.

También en estos pacientes se puede producir una reacción de hipersensibilidad retardada³³.

✓ Diagnóstico

Debe haber tres o más características básicas;

- * Prurito; morfología y distribución típicas (liquenificación flexural o linealidad en adultos, afectación facial y de superficies de extensión en lactantes y niños)
- * Dermatitis crónica o recurrente.
- * Historia personal o familiar de atopia (AE, RA, DA).

También debe haber tres o más características menores:

- * Xerosis.
- * Ictiosis/hiperlinealidad palmar/queratosis pilosa
- * Reactividad inmediata (tipo I) en la prueba cutánea.
- * Elevación de la IgE sérica.
- * Aparición en edad temprana.
- * Tendencia a las infecciones cutáneas (por Staphylococcus aureus y herpes simple, verrugas vulgares, dermatitis seborreica por Pytirosporum ovale y tiñas), así como disminución de la inmunidad celular.

- * Tendencia a la dermatitis inespecífica de manos y pies, etc.

Lo más llamativo es el intenso prurito que obliga a rascarse durante el día y mientras se esta dormido. La mayor parte de las lesiones cutáneas son secundarias al rascado y excoiación consiguiente así como al roce crónico. Esto da lugar al engrosamiento epidérmico conocido como liquenificación, que se distribuye típicamente a lo largo de las superficies extensoras durante la infancia y se convierte en flexural en la niñez y en la edad adulta.

✓ Tratamiento

Generalmente comienza con el control de la piel húmeda, con uso de esteroides tópicos, y utilizar un emoliente después del baño es de mucha ayuda.

Los pacientes con este padecimiento deben evitar materiales que irriten la piel, lo cual incluye fibras sintéticas y lana; se propone algodón. También se les recomienda no enfrentarse a cambios ambientales y de humedad contrastantes, así como evitar la exposición a alergenios ambientales.

Los corticoesteroides sistémicos son benéficos en casos de DA crónica severa. Muchos dermatólogos proponen el uso adicional agentes antibacterianos tópicos.

El uso de antagonistas de los receptores H_1 de histamina es frecuente en estos padecimientos. Pero sólo son de beneficio para aquellos pacientes que tienen prurito en las noches.

CAPITULO III

3. ALERGENOS

Cualquier antígeno que puede inducir una respuesta inmunitaria es considerado como alérgeno potencial. Hay muchas sustancias químicas de origen natural y sintético que son alérgicas. Las sustancias orgánicas naturales complejas, pueden originar alergia mediada por anticuerpos, los compuestos orgánicos naturales simples y sustancias inorgánicas, ocasionan con mayor frecuencia alergia mediada por células T^{53,79}.

Son antígenos solubles que producen una respuesta alérgica mediada por anticuerpos IgE^{33,53,75}. La mayoría tiene peso molecular de entre 10-70KDa⁴¹.

Los antígenos menores de 10KDa son incapaces de unir los sitios Fab entre dos moléculas de IgE, excepto cuando están polimerizados. Los alérgenos con peso molecular mayor a 70KDa no penetran fácilmente la mucosa, pero pueden sensibilizar en concentraciones bajas⁷⁹.

La mayoría son proteínas o glucoproteínas solubles de tipo secuencial o conformacional capaces de provocar la formación de anticuerpos IgE (sensibilización). En ocasiones los polisacáridos o sustancias de bajo peso molecular como algunos fármacos, pueden ser alérgicos⁵³ Las personas

sensibilizadas que más tarde entran en contacto subsecuente con los mismos alergenos en niveles suficientes de exposición presentarán signos y síntomas producidos por mediadores inflamatorios que se liberan por interacción del alergeno con el anticuerpo IgE fijado a las células de tejidos sensibilizados^{53,75}.

En la nomenclatura, los alergenos son designados por las tres primeras letras del género (en cursiva), seguidas de un espacio; la primera letra de la especie (en cursiva) seguida por un espacio, y un número romano^{33,39,91}.

Las fuentes más complejas de alergenos son hongos, pólenes, ácaros y polvo doméstico. De las muchas proteínas contenidas en estas fuentes, el 20-60% son alérgicas³³.

Los pacientes sensibilizados no necesariamente reconocen los mismos alergenos, pero los que son más frecuentemente reconocidos son llamados "alergenos mayores" mientras que los otros no tan frecuentes son llamados "alergenos menores"³³.

Los factores que influyen la alérgenicidad son³³:

- * Habilidad de atravesar mecanismos de defensa física.
- * Complejidad molecular
- * Concentración

- * Solubilidad
- * Estabilidad
- * Características bioquímicas
- * Predisposición genética del individuo

3.1. CLASIFICACIÓN

De acuerdo a su frecuencia y vía de exposición se clasifican en^{33,79}:

1. INHALABLES o aeroalergenos; son todos aquellos que transportados por el aire (anemófilos), se ponen en contacto con la mucosa nasal y/o bronquial y conjuntival. Y pueden ser de origen:
 - a) Vegetal: pólenes, pochote, algodón.
 - b) Microbianos: hongos, ácaros, bacterias.
 - c) Animal: pelos, caspas, plumas, epitelios.
 - d) Diversos: polvo casero, fibras.
2. INGERIBLES; alimentos y medicamentos.
3. INYECTABLES; insectos y medicamentos.
4. CONTACTANTES; cosméticos, medicamentos y metales.

3.1.1. ÁCAROS

Existen más de 50,000 especies de ácaros⁷⁹, de las cuales sólo algunas parecen estar relacionadas

con la alergia. El género Dermatophagoides pertenece a la familia Pyroglyphide, la cual incluye 47 especies y 17 géneros, las especies más conocidas son: Dermatophagoides pteronyssinus, Dermatophagoides farinae, Dermatophagoides microcerans, y Euroglyphus mayney^{28,33,41,53,76}.

Los ácaros son microorganismos translúcidos que miden de 250-300 μ m de largo, tienen 8 patas peludas, no tienen ojos, no tienen antenas, tienen una boca en la parte frontal del cuerpo, las hembras fertilizadas ponen dos huevos por día, y esto lo hacen hasta que mueren (días a meses). Su ciclo de vida de 2-3½ meses. Su principal fuente alimenticia son escamas de piel, ya sea humanas o de animales. Pero también necesita de otros nutrientes, los cuales le son provistos por: bacterias, conidios y esporas de hongos, restos de cereales, alimento para animales, pescado, etc. Su temperatura de desarrollo es de 25°C, con humedad relativa del 75%. El factor más importante para que un ácaro sobreviva y se desarrolle es la cantidad de agua disponible^{28,41}.

Puesto que se desarrollan mejor a una humedad relativa del 75% y en temperaturas cálidas, se encuentran en grandes cantidades a finales de verano^{28,41,53,79}. Esto puede originar una cierta superposición de la alergia a los ácaros. Un estudio realizado en Holanda, donde todos los casos de

alergia al polvo doméstico se deben a los ácaros, sugiere que la severidad de ésta se asocia a la estación en la que el número de ácaros es máximo⁵³.

En 1928 Dekker comunicó algunas observaciones que llevaron a la conclusión de que los ácaros presentes en la ropa de cama eran la causa principal del asma en Alemania⁵³. Esto fue olvidado hasta que en 1960, Voorhorst dejó establecido que estos microorganismos son frecuentemente responsables de la rinitis y asma alérgica.

Los ácaros más importantes desde un punto de vista alérgico pertenecen al género Dermatophagoides, y las especies más conocidas son: Dermatophagoides pteronyssinus, Dermatophagoides farinae que se encuentran en las habitaciones en la mayor parte del mundo, especialmente en pijamas, tapicería, sábanas, alfombras y muñecos de peluche; D. Microceras y E. maynei también se pueden encontrar en las casas, pero parecen tener una menor importancia en la alergia^{28,33,65,73}.

Muchos alérgenos de ácaros son enzimas proteolíticas secretadas en las heces de éstos, la estructura de las partículas fecales de los ácaros esta cubierta por una membrana externa, la cual las mantiene intactas. Cada ácaro excreta aproximadamente 20 partículas por día y miden entre 10-35µm de diámetro^{28,33,65,73}.

Chapman y cols. en 1980 purificaron y caracterizaron los principales alérgenos, denominados como P1 (*Der p 1*) de 24KDa, AgX (*Der p II*), Ag23 para *D. pteronyssinus* y F1 (*Der f 1*) para *D. farinae*. Se ha demostrado que al menos uno de los cuatro alérgenos principales de *D. farinae*, comparte determinantes antigénicos con *D. pteronyssinus*^{27,53,85}.

Se han descrito 7 grupos de alérgenos de ácaros, 4 de estos tienen actividad enzimática^{39,81,91}:

El grupo I: *Der pI* y *Der fI* son cistein proteasas, son glucoproteínas solubles de 24KDa las cuales son lábiles al calor^{73,81,89}. Son estables a pH 4-10 y son resistentes a la tripsina. Se encuentran en la materia fecal y se relaciona con el intestino del ácaro, cada partícula fecal contiene 100pg de antígeno (Tovey y col. 1981)^{73,89}. Al menos 6 sitios antigénicos se han descrito para *Der pI* y *Der fI*, uno de los cuales muestra reactividad cruzada⁸⁹.

El grupo II: *Der pII* y *Der fII* son probablemente lisozimas⁸¹ fácilmente solubles de 14KDa y son más resistentes a la temperatura y el pH que los del grupo I, toleran pH de 2-12. Los antígenos de este grupo tienen una homología mayor al 90% y tienen reactividad cruzada muy fuerte entre sí. No parece estar relacionado al intestino de los ácaros^{73,81,89}.

El grupo III: *Der pIII* y *Der fIII* son tripsinas de 28-30KDa, son antigénicamente menores, pues sólo

un 16% de los pacientes alérgicos a ácaros tiene respuesta a este grupo (73,81).

El grupo IV: son amilasas de 60KDa.

El grupo V: son proteínas de 14KDa.

El grupo VI: son quimiotripsinas de 25KDa.

El grupo VII: son proteínas de 22-28KDa.

3.1.2. POLVO DOMÉSTICO

El polvo doméstico es la causa de rinitis y asma alérgicos en la mayoría de los pacientes alérgicos⁴¹. A principios de los años 20', Cooke, Kern, Storm Van Leeuwen y otros investigadores introdujeron el concepto de alergia al polvo doméstico y constituye un cuadro patológico diferenciado originado por alergenos únicos⁴¹. No se ha identificado ningún alergeno específico para el polvo doméstico, pues es una mezcla de alergenos de diversas procedencias, generalmente contiene: fibras de tapicería y ropa, partículas de arena, escamas humanas, restos de comida, restos de insectos, ácaros, caspas y pelos de animales domésticos, bacterias y hongos⁴¹, y por consiguiente, la reactividad de cada lote depende de la mezcla de alergenos presente en la fuente empleada. La reactividad cutánea de los extractos de polvo doméstico puede deberse al contenido alergénico o puede ser una reactividad inespecífica

a causa del contenido de endotoxinas, pues potencian la liberación de histamina por leucocitos periféricos de individuos alérgicos, entonces, es posible que la endotoxina pueda potenciar las reacciones cutáneas⁵³.

La inoculación de extractos de polvo doméstico, tal como se elaboran actualmente, puede no estar exenta de algún riesgo, ya que no se dispone de información sobre el contenido de detergentes, pesticidas y otros; tales como los de origen humano, que se pueden encontrar en el material a partir del cual se obtiene el extracto.

3.2. EXTRACTOS ALERGÉNICOS

Los extractos alérgicos son mezclas heterogéneas en que los alérgenos constituyen una pequeña porción, el resto se compone de diversas proteínas, incluyendo enzimas, otras sustancias nitrogenadas como aminos, glucoproteínas, carbohidratos y otras sustancias (pigmentos). Las sustancias alérgicamente activas solo proteínas o proteínas con componentes de carbohidratos, y por lo común sus pesos moleculares varían de 5,000 a 60,000 daltons, algunas son más inmunogénicas que otras. De los procesos de extracción depende la constitución

del extracto final⁶⁵. Los extractos alergénicos se extraen rápidamente de sus fuentes naturales en general en pocos minutos, pero raras ocasiones en más de algunas horas, si bien los tiempos de extracción por encima de las 14h. pueden aumentar la concentración de alérgenos y alterar la relación entre la concentración de los distintos alérgenos⁴⁸.

Los extractos alergénicos son inmunoestimulantes parenterales selectivos que reducen los síntomas alérgicos, son soluciones acuosas o glicerinadas preparados a partir de una amplia variedad de materia prima con actividad alérgica²⁰, e inducen la producción de anticuerpos IgE. Estos anticuerpos son homocitotrópicos y con frecuencia se encuentran en bajas concentraciones en el suero de los individuos alérgicos (ng-pg/ml). Los estudios de estos sueros han ayudado a definir la naturaleza de los alérgenos y han desempeñado un papel de gran importancia en la estandarización. En 1913, Dumber demostró que la inoculación de extractos alergénicos de polen podía reproducir síntomas de alergia y que la proteína es el componente activo⁵³. Posteriormente se han utilizado extractos para el diagnóstico mediante pruebas *in vivo* o *in vitro* para la inmunoterapia, éstos deben ser antigénicos e inocuos en los pacientes sensibilizados²⁰.

El método más directo para detectar la presencia de alérgenos en la mezcla de proteínas presente en

un extracto es una exposición *in vivo* de personas alérgicas mediante pruebas cutáneas o la liberación de histamina por los leucocitos de individuos alérgicos, sin embargo, actualmente se dispone de métodos de laboratorio excelentes que han producido rápidos avances en el reconocimiento de los alérgenos y su diferenciación de los antígenos en general. Los más utilizados son el RAST, una combinación de IEF, e inhibición del RAST, CRIE, y varios métodos de inmunodetección. La detección de alérgenos en mezclas de proteínas complejas, como los extractos, sin necesidad de aislamiento real hace posible la comparación y estandarización de extractos. También abre la posibilidad de reducir la concentración de moléculas no alérgicas en los extractos por fraccionamiento, por ejemplo, basándose en el peso molecular, ya que este tiende a estar dentro de márgenes restringidos. Si bien este procedimiento no proporciona necesariamente una mezcla pura de alérgenos, pero enriquece el contenido alérgénico de los extractos.

Los extractos alérgénicos estandarizados son generalmente más caros, pero más efectivos y más consistentes en potencia. Después de la extracción, la actividad alérgica de los extractos baja con el tiempo, muchos alérgenos son lábiles o son degradados por enzimas. Los factores que determinan la pérdida de actividad durante el almacenamiento

son: temperatura, dilución y mezcla con otros extractos alérgicos^{16,57,69}.

Para evitar que la potencia de los extractos baje, se adicionan:

- * Conservadores: Inhiben el crecimiento bacteriano y fúngico en los extractos alérgicos, los más utilizados son: fenol al 0.4%, timerosal y glicerina.
- * Adyuvantes: El hidróxido de aluminio y la emulsión agua-aceite se han utilizado con éxito.
- * Estabilizadores: La estabilidad de un extracto alérgico es crucial para el diagnóstico y tratamiento de las alergias. 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: glicerina al 50% y albúmina sérica humana al 0.03%^{16,20,57}. La liofilización incrementa también la estabilidad.
- * La albúmina sérica humana disminuye la desnaturalización de la superficie y la absorción al vidrio del vial, la liofilización es preferible para la mayoría de los extractos, pero algunos, por ejemplo, los ácaros y el polvo casero,

pierden mucho de su actividad biológica en el proceso^{16,57,69}.

- * La glicerina al 50% es un inhibidor enzimático por lo que inhibe las proteasas contenidas en los extractos alérgicos y bajan la potencia de las mismas^{16,57,69}.

3.2.1. MATERIALES DE ORIGEN

El material de origen de cualquier extracto alérgico desempeña un papel crucial en la determinación de la calidad o alergenidad potencial del producto final. Sin realizar investigaciones iniciales de los materiales de origen para optimizar el potencial de producción de un extracto con una dotación completa de alérgenos, no cabe esperar que éstos sean constantes, apropiados o potentes para su utilización en diagnóstico e inmunoterapia.

3.2.2. EXTRACTOS ALERGÉNICOS DE ÁCAROS

Los extractos obtenidos de las dos especies muestran una gran reactividad cruzada, pero no son idénticos desde el punto de vista alérgico; por ello, son necesarios extractos de ambas especies.

Para obtener cantidades suficientes de ácaros para la preparación de extractos alergénicos es necesario que los éstos sean cultivados; se pueden utilizar dos sistemas básicos; un método supone dejar que los ácaros se desarrollen hasta que el medio de cultivo contenga unos cuantos de éstos vivos, y la posterior extracción del cultivo entero, que esta formado por componentes del medio, materiales fecales, componentes de algunos ácaros vivos y componentes de los armazones descompuestos de éstos; el otro método implica cultivar los ácaros y retirarlos del medio, de modo que el material de extracción esta formado principalmente por ácaros enteros e incluye algunas partículas fecales⁴¹. Los datos sobre comparaciones de estos dos tipos de extractos son insuficientes, aunque en un estudio se demostró que los extractos de medio entero producen un patrón de IEF sin bandas bien definidas, mientras que un extracto de ácaros enteros tenía muchas bandas definidas bien localizadas. El mismo estudio sugirió, utilizando RAST, que el extracto de medio tenía una potencia mucho menor que el extracto de cuerpos de ácaros. Dado que cada especie tiene importantes alergenos, los extractos derivados de las heces y los cuerpos deben contener todos los componentes que se pueden unir a IgE específica procedente de individuos alérgicos a los ácaros.

3.2.3. EXTRACTOS ALERGÉNICOS DE REFERENCIA

La estandarización de extractos alérgicos depende en gran medida de la disponibilidad de un extracto de referencia bien definido y de potencia conocida para cada extracto alérgico que se desea estandarizar. Para que un extracto sea aprobado como estándar de referencia, debe someterse a rigurosos análisis cualitativos y cuantitativos, es decir, debe asegurarse de que contiene un complemento total de alérgenos a los que un paciente alérgico estaría expuesto, también pueden realizarse extensas pruebas cutáneas y titulaciones intradérmicas. También cuando se requiere de alérgenos individuales como estándares de potencia requiere de una considerable comprensión de la estabilidad de ese alérgeno específico y de su índice respecto a otros presentes en el extracto alérgico del que proviene^{48,53}.

Debido a que la estandarización establece una potencia relativa, son necesarios extractos de referencia. La IUIS ha creado un Comité en Estandarización de Extractos Alérgicos que ha establecido requisitos específicos para los extractos de referencia. Cuando se completan todos los estudios, los extractos se proponen como referencias internacionales y finalmente son aceptados por la Organización Mundial de la Salud^{53,59}.

Los estándares internacionales pueden ser utilizados como calibradores para determinaciones de actividad alérgica total o para determinaciones de componentes alérgicos individuales⁵⁹.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

CAPITULO IV

4. ESTANDARIZACIÓN DE EXTRACTOS ALERGÉNICOS

En la actualidad no se ha establecido el potencial de los extractos alérgicos utilizados en el diagnóstico de enfermedades alérgicas, por lo que ha surgido la necesidad de su determinación desde la aparición de la alergología como especialidad médica.

La estandarización es cada vez más importante, pues intenta garantizar una homogeneidad entre lotes y una potencia relativa de los extractos alérgicos logrando así disminuir riesgos en la actividad clínica, ésto se realiza aplicando métodos uniformes para comparar los productos con un extracto de referencia, permitiendo así asignar un valor de potencia relativa a cada lote de extracto^{25,48,53,83}. La potencia relativa indica la cantidad de actividad alérgica o la concentración de uno o más alérgenos, sin embargo, la potencia no implica una eficacia diagnóstica o terapéutica⁴⁸. En un esfuerzo por expresar la potencia de los extractos se han utilizado diversas unidades:

- * Unidad Noon (polen); Es la cantidad de alérgeno extraído de 1 μ g de polen, establecido por definición. Su uso es obsoleto.

- * Unidad alergenico (AU); Es la cantidad de alergenico extraído de $1\mu\text{g}$ de alergenico, establecido por definici3n. Se utiliza en USA.
- * Peso / volumen; Es el peso en gramos por volumen en mililitros, establecido por medici3n fisisca. Se utiliza en todo el mundo.
- * Unidad de nitr3geno proteico (UNP); Es el contenido de proteina: $1\text{UNP} = 0.01\mu\text{g}$ de nitr3geno proteico, y se establece por micro-Kjeldahl. Se utiliza en todo el mundo.
- * Antigeno E (AgE); Una unidad AgE $\approx 1\mu\text{g}$, se establece por inmunodifusi3n radiada. Se usa en USA.
- * Unidades de alergia a gatos/ml (AU/ml); AU arbitraria/Cat 1 (*Fel d I*), se establece por inmunodifusi3n radiada. Se usa en USA.
- * Unidades de alergia/ml (AU/ml); Es la D_{50} promedio, de prueba ID_{50}EAL , se establece por ID_{50}EAL e inhibici3n de RAST. Se usa en USA.
- * Unidades biol3gicas/ml (BU); Son pruebas cutaneas relativas a histamina: $1\text{HEP} = 1,000\text{BU}$, se establece por equivalente de histamina por pinchazo. Se usa en países n3rdicos y otras partes de Europa.
- * Unidades internacionales (UI); Son unidades arbitrarias, se establecen por análisis *in vitro*

respecto a los estándares internacionales de la OMS. Se usa en todo el mundo.

Para asignar unidades a los extractos de prueba es necesario asignar unidades al extracto de referencia. Las unidades se pueden asignar a la referencia basándose en diversos métodos⁵³:

1. Asignación de unidades arbitrarias. Es el método aplicado para las preparaciones de referencia internacionales bajo los auspicios de la IUIS, en el que a todas las referencias se les asignan 100,000 unidades internacionales (UI). Esta unidad no refleja la actividad *in vivo* de las referencias.
2. Asignación de unidades basadas en ensayos de un único antígeno. Las limitaciones de este método son: a) un solo antígeno puede no reflejar la actividad de todos los alérgenos presentes en los extractos: b) hay relativamente pocos alérgenos como éstos que se puedan analizar, y c) las unidades que reflejan el contenido de cada alérgeno o del extracto (por RAST) pueden no ser directamente comparables en términos de actividad alérgica *in vivo*.
3. La asignación de unidades se puede basar en técnicas *in vivo* (pruebas cutáneas). Este método se basa en la presunción de que se puede asignar una unidad común a todos los

extractos atendiéndose a una propiedad *in vivo* común de todos los extractos (provocación de respuestas cutáneas alérgicas). Así prescindiendo de su origen, los extractos administrados a unidades iguales basadas en el ensayo *in vivo* a pacientes clínicamente similares de igual sensibilidad cutánea a sus respectivos extractos deben dar respuestas clínicas equivalentes. Este método ofrece la posibilidad de desarrollar pautas genéricas de dosificación para una variedad de extractos a los cuales se pueden asignar unidades bioequivalentes, donde las unidades administradas serán predictivas de los efectos adversos y beneficiosos cualquiera que sea la fuente alérgica de éste.

Se han propuesto diversos métodos para asignar unidades basados en la realización de pruebas cutáneas. Uno se basa en la línea dosis-respuesta de eritema en la inoculación intradérmica del extracto y se denomina método ID₅₀EAL, que significa que la dilución intradérmica para un total de 50mm de eritema determina la unidad de alergia (UA). Los otros métodos se fundamentan en la respuesta papulosa en la prueba por punción del extracto en que la unidad asignada se basa en el tamaño de la pápula inducida por alérgeno en relación

con la pápula inducida por la histamina HCl (HEP), o bien en el tamaño absoluto de la pápula.

En la actualidad no es factible identificar y cuantificar cada componente alergénico de extractos, pero si realizar un análisis comparativo por procedimientos *in vivo* e *in vitro*.

4.1. ESTANDARIZACIÓN *IN VITRO*

En años recientes ha crecido el interés por saber la composición de los extractos alergénicos utilizados para diagnóstico e inmunoterapia de las enfermedades alérgicas⁵.

Se acepta generalmente que los mejores extractos deben contener tantas proteínas que se unan a la IgE como sea posible a partir de una fuente dada, y que estas deben encontrarse en su forma nativa. Para valorar y seleccionar preparados de referencia y comparar las referencias con cada lote de extractos deben emplearse métodos cualitativos y cuantitativos.

4.1.1. METODOS CUALITATIVOS

Los métodos cualitativos para análisis de extractos alergénicos consisten en la separación e identificación de las diversas proteínas, también incluyen la diferenciación de proteínas alergénicas (capturadas por IgE) de aquellas que podrían ser extrañas.

✓ Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Es un método de separación de proteínas por el que se induce la migración de éstas en un gel que contiene dodecilsulfato de sodio (SDS) en cantidades que varían respecto a los pesos moleculares individuales de cada proteína, lo que da un patrón de bandas después de teñir, y al incluir en el mismo gel proteínas marcadoras de referencia de pesos moleculares conocidos, se pueden calcular los pesos moleculares de diversos extractos proteicos^{48, 53}.

✓ Inmunolectroforesis cruzada (CIE)

Es otro método de separación electroforética de proteínas que incluye electroforesis de proteínas en una capa delgada de gel en un extracto alergénico en una dirección, seguido por una segunda electroforesis a 90° respecto a la primera en un gel diferente que contiene antisuero animal precipitado

específico para el alérgeno que se analiza. Una vez teñidos los patrones de formación de bandas pueden compararse con los producidos de otros extractos del mismo alérgeno o con datos obtenidos en otros análisis. La CIE requiere la producción de suero animal contra el extracto específico. Si el animal inmunizado no responde a uno o más componentes de alérgeno, no se observan y por tanto pareciera que no existen^{48,53}.

✓ Radioinmunolectroforesis cruzada (CRIE)

Es la realización de CIE modificada por exposición del gel que contiene los arcos de precipitina no teñida a anticuerpos IgE que sólo se unen a las proteínas alérgicas; después de lavar los anticuerpos IgE no unidos, se aplica IgE anti-humana y se produce un patrón por autorradiografía. Las bandas visibles por este método representan las proteínas en el extracto que reaccionaron con los anticuerpos contenidos en el suero humano acumulado^{21,48,53,85}.

✓ Enfoque isoeléctrico (IEF)

Es otra técnica de electroforesis que se realiza en una delgada capa de gel y separa los extractos con base al punto isoeléctrico de las proteínas individuales. Al igual que SDS-PAGE, IEF constituye

todas las proteínas en un extracto visible, incluyendo las alergénicas y las que no lo son. Muchos pólenes son indistinguibles por examen microscópico, pero cada extracto de polen puede producir un patrón específico de formación de bandas de proteínas. Estos patrones son muy útiles para establecer o verificar la identidad del polen utilizado para preparar extracto alergénico^{48,53,85}.

4.1.2. METODOS CUANTITATIVOS

Los métodos cuantitativos comprenden determinación de las proteínas totales, análisis de antígenos individuales, liberación de histamina por leucocitos periféricos de individuos alérgicos e inhibición del RAST, entre otros^{48,53}.

✓ Peso por volumen

El primer intento de expresar la potencia de un extracto alergénico fue el uso de cocientes peso por volumen, un método que aún es común en la actualidad. Las unidades peso por volumen son la simple expresión de un índice de peso de alergen seco que se encuentra en un volumen dado de solución. La expresión peso/volumen no se debe confundir con "peso a volumen" que se utiliza en

química como en el peso en gramos de un soluto en un volumen de solución en litros^{48,53,85}.

El peso por volumen indica el cociente inicial de extracción, y tal vez no exprese con precisión la potencia biológica del extracto terminado; no obstante, la relación peso/volumen se extiende con claridad y proporciona información útil para calcular las dosis de extractos de alérgeno estandarizados que deben administrarse.

✓ Análisis enzimático

Muchos extractos alérgicos contienen enzimas, por ejemplo: los venenos de Hymenoptera contienen enzimas que son alérgicas; fosfolipasa-A hialuronidasa. en venenos de abeja y avispa, fosfatasa ácida en veneno de abeja. En estos casos, la medición de las actividades enzimáticas sirve para definir y estandarizar extractos alérgicos de veneno de Hymenoptera. El empleo de contenido enzimático como estándar de potencia de extractos alérgicos que no sean de Hymenoptera tiene serias limitaciones^{21,85}.

✓ Inmunodifusión radiada (RID)

El análisis de un solo alérgeno principal en un extracto puede proporcionar un estándar preciso de la potencia. La medición de antígeno requiere de la

producción de un antisuero específico al que pueda incorporarse el alérgeno individual en el gel para emplear un análisis RID sencillo. Después que las cisternas se colocan en el gel impregnado con antisuero, se les aplica el extracto a estudiar. Durante la difusión se formará y tornará visible un anillo de precipitina. El diámetro de dicho anillo es directamente proporcional al contenido de antígeno del extracto alérgico. Se pueden realizar análisis de alérgenos individuales mayores por pruebas alternativas con anticuerpos monoclonales, y tal vez en el futuro ofrezcan ventajas sobre RID^{21,85}.

✓ Contenido de proteínas

El contenido total de proteínas de un extracto es importante en la evaluación de la fuente de materiales, además que garantiza la igualdad entre lotes en lo que se refiere al procedimiento de extracción. Permite también comparar los diversos procedimientos en gel, pues la calidad del patrón depende de la carga total de proteínas. Existen diversos análisis de proteínas, pero la mayoría tiene limitaciones para el empleo de extractos alérgicos debido a la complejidad de la mezcla de alérgenos y a la presencia de estabilizadores y conservadores. El contenido proteico de un extracto se expresa en unidades de nitrógeno proteínico (UNP)

y se establece por el método micro-Kjeldahl, este método fue propuesto por Cooke y Stull en 1933^{50,69}. Se ha demostrado que UNP no es una medida confiable de potencia y no hay correlación entre la actividad biológica en pruebas cutáneas de un extracto con su contenido de nitrógeno proteico⁴⁸, ya que la mayor parte de proteínas de extractos alergénicos no son alergénicas; entonces, el contenido de PNU como aparece en las etiquetas de extractos alérgicos comerciales no puede convertirse a cifras de peso por volumen pues no tienen relación directa. Al parecer el mejor método es por analizador de aminoácidos, aunque el análisis de proteínas por el procedimiento de ninhidrina es más práctico y da resultados similares^{20,85}.

✓ Liberación de histamina leucocítica

La liberación de histamina por leucocitos periféricos de sangre de pacientes con alergia es un procedimiento de análisis *in vitro* que se correlaciona con los resultados de las pruebas cutáneas, pero no tiene uso común para análisis de extractos alergénicos porque requiere continuo aporte de células frescas.

✓ Inhibición RAST

Este método fue propuesto por Gleich y col. en 1974 y se ha empleado bastante como prueba diagnóstica e *in vitro* para cuantificar anticuerpos IgE-alergeno específicos en el suero de pacientes alérgicos. Este sistema permite comparar directamente la actividad alérgica de dos o más extractos en paralelo, y puede producir resultados cuantitativos precisos. Se realiza por unión covalente de un extracto alérgico de alta calidad y bien definido a un sostén sólido de Matrex, Sepharosa, celulosa microcristalina, o discos de papel. Las diluciones seriadas triplicadas del extracto que se desea examinar se combinan con suero almacenado de paciente que contiene anticuerpos IgE específicos para ese alergeno, esta mezcla extracto/anticuerpo se expone al alergeno del sustrato sólido, lo que permite que la IgE específica residual (la que no se ha enlazado con el alergeno en el extracto) se una al alergeno de dicho sustrato; el soporte sólido se lava para retirar anticuerpos no ligados, se expone a anti-IgE radiomarcada, se lava otra vez para retirar el exceso de esta y se procesa en un contador gamma.

Conforme la cantidad de alergeno soluble disminuye con soluciones más leves, el número de anticuerpos que se une al soporte sólido aumenta.

Las diluciones triplicadas (por lo general 10) del extracto de prueba se procesan en paralelo con las del estándar de referencia, y se obtiene una representación gráfica de curvas de inhibición al analizar los datos y emplear un procedimiento estadístico adecuado^{53,85}.

Para la obtención de datos estadísticamente significativos, se procesan al mismo tiempo las diluciones seriadas triplicadas del extracto de prueba y el estándar de referencia. Los resultados se expresan como potencia relativa del extracto de prueba en comparación con el estándar de referencia. La FDA/CBER estableció los siguientes límites para asignación de unidades a extractos de ácaros analizados por inhibición de RAST (al estándar de ácaros se les asignó un valor de potencia relativa de 1.0)^{48,79}:

Límites para asignación de unidades alergénicas^{48,79}

Inhibición de RAST	Unidades
Potencia relativa	Alergia/ml (AU)
0.05 a 0.19	1,000
0.20 a 0.46	3,000
0.47 a 2.12	10,000
2.13 a 6.36	30,000

Este es un análisis de línea paralela y supone que cuando las unidades alergénicas (AU) del extracto de prueba y de referencia se ajustan al

mismo valor, el extracto de prueba puede provocar la misma respuesta alérgica o inmunógena que el de referencia. Las unidades antes señaladas no tienen la precisión de dosis de fármaco usuales, ya que el extracto de prueba no se considera estadísticamente diferente del estándar de referencia y varía entre el 47-213% respecto a éste. Este método puede permitir una diferencia de hasta 4.5 veces entre lotes diferentes del mismo extracto; aunque esto pareciera impreciso representa una gran mejoría sobre la variabilidad de 100-1,000 veces encontrada en el pasado entre extractos no estandarizados disponibles en el comercio⁴⁸.

Para un análisis de inhibición de RAST es fundamental contar con lo siguiente:

- 1) Un alérgeno en fase sólida de alta calidad en el que estén presentes todos los componentes alérgicos, y estén representados en la misma relación que en estado natural.
- 2) Suero acumulado de individuos alérgicos al alérgeno que se analizará
- 3) Anti- IgE radiomarcada
- 4) Un estándar de referencia bien definido para cada alérgeno que se desee analizar.

Se han empleado métodos diferentes a las inhibiciones por inmunoanálisis para producir resultados similares a los logrados con inhibición de RAST.

4.2. ESTANDARIZACIÓN *IN VIVO*

Diferentes extractos aun cuando esten estandarizados *in vitro*, la actividad biológica de éstos varía, para asegurar una potencia similar logrando así incrementar la conveniencia y seguridad en la práctica clínica, los extractos alergénicos deben estar estandarizados biológicamente por medio de pruebas cutáneas en grupos de pacientes alérgicos a los alergenos a estandarizar⁵.

La estandarización *in vivo* proporciona un modelo clínico para:

- 1) Comparar cuantitativamente los extractos utilizados para diagnóstico e inmunoterapia.
- 2) Valorar los extractos cuando no se han desarrollado o no se dispone de pruebas *in vitro*.
- 3) Valorar la exactitud de los ensayos *in vitro* utilizados para predecir las propiedades *in vivo* de los extractos.

Dado que los ensayos *in vivo* dependen de la disponibilidad de pacientes con sensibilización adecuada, pueden ser utilizados por cualquier médico para comparar extractos en grupos de pacientes localmente relevantes.

Las pruebas cutáneas son el método *in vivo* más utilizado para la estandarización de extractos

alergénicos. Se han impugnado precisión y exactitud de éstas, pero se han creado métodos apropiados para controlar las variables. Estos métodos incluyen examen de la capacidad de los técnicos que aplican las pruebas, métodos estandarizados para medición y registro de resultados y análisis estadísticos de los datos obtenidos. Los métodos de pruebas cutáneas empleados para estandarización difieren en gran parte de procedimientos que se emplean en la práctica clínica para el diagnóstico de alergias, pero sin duda los clínicos pueden realizar las pruebas cutáneas con estos métodos y controles. Las pruebas cutáneas precisas y exactas permiten la comparación cualitativa y cuantitativa de extractos alergénicos, hacen posible valorar la viabilidad de pruebas *in vitro* para la estandarización.

4.2.1. POTENCIA RELATIVA

La potencia relativa determina las dosis bioequivalentes de extractos en estudio, lo que se va a valorar con dos extractos diferentes para comparar su seguridad y eficacia⁵³.

La identificación de la potencia relativa por cualquier método requiere múltiples comparaciones simultáneas paralelas de dos o más extractos o dosis múltiples. Este método identifica la potencia de un

extracto alergénico por comparación de la potencia del extracto de prueba contra un estándar de referencia, en donde esta relación se emplea para asignar unidades al extracto de prueba. En la mayor parte de métodos *in vivo* e *in vitro*, la potencia relativa es una valoración de la actividad funcional del extracto de prueba.

Si el cociente entre las dosis de prueba y de referencia que producen respuestas idénticas es constante, es decir, es independiente de la respuesta alérgica, las líneas dosis-respuesta son paralelas. La única diferencia en el comportamiento funcional de los dos extractos es la diferencia de la dilución (dosis) necesaria para inducir respuestas idénticas. Se puede hacer que estos dos extractos actúen de igual forma diluyendo el extracto más potente en la misma medida que la diferencia en las diluciones entre las dos líneas paralelas. El cociente constante de las dosis de prueba y de referencia necesarias para producir respuestas alérgicas idénticas es, por tanto, un número menor que la unidad que define el factor de dilución requerido para igualar la actividad alergénica de dos extractos. Si el cociente de las dosis necesarias para inducir respuestas idénticas no es constante, es decir, las líneas no son paralelas y por lo tanto, la potencia relativa no es constante para todas las respuestas alérgicas,

entonces, los extractos no pueden producir respuestas idénticas en todas las respuestas alérgicas utilizando un simple factor de dilución y, por tanto, no se pueden estandarizar.

El modelo de líneas paralelas también es aplicable a los ensayos *in vitro* de potencia relativa, por ejemplo, la inhibición del RAST⁵³. Así se puede comparar la potencia relativa determinada por ensayos *in vivo* e *in vitro* utilizando los mismos extractos, pacientes y análisis estadísticos, de modo que se pueden valorar los errores relativos derivados de la variabilidad *in vivo* respecto a la observada *in vitro*.

4.2.2. DOSIS BIOEQUIVALENTES

Para determinar las dosis bioequivalentes; si la potencia relativa es 1, el cociente de las dosis del extracto de prueba y de referencia para obtener respuestas idénticas es 1, o el concentrado de extracto de prueba tiene el 100% de la potencia del concentrado de referencia. En este caso los concentrados de prueba y de referencia se pueden administrar a dosis iguales (diluciones) con respuestas alérgicas idénticas (dosis bioequivalentes)⁵³.

Los médicos deben ser capaces de especificar las dosis de extracto que administran, puede ser difícil para ellos referirse a los extractos sólo en términos de potencia relativa. Entonces, basándose en la potencia relativa del extracto de prueba con respecto al de referencia se pueden asignar unidades al extracto de prueba bioequivalentes al de referencia.

La asignación de dosis bioequivalentes sólo es posible después del desarrollo de un ensayo *in vivo* exacto y preciso de la potencia relativa. La estandarización implica que extractos marcados con unidades iguales tendrán la misma potencia relativa, basada en la variabilidad estadística del ensayo de potencia relativa, suponiendo que éstos no difieren en su composición.

4.2.3. DIFERENCIAS DE COMPOSICIÓN

Las líneas dosis-respuesta paralelas sugieren que los extractos son funcionalmente idénticos, ya que la única diferencia entre los concentrados de extractos se deriva de la diferencia en la dilución, cuando estos difieren en su composición, la proporción relativa de alérgenos no es la misma en los de referencia y de prueba, por ejemplo, si la referencia contiene los alérgenos 1A, 1B, 1C y el

preparado de prueba contiene los alergenos 100A, 0.01B, 10C, y 1D, la diferencia en la proporción de los componentes entre estos dos extractos no se puede corregir mediante un simple factor de dilución en un paciente sensible a todos los componentes, por tanto, estos extractos pueden tener diferentes relaciones dosis-respuesta y las líneas pueden no ser paralelas. Las líneas dosis-respuesta no paralelas indican la existencia de diferencias composicionales entre los extractos, sin embargo, si estos dos productos de composiciones diferentes se prueban en un paciente que sólo es sensible a un alergen que esta contenido en los dos extractos, el de prueba y el de referencia, las diferentes proporciones de los otros alergenos no se detectarán y darán líneas dosis-respuesta paralelas y parecerán funcionalmente idénticos, diferenciándose sólo en un factor de dilución. Así, las líneas dosis-respuesta paralelas, si bien demuestran identidad funcional en un paciente en particular, no garantizan la identidad composicional⁵³.

Para valorar de una forma más completa de identidad composicional es necesario determinar la potencia relativa en varios pacientes. Dado que los extractos se administran a pacientes de distinta sensibilidad, es esencial que el ensayo *in vivo* de la potencia relativa del extracto de prueba y de referencia se realice en una muestra de pacientes

para determinar si la potencia relativa en un paciente se mantiene en los otros. Por ello, si la potencia relativa varía significativamente entre varios pacientes, indica que los extractos son diferentes en su composición, si tienen una potencia relativa constante independientemente del paciente en el que se hace la prueba, indica que éstos tienen composiciones similares. La valoración de la variabilidad de la potencia relativa entre los pacientes es, por tanto, un elemento crítico en la estandarización de los extractos alergénicos. Esta valoración de la variabilidad de la potencia relativa entre los pacientes también es importante para los ensayos de potencia relativa *in vitro*, por esto se utilizan *pools* de sueros de pacientes, y no sueros de un solo paciente, estas diferencias entre pacientes no son aparentes en la potencia relativa determinada *in vitro*.

4.2.5. OPTIMIZACIÓN DE LOS ENSAYOS *IN VIVO*

✓ Medición de la dosis

El método más sencillo para medir la dosis del extracto es considerar el extracto de prueba como si fuera dilución del extracto de referencia. La utilización de diluciones para expresar la dosis de alérgeno evita errores de composición inherentes a

otros métodos de ensayo. El error producido en la dilución se ha estimado que es de hasta del 20%. Para preparar diluciones seriadas exactas es necesario utilizar una jeringa y aguja nuevas cuando se extrae extracto de cada dilución. La distribución del volumen de muestra correcto debe realizarse sin reaspiración. Estas técnicas evitan la contaminación de la muestra aspirada, ya que si se utiliza de nuevo la misma aguja y la misma jeringa se dejan concentraciones más altas en la jeringa y la aguja.

El empleo de logaritmos para expresar la dosis de alérgeno facilita los análisis gráficos y estadísticos de los datos dosis-respuesta, por ejemplo, en una serie de preparados cada uno tres veces más diluido, al concentrado se le puede asignar la dilución No. 0, a la primera dilución, el No.1, que es 3^{-1} o 10^{-1} del concentrado, y el \log_{10} de la primera dosis es -1^{53} .

✓ Medición de la respuesta alérgica

En el ensayo *in vivo* se deben comparar las respuestas alérgicas del paciente a varias concentraciones de los extractos (prueba y referencia). El único órgano que permite realizar estas comparaciones simultáneas es la piel, por medio de pruebas cutáneas.

La prueba cutánea esta formada por eritema y pápula. El método más simple para captar permanentemente la respuesta cutánea alérgica es dibujar con tinta el contorno de la reacción papuloeritematosa en la piel en el momento adecuado. Luego, el dibujo se transfiere a una tira transparente para guardarlo en un libro de anotaciones y valorarlo. Para cuantificar una prueba cutánea, se hace la suma de diámetros, el área de respuesta, y el producto de los diámetros. Se ha demostrado que tanto la suma como el producto de los diámetros estan muy asociadas con el área de la respuesta cutánea. Dado que las respuestas eritematosas son varias veces mayores que las respuestas papulosas, puede producirse una menor variabilidad si se miden respuestas eritematosas, que son más grandes a las dosis de alérgeno que inducen respuestas papulosas pequeñas e imprecisas. Utilizando la técnica de punción o bien intradérmica, se ha observado que la variabilidad en la medición del eritema y la reacción papulosa es similar, independientemente de la técnica de inoculación. El coeficiente de variación para la respuesta papulosa o eritematosa puede ser menor del 20% si se mide el diámetro medio, o del 40% si se mide el área media, de modo que se pueden medir la reacción papulosa o eritematosa a tamaños especificados con una precisión similar⁵³.

✓ Relación dosis-respuesta

En 1941, los datos experimentales basados en la titulación intradérmica sugerían que la relación entre la dosis de histamina (log de la concentración) y la respuesta cutánea (diámetro de la pápula o del eritema) es lineal⁵³. Posteriormente, se han publicado relaciones lineales dosis-respuesta basadas en resultados de pruebas cutáneas experimentales realizadas con extractos alérgicos para pápula y eritema intradérmicos, eritema y pápula en la prueba de punción, las cuales presentan elevados coeficientes de correlación, por encima de 0.85, para las respuestas de eritema intradérmico, pápula intradérmica, eritema en la prueba de punción y pápula en la prueba de punción, lo que demuestra que el modelo dosis-respuesta de líneas paralelas para la potencia relativa se podría aplicar para la estandarización de extractos alérgicos, cualquiera que sea el método de administración del alérgeno⁵³.

Las líneas dosis-respuesta se pueden definir por su pendiente e intersección. Dos extractos con idénticas pendientes e intersecciones tendrán una potencia relativa igual a 1. Debido al carácter sigmoidal de la curva dosis-respuesta completa, es de la mayor importancia especificar los límites de respuestas alérgicas necesarios para producir la pendiente más empinada, y asegurar que la

comparación de los extractos se llevará a cabo en la porción de la línea dosis-respuesta más sensible a pequeños cambios en la dosis de alérgeno, es decir, la porción de la línea que produce el mayor cambio en la respuesta alérgica para un incremento dado en la dosis. Se ha observado que la respuesta papulosa da líneas más horizontales, en cambio la respuesta eritematosa da líneas más escarpadas^{48,53,83}.

Para obtener líneas dosis-respuesta constantes de pendientes pronunciadas con la respuesta de eritema es necesario especificar unos límites del tamaño de las respuestas de eritema obtenidas aplicando una serie de diluciones específicas^{48,53}. Una línea dosis-respuesta escarpada (eritema intradérmico) sólo requiere una pequeña diferencia del tamaño de la respuesta alérgica para detectar una diferencia significativa en la potencia entre dos extractos cuando se hace la prueba en tres pacientes⁵³. Una vez que se ha determinado la pendiente para cada extracto, las pendientes se pueden analizar estadísticamente para determinar si son o no diferentes. Si las pendientes no son diferentes, las líneas se consideran paralelas, y se puede calcular una pendiente común para análisis subsiguiente de la potencia relativa.

Cuando se utiliza la misma escala, las líneas dosis-respuesta producidas por el eritema inducido por inoculación intradérmica tienen pendientes

significativamente mayores en comparación con las respuestas de eritema en la prueba por punción, de pápula en la misma prueba, o de pápula en la inoculación intradérmica, se toma la porción más escarpada de la línea dosis-respuesta del eritema por inoculación intradérmica, inmediatamente por encima de la dilución final, para realizar la comparación. El modelo de líneas paralelas sugiere que las estimaciones de la dosis y la potencia relativa basadas en líneas dosis-respuesta escarpadas serán más exactas y más precisas que las mismas estimaciones basadas en un ensayo que de líneas dosis-respuesta más horizontales⁵³.

- ✓ Pruebas cutáneas de punción (prick) e intradérmicas.

La prueba cutánea es una biovaloración sobre la presencia o ausencia de una respuesta inmunitaria a un alérgeno específico que activa a un mecanismo efector particular de inflamación y origina una lesión transitoria y visible de la piel¹⁶. La prueba cutánea introduce en un solo punto de la dermis una pequeña cantidad de alérgeno suficiente para reaccionar con los anticuerpos IgE fijos a las células cebadas cutáneas, para que liberen mediadores y originen una pápula visible y eritema.

La prueba por punción es de las pruebas diagnósticas más sencillas en alergia, y es el procedimiento que tiene menos posibilidades de ocasionar anafilaxia sistémica. Se coloca una sola gota de extracto alérgico glicerinado en la piel, se punciona suavemente con la punta de una aguja o lanceta en el centro de la gota. Después de 15-20min. Se mide y registra la reacción. Se debe incluir un control negativo con el diluyente y un control positivo con histamina. Se puede utilizar la piel de la parte interna de los antebrazos o los brazos, o la parte superior de la espalda. Los sitios por probar deberán estar separados al menos 3.0cm⁷⁹.

En la prueba intradérmica se introduce una cantidad media de alérgeno acuoso (0.01-0.05ml) en la piel para detectar respuestas mediadas por IgE. Deberán aplicarse sólo en el brazo, de manera que se pueda utilizar un torniquete en caso de que se presente una reacción sistémica inesperada. Esta prueba es aproximadamente 1000 veces más sensible que la de punción. La reacción se lee a los 15-20min. Se sugiere la práctica de control negativo del diluyente^{71,79}.

La técnica intradérmica requiere dosis de 100-400,000 veces menores de extracto que la prueba percutánea para producir respuestas cutáneas de igual tamaño, y cuando no aparece ninguna respuesta

alérgica en la prueba de punción, se ha demostrado que una dosis intradérmica de extracto 100 veces menor que la dosis ineficaz de la prueba de punción induce respuestas cutáneas alérgicas^{53,83}. Esto permite evaluar extractos cuya potencia no es suficiente para inducir respuestas positivas en las pruebas por punción, haciendo posible realizar la prueba con una mayor variedad de extractos, entre ellos los de baja potencia y/o diluidos. Esto hace posible la estandarización de un espectro más amplio de extractos en una población más numerosa de pacientes alérgicos de los que sería posible con la prueba por punción. Teniendo en cuenta que las reacciones adversas son dosis-dependientes, los métodos estandarizados basados en la realización de pruebas intradérmicas deben especificar una dosis inicial segura, mientras que las pruebas por punción con frecuencia se llevan a cabo con extractos alergénicos concentrados.

La prueba por punción es más fácil y se aplica rápidamente, es menos dolorosa, y las reacciones adversas, como la anafilaxia, también son menos probables, por tanto son más seguras, mientras que las intradérmicas son más sensibles, pero tienen mayor tendencia a producir reacciones adversas y positivas falsas a consecuencia de la irritación local¹⁹. Un tratamiento con β -bloqueadores puede incrementar el riesgo de reacciones adversas¹⁹.

✓ Factores del paciente

Hay factores relacionados con el paciente que pueden influir sobre el tamaño de la respuesta cutánea, por ejemplo, la distancia e interacciones entre los puntos de inyección y el tiempo que transcurre hasta que se valora la respuesta alérgica. Estas variables han de ser controladas en los ensayos estandarizados de pruebas cutáneas. Los efectos de la medicación, pigmentación de la piel, estación del año, hora del día, la edad y el sexo también pueden influir en una respuesta alérgica individual. El método más eficaz para controlar estas diferencias entre los pacientes es comparar los extractos en cada uno⁵³.

La sensibilidad del ensayo *in vivo* para detectar la variabilidad entre pacientes se puede incrementar incluyendo pacientes cuya reactividad cutánea varíe ampliamente frente al extracto de prueba o al de referencia y cuya sensibilidad varíe ampliamente a diferentes componentes alergénicos presentes en los extractos⁵³.

Todos los ensayos *in vivo* deben especificar un límite superior aceptable de la variabilidad entre pacientes para detectar diferencias composicionales entre los extractos y poder asegurar que las estimaciones de la potencia relativa media son

aplicables a cada paciente en el que se realiza la prueba.

4.2.5. PRUEBA DE PINCHAZO PARA EQUIVALENTE DE HISTAMINA (HEP)

El método HEP para asignar unidades a extractos se basa en la determinación de la concentración del alérgeno que produce una pápula en la prueba de punción igual en tamaño a la pápula producida por una dosis definida de histamina HCl, este método fue propuesto por Ass en 1978⁶⁸.

Las pruebas cutáneas por el método HEP se realizan en 20 o más pacientes con antecedentes clínicos de sensibilidad y pruebas cutáneas positivas al alérgeno que se desea estandarizar. En cada paciente se estudian de manera simultánea múltiples diluciones del extracto de prueba y una dilución de concentración específica de biclorohidrato de histamina (1mg/ml), de esta manera se normalizan todas las reacciones alérgicas con las reacciones a la histamina, por tanto, intenta controlar las diferencias en la técnica por punción en un mismo investigador y entre distintos investigadores y las diferencias en la reactividad a la histamina entre pacientes⁵³.

La concentración de extracto que provoca una roncha de igual tamaño a la producida por la prueba de histamina se define como 1 HEP, y por la comodidad que significa para trabajar con números redondos, 1HEP = 1,000 unidades biológicas/mililitro (BU). Se ha propuesto que todos los extractos se preparen a 100,000 UB/ml^{16,48,53,85}. Este es un análisis de prueba cutánea de "punto único" y la potencia se calcula con base en la respuesta de formación de roncha, estos factores limitan la precisión de este método para estandarización de extractos alergénicos. La variabilidad de la HEP es influenciada por la concentración de histamina utilizada, el estado atópico de la población en que se realiza la prueba y el tamaño de la pápula más pequeña aceptable para el análisis. Este método evita la inoculación intradérmica, lo que puede ser más aceptable para los pacientes, pero a expensas de una menor sensibilidad de la prueba⁵³.

El HEP se ha utilizado en los países escandinavos y otras partes de Europa, pero no en EUA^{16,48,53,85}.

4.2.6. UNIDAD DE ALERGIA, POR EL MÉTODO DE LA DILUCIÓN INTRADÉRMICA PARA LA SUMA DE 50mm DE ERITEMA (ID₅₀EAL)

Voorhorost sugiere que no es necesario realizar un ensayo *in vivo* de líneas paralelas cuando se comparan extractos de diferentes orígenes. En esta circunstancia clínica, en la que ni es posible localizar fácilmente a pacientes individuales con igual sensibilidad a cada extracto ni es clínicamente necesario cambiarlos en los mismos pacientes, y propuso un enfoque alternativo para calcular las dosis bioequivalentes^{53,83}. Si se identifican los pacientes más sensibles que sean alérgicos a cada extracto en particular y se determina en cada población altamente sensible la dosis de cada extracto que produce una respuesta cutánea específica, sería posible entre las poblaciones calcular el cociente de las dosis para respuestas idénticas entre las poblaciones y estimar la actividad alérgica relativa de cada extracto en sus respectivas poblaciones. El método ID₅₀EAL adoptado por la FDA, se realiza como se expone a continuación:

- a) Se seleccionan los pacientes, que son clínicamente alérgicos y muy sensibles al alérgeno que nos interesa, lo que se determina mediante una prueba de punción positiva con el concentrado del

extracto (diámetro total del eritema superior a los 40mm) utilizando un dispositivo de prueba de punción especificado (aguja bifurcada).

- b) Se calcula en cada paciente de gran sensibilidad la dilución de la serie de preparaciones que difieren en un factor 3 de dilución que corresponde a un eritema total de 50mm (D_{50}) a partir de la línea más aproximada.
- c) Al menos 15 pacientes se someten a pruebas cutáneas de titulación en las que en cada paciente se prueban en forma simultánea diluciones seriadas triplicadas de 0.05ml (\log^3) del extracto de prueba y del estándar de referencia. El eritema que se produce se delinea y transfiere al registro del enfermo. Se dibuja una línea a lo largo del eje longitudinal de la zona de eritema y luego otra en el punto medio de la primera línea y en el ángulo de 90° respecto a ella, estos diámetros se miden y se suman para calcular la suma de eritema (E). Para las múltiples sumas de eritema producidas por las varias diluciones de extracto hacer una gráfica de regresión lineal y trazar la línea de mayor concordancia para cada paciente. El número de dilución que produce una suma de 50mm de eritema (D_{50}) se considera el punto óptimo y puede calcularse a partir de la línea de mayor concordancia. En este cálculo, se utiliza el tamaño del eritema en lugar del de la roncha

debido a que produce una curva más escalonada de dosis-repuesta, por lo tanto, es más fácil detectar diferencias en diluciones de extracto. La curva producida tiene forma sigmoidea y el valor de D_{50} (número de dilución que produce una suma de eritema = 50mm) se considera como punto óptimo debido a que se presenta en el sitio que la curva tiene un decremento escalonado, en cambio se emplearan los tamaños de las ronchas, no se podría detectar una diferencia de nueve veces la potencia entre las diluciones con base en la respuesta del paciente. De 15 pacientes muy sensibles pueden calcularse una D_{50} promedio, y se ha demostrado que este volumen puede ser reproducido entre años, entre regiones y entre investigadores^{1,16,48,53,64,85}.

Cuando se compara la D_{50} de diferentes extractos, se encuentran diferencias significativas relacionadas con la fuente de estos. Todavía no se ha determinado si estas diferencias en la D_{50} reflejan diferencias intrínsecas en la actividad alergénica de cada fuente o son debidas a la degradación de los alergenos por diferencias en la recolección y procesamiento de los materiales utilizados para elaborar los extractos. Dado que la diferencia en la D_{50} entre distintos extractos determina la proporción de las dosis para respuestas idénticas ($E=50mm$) independientemente de las diferencias en las fuentes alergénicas y que la

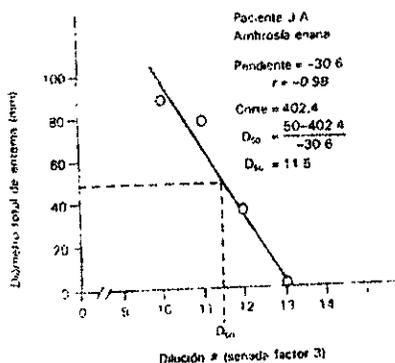
variabilidad de la D_{50} es conocida, se puede trazar un esquema para asignar unidades a los extractos de referencia. En el siguiente cuadro se presentan los valores promedio de D_{50} y sus valores asignados de AU para estándares de referencia, el grupo de extractos con D_{50} de 14 +/- 1 (factor 3 de dilución) que contienen pólenes de ambrosía enana y hierbas, se consideraron el grupo de referencia y se les asignó arbitrariamente 100,000 UA/ml^{1,16,48,53,64,83}.

Valores asignados de AU para estándares de referencia^{1,16,48,53,64,83}

Dilución promedio para producir un eritema de suma de 50mm	Unidades de alergia/ml de estándar
5.0 a 6.9	10 AU
7.0 a 8.9	100 AU
9.0 a 10.9	1,000 AU
11.0 a 12.9	10,000 AU
13.0 a 14.9	100,000 AU

Cuando a extractos de diferentes orígenes se les asignan idénticas unidades por este método, y se administran a pacientes clínicamente similares con igual sensibilidad cutánea a sus respectivos extractos, se observan respuestas clínicas similares a dosis equivalentes, lo que confirma que el método $ID_{50}EAL$ puede predecir las dosis bioequivalentes independientemente de la fuente del alergen. Sin embargo, si éste se administra a una población con

una menor sensibilidad cutánea, se observa una menor incidencia de respuestas clínicas adversas tanto para los extractos de la misma fuente como de diferentes fuentes, lo que sugiere que las reacciones adversas dosis-dependientes dependen en una gran medida de la D_{50} de la población de pacientes y de la dosis de extracto administrada. Por esto, parece que es esencial el conocimiento no sólo de la dosis de alérgeno sino de la sensibilidad del paciente, para predecir con exactitud los efectos clínicos adversos dosis-dependientes^{48,53,83}.



Gráfica 1

Diámetro total de eritema ΣE VS dilución X

Titulación intradérmica seriada (0.05ml/inyección) con extracto A (Graf. 1). Se representa la línea de regresión más aproximada del diámetro total (Y) del eritema (ΣE) correspondiente

al número de dilución (factor 3)(X). La línea más aproximada se considera aceptable cuando cuatro diluciones seriadas que difieren en un factor 3 de dilución (incluida la última) producen una línea con un coeficiente de correlación igual o por encima de 0.85, respuestas eritematosas gradualmente menores y una pendiente igual o por encima de 10, donde ΣE abarca el amplio margen de respuestas y define la $\Sigma E=50$. La fórmula para calcular la X, el número de dilución que produce un eritema total de 50mm (D_{50}) cuando $Y=50$ es:

$$D_{50} = (50 - \text{intersección}) / \text{pendiente}.$$

CAPITULO V

PROCOLO
PROPUESTO

5.1. TITULO

ESTANDARIZACIÓN BIOLÓGICA DE EXTRACTOS
ALERGÉNICOS DE Dermatophagoides pteronyssinus Y
Dermatophagoides farinae PARA INMUNOTERAPIA.

5.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Es la estandarización biológica de extractos alergénicos de Dermatophagoides pteronyssinus y Dermatophagoides farinae un método útil para disminuir la variabilidad entre lotes, minimizar los problemas en la aplicación clínica y sobretodo que permita dosificar con exactitud la concentración de alergenos mayores biológicamente activos?

5.3. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Las enfermedades alérgico respiratorias estan mediadas por el anticuerpo IgE dentro de la hipersensibilidad de tipo I (Gell y Coombs, 1969), las cuales se producen específicamente contra diversos aeroalergenos del medio ambiente siendo los ácaros del género Dermatophagoides los más alergénicos (Vorhoost, 1964). La alta frecuencia de inducción de síntomas de la Rinitis Alérgica y el Asma Extrínseco en un 15-20% de la población mundial estan determinados por estos microorganismos. Actualmente se reconoce que las proteínas alergénicas se encuentran en las heces fecales de éstos, de las que se conocen: peso molecular, punto isoeléctrico y comportamiento inmunológico. En el caso de Dermatophagoides pteronyssinus que se encuentra en el polvo de la casa, su alergen mayor es el *Der pI* de 25.5Kd y el de Dermatophagoides farinae que se encuentra en las harinas es el *Der fI* de 25.5Kd. Estas moléculas son extraídas para ser utilizadas en el diagnóstico a través de pruebas cutáneas y en el tratamiento inmunológico o hiposensibilización de enfermedades alérgicas. Desafortunadamente en México no existe la estandarización de estos productos biológicos.

5.4. JUSTIFICACIÓN

Los extractos alérgicos utilizados para inmunoterapia en los diferentes servicios de Inmunoalergología en nuestro país no tienen una concentración exacta de alérgenos biológicamente activos, lo que implica una gran variabilidad entre lotes, de un fabricante a otro, esto hace más peligroso el uso de los extractos, así como respuestas clínicas variables o nulas.

Por lo anterior una estandarización de los extractos alérgicos de Dermatophagoides pteronyssinus y Dermatophagoides farinae nos permitirá dosificar con exactitud la concentración de alérgenos biológicamente activos y así garantizar la homogeneidad entre lotes y minimizar los problemas en la aplicación clínica.

5.5. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS VERDADERA

La estandarización biológica de los extractos alérgicos de Dermatophagoides pteronyssinus y Dermatophagoides farinae nos permitirá dosificar con exactitud la concentración de alérgenos biológicamente activos.

HIPÓTESIS NULA

La estandarización biológica de los extractos alérgicos de Dermatophagoides pteronyssinus y Dermatophagoides farinae no nos permitirá dosificar con exactitud la concentración de alérgenos biológicamente activos.

HIPÓTESIS ALTERNA

La estandarización biológica de los extractos alérgicos de Dermatophagoides pteronyssinus y Dermatophagoides farinae nos puede ayudar a dosificar con exactitud la concentración de alérgenos biológicamente activos.

5.6. VARIABLES

VARIABLES INDEPENDIENTES

Estandarización Biológica de extractos
alergénicos.

VARIABLES DEPENDIENTES

Dermatophagoides pteronyssinus y
Dermatophagoides farinae.

5.7. OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

- * Estandarizar biológicamente los extractos alérgicos de Dermatophagoides pteronyssinus y Dermatophagoides farinae.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- * Estandarización *in vivo* de los extractos alérgicos de Dermatophagoides pteronyssinus y Dermatophagoides farinae por el método ID₅₀EAL.
- * Determinar la importancia de la estandarización *in vivo* por el método ID₅₀EAL.
- * Analizar las ventajas y desventajas que ofrece el método ID₅₀EAL en relación al método HEP.
- * Analizar las ventajas y desventajas que ofrece la estandarización *in vivo* en relación con la estandarización *in vitro*.

5.8. CRITERIOS

Muestra: 20 pacientes

1. INCLUSIÓN.-

- a) Pacientes del sexo femenino o masculino de 10 a 45 años de edad con historia clínica de enfermedad alérgica compatible con el alérgeno a probar (Dermatophagoides pteronyssinus o Dermatophagoides farinae)
- b) Diámetro del edema (mácula) a la histamina mayor o igual a 4 mm.
- c) Sin tratamiento previo con inmunoterapia al alérgeno en estudio (Dermatophagoides pteronyssinus o Dermatophagoides farinae)
- d) De cualquier parte de la República Mexicana, ya que en todo el país prevalece la alergia respiratoria a dichos ácaros.
- e) Sin tratamiento farmacológico con antihistamínicos un mes antes de las pruebas a realizar.
- f) Consentimiento del paciente.

2. EXCLUSIÓN.-

- a) Pacientes con dermatitis generalizadas.
- b) Pacientes con riesgo de choque anafiláctico a dichos alérgenos.

- c) Pacientes con cualquier tipo de urticaria.
- d) Mujeres embarazadas.
- e) Pacientes con: alergia + infección por VIH,
alergia + cáncer y alergia + autoinmunidad.

3. ELIMINACIÓN.-

- a) Pacientes que no acepten, ni firmen la carta de consentimiento.

Químicos responsables;

5.9. INFORMACIÓN Y LINEAMIENTOS SOBRE LOS BENEFICIOS QUE OBTENDRÁ EL PACIENTE QUE ACEPTE INGRESAR AL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN.

Los animales microscópicos denominados ácaros del género Dermatophagoides, se encuentran dentro de las casas de los pacientes que son alérgicos a éstos, sobre todo en los colchones, almohadas, alfombras, cortinas, polvos de las casas y muñecos de peluche, habita dentro de los hogares en todo el mundo. Son los que más generan alergias respiratorias como la rinitis y asma alérgicos. Este estudio se realizará para obtener la uniformidad de la potencia biológica de las vacunas que usted recibirá en el tratamiento de su enfermedad, con el fin de que usted mejore en menos tiempo y se recupere totalmente de la misma.

El estudio se basa en la aplicación de pruebas cutáneas las cuales consisten en la introducción de pequeñas cantidades de los extractos de referencia y de los que se quiere estandarizar en la piel (cara interna del antebrazo), se observará el desarrollo de una reacción positiva; aparición de roncha y eritema en el área de aplicación. Los resultados se leerán de 15-20 minutos después de la aplicación del

alergeno. Las pruebas cutáneas que se realizarán son:

- * Punción; Se hace un pinchazo con una lanceta estéril en la cara externa de antebrazos donde previamente se encuentra una gota de alergeno.
- * Intradérmica; Se aplica 0.05ml del alergeno por vía intradérmica en la cara externa de brazos.

Para poder llevar a cabo nuestro estudio le pedimos que no ingiera medicamentos del tipo de los antihistamínicos y esteroides un mes antes de la fecha señalada para realizar el estudio, sin tratamiento previo con vacunas para alergia, que acuda bañado(a) y desayunado(a) el día en que se le cite para aplicarle las pruebas cutáneas (en la piel).

Si ha entendido lo que le solicitamos y esta de acuerdo, favor de leer y firmar la carta de consentimiento.

Atentamente,

5.10. CARTA DE CONSENTIMIENTO

México, D.F., a _____ de _____ de 19__.

Por medio de este documento, afirmo que se me ha explicado en que consiste este estudio y he entendido claramente las reglas del mismo, donde se me ha garantizado que de ninguna manera mi salud corre ningún peligro, por lo que estoy dispuesto(a) a que se me apliquen en los brazos las pruebas de alergología especializadas requeridas para esta investigación.

También se que con esto ayudaré de manera importante para que el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades alérgicas sea más eficiente y seguro.

Nombre del paciente: _____

No. de expediente: _____ edad: _____

Firma de aceptación

Testigo "A"

Testigo "B"

5.11. METODOLOGÍA

5.11.1. MATERIAL

Jeringas 1.0, 3.0 y 10ml

Jeringas de insulina

Lancetas calibradas 0.01cm

Frascos gotero estériles 5ml

Torundas de algodón

Regla

Pluma negra

Diurex ancho

5.11.2. REACTIVOS

Alcohol etílico

4.11.3. MATERIAL BIOLÓGICO

* Extracto referencia de Dermatophagoides
pteronyssinus

1,000 BAU/ml

3,000 BAU/ml

6,000 BAU/ml

9,000 BAU/ml

* Extracto referencia de Dermatophagoides farinae

1,000 BAU/ml

3,000 BAU/ml

6,000 BAU/ml

9,000 BAU/ml

* Extracto a estandarizar de Dermatophagoides pteronyssinus

1: 6,000 v/v

1: 9,000 v/v

1:12,000 v/v

1:15,000 v/v

* Extracto a estandarizar de Dermatophagoides farinae

1: 6,000 v/v

1: 9,000 v/v

1:12,000 v/v

1:15,000 v/v

5.11.4. BOTIQUIN

Estetoscopio

Baumanómetro

Torniquete

Agujas hipodérmicas del 21 y 25

Equipo para canalización

Suero fisiológico (salina y/o glucosada)

Adrenalina o Clorhidrato de epinefrina; inyectada
(amp.)

Cloropiramina; inyectada (amp.)

Antihistamínicos; oral e inyectados (amp.)

Aminofilina; inyectada (amp.)

Coricoesteroides, metil cortisona o metil
prednisolona; oral e inyectados (amp.)

5.11.5. REGISTRO DE RESULTADOS

ESTANDARIZACIÓN BIOLÓGICA DEL EXTRACTO ALERGÉNICO DE

Dermatophagoides pteronyssinus PARA INMUNOTERAPIA

PACIENTE: _____
No. DE EXPEDIENTE: _____ FECHA: _____
EDAD: _____ SEXO: _____ DX: _____
EVOLUCIÓN: _____

PRUEBA CUTÁNEA

Extracto alergénico: Dermatophagoides pteronyssinus
Glicerinado 1:20 v/v.

Aplicación: punción

Respuesta:

Roncha: Eritema:

Tiempo de lectura:

Realizó:

ESTANDARIZACIÓN BIOLÓGICA DEL EXTRACTO ALERGÉNICO
DE
Dermatophagoides pteronyssinus PARA INMUNOTERAPIA

PACIENTE: _____
No. DE EXPEDIENTE: _____ FECHA: _____
EDAD: _____ SEXO: _____ DX: _____
EVOLUCIÓN: _____

EXTRACTO A ESTANDARIZAR

Extracto: Dermatophagoides pteronyssinus

Lote: _____

Fecha de preparación: _____

Fecha de caducidad: _____

Aplicación: Intradermorreacción

1) 1:6000 v/v

Roncha:

Eritema:

2) 1:9,000 v/v

Roncha:

Eritema:

3) 1:12,000 v/v

Roncha:

Eritema:

4) 1:15,000 v/v

Roncha:

Eritema:

EXTRACTO DE REFERENCIA

Extracto: Dermatophagoides pteronyssinus

Concentración: 10,000 AU/ml

Lote: J98E8879

Fecha de caducidad: 10/01/2000

Conservador: Glicerina 50% v/v

Fabricante: Hollister-Stier, USA

Aplicación: Intradermorreacción

1) 1,000 BAU/ml

Roncha:

Eritema:

2) 3,000 BAU/ml

Roncha:

Eritema

3) 6,000 BAU/ml

Roncha:

Eritema:

4) 9,000 BAU/ml

Roncha:

Eritema:

PRUEBA CON FOSFATO DE HISTAMINA

PUNCIÓN

Fosfato de histamina: 1mg/ml

Roncha:

Eritema:

INTRADERMORREACCIÓN

Fosfato de histamina: 0.1mg/ml

Roncha:

Eritema:

Tiempo de lectura:

Realizó:

ESTANDARIZACIÓN BIOLÓGICA DE EXTRACTOS ALERGÉNICOS
DE
Dermatophagoides farinae PARA INMUNOTERAPIA

PACIENTE: _____
No. DE EXPEDIENTE: _____ FECHA: _____
EDAD: _____ SEXO: _____ DX: _____
EVOLUCIÓN: _____

PRUEBA CUTÁNEA

Extracto alergénico: Dermatophagoides farinae
Glicerinado 1:20 v/v.

Aplicación: Punción

Respuesta:

Roncha:

Eritema:

Tiempo de lectura:

Realizó:

ESTANDARIZACIÓN BIOLÓGICA DEL EXTRACTO ALERGÉNICO
DE
Dermatophagoides farinae PARA INMUNOTERAPIA

PACIENTE: _____
No. DE EXPEDIENTE: _____ FECHA: _____
EDAD: _____ SEXO: _____ DX: _____
EVOLUCIÓN: _____

EXTRACTO A ESTANDARIZAR

Extracto: Dermatophagoides farinae

Lote: _____

Fecha de preparación: _____

Fecha de caducidad: _____

Aplicación: Intradermorreacción

1) 1:6000 v/v

Roncha:

Eritema:

2) 1:9,000 v/v.

Roncha:

Eritema:

3) 1:12,000 v/v

Roncha:

Eritema:

4) 1:15,000 v/v

Roncha:

Eritema:

EXTRACTO DE REFERENCIA

Extracto: Dermatophagoides farinae

Concentración: 10,000 AU/ml

Lote: J98K4962

Fecha de caducidad: 10/01/2000

Fabricante: Hollister-Stier

Conservador: Glicerina 50% v/v

Aplicación: Intradermorreacción

1) 1,000 BAU/ml

Roncha:

Eritema:

2) 3,000 BAU/ml

Roncha:

Eritema

FALTA PAGINA

No.

145

INTRADERMORREACCIÓN

Fosfato de histamina: 0.1mg/ml

Roncha:

Eritema:

Tiempo de lectura:

Realizó:

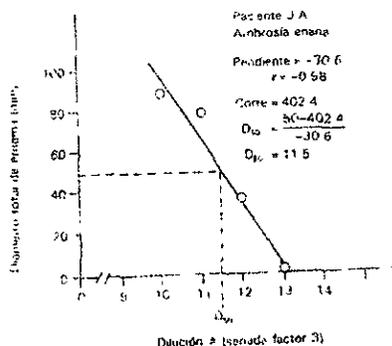
5.11.6. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

1. El eritema que se produce se delinea con pluma y se transfiere con un diurex al registro del paciente.
2. Se dibuja una línea a lo largo del eje longitudinal de la zona de eritema y luego otra en el punto medio de la primera línea y en un ángulo de 90° respecto a ella.
3. Los diámetros se miden y se suman para calcular la suma del eritema (E).
4. Para las múltiples sumas de eritema producidas por las varias diluciones de extracto, hacer una gráfica de regresión lineal y trazar la línea de mayor concordancia para cada paciente.
5. A partir de la gráfica calcular la dilución que produce una suma de 50mm de eritema (D_{50}).

La línea más aproximada se considera aceptable cuando cuatro diluciones seriadas difieren en un factor 3 de dilución y producen una línea con un coeficiente de correlación igual o por encima de 0.85 y una pendiente igual o por encima de 10.

La fórmula para calcular la dilución que produce un eritema total de 50mm (D_{50}) es:

$$D_{50} = 50 - (\text{intersección}) / \text{pendiente}$$



Diámetro total de eritema ΣE VS dilución X

De la D_{50} calculada para cada paciente, hacer un promedio de la D_{50} de todos los pacientes y asignar el valor correspondiente de Unidades alergénicas de acuerdo al siguiente cuadro:

Valores asignados de AU para estándares de referencia^{1, 16, 48, 53, 64, 83}

Dilución promedio para producir un eritema de suma de 50mm	Unidades de alergia/ml de estándar
5.0 a 6.9	10 AU
7.0 a 8.9	100 AU
9.0 a 10.9	1,000 AU
11.0 a 12.9	10,000 AU
13.0 a 14.9	100,000 AU

El valor de AU/ml obtenido nos indicará la cantidad de Unidades de alergia/ml que contiene el extracto de prueba a una dilución determinada.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- * Los ácaros: Dermatophagoides pteronyssinus y Dermatophagoides farinae, son la causa principal de la rinitis y asma alérgicas en el mundo.
- * El uso de extractos alérgicos estandarizados aumenta la seguridad y eficacia en el diagnóstico y tratamiento de padecimientos alérgicos, también permitirá el intercambio de información entre médicos.
- * La estandarización *in vitro* nos proporciona información sobre la composición definida de extractos alérgicos, en cambio, la estandarización biológica (*in vivo*) nos da a conocer la actividad biológica exacta de estos.
- * El método ID₅₀EAL, como el HEP determinan un espectro similar de actividad alérgica relativa, siendo el primero el método más exacto y representativo.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

1. Consequences of environmental treatment of AAAAI: the use of standardized allergen extracts. Position paper. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:583-586.
2. Adkinson, F. In vitro alternatives to skin testing. AAAI Annual meeting, California USA. 1994;35-43.
3. Adkinson, F.N. The radioallergosorbent test: uses and abuses. *J Allergy Clin Immunol* 1980; 65: 1-4.
4. Allergy yearbook 1984. Pharmacia Allergy and Diagnostics Division. Uppsala Suecia, 1984.
5. Allergy yearbook 1982. Pharmacia Diagnostics. Suecia, 1983.
6. Arlian, L.G., Rapp, C.M., Fernández-Caldas, E. Allergenicity of Euroglyphus maney and it's cross-reactivity with Dermatophagoides species. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 91:1051-1058.
7. Arlian, L.G., Bernstein, D., Bernstein, I.L., et al. Dermatophagoides species. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 90Part1:292-300.
8. Backman, A. Skin tests for epidemiologic studies. *Allergy* 1994; 49:493-494.
9. Backman, A., Belin, L., Dreborg, S., et al. Standardization of allergenic preparations. Review article. *Allergy* 1991; 46: 81-84.

10. Bonini, S., Maugrini, L., Rotiroti, G. Genetic and environmental factors in the changing incidence of allergy. *Allergy* 1994; 49:6-4.
11. Bousquet, J., Calvayrac, P., Guerin, B. Immunotherapy with a standardized Dermatophagoides pteronyssinus. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 76:734-743.
12. Busse, W.W. Current research and future needs in allergic rhinitis and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101Part2:S424-S426.
13. Burney, P. Epidemiology of asthma. *Allergy* 1993; 48:17-21.
14. Byron, K.A., O'Brien, R.M., Varigos, G.A., *et al.* Dermatophagoides pteronyssinus II-induced interleukin-4 and interferon- γ expression by freshly isolated lymphocytes of atopic individuals. *Clin & Exp Allergy* 1994; 24:737-742.
15. Church, M.K., EL-Lati, S. and Okayama, Y. Biological properties of human skin mast cells. *Clin and Exp Allergy* 1991; 21Suppl.3:1-9.
16. Creticos, P.S. Immunotherapy; A practical guide to current procedures. AAAI. USA, 1994.
17. Crimi, E., Votolini, S., Traise, C., *et al.* Local immunotherapy with Dermatophagoides extract in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 87:721-728.
18. Definition and classification of rhinitis. *Allergy* 1994; Suppl 19:5-34.

19. Dreborg, S., Frew, A. Position paper: Allergen standardization and skin tests. *Allergy* 1993; 48Suppl.14:49-82.
20. Drede, H.D., Stevens, E. Regulatory control and standardization of allergenic extracts. 3rd Int Paul-Ehrlich Seminar. Alemania, 1985.
21. Ebner, C., Feldner, H., Ebner, H., *et al.* Sensitization to storage mites in house dust mite (Dermatophagoides pteronyssinus) allergic patients. Comparison of a rural and an urban population. *Clin & Exp Allergy* 1994; 24:347-352.
22. Einarsson, R., Dreborg, S., Hammarström, L., *et al.* Monitoring of mite Dermatophagoides farinae allergen-specific IgG and IgG subclass distribution in patients on immunotherapy. *Allergy* 1992;47:76-82.
23. Ford, A., Seagroatt, V., Platts-Mills, T.A.E. A collaborative study on the first international standard of Dermatophagoides pteronyssinus (house dust mite) extract. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 75:676-685.
24. Geissler, W., Maasch, H.J., Winter, G. Kinetics of allergen release from house dust mite Dermatophagoides pteronyssinus. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77 Part.1:31.
25. Griffith, J. Allergen standardization. *Clin and Exp Allergy* 1993; 23 Suppl.3:23-26.

26. Gruchalla, R. Perioperative anaphylaxis. AAAAI. Annual Meeting. Washington, 1998;217-240.
27. Haida, M., Okudaira, H., Ogita, T., *et al.* Allergens of the house dust mite Dermatophagoides farinae immunochemical studies of four allergenic fractions. J Allergy Clin Immunol 1985; 75:686-692.
28. Hallas, T.E. The biology of mites. Allergy 1991; 46Suppl.11:6-9.
29. Harving, H., Hansen, L.G., Korsgaard, J., *et al.* House dust mite allergy and anti-mite measures in the indoor environment. Allergy 1991; 46Suppl.11:33-38.
30. Haugaard, L., Mosbech, H., Heing, J.H., *et al.* Treatment of patients allergic to house dust mites. Allergy 1991; 46Suppl.11:26-32.
31. Heing, J.H., Mosbech, H., Haugaard, L. Diagnosis of house dust mite allergy. Allergy 1991; 46Suppl.11:19-22.
32. Holgate, S.T. The mast cell and it's function in allergic disease. Clin and Exp Allergy 1991; 21Suppl.3:11-16.
33. Holgate, S.T., Church, M.K., Austen, K.F. Allergy. Ed. Gower Medical Publishing. Londres, 1993.
34. Howarth, P.H., Redington, A.E., Montefort, S. Pathophysiology of asthma. Allergy 1993; 48:50-56.

35. Johnsen, G.R., Abrahamsen, L., Stahl, P., *et al.* Aeroallergen analyses and their clinical relevance. *Allergy* 1991;46:492-501.
36. Jrsiwu, P. Anti-IgE syllabus. AAAAI. Annual Meeting. Washington, 1998;59-67.
37. Kaplan, A.P., Kuna, P., Reddigari, S.R. Chemokines as allergic mediators relationship to histamine releasing factors. Review article. *Allergy* 1994;49:495-501.
38. Kay, A.B. Biological properties of eosinophils. *Clin and Exp Allergy* 1991; 21Suppl.3:23-29.
39. King, T.P., Chairman, D.H., Lownstein, H., *et al.* Allergen nomenclature. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96:5-14.
40. Korsgaard, J., Iversen, M. Epidemiology of house dust mite allergy. *Allergy* 1991; 46Suppl.11:14-18.
41. Ledford, D. Indoor allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 94 Part 2:327-333.
42. Lemanske, R.F. A review of the current guidelines for allergic rhinitis and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101Part2:S424-S426.
43. Lind, P. Purification and partial characterization of two major allergens from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 76:753-761.
44. Lliopoulos, O., Proud, D., Adkinson, F., *et al.* Effects of immunotherapy on the early, late and

- rechallenge nasal reaction to provocation with allergen: changes in inflammatory mediators and cells. Dermatophagoides species. J Allergy Clin Immunol 1981; 87:855-866.
45. Löfkvist, T., Agrell, B., Dreborg, S., *et al.* Effects of immunotherapy with a purified standardized allergen preparation of Dermatophagoides farinae in adults with perennial allergic rhinoconjunctivitis. Allergy 1994; 49:100-107.
46. Lovinfosse, S., Charpin, D., Dornelas, A., *et al.* Can mite-specific IgE be used as a surrogate for mite exposure? Short communication. Allergy 1994; 49:64-66.
47. Margini, R.A. Inmunología e Inmunoquímica. Ed. Médica Panamericana, Argentina, 1989.
48. Mason, W.W., Word, W.A. Extractos estandarizados.
49. Mata, P., Charpin, D., Kaytandjian, N., *et al.* Standardization of house-dust sampling. Allergy 1994; 49:134.
50. May, J.C., Sih, J.T., Miller, J.R., *et al.* Optimization of parameters in protein nitrogen unit precipitation procedures for allergenic extracts. J Allergy Clin Immunol 1979; 63:87-97.
51. Meyer, C.H., Bond, J.F., Chen, M.S., *et al.* Comparison of the levels of the mayor allergens *Der p* and *Der p*II in standardized extracts of the

- house dust mite, Dermatophagoides pteronyssinus.
Clin & Exp Allergy 1994;24:1041-1048.
52. Michiko, H., Hirokazu, O., Tadaatsu, O., *et al.*
Allergens of the house dust mite Dermatophagoides
farinae immunochemical studies of four allergenic
fractions. J Allergy Clin Immunol 1985; 75:686-
692
53. Middelton, E., Reed, E.C., Ellis, E. Alergia.
Principios y práctica. 3ªed. Ed. Salvat. Español.
México, 1985.
54. Mosbech, H., Gravesen, S., Heing, J.H., *et al.*
Diagnostic procedures-exposure and environment.
Allergy 1991; 46Suppl.11:23-25.
55. Naclerio, R. Clinical manifestations of the
release of histamine and other inflammatory
mediators. J Allergy Clin Immunol 1999; 103:S382-
S384.
56. Naclerio, R., Solomon, W. Rhinitis and inhalant
allergens. JAMA 1997; 278:1842-1848.
57. Nelson, H.S., Iklé, D., Buchemeier, A. Studies of
allergen extract stability: The effects of
dilution and mixing. J Allergy Clin Immunol 1996;
98:382-388.
58. Nelson, H.S., Lahr, J., Buchmeier, A. Clinical
aspects of allergic disease; evaluation of
devices for skin prick testing. J Allergy Clin
Immunol 1998; 101Part1:153-156.

59. Norman, P.S. Why standardized extracts?. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77:405-406.
60. Nuñez-Nuñez, M.E., Torres, C., Pedroza, A., *et al.* Pruebas *in vitro* e *in vivo* a ácaros. *Rev. Alergia Méx.* 1992; XXXIX:81-85.
61. Olsen, O.F., Mosbech, H., Elbek, R., *et al.* Social, political, economic and health house dust mites. *Allergy* 1991; 46Suppl.11:39-44.
62. Pepys, J. "Atopy": A study in definition. *Allergy* 1994; 49:397-399.
63. Platts-Mills, T.A.E. The role of allergens in allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101:S364-S366.
64. Platts-Mills, T.A.E., Chapman. Allergen standardization. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87:621-625.
65. Platts-Mills, T.A.E., Vervloet, D., Thomas, W.R., *et al.* Indoor allergens and asthma. Report of the 3rd International Workshop. 1997; 100 Part 1:S2-S18
66. Prieto, L., Sienra, J., Del Río, B., *et al.* Pruebas cutáneas a diferentes especies de ácaros en niños asmáticos de la ciudad de México. *Rev Alergia Méx* 1995; XLII:49-52.
67. Punnonen, J., Aversa, G., Cocks, B.G., *et al.* Role of interleukin-4 and interleukin-13 in synthesis of IgE and expression of CD23 by human B cells. *Allergy* 1994; 49:576-586.

68. Ramírez, F.W., Olive, P.A. Estandarización y caracterización de los extractos alérgicos. *Rev Alergia Mex* 1988; XXXV:93-97.
69. Reed, C.E. Quality assurance and standardization of allergy extracts in allergy practice. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84:4-7.
70. Roches, A.D., Parados, L., Menardo, J., *et al.* Immunotherapy with a standardized Dermatophagoides pteronyssinus extract. VI Specific immunotherapy prevents the onset of new sensitizations in children. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:450-453.
71. Roitt, I., Borostoff, J., Male, D. *Immunology*. 4thed. Ed. Mosby. España, 1996.
72. Salazar, M.M., Cueva, V.J., Gordillo, H.D., *et al.* La alergia en la teoría y en la práctica. Ed. Librería de medicina. México, 1958.
73. Schou, C., Lind, P. The antigenicity of house dust mites. *Allergy* 1991; 46Suppl.11:10-13.
74. Sears, M.R. The definition and diagnosis of asthma. *Allergy* 1993; 48:12-16.
75. Smith, T.F., Kelly, L.B., Heymann, P.W. Natural exposure and serum antibodies to house dust mite of mite allergic children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 76:782-788.
76. Spieksma, F. Domestic mites: Their role in respiratory allergy. *Clin and Exp Allergy* 1991; 21:655-660.

77. Stewart, G.A., Buther, A., Lees, K. Immunochemical and enzymatic analyses of extracts of the house dust mite Dermatophagoides pteronyssinus. J Allergy Clin Immunol 1986; 77 Part. 1:14-24.
78. Stewart, G.A., Kollinger, M.R., King, C.M., *et al.* A comparative study of three serine proteases from Dermatophagoides pteronyssinus and D. Farinae. Allergy 1994; 49:450-453.
79. Stites, D.P., Terr, A.I., Parslow, T.G. Inmunología básica y clínica. 8ª ed. Ed. El Manual Moderno. México, 1996.
80. Tabar, A.I., García, B.E., Rodríguez, A., *et al.* A prospective safety monitoring study of immunotherapy with biologically standardized extracts. Allergy 1993; 48:450-453.
81. Thomas, W.R. Mite allergens groups I-VII. A catalogue of enzymes. Clin & Exp Allergy 1993; 23:350-353.
82. Trescec, A., Kolevska, T., Cvoriscec, B., *et al.* Characterization and partial purification of the Croatian national standard Dermatophagoides pteronyssinus allergen extract. Allergy 1993; 48:454-459.
83. Turkeltaub, P.C. The allergy unit, clinical relevance.

84. Uranga, F.G., Hernández, C.L., Gómez, M. Rinitis alérgica. Revisión. Rev Alergia Mex 1994;XLI:25-28.
85. Valladares, S.A., Silva, G.R. Estandarización de alergenos por la técnica de inhibición del RAST, unidades HEP y determinación de PNU. Tesis de Licenciatura. ENEP "Zaragoza". UNAM, 1991.
86. Venge, P. Eosinophil and neutrophil granulocytes. Allergy 1993; 48:39-47.
87. Venge, P. and Hakansson, L. Current understanding of the role of the eosinophil granulocyte in asthma. Clin And Exp Allergy 1991; 21Suppl.3:31-37.
88. Walker, C., Wirchow, J-C. T-cells and endothelial cells in asthma. Allergy 1993; 48:24-31.
89. Weber, R.M. Immediate hipersensitivity testing for aeroallergens.
90. White, M. Mediators of inflammation and the inflammatory process. J Allergy Clin Immunol 1999; 103:S377-S381.
91. WHO/IUIS. Allergen nomenclature. Clin. & Exp. Allergy 1995; 25:27-37.
92. Witteman, A.M., Stapel, S.O., Perdok, G.J. The relationship between RAST and skin test results in patients with asthma or rhinitis. A quantitative study with purified major allergens. J Allergy Clin Immunol 1996; 97Part 1:16-25.

93. Wraith, D.G., Cunnington, A.M., Seymour, W.M. The role and allergenic importance of storage mites in house dust and other environments. Clin Allergy 1979; 9:545-561.
94. Yashueda, H., Saito, A., Akiyama, K., *et al.* Estimation of *Der p* and *der fII* quantities in the reference preparations of Dermatophagoides mite extracts. Clin & Exp Allergy 1994; 24:1030-1035.
95. Yunginger, J.W. Allergen standardization: 1984. J Allergy Clin Immunol 1984; 73:316-317.
96. Yunginger, J. W., Nelson, H.S. Quality control of immunotherapy. Annual Meeting AAAI. California 1991; 1-6.