



11236

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

**HOSPITAL DE ALTA ESPECIALIDAD "DR. GAUDENCIO GONZALEZ GARZA"
CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"**

**CITOLOGIA DE LA MUCOSA NASAL EN POBLACION
PEDIATRICA CON RINITIS ALERGICA PERSISTENTE**

T E S I S

**PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALISTA EN OTORRINOLARINGOLOGIA**

**P R E S E N T A
VIVIAN PASTRANA GONZALEZ**

**ASESOR:
DRA. BERTHA BEATRIZ MONTAÑO VELAZQUEZ**

**COASESOR:
DRA. SARA HUERTA YEPEZ**

MEXICO, D.F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

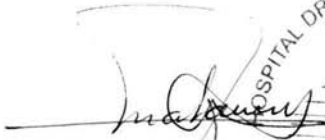


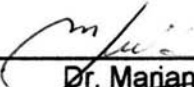
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

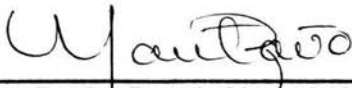
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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.


Dr. José Luis Matamoros Tapia
Jefe de División de Enseñanza e Investigación Médica
Hospital de Alta Especialidad "Dr. Gaudencio González Garza"
Centro Médico Nacional "La Raza"
DIVISION
EDUCACION E INVESTIGACION EN SALUD


Dr. Mariano Hernández Goribar
Jefe del Servicio de Otorrinolaringología
Hospital de Alta Especialidad "Dr. Gaudencio González Garza"
Centro Médico Nacional "La Raza"


Dra. Bertha Beatriz Montaña Velázquez
Investigador Principal
Médico Adscrito a la Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica
Hospital de Alta Especialidad "Dr. Gaudencio González Garza"
Centro Médico Nacional "La Raza"

COLABORADORES:

DRA. VILMA CAROLINA BEKKER MENDEZ¹

DR. RAMON CAMPILLO NAVARRETE²

QBP. MA. DEL REFUGIO CISNEROS SALAZAR²

MARIA DOLORES MOGICA MARTINEZ²

ROBERTO SALAZAR SANTIAGO³

¹SERVICIO DE ALERGIA E INMUNOLOGÍA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA".

²UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN INMUNOLOGIA E INFECTOLOGIA, HOSPITAL DE INFECTOLOGIA, CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"

³LABORATORIO DE URGENCIAS, HOSPITAL GENERAL, CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA".

AGRADECIMIENTOS.

A Dios, por darme la oportunidad.

**A Betty y Sara por su inigualable ayuda,
su esfuerzo incondicional
y su amistad.**

Al Dr. Arturo Ruiz por su apoyo, siempre.

**A mi familia, en especial a mis padres y mi hermana Diana,
por su impulso a través de la distancia.**

**A Eduin por compartir conmigo los buenos y
malos momentos durante la realización de este trabajo
y con su amor llenarlos de esperanza.**

DEDICATORIA.

A Dios.

A mi familia.

A mi esposo, Eduin.

A Colombia, tierra de valientes corazones.

A los colombianos dentro y fuera de la patria.

INDICE

Resumen	7
Antecedentes	8
Objetivo	17
Material y métodos	18
Resultados	23
Discusión	26
Conclusión	33
Anexos	34
Bibliografía	37

RESUMEN

CITOLOGIA DE LA MUCOSA NASAL EN POBLACION PEDIATRICA CON RINITIS ALERGICA PERSISTENTE.

OBJETIVO. Identificar las características citológicas de la mucosa nasal (epitelial, inflamatoria y apoptótica) y la viabilidad de las células en población pediátrica con rinitis alérgica persistente, obtenida por lavado nasal.

MATERIAL Y METODOS: Se realizó un estudio clínico, transversal analítico. Aceptaron participar de forma consecutiva 12 pacientes de la consulta externa de los servicios de Otorrinolaringología y Alergia e Inmunología Clínica, con diagnóstico de primera vez de rinitis alérgica (RA) persistente de 10 a 16 años, sin enfermedad infecciosa, inflamatoria u obstructiva de nariz y senos paranasales, exposición a humo de tabaco, inmunoterapia previa, epistaxis, reflujo gastroesofágico, administración de esteroides y antileucotrienos cuatro semanas previas o antihistamínicos dos semanas antes del estudio, embarazo, hipertensión arterial, diabetes o alteraciones de la coagulación; y como controles 5 sujetos sanos sin sintomatología nasal sugestiva de RA. Se eliminó un paciente para la detección de caspasa-3 activa por muestra insuficiente en la laminilla. Se identificaron las características demográficas y la intensidad y severidad de los síntomas nasales con cuestionario. El lavado nasal se realizó para obtener células de la mucosa nasal irrigando 20 ml de solución salina en cada fosa nasal, la muestra se conservó en frío hasta su procesamiento, luego se sometió a centrifugación, eliminación del sobrenadante, homogeneización, montaje en laminillas de citocentrífuga y fijación en acetona fría. Se identificó la viabilidad de las células con tinción de azul de Tripán, la morfología con Giemsa y eosina amarillenta y de la apoptosis con detección de caspasa-3 activa por inmunohistoquímica, todas las laminillas se observaron en microscopio de luz. Se utilizó estadística descriptiva con medidas de tendencia central y dispersión de acuerdo a la distribución de los datos y para la variabilidad intra e interobservador se calculó el coeficiente de correlación r Spearman y para la diferencia entre grupos U de Mann Whitney, se consideró como significativa una $p \leq 0.05$. El estudio se llevó a cabo de acuerdo a las Leyes de Investigación en seres humanos y se consideró de riesgo mínimo según la ley General de Salud.

RESULTADOS: Participaron 12 estudiantes con mediana de edad de 12 años ($P_{25}10 - P_{75}13.7$) con alergia a ácaros ácaros (91.6%), hongos (33.3%), gato (33.3%), polvo casero (25%), cucaracha (8.3%), perro (8.3%) y a alimentos (8.3%). La mediana de la intensidad y severidad de los síntomas fue de 5.5 ($P_{25}3-7.5$), en los alérgicos y de 2 ($P_{25}1-3.5$), en los controles. La viabilidad celular fue de 72%. En pacientes con RA los eosinófilos se encontraron de un 11 a 80% y las células epiteliales 10 a 32%. En los pacientes con rinitis alérgica las células apoptóticas presentaron una mediana de 2.0 ($P_{25}0.25-7.5$), y en los sanos la mediana fue de 8 ($P_{25}6-7.5$ 13). La intensidad y severidad de los síntomas nasales en relación con la frecuencia de apoptosis mostró una correlación de -0.29 (r de Spearman, $p=0.35$). La apoptosis en las células de la mucosa nasal de los pacientes con RA fue menor comparado con los controles sanos (U de Mann Whitney, $p \leq 0.01$).

CONCLUSION. En este estudio se demostró que en pacientes con RA persistente, el lavado nasal es una técnica útil para estudios citológicos y proporciona una adecuada cantidad de células viables, con la cual logramos identificar un predominio de eosinófilos (11 al 80%) y una menor cantidad de células epiteliales (10 a 32%). Además, en estos pacientes la presencia de apoptosis fue significativamente menor al compararla con los controles sanos, ésta disminución no se relacionó con la intensidad y severidad de los síntomas. No se encuentran estudios reportados en la literatura de detección de apoptosis en pacientes con RA en muestras de lavado nasal ni de la detección de caspasa-3 activa para determinar apoptosis.

ANTECEDENTES

RINITIS ALERGICA (RA)

Es una enfermedad inflamatoria de la mucosa nasal mediada por IgE, en respuesta a uno o más alérgenos, que afecta la calidad de vida por su asociación con otras enfermedades del tracto respiratorio, por el desgaste económico y el ausentismo escolar y laboral que conlleva ¹. Se estima que afecta el 25% de la población adulta y el 40% de la población infantil ², además corresponde al 50% de las consultas del otorrinolaringólogo y a un 2.5 % del médico general ³.

La RA se ha clasificado tradicionalmente como estacional o perenne si los síntomas aparecen ante la exposición a alérgenos propios de determinadas estaciones o si estos ocurren como resultado de la exposición a alérgenos con poca o nula variación estacional, respectivamente ¹. La Organización Mundial de la Salud clasifica la RA en rinitis alérgica intermitente si los síntomas se presentan a) por menos de 4 días a la semana y b) por menos de 4 semanas; o persistente si los síntomas se presentan a) por más de 4 días a la semana y b) más de 4 semanas al mes. Además se subdivide en leve o moderada-severa según la afección de la calidad de vida del paciente, es leve si no hay a) alteraciones del sueño, b) deterioro de las actividades diarias, horas libres o deportes, c) deterioro en la escuela o el trabajo y d) síntomas molestos; es moderada-severa si están presentes uno o más de los síntomas anteriores ^{4,5}.

La respuesta inmunológica se presenta en una fase temprana caracterizada por prurito, rinorrea y estornudos, la cual ocurre pocos minutos después de la exposición al alérgeno y una tardía

caracterizada por obstrucción nasal, malestar, fatiga e irritabilidad que ocurre aproximadamente 48 horas después de la exposición ¹.

El diagnóstico de RA se sospecha con la historia clínica y con determinaciones de IgE sérica total o específica, de eosinofilia en sangre periférica y del porcentaje de eosinófilos en la citología del moco nasal (anexo 1), éste se hace habitualmente con hisopo, sin embargo existen otras técnicas para la citología reportadas en pocos estudios ^{6,7,8,9}. El estándar de oro para el diagnóstico son las pruebas cutáneas de hipersensibilidad inmediata (PRICK) o la realización de pruebas *in vitro* como son RAST (Radioalergosorbent test), AlaSTAT (Microplate allergen-specific IgE estándar scoring), MAST (Inmunoquimioluminiscence Allergen System Test), entre otras ^{3,10}.

Existen diversos cuestionarios que evalúan los síntomas de la rinitis alérgica, pero la mayoría se relacionan con la calidad de vida ^{11,12,13}. Se ha identificado un cuestionario para la evaluación de la intensidad y frecuencia de los síntomas en la rinitis alérgica perenne en población pediátrica mexicana (ver tabla 1) ¹⁴.

El tratamiento comprende evitar la exposición al alérgeno, la administración de antihistamínicos, esteroides tópicos y sistémicos, estabilizadores de mastocitos, vasoconstrictores α adrenérgicos, anticolinérgicos, los antileucotrienos y la inmunoterapia ^{1,2,3}.

CITOLOGIA DE LA MUCOSA NASAL.

El estudio citológico de la mucosa nasal es un paso esencial para el mejor entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en afecciones crónicas de la nariz. El desarrollo de una técnica útil, no invasiva y reproducible para obtener células es un prerrequisito para el análisis ¹⁵. Se han reportado diversas técnicas como la utilización de biopsia, hisopo, lavado, curetaje y cepillado nasal.

La biopsia nasal, es la obtención de un fragmento de tejido del borde inferior del cornete inferior con anestesia previa, que permite el estudio tanto de la capa epitelial como subepitelial, sin embargo, es un método invasivo, con riesgo de infección y sangrado, además que no permite evaluar células de diversas áreas de la mucosa nasal en una sola toma ^{16,17}. La utilización de hisopo de algodón se emplea utilizando movimientos de rotación y raspado de la mucosa nasal a nivel del cornete inferior; aunque es fácil de realizar, no invasiva y reproducible, presenta un gran acumulo de moco con células dispersas en forma heterogénea que dificulta su identificación ^{18,19,20}.

El curetaje se realiza mediante raspado de la mucosa nasal con una cureta de plástico (cureta-probe) a nivel de la superficie medial del cornete inferior en dos o tres ocasiones. Es una técnica reproducible, obteniendo una adecuada cantidad de células con pocas molestias y puede realizarse en niños ²¹. El cepillado nasal consiste en introducir un pequeño cepillo de nylon en el interior de la fosa nasal con movimientos de rotación y traslación a través de superficie mucosa en el tercio medio y posterior del cornete inferior, previa aplicación de anestésico tópico y vasoconstrictor ^{15,22,23}. No es invasivo, produce pocas molestias, se obtienen células de áreas más extensas ^{22,23},

permite identificar diferentes tipos celulares y es fácil de realizar en niños ^{15,23} sin embargo, este método puede producir mayor dificultad en la identificación de las células al dañarse por el propio raspado.

El lavado nasal se realiza con el paciente sentado, ligeramente inclinado hacia delante y se le instruye para respirar por la boca durante el procedimiento al introducir cuidadosamente 5 cm de una sonda de alimentación número 8 en la fosa nasal. Se instilan lentamente 10 ml de solución salina estéril en la nasofaringe con una jeringa de 12 ml conectada al extremo proximal del tubo. La solución es inmediatamente aspirada dentro de la jeringa y luego lentamente se re-instila y se aspira (método modificado de Greiff y Grünberg). Otro método es instilar 5 ml de solución en una cavidad nasal con el paciente teniendo el cuello extendido 30 grados y permaneciendo así por 10 segundos, después de los cuales flexiona el cuello y expelle el contenido en un frasco contenedor (método de Nacleiro) ²⁴. El lavado nasal es un método seguro, bien tolerado y reproducible, con adecuada conservación de la integridad celular, que se puede usar para examinar la vía aérea superior en grandes poblaciones de individuos ²⁵, sin embargo, estudios comparativos con cepillado nasal han mostrado que este último refleja mejor los eventos celulares que ocurren en la capa epitelial de la mucosa nasal ^{26,27}.

Existen pocos estudios que han determinado las características citológicas de la mucosa nasal. En la mucosa nasal de pacientes con rinitis alérgica sintomáticos, se ha encontrado un incremento en el número de eosinófilos, basófilos, neutrófilos y células caliciformes ^{1,28,29}. La presencia de los eosinófilos es la característica predominante y se observa a los 30 minutos después de la exposición

al alergeno ^{16,30}. En pacientes con RA persistente se ha encontrado daño en el epitelio nasal que consiste en incremento de las células epiteliales con citoplasma vacuolado (acompañadas frecuentemente de eosinófilos), así como en la amplitud de los espacios intercelulares ³¹. Un estudio citológico con hisopo y tinción de Giemsa, mostró la presencia de eosinófilos positivos en un 25 % de 100 pacientes con RA ⁶. En estudios realizados con biopsia e inmunohistoquímica, se encontró tres veces mayor cantidad de mastocitos en pacientes con rinitis alérgica perenne que en los controles sanos ⁷; ésta técnica detecta la presencia de mastocitos en forma mas o menos adecuada debido a que la presencia de degranulación de los mismos los hace menos sensible a las tinciones convencionales. En relación a pacientes con RA persistente y no alérgica, en los primeros identificaron en biopsias e inmunohistoquímica, la acumulación de eosinófilos y mastocitos así como pérdida de la integridad epitelial ⁸, y en otro estudio realizado con la misma técnica en pacientes con RA estacional, se encontró acumulación de eosinófilos y mastocitos después de la exposición al alergeno ⁹.

En estudios que compararon la respuesta de pacientes alérgicos con pruebas de reto nasal, mediante cepillado y biopsia encontraron que si se toman en repetidas ocasiones, estas pruebas son complementarias para el estudio de la dinámica de los eosinófilos en la reacción alérgica; en el cepillado nasal la migración de eosinófilos hacia el epitelio de la mucosa se notó en forma más precoz que la biopsia debido a la rápida migración de los mismos desde los vasos sanguíneos subepiteliales a la superficie epitelial ¹⁶.

En pacientes con RA, la obtención de muestras de la mucosa nasal con cureta mostró una mayor correlación clínica con el estado de la rinitis que con cepillado ²¹. En un estudio realizado en 117 niños con rinosinusitis aguda el cepillado nasal fue útil para determinar el origen infeccioso mediante la relación neutrófilos/ eosinófilos y para la obtención de cultivos con pocas molestias tanto en niños alérgicos como no alérgicos ³².

Se ha descrito en pacientes con rinitis alérgica disminución de la apoptosis en los eosinófilos en sangre periférica ³³ y pólipos nasales disminución a nivel de material de biopsia ³⁴. También se ha encontrado disminución de la apoptosis en eosinófilos en sujetos con dermatitis atópica ³⁵. Se ha sugerido que esto puede condicionar la eosinofilia y el aumento de la respuesta inflamatoria de tipo inmunológico. En pacientes asmáticos se ha relacionado la disminución de la apoptosis en eosinófilos en expectoración y en bronquios con la severidad de los síntomas ^{36,37,38}.

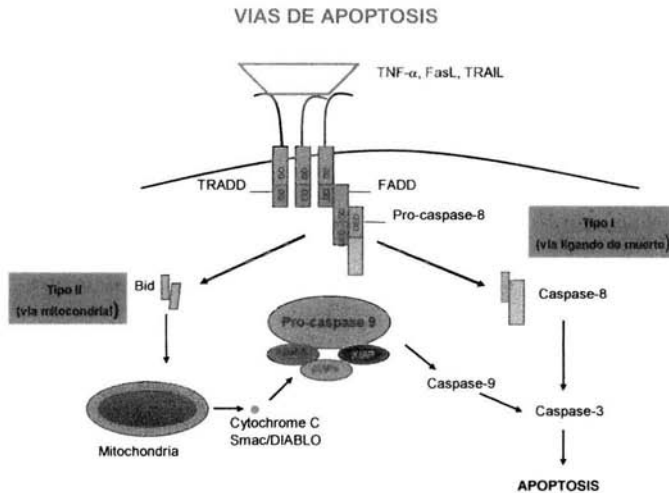
Las células pueden morir por dos mecanismos principales: necrosis o apoptosis. La necrosis es la muerte de células a través de daño extremo, liberando sus componentes alrededor del tejido lesionado y con atracción de células inflamatorias ³⁹. La apoptosis o muerte celular programada, es un mecanismo fisiológico de suicidio, donde las células mueren naturalmente para participar en la morfogénesis, ontogenia, fisiología y homeostasis. Las células presentan condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos que se eliminan por fagocitos adyacentes sin provocar respuesta inflamatoria ⁴⁰. Es un proceso en el que participan en cascada un grupo de cistein-proteasas, con especificidad sobre

residuos de aspartato, conocidas como caspasas, las cuales se encuentran inactivas en el citosol en forma de dímeros y para ser activadas requieren ser cortadas.

Existe una vía extrínseca y una intrínseca por la cual la célula puede sufrir apoptosis. La *vía extrínseca* (tipo I o ligando de muerte) se activa al unirse receptores citosólicos de la familia del TNFR (TNFR1, DR5/DR4 y Fas) a sus respectivos ligandos (TNF, TRAIL y FasL) del exterior de la célula. En general los receptores citosólicos contienen dominios de muerte (DD) que se unen a proteínas adaptadoras FADD y estas tienen un dominio efector (DED) que se une a su vez a las procaspasa-8 formando un “complejo inductor de la señalización de muerte” que induce el rompimiento de la procaspasa-8 a caspasa-8 activa y allí se inicia la cascada de caspasas. La *vía intrínseca* (tipo II o mitocondrial) depende de la permeabilización de la membrana mitocondrial ^{41,42}. Involucra a la caspasa-9 que se encuentra unida a dominios denominados CARD (death-fold caspase recruitment domain) y APAF-1 (protease activating factor-1); el complejo de estas proteínas forman el apoptosoma presente en el citosol, pero que al activarse por acción del citocromo-c se activa la caspasa-9 y consecutivamente la cascada de las caspasas.

Las vías extrínseca e intrínseca confluyen en una sola al activar la caspasa-3 a partir de la cual el proceso de apoptosis se hace irreversible (ver figura 1).

Figura 1. Vía de caspasas para activación de apoptosis.



La familia de Bcl-2 regula el proceso de permeabilización mitocondrial mediante proteínas antiapoptóticas y proteínas proapoptóticas. Otras proteínas pueden promover apoptosis por mecanismo independiente a activación de caspasas, estas son EndoG y AIF (apoptosis inducing factor) y Smac/DIABLO y Omi/Htra2 que interfiere con IAP (inhibitor of apoptosis protein).

Existen diversas técnicas de laboratorio para la determinación de apoptosis. Inicialmente la célula apoptótica se expone a fosfatidilserina en la superficie que puede determinarse por anexina V. La actividad de las caspasas puede ser determinada directamente o con anticuerpos específicos contra los productos de su proteólisis. El rompimiento del DNA celular puede determinarse por electroforesis o TUNEL (terminal-deoxinuceotidyl-tranferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling).

Existen pocos estudios enfocados a la identificación y cuantificación de células epiteliales, inflamatorias ^{24,25} y apoptóticas en sujetos con enfermedades como la rinitis alérgica y debido a que el lavado nasal se considera un método no invasivo, bien tolerado y fácil de realizar y además permite el estudio de una fase celular y soluble con adecuada conservación de la integridad celular, en el presente proyecto se pretendió obtener información para la identificación de la citología de la mucosa nasal (epitelial, inflamatoria y apoptótica) y su viabilidad en población pediátrica con rinitis alérgica persistente obtenida por lavado nasal, para cultivos y utilizarla como referencia para estudios de diagnóstico o tratamiento y proponer la realización de esta técnica en nuestro servicio en forma rutinaria y sustentar otros proyectos de investigación.

OBJETIVO.

Identificar las características citológicas de la mucosa nasal (epitelial, inflamatoria y apoptótica) en población pediátrica con rinitis alérgica persistente, obtenida por lavado nasal.

Identificar la viabilidad de las células epiteliales en población pediátrica con rinitis alérgica persistente, obtenida por lavado nasal.

MATERIAL Y METODOS

Se realizó un estudio clínico, transversal analítico y prospectivo en 12 sujetos con mediana de edad de 12.0 años (P₂₅10 –P₇₅ 13.7) de 10 a 16 años de edad, 8 (67%) de sexo masculino y 4 (33%) de sexo femenino, todos estudiantes, con diagnóstico de rinitis alérgica persistente, confirmado clínicamente (anexo 1) y por pruebas cutáneas por el método de *prick* a los alérgenos inhalables más comunes como (*Dermatophagoides sp*, polvo casero, capriola, desechos de perro y gato, cucaracha y hongos). No se incluyeron pacientes con patología infecciosa, inflamatoria u obstructiva de nariz o senos paranasales, patología adenoamigdalina, epistaxis en las dos semanas previas al estudio, asma, ingesta en las 4 semanas previas de esteroides o antileucotrienos y de dos semanas previas de antihistamínicos, vasoconstrictores o anti-inflamatorios no esteroideos, exposición a humo de cigarro, inmunoterapia previa, embarazo, hipertensión arterial, diabetes o alteraciones de la coagulación. Se eliminó un paciente en el análisis de detección de caspasa-3 por muestra insuficiente de células. Se estudiaron a 5 sujetos como controles (residentes de los servicios de Otorrinolaringología y Audiología) con mediana de edad 28 años (P₂₅27-P₇₅.28.5), de 27 a 29 años; 4 hombres y 1 mujer, sin sintomatología sugestiva de enfermedad alérgica, obstructiva o infecciosa.

DESCRIPCION GENERAL DEL ESTUDIO.

Con consentimiento informado se capturaron de forma consecutiva a los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión, identificando las características principales de los sujetos. Se identificó la severidad de los síntomas nasales (obstrucción nasal, prurito, rinorrea y

estornudos) mediante cuestionario a través de entrevista e inmediatamente se realizó lavado nasal para obtención de células de la mucosa para la identificación de la viabilidad, la morfología de las células epiteliales e inflamatorias con la tinción de Giemsa y de eosina amarillenta y apoptóticas con inmunohistoquímica para caspasa-3 activa (ver anexo 2).

PROCEDIMIENTOS.

Evaluación de la intensidad y severidad de los síntomas nasales.

Se aplicó cuestionario para identificar la presencia de obstrucción nasal, prurito, rinorrea y estornudos con una escala del 0 (ninguna), 1 (leve), 2 (moderado) y 3 (severo), obteniendo un puntaje global de 0 a 12 puntos (ver tabla 1)¹⁴.

Tabla 1. Cuestionario de síntomas nasales.

Escala	0	1	2	3
<i>¿Dificultad para respirar a través de la nariz?</i>	<i>Ninguna</i>	<i>Leve</i>	<i>Difícil</i>	<i>Muy difícil o imposible</i>
<i>Con qué frecuencia tiene comezón en la nariz?</i>	<i>Ninguna</i>	<i>Ocasional</i>	<i>Frecuente</i>	<i>Persistente o todo el día</i>
<i>¿Cuánto moco escurre por la nariz?</i>	<i>Ninguna</i>	<i>Ocasional</i>	<i>Frecuente</i>	<i>Persistente o todo el día</i>
<i>¿Cuántas veces en el día ocurren estornudos?</i>	0	1 a 4	5 a 9	Igual o mayor a 10

Nota: Ninguna, obstrucción nasal que permite respirar a través de la nariz sin necesidad de abrir la boca. Leve, aunque hay dificultad para respirar por la nariz no hay necesidad de abrir la boca. Difícil, ocasionalmente necesita respirar con la boca abierta. Muy difícil o imposible, tiene que respirar todo el tiempo con la boca abierta. Los estornudos que ocurren en un día se refiere al número de ellos en un episodio.

TOTAL _____

Lavado nasal

Se realizó con el paciente sentado y ligeramente inclinado hacia delante, con la cabeza flexionada, se aplicaron 20 cm de solución fisiológica al 0.09% con jeringa de 20 cm y el protector de plástico de aguja de punción (Punzocat no.16) con longitud de 1.5 cm, en cada fosa nasal y se recolectó la muestra en tubos de falcon de 50 mL transportándose en hielo.

Procesamiento de la muestra.

La muestra se centrifugó a 1500 rpm durante 7 minutos, utilizando una citocentrífuga (SORVALL SUPER T21), se retiró el sobrenadante dejando aproximadamente 600 μ L, se homogenizó y se fraccionó en cuatro alícuotas iguales y se montaron laminillas de portaobjetos en citocentrífuga (T-18, Sol-Bat) a 1700 rpm por 10 minutos y se fijaron en acetona 20 min a -20°C . Antes de la preparación en laminillas se determinó la viabilidad de las células con Azul de Tripán en la cámara de Neubauer.

Tinción

El colorante de Giemsa diluido en proporción de 1:20 en buffer de fosfatos, se colocó a la muestra por 35 minutos, se enjuagó con buffer de fosfatos y se dejó secar a temperatura ambiente. Para la tinción de eosina amarillenta se sumergió la laminilla en el colorante durante 20 min, después en alcohol acetona durante 60 seg y luego se introdujo en azul de metileno durante cinco minutos y se dejó secar a temperatura ambiente; entre cada uno de estos pasos la laminilla se

enjuagó con agua de la llave suavemente. Las muestras se observaron en microscopio de luz a 100x (Olimpus,Japan).

Imunohistoquímica

Caspasa-3 activa

La actividad de peroxidasa endógena se bloqueó con una mezcla de metanol:agua oxigenada 30% por 25 min en agitación, como recuperador de antígenos, las laminillas se sumergieron en solución de citrato de sodio 0.1 M pH 6 durante 25 min en baño de María a ebullición y se usó suero normal de cabra al 10% en PBS como bloqueador por una hora a temperatura ambiente. Las laminillas se incubaron en cámara húmeda a temperatura ambiente toda la noche con un anticuerpo anticaspasa-3 activa (p20 L18, sc-1225. Santa Cruz Biothecnology, Inc. Santa Cruz, Cal.USA) diluido 1:250. Como segundo anticuerpo se utilizó "kit" large volume LSAB+, peroxidase (CAt No K0690, DAKO, Carpintería, CA, USA) incubando 30 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. Entre incubaciones las laminillas se lavaron tres veces por inmersión de cinco minutos en PBS en agitación.

Las laminillas se revelaron con DAB y agua oxigenada al 30% (DAKO liquid DAB+, large volume substrate-chromogensolution, Cat No. K3468, DAKO). Las laminillas se lavaron con agua destilada y se contratiñeron con hematoxilina por 45 segundos. Finalmente se deshidrataron con etanol a concentraciones crecientes y xilol y se montaron con resina para analizarlos con microscopio de luz.

Analisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva con medidas de tendencia central y dispersión de acuerdo a la distribución de los datos y para la variabilidad intra e interboservador se calculó el coeficiente de correlación r Spearman y para la diferencia entre grupos U de Mann Whitney, considerando como significativa una $p \leq 0.05$. Para el tamaño de la muestra se utilizó la fórmula para una proporción en una muestra considerando una proporción del 25% con un nivel de confianza del 95%.

Debido a que la citología nasal es un procedimiento que se realiza para diagnóstico en forma rutinaria y la utilización del lavado no presenta ningún riesgo, la investigación presente se consideró con riesgo mínimo de acuerdo a la Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos en materia de Investigación para Salud.

RESULTADOS

Sujetos. Participaron 12 sujetos con diagnóstico de RA con mediana de edad de 12.0 años ($P_{25}10-P_{75}13.7$) de 10 a 16 años de edad, todos estudiantes, ocho hombres y cuatro mujeres. Se estudiaron a 5 sujetos como controles (residentes de los servicios de Otorrinolaringología y Audiología) con mediana de edad 28 años ($P_{25}27-P_{75}28.5$), de 27 a 29 años; 4 hombres y 1 mujer, sin sintomatología sugestiva de enfermedad alérgica, obstructiva o infecciosa nasal. Los pacientes en las pruebas cutáneas (prick) fueron positivos a: ácaros 11 (91.6%) seguido de hongos y gato 4 cada uno (33.3%), tres a polvo casero (25%), uno a cucaracha (8.3%), uno a perro (8.3%) y otro con alergia alimentaria (ajo, cebolla, cerdo) (8.3%). Siete (58.3%) presentaron positividad a alérgenos estacionales (ver tabla 2).

Intensidad y severidad de los síntomas. Los síntomas nasales en los pacientes con rinitis alérgica persistente presentaron en total una mediana de 5.5 ($P_{25}3-P_{75}6.7$), de 3 a 8 de calificación. Presentaron obstrucción nasal leve 6 (50%), moderada 2 (16.6%) y ninguna 4 (33.3%); prurito leve 5 (41.6%), moderado 5 (41.6%) y ninguno 2 (16.6%); rinorrea leve 5 (41.6%), moderada 5 (41.6%) y severa 2 (16.6%) y los estornudos fueron leves en 8 (66.6%) y moderados en 4 (33.3%). En los sujetos sanos la mediana fue de 2 ($P_{25}1-P_{75}3.5$), rango de 1 a 4. La obstrucción nasal fue leve en 3 sujetos (60%) y ninguna en 2 (40%); prurito leve en 2 (40%), ninguno en 3 (60%); rinorrea leve en 2 (40%), moderada en uno (20%) y ninguna en dos (40%) y los estornudos fueron leves en 2 sujetos (40%) y ninguno en 3 (60%).

Tabla 2. Resultados de pruebas cutáneas en pacientes con rinitis alérgica.

ALERGENOS	S U J E T O S	
	Número (n)	Porcentaje (%)
Hongos	4	33.3
Acaros	11	91.6
Perro	1	8.3
Gato	4	33.3
Polvo casero	3	25
Cucaracha	1	8.3
Ajo	1	8.3
Cebolla	1	8.3
Cerdo	1	8.3
Polen	7	58.3
Total	30	100

Citología de la mucosa nasal. La viabilidad se determinó en las células obtenidas por lavado nasal en pacientes con rinitis alérgica persistente con azul Tripán y se obtuvo en un conteo total de células de 194,000 a 200,000 células con una viabilidad del 72%. La identificación y cuantificación de las células de la mucosa nasal se encontró de la siguiente forma: las células epiteliales, en los pacientes con RA se presentaron en menor porcentaje desde el 10 al 32% y en los sujetos sanos se obtuvo un predominio de éstas células alcanzando el 98 al 100% en un total de 200 células; las células inflamatorias como los eosinófilos en los pacientes con RA se encontraron en un mayor porcentaje desde el 11 al 80% y en los sujetos sanos en el 1% en 200 células, los porcentajes se muestran en la tabla 3; en relación a las células apoptóticas los pacientes con RA presentaron una mediana de 2.0 ($P_{25}0.25$ - $P_{75}5$), rango de 0 a 14 y en los sanos la mediana fue de 8 ($P_{25}6$ - $P_{75}13$), rango de 4 a 16 (ver tabla 4 y figura 2). La variabilidad inter-observador para la indentificación y cuantificación de células de la mucosa nasal fue adecuada al obtener una r de Sperman de 0.90 ($p \leq 0.05$)

Tabla 3. Resultados del porcentaje obtenido de la citología de la mucosa nasal en sujetos con rinitis alérgica y sanos.

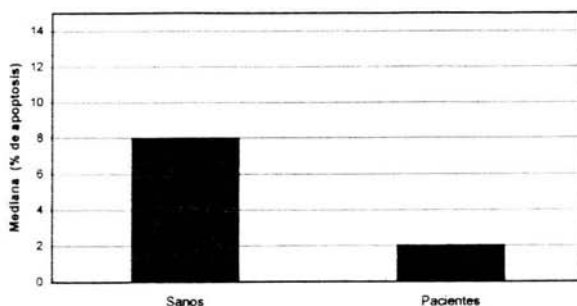
CELULAS	RINITIS ALERGICA	SANOS
	Porcentaje (%)	Porcentaje (%)
Epiteliales	11 a 32	98 a 100
Inflamatorias eosinófilos	11 a 80	1

Observación al microscopio a 100X en un área de 200 células.

La intensidad y severidad de los síntomas nasales en relación frecuencia de apoptosis mostró una correlación negativa de -0.29, sin embargo no fue estadísticamente significativa (r de Spearman, $p=0.35$). La apoptosis en la células de la mucosa nasal de los pacientes con RA fue menor comparado con los controles sanos y fue estadísticamente significativa (U de Mann Whitney, $p=0.02$).

Tabla 4 y figura 2. Resultados de pruebas de apoptosis en pacientes sanos comparados con pacientes con rinitis alérgica.

CELULAS EN APOPTOSIS (Caspasa-3 activa)	
Muestras	Mediana
Sanos	8 (P ₂₅ 6-P ₇₅ 13)
Pacientes	2 (P ₂₅ 0.25-P ₇₅ 5)



DISCUSION

El propósito de este trabajo fue identificar las características citológicas de la mucosa nasal tanto epitelial como inflamatoria y apoptótica e identificar la viabilidad de las células epiteliales en pacientes pediátricos con RA persistente mediante técnica de lavado nasal.

Sujetos. La mediana para la edad de los pacientes evaluados fue de 12.0 años ($P_{25}10-P_{75}13.7$) y la relación hombre: mujer de 2:1. Los participantes de esta investigación se encuentran en el rango de edad que se considera más frecuente según los informes nacionales e internacionales que establecen una mayor prevalencia de la enfermedad en pacientes escolares y adolescentes ^{43,44}.

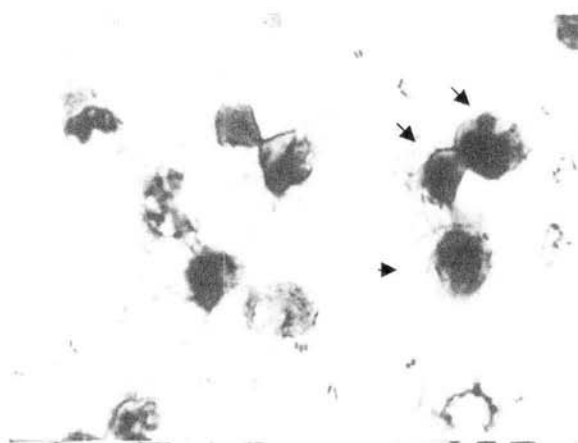
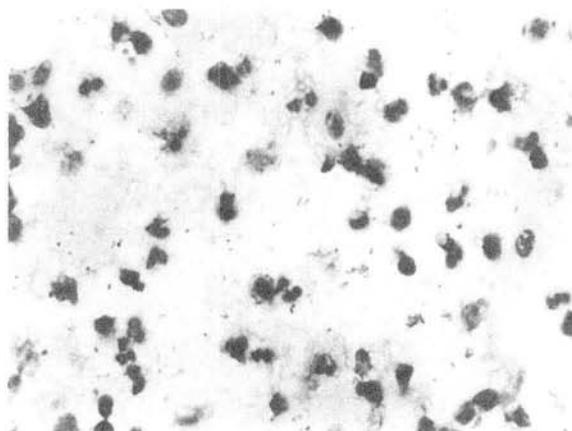
Los síntomas nasales se presentaron con mayor frecuencia en el grupo de estudio que en el grupo control (mediana de 5.5, $P_{25}3-P_{75}6.7$ vs 2, $P_{25}1-P_{75}3.5$), similar a lo reportado por Montaña y cols, en población similar (promedio de 7.1, DE 2 vs 1.9 DE 1.4) por lo tanto, nuestros resultados son comparables a este estudio ¹⁴. Sin embargo la frecuencia de síntomas en los pacientes con RA fue diferente en nuestro estudio; la frecuencia de los síntomas fue la siguiente: obstrucción nasal en 66.6%, prurito 80%, rinorrea 100% y estornudos 100% y Montaña y cols reportó 96.5%, 91.4%, 98.3% y 100% respectivamente ¹⁴, por lo tanto fueron diferentes en relación a la frecuencia de obstrucción nasal, prurito y rinorrea y similar en los estornudos.

Debido a que se encuentra reportado que el lavado nasal se considera un método no invasivo, bien tolerado y fácil de realizar y

además permite el estudio de una fase celular y soluble con adecuada conservación de la integridad celular, se utilizó en esta técnica al considerarla como adecuada para la identificación de la citología de la mucosa nasal (epitelial, inflamatoria y apoptótica) y aunque la técnica más utilizada para el lavado nasal es la modificada de Greiff y Grünberg y también la de Nacleiro ²⁴ modificamos la primera técnica debido a que encontramos una mejor viabilidad de las células indispensable en la evaluación de apoptosis y una muy buena tolerancia a la realización del procedimiento en estos pacientes.

El lavado nasal es una técnica que en pacientes con alergia se ha realizado con diferentes propósitos. Lim y cols analizaron la morfología celular en un estudio comparativo y encontraron mayor cantidad de células en pacientes con RA perenne que con la estacional y a su vez en los sujetos sanos. En el primer grupo predominaron los eosinófilos y en el segundo los neutrófilos en estado basal y los esinófilos posterior a reto nasal ⁴⁵, similar a los resultados encontrados en nuestro estudio considerando que encontramos un predominio de eosinófilos y escasas células epiteliales en los pacientes con rinitis alérgica persistente comparado con los sanos (ver figura 3). Diversos autores han encontrado útil estudiar la fase soluble del lavado nasal para determinación de sustancias como la proteína catiónica eosinofílica indicativa de presencia y activación de eosinófilos ^{24,46}, las proteínas 66-kDa, 26 kDa ⁴⁷ y de interleucinas ⁴⁸ relacionadas con la RA.

Figura 2. Resultado de tinción de eosina amarillenta en paciente con rinitis alérgica.



Frotis tomados de lavado nasal y sometidos a citocentrifugación, teñidos con eosina amarillenta, ver el detalle de los eosinófilos.

Apoptosis en células nasales

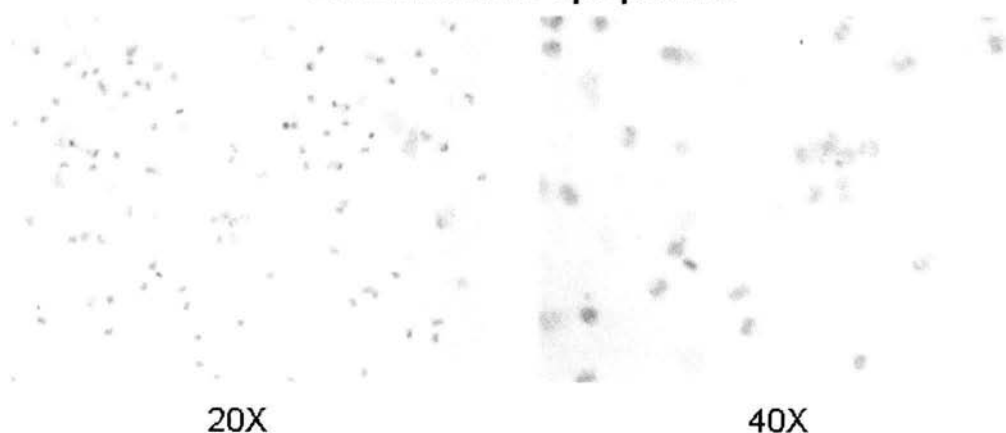
En nuestro estudio en los pacientes con RA las células apoptóticas se presentaron en un número considerablemente más bajo que los sanos, con medianas de 2.0 ($P_{25}0.25$ - $P_{75}5$) vs 8 ($P_{25}6$ - $P_{75}13$), respectivamente y fue estadísticamente significativo, sin embargo no identificamos con certeza el tipo de célula que se encontraba en

Apoptosis (ver figura 4). Son pocos los estudios en RA en relación a la apoptosis. Simon y cols en 17 pacientes con poliposis sinonasal e hipersensibilidad a la aspirina (ASA) identificaron en biopsia nasal un retardo en la apoptosis de los eosinófilos por TUNEL, relacionada al menos en parte con la presencia de IL-5 (49). En pacientes con poliposis nasal con o sin hipersensibilidad a ASA, Kowalski y cols, encontraron un menor porcentaje de apoptosis de eosinófilos mediante TUNEL, en los pacientes del primer grupo ⁵⁰. Davidsson encontró en muestras quirúrgicas de pólipos nasales, un infiltrado eosinofílico característico de la patología, pero además se detectó aumento en la apoptosis de 42% (TUNEL y análisis de morfología), que se atribuyó al uso de corticoides (inductores de la apoptosis) previo a la cirugía ¹⁰.

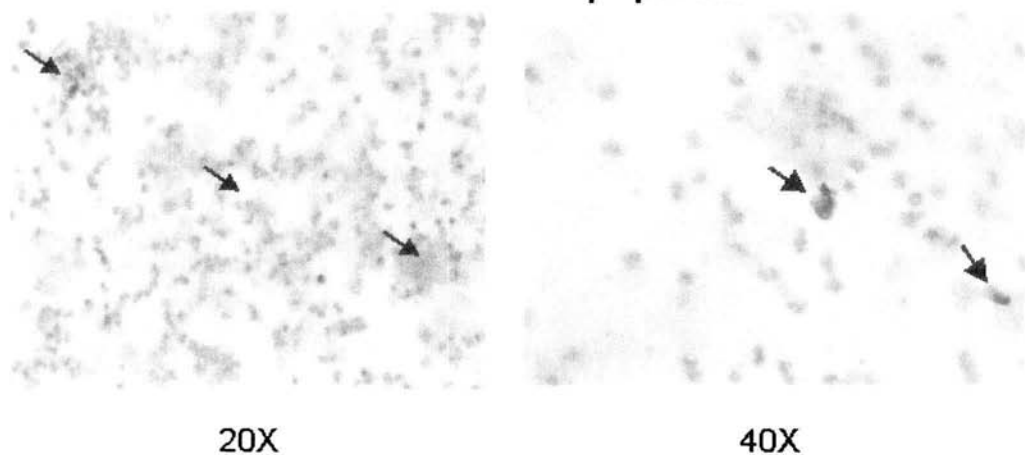
En relación a la intensidad y severidad de los síntomas nasales con la frecuencia de apoptosis nuestro estudio mostró una correlación negativa pero no estadísticamente significativa (r de spearman -0.29 , $p=0.35$), este resultado es diferente en parte a los reportes de estudios en pacientes con asma alérgica en los que se encuentra disminución de la apoptosis de eosinófilos y aumento de los eosinófilos que se relaciona con el incremento en la severidad de los síntomas ^{36,37,38} y con alteración de pruebas de función pulmonar, lo cual sugiere que el incremento en el número de eosinófilos posiblemente es producido por la disminución de la apoptosis y conlleva a las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Woolley y cols estudiaron eosinófilos apoptóticos por técnica de TUNEL en expectoración de pacientes durante la exacerbación de asma y después de dos semanas de tratamiento con corticoides y notaron una importante disminución del infiltrado eosinofílico y aumento significativo de la apoptosis postratamiento, concluyendo que la

Figura 4. Determinación de apoptosis mediante evaluación de caspasa-3 activa por citoimmunohistoquímicas en células provenientes de lavado nasal.

Ausencia de apoptosis



Presencia de Apoptosis



Frotis de células de lavados nasales preparadas mediante citocentrifugación, fueron teñidos con un anticuerpo específico anti-caspasa-3 activa, utilizando un sistema de revelado con peroxidasa (color café), como se describe en la sección de materiales y métodos. Los resultados muestran claramente células positivas color café las cuales se encuentran en apoptosis.

apoptosis de eosinófilos facilita la resolución de inflamación eosinofílica en el asma y favorece la mejoría clínica del paciente ⁵¹. No existen reportes de pacientes con rinitis alérgica en que se demuestre en mucosa nasal esta asociación. Existen un estudio que relaciona la disminución de la apoptosis de eosinófilos en sangre periférica determinada mediante detección por ELISA de Fas (molécula que libera una señal para inducción de apoptosis) con la presencia de RA y otros que compara los niveles de Fas, también por ELISA, en pacientes con RA, con asma y sujetos sanos y detectó un nivel de Fas menor en pacientes con rinitis alérgica y mayor en los de asma, comparados con los sanos por lo cual sugirió que estas patologías pueden representar diferentes sistemas de apoptosis ⁵³.

En nuestro estudio no se pudo establecer con claridad que tipo de células presentaban apoptosis dado que la técnica de caspasa-3 no admite el uso de alguna tinción diferencial y no se contaba al momento del estudio con marcadores específicos de eosinófilos, que permitieran identificarlos mediante técnicas de inmunofluorescencia. Unicamente existe un estudio de determinación de la actividad de caspasa-3 por inmunohistoquímica en mucosa nasal en sujetos con epistaxis comparados con controles sanos en el que encuentran un incremento de cinco veces la actividad de caspasa-3 a nivel de capilares, células musculares y glandulares septales ⁵⁴, por lo tanto, no se encuentran otros estudios en la literatura del uso de esta técnica a nivel local para enfermedades alérgicas de la mucosa nasal.

No existen estudios reportados en la literatura de detección de apoptosis en muestras tomadas por medio de lavado nasal, así mismo la detección de caspasa-3 activa no se halla reportada como técnica

de estudio de apoptosis en pacientes con rinitis alérgica. Nuestro estudio demostró que el lavado nasal es una técnica sencilla, reproducible, que proporciona una adecuada cantidad de células viables. Este es el primer informe acerca del uso de la determinación de caspasa-3 activa en pacientes con rinitis alérgica mediante la técnica de lavado nasal. Las limitaciones en la diferenciación de las células pueden mejorarse en otros estudios con el uso de anticuerpos específicos marcados con fluorescencia.

CONCLUSION

En este estudio se demostró que en pacientes con rinitis alérgica persistente, el lavado nasal es una técnica útil para estudios citológicos debido a que es una técnica sencilla, reproducible y proporciona una adecuada cantidad de células viables, con la cual logramos identificar un predominio de eosinófilos (11 al 80%) y una menor cantidad de células epiteliales. Además, en estos pacientes la disminución de la apoptosis de las células de la mucosa nasal se relacionó con la intensidad y severidad de los síntomas y la presencia de apoptosis fue menor al compararla con los controles sanos. No se encuentran estudios reportados en la literatura de detección de apoptosis en pacientes con rinitis alérgica en muestras de lavado nasal ni de la detección de caspasa-3 activa para determinar apoptosis.

ANEXO 1. PROTOCOLO PARA DIAGNOSTICO DE RINITIS ALERGICA EN CENTRO MEDICO LA RAZA.

El diagnóstico se realiza basados en los siguientes parámetros, los cuales usa el servicio de Alergia e Inmunología Clínica en forma rutinaria:

1. Historia clínica y examen físico sugestivo de rinitis alérgica.
2. Eosinofilia en muestra de biometría hemática mayor de 4%.
3. Porcentaje de eosinófilos mayor de 10% en citología nasal tomada con hisopo en al menos una de tres muestras seriadas.
4. Determinación de IgE sérica, así
Niños: 0-15 UI
Jóvenes: 0-200 UI
Adultos: 0-200 UI
5. Coproparasitoscópico en serie de 3 muestras, negativo para helmintiasis.
6. Examen general de orina normal.
7. Serie radiológica en 3 proyecciones o Tomografía de nariz y senos paranasales normal.
8. Radiografía de torax normal.
9. Pruebas cutáneas intradérmicas de hipérsensibilidad positivas a alergenitos inhalables comunes.

ANEXO 2. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LAS CELULAS PRESENTES EN LA MUCOSA NASAL

Epiteliales

Células ciliadas: Son altas y delgadas con núcleo ubicado en la base cuenta con cilios y microvelocidades en la membrana apical ^{15,55}.

Células caliciformes: Tienen un tallo basal angosto y una porción superior ancha en la que se ubican una gran cantidad de vesículas secretorias junto a la membrana ^{39,40}.

Células basales: Son cortas basofílicas, y con forma piramidal, su núcleo es de ubicación central. Su tamaño ocupa el tercio basal de su epitelio ⁵⁶.

Inflamatorias

Eosinófilos: Diámetro de 12 a 17 μm , su núcleo es bilobulado y los nucleolos están ausentes. El citoplasma presenta grandes gránulos rojo o púrpura rojizo los cuales son ovoides y se encuentran en relación con la membrana celular ⁵⁶.

Basófilos: miden de 10 a 12 μm , su núcleo generalmente es bilobulado aunque pueden presentar más segmentaciones y se tiñe menos profundamente que los neutrófilos. Contienen grandes gránulos azul oscuro en el citoplasma que a veces oscurece las características del núcleo ⁵⁶.

Neutrófilos: miden de 12 a 15 μm de diámetro, el núcleo segmentado en la mayoría se compone de dos a cinco lóbulos interconectados. No se pueden ver los nucleolos. En el citoplasma se pueden ver gránulos finos que le dan un aspecto granular color lila y otros gránulos mas grandes color púrpura rojizo ⁵⁶.

Monocitos: Pueden parecerse a los linfocitos grandes. Miden de 12 a 20 μm de diámetro. La forma de su núcleo puede ser variable. Puede ser desde una forma ovoide o más o menos arriñonada hasta en forma de una amplia herradura. Se tiñe más pálido que los linfocitos. Los nucleolos generalmente no son visibles. Su citoplasma es abundante y se tiñe azul grisáceo pálido ⁵⁶.

Linfocitos: Unos miden entre 6 y 9 μm (linfocitos pequeños) y otros entre 9 y 15 μm (linfocitos grandes). La mayoría no tienen gránulos citoplasmáticos sin embargo el 10% tienen gránulos púrpura rojizos. Poseen un citoplasma escaso el cual puede verse solo como un reborde alrededor del núcleo. Los grandes pueden verse similares a monocitos sin embargo pueden tener un poco menos de citoplasma y tener un núcleo mas pequeño que ellos ⁵⁶.

Apoptóticas: En la apoptosis temprana, las células se hace más compacta, se forman vesículas en las membranas, la cromatina se condensa (esto la hace heteropnótica). En la apoptosis tardía, se forman los cuerpos apoptóticos, debido a la fragmentación del ADN (57). Cuando se evaluó la apoptosis mediante caspas-3 activa por citoimmunohistoquímica, las células positivas se tiñen de color café debido al substrato (DAB) que se utilizó.

Células viables y no viables:

La célula viable presenta colorante alrededor que no penetra al citoplasma, la célula no viable presentará colorante dentro del citoplasma debido al daño de la membrana celular.

BIBLIOGRAFIA

1. Baroody, F. Allergic Rhinitis: Broader disease effects and implications for management. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 128:616-631.
2. Wilson D, Sheikh A, Hurwitz B, Durham S. Allergen injection immunotherapy for seasonal allergic rhinitis (Protocol). *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2003.
3. De la Garza H, García R. Rinitis EN: Rinología. Ciencia y arte. JGH Editores. México 1996:130-39.
4. Bousquet J, Vignola A, Campbell A, Michel F. Pathophysiology of allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol* 1996 ;110 :207-218.
5. Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N. Aria workshop Group; World Health Organization. Allergic Rhinitis and its impact on asthma. *J allergy Clin Immunol* 2001; 108(5 suppl):147-334.
6. Segura N, Martínez H, Cisneros N. Características clínicas y de laboratorio de 100 pacientes con rinitis alérgica perenne. *Rev Alergia Mex* 1993;40:110-113.
7. Slater A, Smallman L, Drake-Lee A. Increase in the epithelial mast cell numbers in the nasal mucosa of patient with perennial allergic rhinitis. *J Laryngol Otol* 1996;110:929-933.
8. Amin K, Rinne J, Haahtela T and cols. Inflammatory cell and epithelial characteristics of perennial allergic and no allergic rhinitis with a symptom history of 1 to 3 years duration. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:249-257.
9. Bentley A, Jacobson M, Cumberworth and cols. Immunohistology of the nasal mucosa in seasonal allergic rhinitis: Increase in activated eosinophils and epithelial mast cells. *J allergy Clin Immunol* 1992;89:877-883.
10. Lund A. Allergic rhinitis-Making the correct diagnosis. *Clin Exp allergy* 1998;28:S25-8.
11. Meltzer E, Nathan R, Selner J, Storms W. Quality of life and rhinitis symptoms: results of a nation wide survey with the SF-36 and RPLP questionnaires. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:15-19.
12. Bousquet J, Bullinger M *et al.* Assessment of quality of life in patient with perennial rhinitis with the french of SF-36 Health Status Questionnaires. *J allergy Clin Immunol* 1994;94:182-188.
13. Kremer B, Klimek L, Bullinger M, Mosges R. Generic or disease-specific quality of life scales to characterize health status in allergic rhinitis?. *Allergy* 2001;56:957-963
14. Montañó B, Jauregui K, Campillo M y cols. Evaluación de un cuestionario para la medición de síntomas nasales en sujetos con rinitis alérgica. *Rev Alergia Mex* 2003;L(1):17-21.
15. Gilain L, Escudier E, Chapelin C, and cols. Brush technique in cytological analysis of the nasal mucosa. A critical and comparative analysis. *Annal d Oto-Laryngologie et de chirurgie cervico-faciale* 1992; 109(8): 397-401.
16. Godthelp T, Holm A, Fokkens W and cols. Dynamics of nasal eosinophils in response to nonnatural allergen challenge in patients with allergic rhinitis and control subjects: a biopsy and brush study. *J allergy clin immunol* 1996; 97: 800-811.
17. http://www.besthealth.com/spanish/esp_articles/003848res
18. Walsh E, Falsey A. A simple and reproducible method for collecting nasal secretions in frail elderly adults, for measurement of virus-specific IgA. *Journal of Infectious Diseases*; 1999;179:1268-73
19. Stensballe L, Trautner S, Kofoed P and cols. Comparison of nasopharyngeal aspirate and nasal swab specimens for detection of respiratory syncytial virus in different settings in a developing country. *Tropical Medicine & International Health* 2002;7:317-21
20. Catten M, Murr A, Goldstein J, Mhatre A, Lalwani A. Detection of fungi in the nasal mucosa using polymerase chain reaction 2001;111:399-403.
21. Lin R, Nahal A, Lee M, Menikoff H. Cytologic distinctions between clinical groups using curette-probe compare to cytology brush. *Ann Allergy, Asthma Immunol* 2001; 86:226-31.

22. Gilain L, Chapelin C, Boucherat M, Peynegre R, Escudier E. Evaluation of the brushing technique in nasal cytology. *Bulletin de Association des anatomistes* 1994; 78:5-8.
23. Chapelin C, Coste A, Gilain L, Poron F, Verra F, Escurier E. Modified epithelial cell distribution in chronic airways inflammation. *Eur respir J* 1996; 9:2474-2478.
24. Belda J, Parameswaran K, Keith P, Hargreave F. Repeatability and validity of cell and fluid-phase measurements in nasal fluid: a comparison of two methods of nasal lavage. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1111-1115.
25. Blaski Ch, Janet W, Quinn T and cols. Nasal lavage cellularity, grain dust, and airflow obstruction. *Chest* 1996; 109:1086-92
26. Pipkorn U, Karlsson G. Methods for obtaining specimens from the nasal mucosa for morphological and biochemical analysis. *Eur respir J* 1988;1:856-62.
27. Pipkorn U, Karlsson G, Enerback L. A brush method to harvest cells from the nasal mucosa for microscopic and biochemical analysis. *J immunol methods* 1988;112:37-42
28. Viegas M, Gómez E, Brooks J, Gatland D, Davies RJ. Effect of the pollen season on nasal mast cells. *Br Med J* 1987; 294: 414.
29. Gómez E, Clague JE, Gatalnd D, Davies RJ. Effect of topical corticosteroids on seasonally induced increases in mast cells. *Br Med J* 1988; 296:1572-3.
30. Fleming DM, Crombie DL. Prevalence of asthma and hay fever in England and Wales. *Br. Med J* 1987; 296: 279-83.
31. Nagata H, Motosugi H, Sanai A y cols. Enhancement of submicroscopic damage of the nasal epithelium by topical allergen challenge in patient with perennial nasal allergy. *Ann Otol rhinol Laryngol* 2001;110:236-242.
32. Jean R, Delacourt C, Rufin P, Pfister A, Waernessyckle S, de Blic J, Scheinmann P. Nasal cytology in rhinitic children: comparison between brushing and blowing the nose. *Allergy* 1996;51: 932-4.
33. Masashi K, Taku H, Hirotaka I and cols. Serum-soluble Fas levels as a marker to distinguish allergic and nonallergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:1213-1214
34. Davidsson A, Andersson T, Hellquist H. Apoptosis and phagocytosis of tissue-dwelling eosinophils in sinonasal polyps. *Laryngoscope* 2000;110:11-116.
35. Matsukura M, Yamada H, Yudate T, Tezuka T, Chihara J. Steroid-induced changes of eosinophils in atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 114(suppl 1):51-54.
36. Duncan C, Lawrie A, Blaylock M, Douglas J, Walsh G. Reduced eosinophil apoptosis in induced sputum correlates with asthma severity. *Eur Respir J* 2003;22:484-90.
37. Vignola A, Chanez P, Chiappara G *et al.* Evaluation of apoptosis of eosinophils, macrophages and T lymphocytes in mucosal biopsy specimens of patients with asthma and chronic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:563-573.
38. Jang An-Soo, Choi Inseon-S, Lee S, Seo eong-Pyeong, Yang Sung-Won, Chang-Soo. Bcl-2 expression in sputum eosinophils in patients with acute asthma. *Thorax* 2000;55:370-4.
39. Willingham MC. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 1999;47:1101-1110.
40. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26):239-257.
41. Brunelle JK, Chandel NS. Oxygen deprivation induced cell death: a update. *Apoptosis* 2002;7:475-482.
42. Moley KH, Mueckler MM. Glucose transport and apoptosis. *Apoptosis* 2000;5:99-105.
43. The Working Group. International conference on allergic rhinitis in childhood. *Allergy* 1999;55(suppl 5):4-14
44. Tatoo-Cano M, Sanin-Aguirre L, González V, Ruiz-Velazco S, Romieu I. Prevalencia de asma, rinitis y eczema en escolares de la ciudad de Cuernavaca México. *Salud Pública Mex* 1997;39:497-506.
45. Lim M, Tylor R, Nacleiro R. The histology of Allergic rhinitis and its comparison to cellular changes in nasal lavage. *Am J respir Crit Care Med* 1995;151:136-144.

46. Raulf-Heimsoth M, Wirtz C, Papenfuss F, Baur X. Nasal lavage mediators profile and cellular composition of nasal brushing material during latex challenge tests. *Clin Exp allergy* 2000;30:110-121.
47. Tosun F, Gerek M, Ozkaptan and cols. Electroforetic evaluation of nasal discharge in patients with allergic rhinitis and vasomotor rhinitis. *Am J Rhinol* 2002;16:141-144.
48. Noah T, Henderson F, Henry M, Peden D, Devlin R. Nasal lavage cytokines in normal, allergic, and asthmatic school-age children. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1290-1296.
49. Simon H, Yousefi S, Schranz C and cols. Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia. *J Immunol* 1997;158:3902-3908.
50. Kowalski M, Grzegorzczak J, Pawaliczak R y cols. Decreased apoptosis and distinct profile of infiltrating cells in the nasal polyps of patients with aspirin hypersensitivity. *Allergy* 2002;57:493-500.
51. Woolley K, Gibson P, Carty K and cols. Eosinophil apoptosis and the resolution of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:237-243.
52. Kato M, Hattori T, Ito H and cols. Serum-soluble Fas levels as a marker to distinguish allergic and nonallergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:1213-1214.
53. Kato M, Nozari Y, Yoshimoto T and cols. Different serum soluble Fas levels in patients with allergic rhinitis and bronchial asthma. *Allergy* 1999;54:1299-1302.
54. Nakada H, Kase Y, Matsunaga T, Komoda T, Inuma T. Caspase-3 activation in nasal capillary in patient with epistaxis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;128:632-639.
55. Gartner L, Hiatt J. Sistema respiratorio. EN: *Histología, Texto y Atlas*. Mc Graw-Hill Interamericana. México; 1997:301-319.
56. Cormack D. Células hemáticas. EN: *Histología de Ham. Harla*. México; 1987:229-261
12. Lewin B. EN *Genes VII*. Malbar Libros. Madrid, España 2001:86-73