

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DETERMINACIÓ D'ANTICOSSOS BLOQUEJANTS  
EN PACIENTS ASMÀTICS. INACTIVACIÓ DEL  
COMPLEMENT "IN VITRO" PER L'AL.LERGEN  
-ESPECÍFIC

Tesi de Llicenciatura presentada  
per Margarida Castell i Escuer  
per optar al Grau de Llicenciat.

Aquesta Memòria ha estat dirigida  
per la Dra. M. Cristina Castello-  
te i Bargalló.

Barcelona, octubre de 1981.

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701740910

A la meva família

Al Josep Anselm

Vull manifestar el meu agraïment envers tots els qui han contribuït a la realització d'aquesta Memòria.

En primer lloc, vull regradiar la Dra. M. Cristina Castellote, la qual com a directora d'aquest treball, ha representat un ajut invaluable.

A més a més, dec la meva gratitud a la Dra. Guillermina Barberà, tant pels seus suggeriments com per les seves crítiques i al Dr. Antonio Torralba per l'acolliment i disposició que m'ha ofert dins del Departament.

Vull també regradiar a tots els companys que han col.laborat, indirectament, a la realització del present treball.

# Í N D E X

|  | <u>pàg</u> |
|--|------------|
| OBJECTE . . . . .  | 1          |
| 1.- INTRODUCCIÓ . . . . .  | 2          |
| 1.1.- MECANISMES IMMUNITARIS . . . . .                             | 3          |
| 1.2.- REACCIONS IMMUNITARIES . . . . .                             | 9          |
| 2.- ASMA BRONQUIAL . . . . .                                       | 12         |
| 2.1.- CONCEPTE . . . . .   | 13         |
| 2.2.- MECANISMES DE LA REACCIÓ AL·LÈRGICA . . . . .                | 16         |
| 2.2.1.- Immunoglobulina E . . . . .                                | 16         |
| 2.2.2.- Immunoglobulina G i altres immunoglo-<br>bulines . . . . . | 18         |
| 2.2.3.- El sistema del complement . . . . .                        | 20         |
| 2.2.4.- Histamina . . . . .  | 24         |
| 2.2.5.- Altres mediadors . . . . .                                 | 25         |
| 2.3.- ETIOLOGIA . . . . .  | 29         |
| 2.4.- DIAGNÒSTIC . . . . .   | 30         |
| 2.4.1.- Anàmnesi . . . . .   | 30         |
| 2.4.2.- Diagnòstic clínic . . . . .                                | 31         |
| 2.4.3.- Diagnòstic de laboratori . . . . .                         | 32         |
| 2.4.3.1.- Proves "in vivo" . . . . .                               | 32         |
| 2.4.3.2.- Eosinòfilia . . . . .                                    | 33         |
| 2.4.3.3.- Poder histaminopèxic del sèrum . . . . .                 | 34         |
| 2.4.3.4.- Valoració de la IgE . . . . .                            | 34         |
| 2.4.3.5.- Valoració de la IgE específica:<br>RAST . . . . .        | 35         |
| 2.5.- TRACTAMENT . . . . .   | 43         |
| 2.5.1.- Hiposensibilització . . . . .                              | 43         |



|   | <u>pàg</u> |
|---|------------|
| 2.5.1.1.- Mètodes d'hiposensibilització . . .   | 45         |
| 2.5.1.2.- Anticossos bloquejants . . . . .  | 46         |
| 2.5.1.3.- Variació de les immunoglobulines i<br>AMP cíclic durant la hiposensibi-<br>zació . . . . .              | 48         |
| 2.5.2.- Altres teràpies . . . . .   | 50         |
| 3.- MATERIAL I MÈTODES . . . . .  | 52         |
| 3.1.- MATERIAL . . . . .  | 53         |
| 3.1.1.- Grup control . . . . .  | 53         |
| 3.1.2.- Malalts estudiats . . . . .   | 53         |
| 3.1.3.- Estudis previs realitzats . . . . .   | 54         |
| 3.1.3.1.- Proves cutànies . . . . .   | 54         |
| 3.1.3.2.- Valors d'immunoglobulina E . . . .  | 56         |
| 3.1.3.3.- Valors de les immunoglobulines G,<br>M i A . . . . .  | 57         |
| 3.1.3.4.- Valors de l'Activitat Complementà-<br>ria Total i dels components C3, C4<br>i C3 proactivador . . . . . | 57         |
| 3.1.3.5.- Altres paràmetres . . . . .   | 58         |
| 3.1.4.- Obtenció de les mostres . . . . .   | 58         |
| 3.2.- MÈTODES . . . . .   | 61         |
| 3.2.1.- "Radioal·lèrgosorbent test" . . . . .   | 61         |
| 3.2.1.1.- Fonament . . . . .  | 61         |
| 3.2.1.2.- Reactius . . . . .  | 61         |
| 3.2.1.3.- Tècnica . . . . .   | 63         |
| 3.2.1.4.- Expressió dels resultats . . . . .  | 64         |
| 3.2.2.- Assaig de la neutralització del RAST .  | 64         |

|   | <u>pàg</u> |
|---|------------|
| 3.2.2.1.- Fonament . . . . .  | 64         |
| 3.2.2.2.- Reactius . . . . .  | 65         |
| 3.2.2.3.- Tècnica . . . . .   | 65         |
| 3.2.2.4.- Expressió dels resultats . . . . .  | 67         |
| 3.2.3.- Assaig d'interferència del RAST . . . . .   | 67         |
| 3.2.3.1.- Fonament . . . . .  | 67         |
| 3.2.3.2.- Reactius . . . . .  | 69         |
| 3.2.3.3.- Tècnica . . . . .   | 69         |
| 3.2.3.4.- Expressió dels resultats . . . . .  | 70         |
| 3.2.4.- Quantificació del RAST-interferència i<br>d'anticossos bloquejants . . . . .              | 70         |
| 3.2.4.1.- Fonament . . . . .  | 70         |
| 3.2.4.2.- Reactius . . . . .  | 71         |
| 3.2.4.3.- Tècnica . . . . .   | 71         |
| 3.2.4.4.- Expressió dels resultats . . . . .  | 71         |
| 3.2.5.- Adsorció per cromatografia d'afinitat de<br>la IgG i "Radioallergosorbent test" . . . . . | 72         |
| 3.2.5.1.- Fonament . . . . .  | 72         |
| 3.2.5.2.- Reactius . . . . .  | 74         |
| 3.2.5.3.- Tècnica . . . . .   | 76         |
| 3.2.5.4.- Expressió dels resultats . . . . .  | 78         |
| 3.2.6.- Quantificació de les mostres per cente-<br>lleig sòlid . . . . .                          | 78         |
| 3.2.7.- Test d'inactivació del complement . . . . .   | 79         |
| 3.2.7.1.- Fonament . . . . .  | 80         |
| 3.2.7.2.- Reactius . . . . .  | 80         |
| 3.2.7.3.- Tècnica . . . . .   | 81         |

|   | <u>pàg</u> |
|---|------------|
| 3.2.7.4.- Expressió dels resultats . . . . .  | 82         |
| 3.2.8.- Titulació del complement . . . . .  | 82         |
| 3.2.8.1.- Fonament . . . . .  | 82         |
| 3.2.8.2.- Reactius . . . . .  | 83         |
| 3.2.8.3.- Tècnica . . . . .   | 83         |
| 3.2.9.- Tractament estadístic dels resultats .  | 84         |
| 3.2.9.1.- Índex del grau de dispersió . . . .   | 84         |
| 3.2.9.2.- Recta de regressió i coeficient de<br>correlació . . . . .  | 86         |
| 3.2.9.3.- Comparació entre percentatges d'ac<br>tivitat lligada en sèries aparella<br>des . . . . .                 | 87         |
| 3.2.9.4.- Comparació entre dos grups segons<br>la diferència entre els valors<br>migs ("t" de STUDENT) . . . . .    | 88         |
| 3.2.9.5.- Prova de comparació entre dos<br>grups amb dades aparellades . . . .                                      | 89         |
| 4.- RESULTATS . . . . .   | 90         |
| 4.1.- DETERMINACIÓ DE LA I <sub>g</sub> E ESPECÍFICA . . . . .  | 91         |
| 4.2.- RESULTATS DE L'ASSAIG DE NEUTRALITZACIÓ DEL<br>RAST (RAST-N) . . . . .  | 92         |
| 4.3.- RESULTATS OBTINGUTS A L'ASSAIG D'INTERFERÈNCIA<br>DEL RAST (RAST-I) . . . . .                                 | 96         |
| 4.4.- RESULTATS OBTINGUTS A L'ASSAIG DE QUANTIFICA<br>CIÓ DEL RAST-I. NIVELL D'ANTICOSSOS BLOQUE<br>JANTS . . . . . | 97         |
| 4.5.- RESULTATS DEL RAST-PRÈVIA ADSORCIÓ . . . . .  | 100        |

|  | <u>pàg</u> |
|--|------------|
| 4.6.- RESULTATS DEL T.I.C. . . . . .                                     | 104        |
| 5.- DISCUSSIÓ . . . . .  | 110        |
| 5.1.- DETERMINACIÓ DE LA IgE ESPECÍFICA . . . . .                        | 111        |
| 5.2.- DETECCIÓ D'ANTICOSSOS BLOQUEJANTS . . . . .                        | 113        |
| 5.3.- INACTIVACIÓ "IN VITRO" DEL COMPLEMENT PER<br>L'AL.LERGEN . . . . . | 118        |
| 6.- CONCLUSIONS . . . . .  | 120        |
| 7.- BIBLIOGRAFIA . . . . .   | 123        |

## ÍNDIX DE FIGURES

|   | <u>pàg</u> |
|---|------------|
| Figura 1 : Representació esquemàtica del sistema anti<br>còs IgE-cèl.lula grassa-mediador-efector,<br>al teixit pulmonar humà . . . . . | 15         |
| Figura 2 : Mecanismes d'activació del sistema del com<br>plement . . . . .  | 21         |
| Figura 3 : Possible paper del RAST en el diagnòstic<br>de l'al.lèrgia . . . . .   | 42         |
| Figura 4 : Representació esquemàtica del RAST . . . .   | 62         |
| Figura 5 : Representació esquemàtica del RAST-N . . .   | 66         |
| Figura 6 : Representació esquemàtica del RAST-I . . .   | 68         |
| Figura 7 : Representació esquemàtica del RAST-PA . .  | 75         |
| Figura 8 : Corba de titulació del complement . . . .  | 85         |
| Figura 9 : Recta de regressió de l'assaig de quantifi<br>cació del RAST-I . . . . .   | 98         |
| Figura 10 : Nivells d'anticossos bloquejants . . . .  | 99         |

## ÍNDIX DE TAULES

|   | <u>pàg</u> |
|---|------------|
| Taula I a : Propietats físiques de les immunoglobulines humanes . . . . .   | 7          |
| Taula I b : Propietats biològiques de les immunoglobulines humanes . . . . .  | 8          |
| Taula II a : Paràmetres estudiats abans de la hiposensibilització . . . . .   | 55         |
| Taula II b : Immunoglobulines plasmàtiques, A.C.T. i components del complement abans i durant la hiposensibilització . . . . .                      | 59         |
| Taula III : Resultats del RAST i del RAST-N abans i durant el tractament (% activitat lligada)  | 93         |
| Taula IV : Resultats del RAST-interferència (% interferència) i del RAST-prèvia adsorció (% activitat lligada) als 7 mesos del tractament . . . . . | 101        |
| Taula V : Comparacions estadístiques entre els diferents paràmetres estudiats . . . . .   | 102        |
| Taula VI a : Resultats obtinguts del T.I.C. en el grup control (% hemòlisi) . . . . .   | 105        |
| Taula VI b : Resultats obtinguts del T.I.C. en els pacients asmàtics (% hemòlisi) . . . . .   | 107        |
| Taula VII : Comparacions estadístiques amb els resultats del T.I.C. . . . .   | 109        |

## INDEX D'ABREVIATURES

Ac: anticòs

A.C.T.: Activitat Complementària Total

Ag: antigen

AMP-c: AMP cíclic

C: complement

CH50: activitat hemolítica 50 del complement

C3 - PA: C3 proactivador

CRIST: "Cellulose Particle Radioimmunosorbent test"

DAB: doble anticòs

ECF-A: "Eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis"

ELISA: "Enzyme linked immunosorbent assay"

Fc: fragment cristal·litzable

GMP-c: GMP cíclic

ICF-A: "Intermediate chemotactic factor of anaphylaxis"

IgA: immunoglobulina A

IgD: immunoglobulina D

IgE: immunoglobulina E

IgG: immunoglobulina G

IgM: immunoglobulina M

3 M.: tres mesos de tractament

7 M.: set mesos de tractament

MSPRIA: "Microtiter Solid Phase Radioimmunoassay"

NCF-A: "Neutrophil chemotactic factor of anaphylaxis"

N.T.: no tractats

PAF: "Platelet activating factor"

PBS: solució amortidora de fosfat

PG: prostaglandina  
PGE<sub>2</sub>: prostaglandina E<sub>1</sub>  
PGF<sub>2α</sub>: prostaglandina F<sub>2α</sub>  
PMN: polimorfonuclears  
PRIST: "Paper Radioimmunosorbent test"  
RAST: "Radioallergosorbent test"  
RAST-I: assaig de la interferència del RAST  
RAST-N: assaig de la neutralització del RAST  
RAST-PA: assaig del RAST prèvia adsorció  
RCLAAR: "red-cell-linked antigen-antiglobulin reaction"  
RIA: radioimmunoassaig  
RIST: "Radioimmunosorbent test"  
SRS-A: "Slow reacting substance of anaphylaxis"  
T.I.C.: test d'inactivació del complement  
T.L.I.A.: teixit linfàtic intestinal associat  
TxA<sub>2</sub>: tromboxà  
U.F.C.: unitat formadora de colònies.



## OBJECTE

D'entre els tractaments d'utilitat clínica més notoria de l'asma extrínseca, patologia molt comú a la nostra ciutat i que afecta amb molta freqüència a la població infantil, és de destacar la hiposensibilització específica en front l'al.lergen desencadenant. Actualment, s'admet la teoria segons la qual el mecanisme d'acció d'aquesta immunoteràpia, comporta la formació d'anticossos bloquejants corresponents a la classe IgG i que actuen competitivament amb la IgE específica per al mateix al.lergen.

Fins ara s'han proposat dues tècniques per fer palesa l'existència d'anticossos bloquejants. Aquest treball comprèn un estudi dels dos mètodes i desenvolupa un tercer assaig, capaç de demostrar la presència d'un factor bloquejant inclòs a la fracció IgG.

Aquesta tesina intenta, també, aprofundir en el mecanisme d'inactivació "in vitro" del sistema del complement al sèrum de pacients asmàtics, prèvia incubació amb l'al.lergen específic, ja que no es coneix per quina via es produeix l'esmentada inactivació, ni si hi està involucrada la IgE específica.

## 1. INTRODUCCIÓ

### 1.1.- MECANISMES IMMUNITARIS

El concepte d'immunitat engloba a tot el conjunt de manifestacions que alguns éssers vius són capaços de desenvolupar davant qualsevol agent invasor o provocació antigènica que pugui alterar el seu funcionament ...habitual.

La funció principal del sistema immunitari és, per tant, la de mantenir la integritat de l'organisme. Compta per això amb dos mecanismes defensius: el sistema defensiu específic i el sistema defensiu inespecífic.

El darrer d'ells és el que primer intervé i està format per factors humorals i cel·lulars de naturalesa molt variada. Així, es troben la barrera cutàneo-mucosa, que inclou substàncies tipus lisozima i factors fisicoquímics com el pH i el sistema reticle histiocitari, que comprèn macròfags i micròfags. La resposta inflamatòria aguda a organismes o substàncies estranys té un valor protector beneficiós: augmenta la permeabilitat capil·lar que implica la transsudació de polinuclears i monòcits i la de factors sèrics bactericides com la proteïna C reactiva, la properdina i el sistema del complement, que conjuntament poden destruir una varietat de microorganismes en presència de  $Mg^{++}$ .

Quan fracassa la defensa inespecífica, prenen part els elements del sistema específic. Dins d'aquest sistema es troben els linfòcits-T i els linfòcits-B, les

dues cèl.lules immunocòmpetents que actuen de manera selectiva i diferenciada i donen lloc a dos tipus de resposta que reben el nom d'immunitat cel.lular i immunitat humoral respectivament. Tots dos tipus de cèl.lules deriven d'una cèl.lula pluripotencial anomenada unitat formadora de colònies o U.F.C. (HAM 1977). A partir de la U.F.C. es desenvolupen cèl.lules de tipus blàstic que proliferen i posteriorment es diferenciaven en linfòcits-B, que passen a la circulació general i a través d'aquesta a la melsa i teixits linfàtics, excepte el timus. Aquests primers linfòcits-B són inactius immunològicament, només després del primer contacte amb un antigen es transformen en linfòcits B actius i competents. Aquesta activació té lloc, a l'home, en el teixit linfàtic intestinal associat o T.L.I.A.

Els linfòcits-B actius, en un segon contacte amb el mateix antigen i mitjançant la cooperació o activació dels immunòcits donen lloc a cèl.lules plasmàtiques que s'encarreguen de la síntesi d'un anticòs específic.

Hi ha U.F.C. que emigren cap al timus; aleshores originen allí cèl.lules més grans de tipus linfoblàstic, que proliferen i es diferencien, donant lloc als linfòcits-T. Aquests linfòcits-timus dependents poden ésser activats per un segon antigen, resultant cèl.lules immunològicament actives. Després d'un segon contacte amb el mateix antigen els linfòcits-T actius es multipliquen i es transformen en cèl.lules blàstiques anomenades immunòcits que, en créixer i dividir-se i mitjançant la secreció de

linfocines, donaran lloc a la immunitat cel.lular.

Tal com s'ha vist, el desenvolupament de la resposta immunitària està condicionat al contacte amb unes substàncies anomenades antigens o immunògens. Els factors que proporcionen la propietat antigènica són complexos, però hi ha unes condicions que sempre s'han d'acomplir com són: exogenicitat, volum molecular, cert grau de complexitat química,... (FUNDENBERG 1978). Malgrat que totes aquestes condicions es reuneixen quasi sempre en macromolècules, només una petita porció de la macromolècula es combina amb els anticossos. Aquesta àrea que determina l'especificitat de la reacció antígen-anticòs s'anomena determinant antigènic.

Com ja s'ha esmentat, els linfòcits-B i les cèl·lules plasmàtiques, derivades dels primers donaran lloc a la producció d'anticossos. Els anticossos són immunoglobulines encarregades de la funció immunitària. A l'home s'han pogut diferenciar cinc tipus estructurals: IgG, IgM, IgA, IgD i IgE. L'estudi de les immunoglobulines s'ha realitzat principalment mitjançant tres tècniques: tractament químic (en general, reducció), digestió enzimàtica amb pepsina, papaïna i plasmina i cristal·lografia de raigs X (PLAYFAIR 1979).

Tots els estudis estructurals de les immunoglobulines mostren dos tipus de cadenes peptídiques: cadenes lleugeres i cadenes pesades. Les cadenes lleugeres poden ser  $\kappa$  i  $\lambda$ , i mai no es troben a la vegada a la mateixa mo

lècula. Les cadenes pesades determinen els cinc tipus d'immunoglobulines i són:  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\delta$  i  $\epsilon$ . Recentment s'han establert subclasses a les cadenes  $\gamma$ ,  $\alpha$  i  $\mu$ , així hi ha cadenes  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ,  $\gamma_4$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\mu_1$  i  $\mu_2$ .

Cada molècula d'immunoglobulina està constituïda per quatre cadenes peptídiques, aparellades de manera que la unitat està configurada per dues meitats idèntiques, cada una formada per una cadena pesada i una cadena lleugera. Les quatre cadenes estan unides mitjançant ponts de sulfur establerts entre els aminoàcids cisteïna.

Per microscopia electrònica s'ha observat que la IgG adopta forma de "Y", i les seves branques poden obrir-se fins a  $180^\circ$  C gràcies a l'existència d'una regió que fa de frontissa. També s'ha vist que les porcions N-terminals de les cadenes pesades i lleugeres mostren una variació considerable d'aminoàcids i aquestes zones són les que determinen l'especificitat per a un antigen.

Quan la molècula intacta s'activa, les regions variables de les porcions terminals de les cadenes lleugeres i pesades poden unir-se a l'antigen. Els aminoàcids que determinen la geometria interna de les regions d'unió a l'antigen són els que ocupen les zones d'hipervariabilitat, donant lloc a la diversitat d'anticossos que permet establir una especificitat antigènica elevada (CAPRA 1977).

Les característiques principals de les cinc immunoglobulines es troben resumides a les taules Ia i Ib.

TAULA I a : PROPIETATS FÍSQUES DE LES IMMUNOGLOBULINES HUMANES

| Denominació                     | IgG        | IgA                | IgM         | IgD         | IgE       |
|---------------------------------|------------|--------------------|-------------|-------------|-----------|
| Coefficient de sedimentació     | 7S         | 7S 9S 11S          | 19S         | 7S          | 8S        |
| Pes molecular                   | 150,000    | 160,000 i polimers | 900,000     | 185,000     | 200,000   |
| Nombre d'unitats bàsiques       | 1          | 1.2 <sup>†</sup>   | 5           | 1           | 1         |
| València d'unió a l'Ag.         | 2          | 2                  | 5(10)       | ?           | 2         |
| Concentració sèrica normal      | 8-16 mg/ml | 1.4-4 mg/ml        | 0.5-2 mg/ml | 0-0.4 mg/ml | 79.5 U/ml |
| % del total de immunoglobulines | 80         | 13                 | 6           | 1           | 0.002     |
| % carbohidrats                  | 3          | 8                  | 12          | 13          | 12        |
| Cadena pesada                   | γ          | α                  | μ           | δ           | ε         |
| Cadena lleugera                 | λ κ        | λ κ                | λ κ         | λ κ         | λ κ       |

† El dímer a les secrecions externes porta la component secretòria S

TAULA I b : PROPIETATS BIOLÒGIQUES DE LES IMMUNOGLOBULINES HUMANES

|                                | IgG   | IgA   | IgM  | IgD   | IgE  |
|--------------------------------|---|---|--|---|--|
| Característiques principals    | La més abundant als líquids corporals interns, sobre tot extra-vasculars, on combat als micro-organismes i les seves toxines. | La principal a les secrecions seromucoses, on defensa les superfícies corporals externes. | Aglutinadora molt efectiva, primera línia de defensa bacteriana. | Present a la superfície dels limfòcits del nou nat. | Responsable dels símptomes d'al·lergia atòpica. Augmentada en infeccions parasitàries. |
| Fixació de complement          | si  | no  | si   | ?   | no <sup>†</sup>  |
| Travessa la placenta           | si  | no  | no   | no  | no   |
| Es fixa a mastòcits i basòfils | no  | no  | no   | no  | si   |
| Es fixa als macrofags.         | si  | no  | no   | no  | no   |

<sup>†</sup> No fixa complement per la via clàssica i no se sap per la via alterna.



## 1.2.- REACCIONS IMMUNITÀRIES

Després d'un segon contacte amb l'antigen, es des<sup>u</sup> envolupa la resposta secundària ràpida que pot acompanyar<sup>u</sup> se de lesions tisulars, produint les anomenades reaccions immunitàries d'hipersensibilitat.

Les reaccions d'hipersensibilitat varen ésser es-  
quematzades per COOMBS i GELL (1974) que les resumeixen  
en quatre formes de reacció, a les que posteriorment s'ha  
incorporat una cinquena que engloba el tipus estimuladori.

Els tipus I, II, III i V depenen de la interacció  
d'un antigen amb anticossos humorals i reben el nom glo-  
bal de reaccions d'hipersensibilitat im<sup>me</sup>diata. El tipus  
IV constitueix les reaccions d'hipersensibilitat retar-  
dada.

El tipus I o reacció anafilàctica o atòpica com-  
prèn reaccions degudes a anticossos de la classe IgE, a-  
nomenats reagines, que es fixen a les cèl.lules grasses,  
és a dir, mastòcits i basòfils. L'antigen reacciona amb  
les IgE, unint-se a través del fragment Fc de la molècu-  
la (fragment cristal.litzable); aleshores es produeix la  
degranulació de les cèl.lules sensibilitzades per les  
reagines i l'alliberament de mediadors químic<sup>s</sup>, tal com  
histamina, bradiquinina, substàncies de reacció lenta  
(SRS) i altres substàncies actives responsables de les ma-  
nifestacions químic<sup>s</sup>. Dins d'aquest tipus de reaccions  
d'hipersensibilitat s'inclouen la rinitis al.lèrgica,

l'asma extrínseca, al.lèrgica o atòpica, l'eczema atòpic, la urticària al.lèrgica i el xoc anafilàctic.

El tipus II inclou les reaccions citotòxiques o citolítiques degudes a la producció de lesions cel.lulars directes pels anticossos. En aquest cas, l'antigen està unit a la cèl.lula, però la lisi ve determinada per la intervenció del sistema del complement. L'antigen pot ésser un component de la pròpia cèl.lula (reaccions postransfusionals, malaltia hemolítica) o bé una substància estranya, gairebé sempre un haptè que es fixa a la superfície cel.lular per afinitat bioquímica (és el cas de les hemopaties per al.lèrgia medicamentosa). En aquest tipus de reaccions intervenen principalment immunoglobulines de tipus M i G.

El tipus III, també anomenat hipersensibilitat mitjançada per complexos, inclou totes les reaccions produïdes per complexos immunitaris, és a dir, aquells trastorns a on els antigens circulants lliures formen complexos amb anticossos humorals i condueixen a l'activació del sistema del complement i a l'agregació plaquetària. El resultat de la formació d'aquests complexos "in vivo" depèn, per una part, de les quantitats absolutes d'antigen i anticòs que determinaran la intensitat de la reacció i, d'una altra, de les proporcions en què es trobin, perquè un excés d'anticòs precipita els complexos que tendeixen a localitzar-se a la porta d'entrada de l'antigen, produint-se reaccions de tipus ARTHUS; en cas d'elevada

proporció d'antigen es formen complexos solubles que poden donar lloc a reaccions sistèmiques que s'engloben sota el nom de malaltia del sèrum.

En el cas del tipus IV, la reacció apareix a les 10-12 hores de la injecció de l'antigen, desenvolupant-se al màxim a les 24-48 hores. No és una reacció produïda per anticossos, sinó que és deguda a cèl.lules, concretament a linfòcits-T i per tant s'anomena també de tipus cel.lular. Aquests linfòcits a la seva superfície tenen uns receptors específics que al contacte amb l'antigen provoquen l'alliberament de factors anomenats linfoïnes. Té lloc en cas d'infeccions bacterianes, víriques i parasitàries i en certes dermatitis de contacte.

La hipersensibilitat estimulatòria o de tipus V inclou les reaccions en les quals anticossos, que no fixen complement, dirigits contra certs components de la superfície cel.lular produeixen una estimulació cel.lular no destructiva.

2. ASMA BRONQUIAL

## 2.1.- CONCEPTE

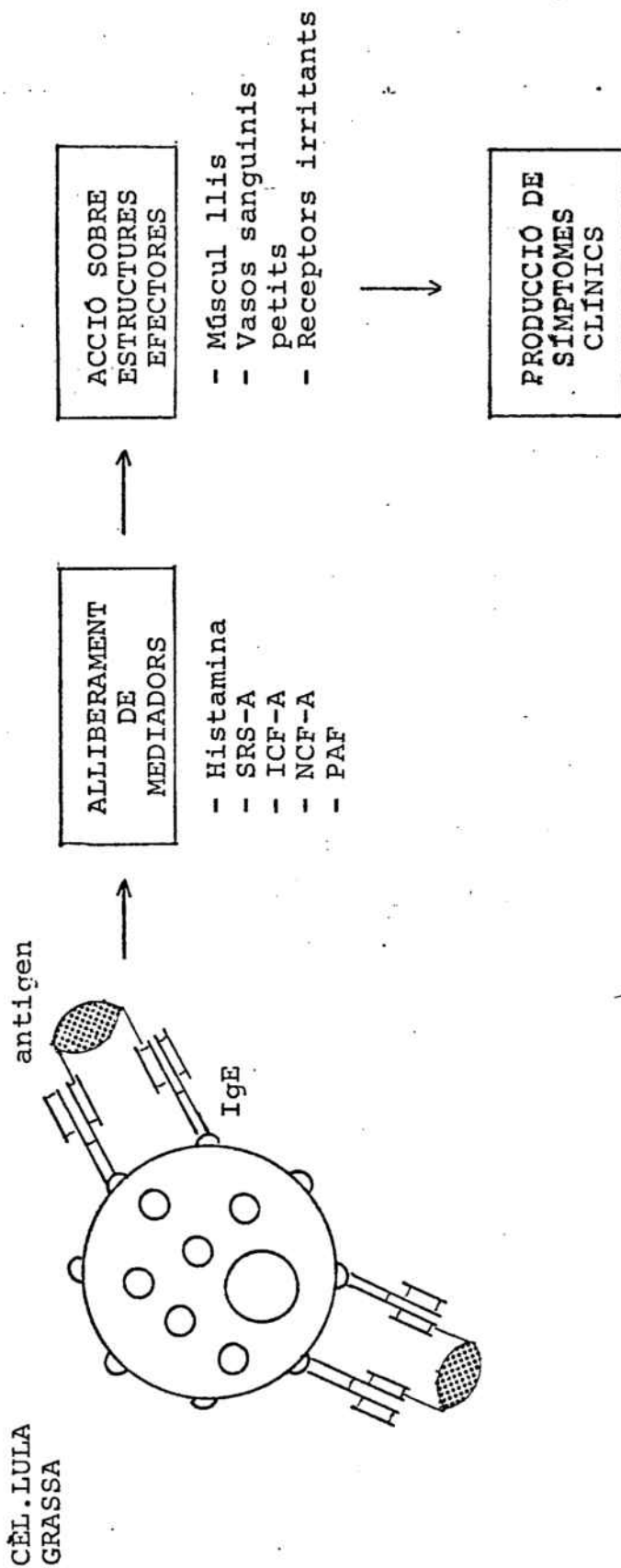
L'asma és una malaltia que es caracteritza per una resposta exacerbada de la tràquea i els bronquis en front a diferents al·lèrgens, prèvia sensibilització. Aquesta resposta es manifesta per una constricció difosa de les vies aèries; la gravetat varia de manera espontània o bé degut a la terapèutica (American Thoracic Society 1962, FROHLICH 1976).

L'obstrucció del flux de l'aire pels bronquis i bronquiols més petits dóna lloc a paroxismes recurrents de disnea de tipus sibilant característic d'aquesta malaltia. Essencialment, a la crisi d'asma participen el broncoespasmes, l'edema i la hipersecreció, que provoquen una disminució de la llum bronquial produint trastorns a la dinàmica ventilatòria, pertorbant-se així l'intercanvi gasós alveolar (MUÑOZ-LOPEZ 1974).

En l'esquema proposat per COOMBS i GELL per classificar les reaccions d'hipersensibilització (capítol 1.2.) l'asma pertany al tipus I. Els individus hipersensibles produeixen anticossos IgE després de l'exposició a l'al·lèrgen. La majoria d'aquests anticossos IgE es fixen a la superfície dels basòfils i dels mastòcits i, en una segona exposició, l'al·lèrgen s'uneix a dues molècules de l'IgE fixada i provoca la degranulació de les cèl·lules sensibilitzades mitjançant un increment de la permeabilitat cel·lular, alliberant-se així els mediadors vasoactius que oca

sionen els símptomes d'al.lergia. A la figura 1 s'esquema  
titza aquest procés.

En ocasions, l'asma s'inclou dins del tipus III,  
quan es manifesta per reaccions tardanes que apareixen  
gradualment i agreugen de manera lenta, hores després del  
contacte amb l'al.lergen; són degudes, probablement, a la  
formació d'immunocomplexos (PEPYS 1977).



**FIGURA 1 : REPRESENTACIÓ ESQUEMÀTICA DEL SISTEMA ANTICÒS IgE-CÈL. LULA GRASSA-MEDIADOR-EFECTOR, AL TEIXIT PULMONAR HUMÀ.**

## 2.2.- MECANISMES DE LA REACCIÓ AL·LÈRGICA

### 2.2.1.- IMMUNOGLOBULINA E

La importància d'aquesta immunoglobulina esdevé de la relació amb les reaccions d'hipersensibilitat de tipus I. A 1966 es va demostrar que els anticossos reagínics que intervenen a la hipersensibilitat de tipus atòpic, corresponien a una sola classe d'immunoglobulina, la IgE (ISHIZAKA 1966). En condicions normals o de salut, la concentració sèrica de la IgE és molt baixa i només una petita proporció de cèl.lules plasmàtiques la sintetitzen, localitzant-se principalment a la mucosa bronquial, gàstrica i a les amigdales (MERLEN 1966). L'activitat reagínica del sèrum humà i la seva relació amb la sensibilitat cutània a les malalties al·lèrgiques van portar a la diferenciació i caracterització de la IgE (ISHIZAKA 1967, JOHANSSON 1967a). Posteriorment es va comprovar que s'unia selectivament i majoritària a les cèl.lules grasses, provocant l'alliberament d'histamina (ISHIZAKA 1970).

Actualment les característiques de la immunoglobulina E estan ben definides gràcies a estudis realitzats en pacients amb mieloma múltiple (BENNICH 1974, DORRINGTON 1973). La proteïna IgE té una mobilitat electroforètica  $\gamma_1$ , un pes molecular d'aproximadament 190,000 daltons i un contingut de carbohidrats del 12 %. Les cadenes pesades són de tipus èpsilon amb 550 residus d'aminoàcids incluint una regió variable i quatre dominis constants:  $C_{e1}$ ,  $C_{e2}$ ,  $C_{e3}$  i



C<sub>ε</sub>4. La gran potència biològica de la IgE resideix en la capacitat d'associar-se a la superfície de mastòcits i basòfils, competència que es troba en les estructures aminoacídiques presents als dominis C<sub>ε</sub>3 i C<sub>ε</sub>4 (ISHIZAKA 1975, BENNICH 1974).

El paper fisiològic de la IgE encara és dubtós, però s'ha vist que els nivells sèrics augmenten molt en cas d'infecció per certs paràsits, sobre tot helmints; es postula si la histamina alliberada, degut al contacte dels antigens del paràsit amb la IgE unida als mastòcits de la paret intestinal, facilita l'expulsió dels intrusos (ROITT 1975).

S'han fet nombroses investigacions amb el fi de trobar una relació entre l'atòpia i la quantitat d'IgE en els mastòcits, arribant a vegades a conclusions contradictòries (ISHIZAKA 1973); però, estudis més recents, indiquen que en cas d'atòpia hi ha una correlació entre la concentració plasmàtica de la IgE i la quantitat d'aquesta unida als basòfils (CONROY 1976, GARCIA 1978). Hom pensa que, un estat al·lèrgic podria reflectir-se en un augment del nombre de receptors per la IgE, en la seva afinitat per tals receptors o bé en la facilitat de produir-se el "capping" amb un nombre inferior de molècules a la seva superfície.

S'han aïllat els receptors monovalents per la IgE de la superfície dels mastòcits i basòfils i s'han definit com una glucoproteïna d'un pes molecular de gairebé 60,000 (CONRAD 1978).

L'estudi de la IgE plasmàtica com a dada alterada en pacients al·lèrgics és indiscutible actualment. S'ha demostrat que en la majoria dels malalts al·lèrgics, els nivells estan augmentats (BARBERA 1977, MOGI 1977, WÜTHRICH 1978).

### 2.2.2.- IMMUNOGLOBULINA G I ALTRES IMMUNOGLOBULINES

A diferència del paper que té la immunoglobulina E en els processos d'hipersensibilitat de tipus I, la influència que pot representar la IgG està més obscura.

Hi ha algunes reaccions asmàtiques immediates, com és el cas de sensibilització a proteïnes de la llet (PARISH 1974) i a *Dermatophagoides* s.p. (BRYANT 1975), que tenen lloc mitjançant una activitat reagínica semblant a l'originaada per la IgE. Aquesta activitat en un principi es va anomenar "short-term sensitizing IgG" (ST-S IgG) i, posteriorment, s'ha vist que aquesta IgG pertany a la subclasse IgG<sub>4</sub> (VIJAY 1977).

La intervenció de la proteïna IgG<sub>4</sub> en al·lèrgics és poc freqüent, l'acció d'alliberament de mediadors és menys potent i, la seva activitat, s'ha atribuït a caràcters familiars hereditaris. Es responsable de reaccions cutànies immediates i tardanes de 5-6 hores (BERRY 1977).

En malalts afectats d'aspergilosi broncopulmonar al·lèrgica, s'ha detectat la intervenció de les subclasses IgG<sub>2</sub> i IgG<sub>3</sub> com anticossos citofíllics per a basòfils cir-

culants (ASSEM 1976). De la mateixa manera, en reaccions asmàtiques al·lèrgiques no immediates estan complicats els anticossos reagínics IgE, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> i IgG<sub>4</sub> i els anticossos precipitants IgG. La formació d'immunocomplexos activa el sistema del complement i produiria, una degranulació cel·lular per les anafilotoxines C3a i C5a; aleshores hom podria parlar d'hipersensibilitat de tipus III (SCHORLEMMER 1977).

Els anticossos bloquejants desenvolupats en el tractament d'hiposensibilització específica (capítol 2.5.1) s'inclouen per la majoria d'autors dins de la fracció proteïca IgG (LICHTENSTEIN 1968, SOBOTKA 1976, WIDE 1976, AALBERSE 1976, PAULL 1978, SHIMIZU 1978, HAMILTON 1979, ZIMMERMANN 1980, GLEICH 1981).

Nombrosos investigadors han estudiat els nivells d'IgG, IgA i IgM, amb l'objectiu de descobrir un mecanisme immunològic operatiu en pacients asmàtics (COLLINS-WILLIAMS 1967 i 1968, PALMA-CARLOS 1971, FROUCHTMAN 1971), però no s'ha trobat coherència en les fluctuacions. En un estudi posterior (LIN 1977) es va observar un increment en els nivells sèrics d'IgM, sense variar les concentracions d'IgG i IgA.

En pacients adults atòpics deficients d'IgA s'ha trobat un elevat nivell d'IgE, superior als malalts amb xifres d'IgA normals (KANOK 1978). També s'han trobat nivells d'immunoglobulina G en nens asmàtics inferiors a poblacions sanes. Però amb tot això, coexisteixen els investigadors

que no troben cap mena de variació als nivells d'anticossos IgG, IgA ò IgM (CABABIEU 1972, JOHANSSON 1967 b).

### 2.2.3.- EL SISTEMA DEL COMPLEMENT

Clàssicament, la hipersensibilitat immediata de tipus reagínic té lloc sense la intervenció del complement: els mastòcits i els basòfils alliberen la histamina quan la IgE fixada a la seva superfície, es combina amb l'antigen i, aquesta immunoglobulina, no pot activar el sistema del complement.

El sistema del complement representa un mecanisme de defensa no específic que, normalment, es troba en estat inactiu a la sang. Es pot activar per dues vies diferents: la via clàssica, coneguda des de fa molt temps i la via alterna, evidenciada més recentment, que representa una via ancestral essencial.

Activada pels complexos antigen-anticòs tipus IgM, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>3</sub> i, en menor grau, IgG<sub>2</sub>, agregats d'immunoglobulines, complexos d'IgG amb proteïna A estafilocòcica, endotoxines de certes bacteries, DNA, plasmina i tripsina (AGNELLO 1970, AUGENER 1971), en la via clàssica intervien els components de C1 a C9. La via alterna convergeix amb la primera en el component C3 i és activada per liposacàrids bacterials, inulina, diverses toxines, ions Mg i agregats d'IgA i IgG<sub>4</sub> (ALPER 1976, BUDKO 1976, MC CONNELL 1976). A la figura 2 s'esquematitza un resum d'aquests processos.

VIA CLÀSSICA

VIA ALTERNA

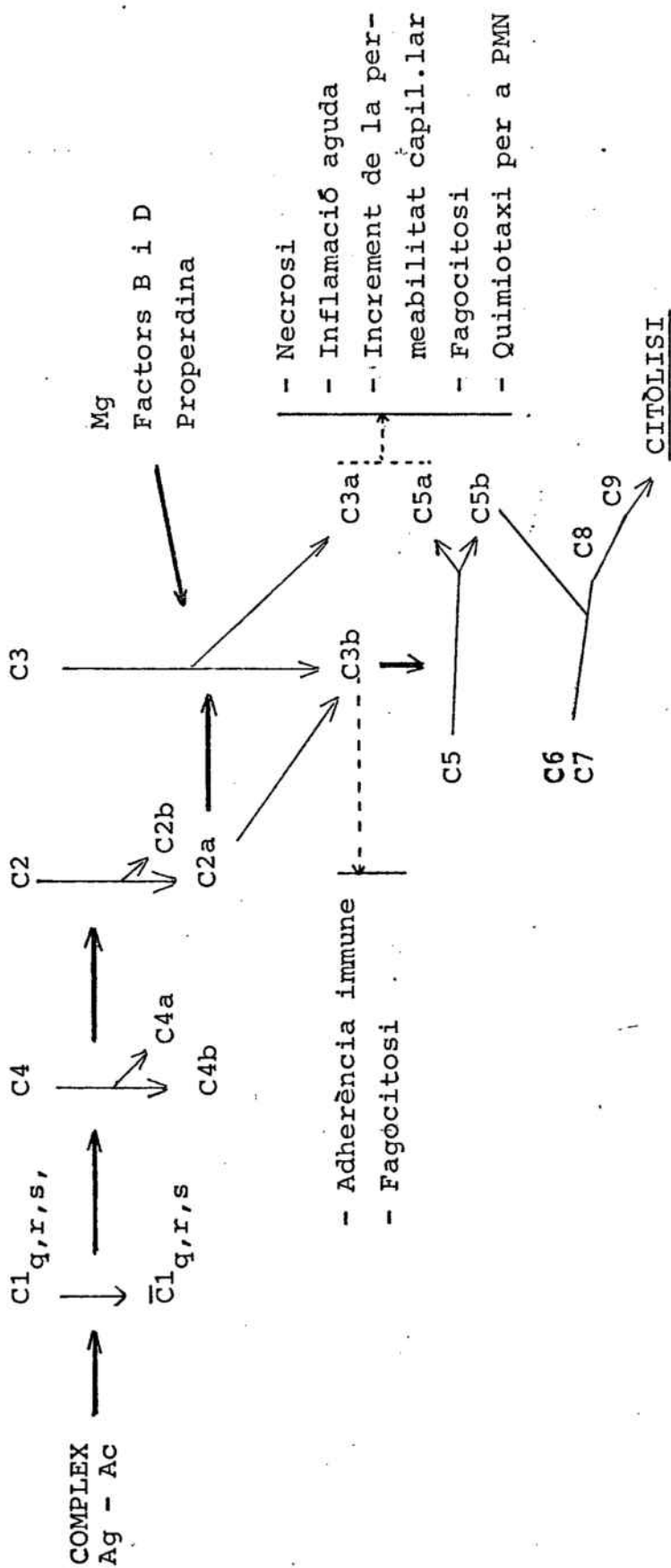


FIGURA 2 : MECANISMES D'ACTIVACIÓ DEL SISTEMA DEL COMPLEMENT

Els efectes ocasionats en posar-se en marxa el sistema del complement són variats. El principal i més conegut és l'atac cel·lular i subsegüent lisi originada pel complex C5-C9; però, a més a més, s'alliberen fragments proteics que produeixen accions diverses, secundàries a aquesta citolisi, com és, una agregació plaquetària i coagulació intravascular (BOKISH 1970, MARNEY 1975), un increment de la permeabilitat capil·lar, el fenomen d'adherència immune i altres.

Com ja s'ha esmentat, el sistema del complement pot activar-se per diferents mecanismes, a partir de substàncies de naturalesa molt variada. Hi ha patologies molt concretes i definides a on s'ha observat que la formació d'immunocomplexos IgG i IgM produeixen un consum de complement (MC DUFFIE 1978, STOJAN 1978, SAGASHI 1978; SMITH 1978). També, en diversos dèficits de  $\gamma$ -globulines, hi ha un increment de C3-PA com a mecanisme compensatori de la manca d'immunitat humoral (NAKAJIMA 1978).

Són nombroses les malalties a on la determinació de l'activitat complementària o d'algun component particular, té valor diagnòstic. Fins fa poc, no s'havien observat immunocomplexos d'IgE que poguessin, per tant, produir un consum de complement. Recentment s'han estudiat en pacients atòpics, immunocomplexos formats per anticossos IgE i antigen, observant que aquests augmentaven proporcionalment amb els símptomes clínics que apareixien després del test de provocació oral (BROSTOFF 1977 i 1979,

PAGANELLI 1979). Més tard, en estudis d'immunocomplexos en pacients asmàtics es va veure una prevalença d'aquests, més alta en els malalts que havien rebut una teràpia d'hiposensibilització (STENDARDI 1980).

Per una altra part, estudis realitzats incubant bàsòfils humans procedents d'individus al·lèrgics han establert que l'alliberament d'histamina induïda per la IgE o per C5a és similar.

En quant al nivell de complement total en asmàtics, no s'han notat diferències significatives, malgrat un sensible augment de la taxa mitja de complement durant els estats patològics en cas de pacients asmàtics al pol·len (BASTIDE 1980), que sembla ser degut al fet que en l'estació pol·línica hi ha més consum de complement que implica un increment de la biosíntesi i que provoca, finalment, una hipercomplementèmia.

Hom sap que nombrosos al·lèrgens són capaços d'activar el complement "in vitro", ja per la via clàssica o la via alterna. Concretament, es coneix que la pols domèstica i l'àcar *Dermatophagoides pteronyssinus*, provoquen l'activació del complement "in vitro" sense la intervenció de la IgE (BERRENS 1975). Però "in vivo", l'stress antigènic és insuficient per a que hi hagi un augment perceptible en el nivell de complement sèric (BASTIDE 1980). També s'ha vist una correlació entre els anticossos IgE a pols casa i la dosi d'al·lergen que ocasiona el broncoespasme en els tests de provocació. Això podria ésser degut a una

activació local del complement, que no es manifestaria a nivell sèric (ALLEN 1979). Però aquesta relació esmentada per alguns autors és contrariada per uns altres (ARROYAVE 1977).

#### 2.2.4.- HISTAMINA

Com ja s'ha esquematitzat a la figura 1, el complex antigen-IgE-cèl.lula grassa comporta l'alliberament de mediadors químics, que produiran els símptomes característics de la reacció al·lèrgica.

La histamina és el mediador és important i conegut. Es sintetitzat per l'organisme a partir de la L-histidina, pas que està regulat per la histidina descarboxilasa i a on actua com a cofactor el piridoxal fosfat. Està emmagatzemat en els mastòcits i basòfils que es localitzen sobre tot a la pell, tub digestiu, múscul estriat, pulmó, ronyó i fetge. Al plasma es troba en quantitat molt més petita que en els teixits i la concentració sèrica a l'home varia de 46 a 75 g/l. Té dues vies metabòliques que provoquen una ràpida destrucció, fet de gran importància, tenint en compte la potencial letalitat de les reserves d'histamina a l'organisme. (BEAVEN 1976).

L'acció farmacològica de la histamina es resumeix en els següents punts:

- Contracció de la musculatura llisa, actuant sobre els receptors tipus  $H_1$ , sobre tot de bronquiols, intestí, úter i



sistema vascular.

- Broncoconstricció, a través dels receptors de la irritació a nivell de la submucosa.

- Producció d'un edema per augment de la permeabilitat capil·lar, al provocar la separació de les cèl·lules endotelials limitants, quedant exposada la membrana basal i fugida del plasma a través d'ella.

- Hipersecreció de les glàndules lacrimals, salivals i de la mucosa nasal, traqueobronquial i digestiva.

- Excitació de les terminacions nervioses de les fibres sensitives de la pell, donant lloc a la pruïja.

Totes aquestes reaccions farmacològiques de la histamina justifiquen les diverses manifestacions clíniques de l'al·lèrgia, tant a nivell respiratori, pell, sistema digestiu, etc. (BARBERÀ 1975, BEAVEN 1976).

#### 2.2.5.- ALTRES MEDIADORS

La segona substància coneguda com a mediador químic va ésser l'anomenada "Slow Reacting Substance of Anaphylaxis" o SRS-A. Si s'administra SRS-A a individus normals, no s'observa cap efecte desagradable, però, si es dona a un individu asmàtic es desenvolupa una crisi típica, que no es combat amb antihistamínics i que presenta uns espasmes del múscul llis, d'efectes més lents que els obtinguts per la histamina i augment de la permeabilitat postcapil·lar.

S'ha aïllat i identificat la SRS-A gràcies a tècni

ques que comporten la seva extracció a gran escala i la conservació de l'activitat biològica durant el magatzematge. Però, la seva estructura no es coneix del tot, encara que sembla ser una molècula lipídica de baix pes molecular, amb un grup sulfat, responsable del caràcter àcid i capaç d'inactivar-se per l'acció de l'aril-sulfatasa B, alliberada dels eosinòfils durant la reacció al·lèrgica (GOOD 1972, HADDEN 1977).

Conjuntament s'allibera també, encara que en menor importància, el sistema de les KININES, format per kalicreïnes, kininògens i kinines, on destaquen la kalidina i la bradiquinina.

Les kinines es formen per acció enzimàtica de la kalicreïna sobre el kininogen involucrant una sèrie d'enzims que previament han d'activar-se. La primera proteïna desencadenant de la reacció és el factor Hageman del plasma, el mateix que provoca la coagulació sanguínea. La kalicreïna alliberada dels basòfils, a més a més, presenta capacitat quimiotàctica directa sobre els neutròfils i regulació "feed-back" sobre el factor Hageman.

La bradiquinina és un nonapèptid bàsic, que presenta una potent acció hipotensora, incrementa la permeabilitat capil·lar, provoca vasodilatació arteriolar i altres accions secundàries. Tots els seus efectes són potenciats per les prostaglandines de la sèrie E.

Un altre grup de mediadors està constituït per diversos factors quimiotàctics. En produir-se una interacció

antigen-IgE en la superfície dels basòfils i dels mastòcits s'alliberen una sèrie de compostos de baix pes molecular amb propietats quimiotàctiques per als eosinòfils ("Eosinophil Chemotactic Factor of Anaphylaxis" o ECF-A). Aquests agents estan preformats en els mastòcits i no en basòfils (LICHTENSTEIN 1978). A partir d'extractes pulmonars humans s'han aïllat i purificat dos tetrapèptids de caràcter àcid, de 300 a 400 daltons, amb activitat ECF-A (GOETZL 1975).

També s'han trobat els ICF-A, grup de pèptids amb característiques eosinofilotàctiques, amb un pes molecular de 1,200 a 2,500 i una activitat dirigida en primer lloc a eosinòfils i en menor grau a neutròfils. Actualment s'ha diferenciat el NCF-A ("Neutrophil Chemotactic Factor of Anaphylaxis"), mediador de pes molecular elevat, superior a 750,000 daltons, amb una acció primordial sobre neutròfils, menor sobre eosinòfils i nula per als monòcits.

El factor agregant de plaquetes o PAF ("Platelet Activating Factor") és un altre mediador de menor importància que, actuant sobre les plaquetes, provoca l'alliberament d'amines vasoactives com la serotonina i del factor plaquetari III (AUSTEN 1977).

A més d'aquests mediadors cal destacar a les prostaglandines. En front a l'estimulació antigènica, el teixit pulmonar humà allibera  $PGE_{1-2}$  i  $PGF_{2\alpha}$ , endoperòxids i  $TxA_2$ . La  $PGF_{2\alpha}$ , els PG-endoperòxids i el  $TxA_2$  són fortament broncoconstrictors i actuen sobre el múscul llis a

través de PG-receptors. Aquest efecte pot ésser inhibit mitjançant la inhalació de  $PGE_{1-2}$ , d'acció broncodilatadora (MATHE 1977).

S'ha trobat una relació quantitativa entre les accions de les prostaglandines de la sèrie E i l'augment dels nivells intracel.lulars d'AMP-cíclic. L'aïllament d'un receptor de membrana específic per a la sèrie E i la capacitat d'estimular la síntesi d'AMP-c, demostra la importància que tenen a la regulació cel.lular. D'un altra part, les accions de la  $PGF_{2\alpha}$  tenen lloc per modificacions de GMP-cíclic i també s'ha vist que la concentració d'AMP cíclic està alterada per variacions elevades d'aquesta prostaglandina, degut a la interacció amb els receptors de la sèrie E (KHUEL 1974).

### 2.3.- ETIOLOGIA

Els malalts d'asma bronquial poden classificar-se en tres grans grups segons la naturalesa de l'antigen desencadenant específic: bacterians, un 44.5 % de la totalitat, al·lèrgènics, un 25 % i mixtes, un 30 % (SCHEUERMAN 1963, PEREZ-GUERRERO 1970).

L'asma al·lèrgènica pura és la més important per aquests treballs ja que inclou a la pols domèstica que és l'agent desencadenant més corrent i és el causal per als nostres pacients.

El poder antigènic de la pols de casa es deu principalment als àcars del gènere *Dermatophagoides*, sobre tot el *D. pteronysinus* (MUÑOZ-LOPEZ 1975), essent més gran la densitat d'àcar en les mostres de pols procedents de matalassos i del terra dels dormitoris (PORTUS 1977), però la composició de les pols domèstiques depèn de les condicions climàtiques i geogràfiques.

Estudis fets amb diferents extractes de la pols de casa determinen una certa activitat enzimàtica en aquests, però descarten la possibilitat que ella sigui la causa antigènica en demostrar que alguns al·lèrgens pols de casa són termoestables (BOUSQUET 1980).

Pel diagnòstic de l'agent causal de l'al·lèrgia s'han estandaritzat extractes de pols domèstic però presenten gran heterogeneïtat i aleshores no es poden establir relacions entre les proves cutànies i la quantitat d'IgE específica (BOUSQUET 1980).

## 2.4.- DIAGNÒSTIC

### 2.4.1.- ANÀMNESI

L'anamnesi completa inclou la història personal i familiar, és a dir, els antecedents al·lèrgics, tant del malalt com de pares i parents propers. S'ha d'investigar també l'existència d'altres processos al·lèrgics concomitants o patits anteriorment. La coexistència d'eczema atòpic amb asma incrementa la gravetat de la simptomatologia al principi de la malaltia, encara que estudis a llarg terme demostren que l'efecte ha minvat. També s'intentarà esbrinar la incidència de rinitis i d'infeccions de l'aparell respiratori per diferenciar l'asma de les broncopaties espàstiques recidivants.

Hi ha una predisposició al·lèrgica hereditària: la incidència en nens és superior quan ambdós progenitors han manifestat alguna patologia atòpica, essent màxima si es tracta de la mateixa malaltia al·lèrgica, el que demostra l'existència d'una influència genètica (MAYER 1973). Fins ara, els estudis realitzats sobre la base genètica semblen indicar, que la transmissió hereditària és de tipus dominant, incomplet i pleòtrop, és a dir, que els gens influeixen en més d'un caràcter (MUÑOZ-LOPEZ 1974).

Hi ha una sèrie de factors que contribueixen al desenvolupament d'una crisi asmàtica, entre aquests factors es poden destacar els agents climatològics, ambientals i la intervenció del factor psicològic.

S'han realitzat molt estudis sobre la influència del sexe i la raça. S'ha descrit un augment d'incidència entre els barons de la raça negra, sense repercutir en el pronòstic i la gravetat (BLAIR 1977).

Entre els factors climàtics que poden influir predominen el fred excessiu, els canvis brucs de temperatura, els corrents d'aire i la humitat. En relació a la contaminació ambiental, les elevades concentracions de diòxid de sofre, diòxid de carboni, òxids de nitrogen, matèries en suspensió, ozon i ions atmosfèrics, modifiquen, en diferent grau, el curs de la malaltia (OSTERBALLE 1979). També s'ha demostrat que el tabac influeix, produint un primerenc desenvolupament de l'asma i una reactivitat superior (WITTIG 1978) i a més a més condueix a un estat no específic causant un increment de la irritabilitat bronquial (JOHNSTONE 1981). S'ha observat que els nens de pares fumadors tenen un nivell d'IgE superior (KJELLMAN 1981).

En referència al component psicològic, el fet de patir una malaltia crònica com l'asma, implica un stress emocional fort que pot comportar un empitjorament i inclús alterar i condicionar la vida del pacient.

#### 2.4.2.- DIAGNÒSTIC CLÍNIC

El quadre clínic de l'asma no està molt ben delimitat, per tant cal fer un diagnòstic diferencial amb altres processos que es presenten amb símptomes semblants.

En una simptomatologia acusada es pot trobar el

volum respiratori de reserva disminuït, la capacitat vital reduïda un 50 %, la capacitat funcional doble del normal i es manté normal la capacitat pulmonar. En sang arterial es pot detectar hipoxèmia, hipocàpnia i alcalosi respiratòria.

També es pot observar malformacions toràciques, lesions eczematoses a la pell, urticària, etc. Conjuntament pot haver certs gestos característics, com l'anomenada "salutació al·lèrgica" (MUÑOZ-LOPEZ 1974).

#### 2.4.3.- DIAGNÒSTIC DE LABORATORI

##### 2.4.3.1.- Proves "in vivo"

Aquestes proves van encaminades a descobrir l'al·lergen desencadenant. Inclouen les proves cutànies i les proves de provocació.

Les proves cutànies posen de manifest les possibles reagines tisulars, mitjançant la introducció d'un al·lergen a la pell de l'individu objecte de l'exploració. Si aquest està sensibilitzat i, per tant, té anticossos específics, es desenvolupa una reacció antígen-anticòs que dona lloc a una sèrie de fenòmens cutanis característics.

Hi ha molts tipus de proves cutànies, entre ells es pot assenyalar el prick skin test, el scratch skin test i el test intradèrmic. La diferència entre aquests assaigs, essencialment, és la quantitat d'al·lergen introduït a la pell i això comporta discordàncies en la sensibilitat. Un



test intradèrmic es considera gairebé 1,000 vegades més sensible que un prick test. Per alguns al.lèrgens els extractes disponibles no són suficientment potents pel prick test o el scratch test i per altres hi ha molt poca o cap correlació entre un resultat altament positiu del test intradèrmic i el quadre clínic (JOHANSSON 1975).

Les proves de provocació donen resultats més bons que els de les proves cutànies, perquè combinen resultats quantitativament del procediment de titulació amb la localització amb la localització de la reacció de l'òrgan que expressa els símptomes clínics. Són proves difícils de fer i presenten un relatiu perill, això fa que, sobre tot en nens, no s'utilitzin gaire.

A més, a l'asma, es pot fer servir el test d'inhalació per confirmar la responsabilitat d'un al.lèrgen com agent causal.

#### 2.4.3.2.- Eosinofília

L'eosinofília és una dada important per al diagnòstic i en general, valors elevats estan relacionats amb la gravetat de l'asma.

El paper que executen els eosinòfils en el fenomen al.lèrgic no està ben establert. L'eosinofília és deguda a l'acció dels mediadors ECF-A alliberats en la reacció antigen-anticòs.

A l'asma extrínsec, la hipereosinofília sembla tenir un beneficiós paper, doncs són cèl.lules capaces de

fagocitar complexos immunes, sobre tot d'IgE. Els eosinòfils neutralitzen també l'acció de la SRS-A i el PAF i produeixen l'alliberament de plasminogen, participant en la resposta inflamatòria (HONSINGER 1972).

#### 2.4.3.3.- Poder histaminopèxic del sèrum

Aquest caràcter ve donat per la capacitat de protecció en front a la histamina i la propietat de captar la histamina endògena. Està disminuït en pacients asmàtics.

#### 2.4.3.4.- Valoració de la IgE

S'han projectat molts mètodes per determinar els nivells d'immunoglobulina E i cada vegada es van trobant procediments més sensibles i precisos.

La tècnica més simple és la immunodifusió radial, però és poc sensible. S'ha tractat d'augmentar la sensibilitat introduint l'ús de substàncies radiactives o emprant substàncies fluorescents.

Un altre mètode és el "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" o ELISA, que presenta l'avantatge d'ésser senzill, arribar a una sensibilitat acceptable i mostrar un alt grau de correlació amb els resultats obtinguts del "Radioimmunosorbent test" o RIST.

Dins de les tècniques de radioimmunoassaig, les més importants fan servir anticossos fixats a una fase sòlida. Un d'aquests mètodes és el RIST, del que es descriu rà el fonament al capítol 3.1.3.2. Si la fase sòlida a la que s'uneix l'anticòs és un disc de paper, el mètode s'ano

mena PRIST ("Paper Radioimmunosorbent test").

El "Cellulose particle radioimmunosorbent test" o CRIST és una tècnica "sandwich" degut a l'addició d'un segon anticòs després de la primera incubació.

La tècnica del doble anticòs o DAB també utilitza un segon anticòs que actua com aglutinant del complex antigen-anticòs i permet la separació; el fonament es descriu al capítol 3.1.3.2.

#### 2.4.3.5.- Valoració de la IgE específica: RAST

Abans del descobriment de la immunoglobulina E, l'estudi dels desordres atòpics només es feia per procediments "in vivo". L'aïllament de la IgE i el desenvolupament d'anticossos contra aquesta immunoglobulina van fer possible la realització de processos immunològics per a la seva detecció.

A 1953, COOMBS, HOWARD i MYNORS van idear un mètode "teòricament capaç de detectar anticossos incomplets i no precipitants", anomenat "red-cell-linked antigen-antiglobulin reaction" o RCLAAR. Però aquest assaig no va aconseguir aïllar reagents fins molts anys després quan es van trobar anticossos anti-IgE eficaços (COMBS 1968).

A 1967, es va descriure per primera vegada el "Radioallergosorbent test" (RAST) per WIDE i col.laboradors, basat en el mateix principi que el RCLAAR, doncs també mesura directament les molècules d'IgE específica, però amb algunes modificacions molt importants a la pràctica.

El RAST és un mètode de radioimmunoassaig, tipus

"sandwich" amb una sensibilitat pràcticament igual que les reaccions intradèrmiques de les proves cutànies. Els resultats obtinguts amb aquest mètode no disminueixen pel tractament simptomàtic i la presència dels símptomes al·lèrgics no interfereix la mesura (JOHANSSON 1975).

La concentració d'IgE que determina el RAST està molt poc influenciada pel tractament amb drogues, com antihistamínics, broncodilatadors, esteroides o cromoglicat sòdic. Sols s'han trobat petites variacions en el cas de teràpia amb esteroides (KUMAR 1971) i cromoglicat sòdic (BERG 1971).

Només cal una substància marcada (anti-IgE) per valorar els anticossos reagínics per a una àmplia gamma d'al·lèrgens. A més és un mètode segur i no té respostes retrasades que podrien existir després que el pacient surt de la clínica.

També es pot aplicar el RAST quan no es poden fer proves cutànies al pacient per ser massa jove o massa vell, està malalt, presenta complicacions tipus eczema, ha pres drogues que interfereixen, com antihistamínics i en cas de pacients embarassades. Aquest assaig té gran utilitat quan cal seguir els efectes del tractament, com una hiposensibilització, amb la síntesi d'IgE, o quan els resultats obtinguts amb les proves cutànies són ambigus i necessiten un suport (MERRET 1981).

Però el RAST donarà resultats erronis si es produeixen falsos positius o falsos negatius. Els resultats

veritables poden indicar una sensibilitat antiga, una reactivitat creuada amb un altre al·lergen o algun mecanisme que evita la degranulació dels mastòcits a l'interferir amb l'atac dels anticossos IgE a aquestes cèl·lules.

Metodològicament, es poden produir falsos positius quan la IgE sèrica total és excepcionalment elevada (superior a 5,000 U/ml) i aleshores pot haver una adsorció inespecífica d'IgE en els porus de les partícules o els discs de paper utilitzats com a suport de l'al·lergen, o una unió no específica d'IgE a substàncies, com lecitines, dels extractes al·lergènic. També es podria produir la unió d'anti-IgE marcada d'especificitat inapropiada. Amb el temps, es podran evitar aquests errors utilitzant suports menys porosos i anti-IgE més específica. D'una altra part, la probabilitat d'obtenir un RAST positiu en un individu no al·lèrgic és inferior al 0.5 %.

Falsos negatius poden tenir lloc quan les reaccions de la IgE estan localitzades en el budell, la mucosa nasal o pulmons i, per tant, no es detecten per proves cutànies, o quan els símptomes són massa recents per al RAST. També aquest mètode pot no mesurar baixos però significants nivells d'IgE específica (MERRET 1981).

En comparar el RAST amb la prova cutània intradèrmica s'obté una coincidència del 60 % (WIDE 1967). També hi ha una correlació d'aquest ordre entre les proves cutànies i el test de provocació. La majoria dels resultats desavinents són proves intradèrmiques positives amb test

de provocació o RAST negatius. Tanmateix, pot donar-se que, pacients després d'una prolongada immunoteràpia no tinguin símptomes, però, encara presentin suficients anticossos IgE per donar una reacció positiva pel RAST (JOHANSSON 1975). Però, moltes vegades es prefereix les proves cutànies per raons econòmiques i perquè si s'utilitzen bons extractes al·lèrgics estàndard, proporcionen resultats de confiança més ràpidament.

En estudiar el valor diagnòstic del RAST es confronten els resultats d'aquest amb els del test de provocació. Les correlacions varien del 74 al 100 %, segons el tipus i puresa de les preparacions d'al·lèrgen utilitzades i els pacients estudiats (JOHANSSON 1972, WIDE 1973). En més del 90 % dels casos s'obtenen conjuntament resultats positius del RAST i del test de provocació.

Finalment cal indicar que un RAST negatiu no es considera com un resultat absolut i, si el test de provocació és positiu, es parla d'una al·lèrgia de baix grau, amb una importància clínica més petita.

En quant al paper o importància del RAST en el diagnòstic, MERRET (1981), ha proposat tres estudis per diagnosticar un pacient atòpic: en primer lloc, la realització del RAST per als al·lèrgens més comuns del medi ambient; la història del pacient a partir d'un qüestionari establert i que es llegirà mitjançant una computadora i, per últim, els nivells sèrics d'IgE total. Aleshores es considera que existeix un procés atòpic quan el resultat

del RAST és positiu, la computadora resumeix la història i dóna els al·lèrgens de primera i segona elecció, i quan el nivell d'IgE sèric és superior al límit considerat normal.

S.G.O. JOHANSSON (1975), després d'una experiència de cinc anys i haver analitzat més de 10,000 pacients, ha proposat un esquema per realitzar el diagnòstic a on confereix al RAST un paper decisiu. Aquest esquema es troba a la figura 3.

Després de considerar l'ampli paper que juga el RAST com a tal, cal assenyalar que dins d'aquest s'han considerat petites modificacions amb el fi d'arribar a una tècnica més idònia. A 1979, NALEBUFF i FADAL van intentar aconseguir un mètode amb una sensibilitat diagnòstica més gran, permetent la identificació de pacients amb baixos però significants nivells d'IgE i, a més, van assegurar predir mitjançant aquest mètode l'òptima concentració d'al·lèrgen per començar la immunoteràpia. Les modificacions més notables són, un increment en la incubació de la primera fase fins a 16 hores i una ampliació del rang de detecció. A més a més, la determinació de la radiactivitat dels problemes la realitzen en dos tubs, de forma que amb un primer tub es mesura el temps necessari per arribar a 40,000 cpm i amb un segon tub es troba el resultat comptant un temps igual al valor mig dels temps mesurats al primer tub de tots els problemes.

A 1980, GLEICH i col.laboradors fan un estudi de



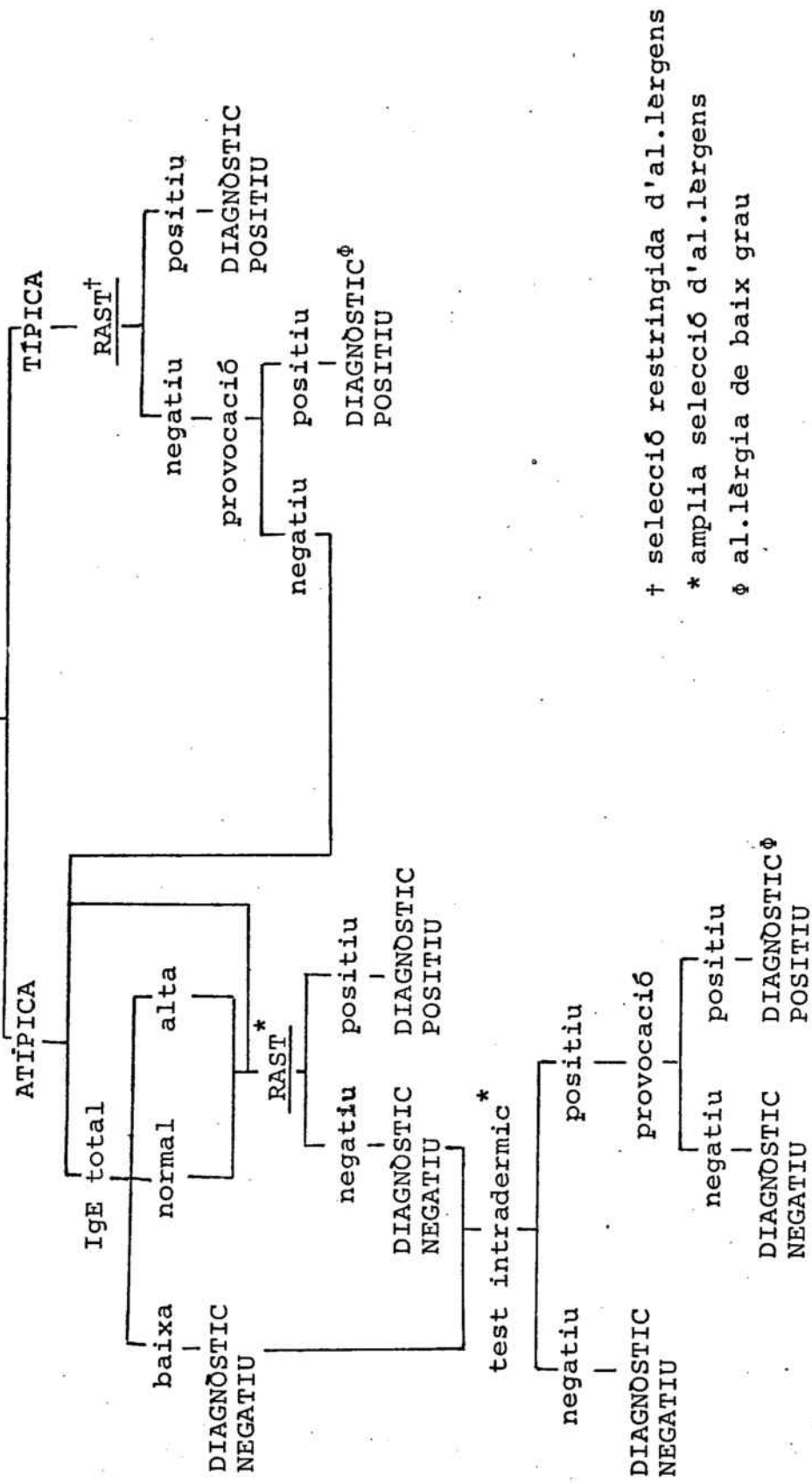
la tècnica del mini-RAST. Aquest assaig es realitza amb al.lergen acoblat a cel.lulosa microcristal.lina i es varien les quantitats d'aquest antigen i de la solució isotòpica. Es treballa amb un volum d'al.lergen acoblat a fase sòlida deu vegades més petit, fet que comporta una tècnica més susceptible a la interferència dels anticossos IgG en el sèrum dels pacients tractats, i també es redueix quatre vegades la quantitat d'anti-IgE  $^{125}\text{I}$ , augmentant així la sensibilitat de l'assaig.

A 1981, DE FILIPPI i col.laboradors comparen la tècnica comercialitzada Phadebas RAST<sup>R</sup> amb dos assaigs modificats. Un d'ells es realitza igual com aconsella la casa subministradora amb l'excepció que s'utilitza una nova anti-IgE  $^{125}\text{I}$  i una nova solució reguladora per als rentats. El segon assaig es fa amb aquestes modificacions i amb un increment del volum sèric i allargant la primera incubació a 16 hores.

Recentment també s'ha desenvolupat un mètode diferent al RAST capaç de mesurar nivells d'IgE específica; és la tècnica anomenada "Microtiter Solid Phase Radioimmunoassay" o MSPRIA (REID 1981). El procediment utilitza plaques de clorur de polivinil per a microtitulació a on s'adsorbeix físicament, en cada pouet, l'antigen i s'incuba successivament amb albúmina, sèrums problema i finalment anti-IgE humana marcada radioactivament; seguidament es separen els pouets i en uns vials es realitza la mesura en el comptador gamma. Aquest assaig presenta l'avantatge d'una manipulació més senzilla.



HISTÒRIA  
(amb proves cutànies)



† selecció restringida d'al.lèrgens  
 \* amplia selecció d'al.lèrgens  
 φ al.lèrgia de baix grau

FIGURA 3 : POSSIBLE PAPER DEL RAST EN EL DIAGNÒSTIC DE L'AL.LÈRGIA

## 2.5.- TRACTAMENT

El tractament bàsic de l'asma té com a fi modificar la personalitat al·lèrgica, evitar el contacte amb els al·lèrgens i disminuir la sensibilitat a aquests. Per això, cal que la terapèutica es realitzi continuadament i seguint unes indicacions precises.

### 2.5.1.- HIPOSENSIBILITZACIÓ

La hiposensibilització és una terapèutica basada en l'etiologia immunològica de la malaltia, que pretèn reduir la capacitat de reacció de l'organisme en front als diferents al·lèrgens, als que el pacient es troba sensibilitzat. Per això, es posa en contacte l'individu al·lèrgic amb l'agent causal i, consegüentment, es desenvolupa una tolerància a l'al·lèrgen (NORMAN 1980).

El mecanisme d'acció de la hiposensibilització es creu que és la formació dels anomenats anticossos bloquejants, després de les injeccions d'al·lèrgens, que actuen competitivament, impedit així la reacció antígen-anticòs en la superfície de les cèl·lules grasses.

Les investigacions clíniques d'aquest tractament parteixen dels treballs realitzats per NOON a l'any 1911. Posteriorment, ARSDEL i MIDDLETON (1961) van demostrar que després d'una teràpia d'hiposensibilització específica, la quantitat d'antigen necessari per produir l'òptim

alliberament d'histamina dels basòfils dels pacients era molt gran. Més tard, però, LICHTENSTEIN (1971) demostrà que els canvis que es produeixen en l'alliberament d'histamina justifiquen només alguns dels resultats beneficiosos de la immunoteràpia.

Nombrosos assaigs de doble cec s'han realitzat per estudiar l'eficàcia de la hiposensibilització. Entre els treballs que han tingut un percentatge d'èxit relativament gran, en el tractament de nens amb asma bronquial, es troben els efectuats per RACKERMANN i EDWARDS (1952), MC ALLEN (1967), JOHNSTONE (1968 b i 1975), TAYLOR (1971) i AAS (1971), concretament aquest últim va fer els estudis en al·lèrgics a pols de casa. Cal indicar, però, que nens asmàtics que conjuntament presentaven o havien presentat febre del fenc o eczema, la persistència de la malaltia era més gran, és a dir, l'asma tenia una durada més llarga (BUFFUM 1968, JOHNSTONE 1968 a). Paral·lelament, s'han desenvolupat treballs que no han trobat diferències entre els pacients en qui s'administrava placebo i els tractats amb l'extracte al·lèrgic (FORGACS 1968, TAYLOR 1974), però aquests fracassos s'atribueixen a la utilització d'una dosi massa baixa d'al·lèrgen, insuficient per obtenir una resposta bloquejant o al fet que els resultats s'han pres massa ràpidament. També les causes de fallida a la pràctica de la immunoteràpia es consideren degudes a l'ús d'antígens no específics o mal escollits, en una dosi inapropiada o, a la utilització de con

dicions de dubtós valor (JOHNSTONE 1981).

#### 2.5.1.1.- Mètodes d'hiposensibilització

La desensibilització en general s'ha portat a terme per injeccions parenterals de l'al.lergen. S'han realitzat treballs, però, que tracten de cercar altres vies, com la via oral o la via intranasal.

Un estudi comparatiu ha demostrat que per extractes de pol.len, el mètode oral és, categòricament, inferior a l'administració parenteral, però, amb altres antigens, pot tenir efectes més profitosos (FEINBERG 1940). Així, en al.lèrgics a la penicil.lina s'ha vist que la hiposensibilització per via oral és un procediment relativament eficaç (SULLIVAN 1980).

WELSH i col.laboradors (1980) han estudiat un mètode intranasal en al.lèrgics a pol.len d'ambrosia i han arribat a concloure que és una tècnica efectiva i una alternativa més barata que la via parenteral. També són bons resultats els obtinguts per NICKERSON (1980) en la desensibilització per via nasal, encara que MATHEWS (1980) la troba un mètode inefectiu.

S'han fet nombroses investigacions amb el fi d'allargar el temps entre injeccions o arribar abans a la hiposensibilització. Ja a 1957 (LOVELESS) es van preparar emulsions de l'extracte al.lergènic en oli mineral, però posteriorment es va descobrir un potencial poder carcinogen en les injeccions d'aquestes emulsions.

La utilització de precipitats d'alúmina d'extractes de pol·len sembla oferir algun avantatge, doncs és possible reduir el nombre d'injeccions necessàries a la immunització pre-estacional.

Un altre material estudiat combina extractes d'al·lergen amb piridina, seguit d'una precipitació amb alúmina (FUCHS 1959), però així és desnaturalitza gran part de l'antigen E.

Es va intentar fer un "al·lergoide" en tractar l'al·lergen amb formaldehid i es van obtenir bastant bons resultats (MARSH 1970). El glutaraldehid també s'ha utilitzat per produir agregats o polímers i ha mostrat una bona eficàcia clínica per a la febre del fenc deguda a ambrosia.

Un tractament amb glutaraldehid i posterior absorció en una suspensió de l-tirosina, ha aconseguit per alguns al·lèrgens, amb tres administracions, reduir la incidència de les reaccions sistèmiques (MILLER 1974) i, recentment, s'ha vist que aquesta associació produeix un increment de 1-200 vegades els nivells d'IgG específica (METZGER 1980). També per extractes de pol·len s'ha utilitzat amb bons resultats el polímer àcid D-glutàmic : D-lisina (GOLDSTEIN 1980).

#### 2.5.1.2.- Anticossos bloquejants

COOKE, a 1935 va descobrir una activitat bloquejant, en trobar després d'una terapèutica per injeccions

d'extracte al·legènic, el sèrum tenia certa activitat neu-  
tralitzant (bloquejant) per a l'al·lergen, que no posseïa  
abans de la immunització. Més tard. LOVELESS (1940) va és  
ser capaç de mesurar els anticossos bloquejants, mitjan-  
çant proves cutànies després de la inactivació al calor  
de l'activitat reagínica (IgE). LICHTENSTEIN i col·labora-  
dors (1966 a i b, 1968) van utilitzar l'alliberament  
d'histamina de leucòcits, per determinar l'activitat blo-  
quejant i van demostrar que aquesta estava associada als  
anticossos IgG. Posteriorment s'ha inclòs dintre de la  
subclasse IgG<sub>4</sub> (GESSEN 1976).

Per mesurar els anticossos bloquejants s'ha uti-  
litzat la tècnica de ràdio-immunoprecipitació específica  
amb antigens marcats radioactivament i anti-sèrum especí-  
fic a IgG (SOBOTKA 1976, PAULL 1978); també el radioimmu-  
noassaig en fase sòlida per anticossos IgG, utilitzant  
cromatografia d'afinitat i anti-IgG <sup>125</sup>I purificat (SHIMI-  
ZU 1978) i, recentment, HAMILTON (1979), ha desenvolupat  
un mètode amb proteïna A estafilocòcica marcada radioacti-  
vament, per mesurar la IgG unida a l'antigen sobre fase  
sòlida,

Uns altres mètodes utilitzats són el RAST (capítol 3.2.1.) i una modificació d'aquest, el RAST-I (capítol 3.2.3.). Aquesta última tècnica presenta els avantat-  
ges següents: mesura anticossos IgG i IgE utilitzant el  
mateix antigen acoblat a la fase sòlida, permet mesurar  
els anticossos IgG encara que es disposi d'antígens no pu

rificats i només cal un reactiu isotòpic anti-IgE (GLEICH 1981).

La mesura dels anticossos bloquejants ha esdevingut de gran importància perquè s'intenta trobar una associació entre els nivells d'IgG bloquejant i la milloria clínica. LICHTSTEIN (1971) no va observar cap correlació entre l'augment d'anticossos bloquejants i la milloria clínica, fet comprovat per BERG (1971), però el primer autor trobà una petita relació entre les respostes d'anticossos bloquejants i els resultats clínics, donant lloc a la hipòtesi segons la qual els anticossos IgG protegeixen de les reaccions adverses de les injeccions d'al·legen. També s'ha postulat sobre la possibilitat que els anticossos bloquejants interfereixin a la síntesi de les reagents (BERG 1971).

#### 2.5.1.3.- Variació de les immunoglobulines i AMP cíclic durant la hiposensibilització

Els nivells d'anticossos IgG han estat mesurats per varis investigadors durant el curs de la immunoteràpia, existint una gran disparitat d'opinions. Així, hom ha observat que la taxa queda igual o a vegades augmenta (NORMAN 1980); per altres autors s'eleva al llarg del tractament fins un màxim, després del qual disminueix lleugerament (CHIPS 1979); també en altres casos s'incrementen els nivells d'IgG i IgA específiques en les secrecions i s'especula si aquest és el lloc ideal per desenvolupar-se la funció dels anticossos protectors en pacients amb al-

lèrgia respiratòria (PLATTS-MILLS 1976); per uns altres autors disminueix la IgG i es manté la IgA (KEELING 1979); també s'ha vist una relativa constància en els nivells d'IgG i un augment en la IgA (CASTELLOTE 1980).

En quant als nicells d'IgE hi ha casos on aquests es mantenen al principi i després disminueixen ràpidament (CHIPS 1979), en altres s'observa un increment durant els primers dies tant d'IgE total com d'IgE específica, fet que s'associa a un efecte reforçador, i després d'una llarga teràpia disminueixen els anticossos reagínics (BERG 1971) i en altres es mantenen els nivells d'IgE (KEELING 1979, CASTELLOTE 1980). També s'ha observat que amb la immunoteràpia es suprimeix l'augment estacional d'anticossos IgE específics i disminueix en gairebé tots els pacients, però encara es manté un nivell elevat (LICHTENSTEIN 1973).

Els nivells d'AMP-cíclic s'han vist augmentar immediatament després de l'administració dels extractes en una majoria dels pacients, potser degut a la molta histamina secretada que estimula la formació d'AMP-c, o bé al fet que aquesta és induïda per catecolamines que la histamina és capaç d'alliberar en virtut d'un balanç catecolamina-histamina (FARRERONS 1980). En altres estudis relatius a l'excreció urinària d'AMP-c, que es troba reduïda abans de la immunoteràpia, no s'ha observat normalització dels nivells amb la hiposensibilització (CASTELLOTE 1981).



### 2.5.2.- ALTRES TERÀPIES

Conjuntament al procés d'hiposensibilització hi ha altres tractaments basats en l'administració d'unes determinades substàncies. Així s'utilitzen corticosteroides, agents  $\beta_2$ -adrenèrgics, metilxantines...

L'administració de corticosteroides té lloc sovint, sobre tot en estats aguts i semicrítics, però presenten nombrosos efectes secundaris si el tractament és prolongat. Es fa servir gran diversitat de derivats, entre ells el di propionat de beclometasona, el valeriat de betametasona, la triamcinolona, la hidrocortisona, la cortisona, la prednisona i la dexametasona. El mecanisme d'acció d'aquestes substàncies no es coneix exactament, se sap segur que actuen modificant el sistema dels nucleòtids cíclics (SVED-MYR 1978).

Els agents  $\beta_2$ -adrenèrgics provoquen una broncodilatació, una inhibició de l'alliberament de mediadors i un increment de la depuració mucociliar, facilitant l'eliminació del mucus viscosos. Actualment el més utilitzat és el salbutamol, per la seva selectivitat i llarga durada.

Les metilxantines s'usen degut a la potent acció broncodilatadora que posseixen, sobre tot la teofil·lina i els seus derivats. Però aquestes substàncies requereixen una bona dosificació i per això s'ha de portar un rigorós control dels seus nivells plasmàtics.

Unes altres substàncies utilitzades són el cromo-

glicat disòdic, expectorants i mucolítics i antihistamí-  
nics. Actualment estan en estudi les prostaglandines de  
la sèrie E per la seva activitat antiinflamatòria i bron-  
codilatadora, però són de curta durada, tenen efectes ir-  
ritants i provoquen respostes molt variades.

### 3. MATERIAL I MÈTODES

### 3.1.- MATERIAL

#### 3.1.1.- GRUP CONTROL

El grup control està format per 21 nens sans d'ambdós sexes amb edats compreses entre 2 i 9 anys. Prèviament es van sotmetre a un "sreening" bioquímic, per assegurar la total normalitat orgànica o funcional.

#### 3.1.2.- MALALTS ESTUDIATS

Hem cercat la possible formació d'anticossos bloquejants i la inactivació "in vitro" del complement per l'al.lergen en un total de 25 pacients d'ambdós sexes, diagnosticats clínicament com asmàtics al.lèrgics, provinents del Servei de Pediatria de l'Hospital Clínic Provincial de Barcelona. Al moment de prendre les mostres, l'edat d'aquests malalts oscil.lava entre 3 i 12 anys, presentant l'estatura i pes normals: en cap s'observaren trastorns endocrins, nutritius o circulatoris.

Aquests pacients es van sotmetre a tractament sota control del Servei de Pediatria de l'esmentat Hospital. El tractament va ésser bàsicament la hiposensibilització específica (capítol 2.5.1.), utilitzant les suspensions d'extractes al.lergènics Pangramin Depot<sup>R</sup>, subministrats per la casa Abelló S.A.

### 3.1.3.- ESTUDIS PREVIS REALITZATS

Els malalts objecte d'aquest treball han estat estudiats en el nostre Departament a anteriors investigacions. Les dades obtingudes fins ara marquen un preludi i completen els nostres resultats, permetent una anàlisi en profunditat que relaciona conjuntament tots els paràmetres aconseguits.

#### 3.1.3.1.- Proves cutànies

Es va utilitzar la tècnica de la intradermorreacció, basada en la producció d'una petita pàpula blanca a la pell per l'administració intradèrmica d'una solució de l'extracte al·lèrgic, llegint-se els resultats després de 15 ò 20 minuts de la injecció.

Els extractes emprats que varen ésser els responsables de la majoria de respostes d'hipersensibilitat, subministrats per la firma Abelló, es resumeixen a continuació:

1. Pols domèstica
2. Dermatophagoides s.p.
3. Arbres
4. Arbusts
5. Gramínees
6. Fongs

Els resultats es troben a la taula II a.

TAULA II a : PARÀMETRES ESTUDIATS ABANS DE LA HIPOSENSI-  
BILITZACIÓ

---

|                       |                       |        |   |                |
|-----------------------|-----------------------|--------|---|----------------|
| PROVES CUTÀNIES :     | Pols domèstica        | 92 %   | > | +++            |
|                       | Dermatophagoides s.p. | 64 %   | > | +++            |
|                       | Arbres                | 16 %   | > | ++             |
|                       | Arbusts               | 24 %   | > | ++             |
|                       | Gramínees             | 16 %   | > | ++             |
|                       | Fongs                 | 48 %   | > | +++            |
|                       |                       |        |   |                |
| LATEX-HISTAMINA       |                       | 55.6 % | < | dilució 1/80   |
|                       |                       |        |   |                |
| EOSINOFÍLIA           |                       | 73.5 % | > | 3 % eosinòfils |
|                       |                       |        |   |                |
| ANTECEDENTS PERSONALS |                       | 32.4 % |   |                |
| ANTECEDENTS FAMILIARS |                       | 73.5 % |   |                |

---

### 3.1.3.2.- Valors d'immunoglobulina E

La mesura de la IgE total es va assajar per dos mètodes diferents: el "Radioimmunosorbent test" o RIST i la tècnica del RIA per doble anticòs o DAB.

El primer mètode es basa en una reacció competitiva fins arribar a l'equilibri de saturació: la concentració d'IgE d'una mostra desconeguda es valora per la capacitat que té de competir amb una quantitat fixa d'IgE marcada per unir-se a anticòsos anti-IgE incorporats covalentment a partícules de Sephadex<sup>R</sup>; es mesura la radioactivitat lligada a aquestes partícules, separades per centrifugació, radioactivitat que és inversament proporcional a la quantitat d'immunoglobulina present als plasmes.

Es van utilitzar per fer el RIST, els reactius subministrats per la casa Phadebas i, prèviament, es van diluir les mostres 1/10 per tractar-se de pacients asmàtics al·lèrgics en qui s'esperava elevats nivells d'IgE.

La tècnica del radioimmunoassaig per doble anticòs està basada en la competència entre la IgE problema i la IgE marcada per unir-se a un antisèrum anti-IgE específic, obtingut de moltó. Després d'aquesta primera incubació, a diferència del mètode anterior, les dues fraccions se separen per l'addició d'una quantitat fixa d'un segon antisèrum que presenta uns punts d'unió específics per les immunoglobulines de moltó. Posteriorment es centrifuga.

Els reactius utilitzats en aquest últim assaig va ren ésser proveïts per Kallestad Inc (IgE Quantitope<sup>R</sup>).

Els resultats obtinguts dels malalts en els diferents intervals estudiats es mostren a la taula II b.

#### 3.1.3.3.- Valors de les immunoglobulines G, M i A

Els nivells d'IgG, IgM i IgA es van establir per la tècnica de la immunodifusió radial simple, que es fonda en què en posar en contacte antigens multivalents i anticossos divalents es combinen, formant xarxes tridimensionals que s'agreguen i precipiten. En aquest mètode en concret es visualitzen anells de precipitació després de la difusió de l'antigen en una capa de gel que conté l'antisèrum corresponent. L'àrea limitada per l'anell és directament proporcional a la concentració de l'antigen.

La quantificació de les immunoglobulines es va realitzar per les plaques d'immunodifusió Tri-Partigen<sup>R</sup>, utilitzant solucions estàndard subministrades, al igual que les plaques, per l'Institut Behring.

Els resultats es troben a la taula II b.

#### 3.1.3.4.- Valors de l'Activitat Complementària Total i dels components C3, C4 i C3 proactivador

Aquests nivells es van estudiar utilitzant la mateixa tècnica d'immunodifusió radial (capítol 3.1.3.3.).

Per determinar l'Activitat Complementària Total o A.C.T. els reactius varen ser subministrats per la casa Kallestad, tant la solució estàndard com les plaques d'immunodifusió radial.



En el cas del component C3 es va fer servir la solució estàndard proporcionada per l'Institut Behring i Immuno-plate III Radial Immunodiffusion test Plates<sup>R</sup>.

L'estudi dels nivells de C3 proactivador i C4 es va fer utilitzant el Protein estàndard plasma (humà) i les plaques d'immunodifusió M-Partigen<sup>R</sup> proporcionats per l'Institut Behring.

Els resultats d'aquestes determinacions estan resumits a la taula II b.

#### 3.1.3.5.- Altres paràmetres

Es va determinar el poder histaminopèxic del sèrum mitjançant la tècnica de LABORDE i MESKLEN (Test de làtex-histamina), resultant que un 55.6 % dels pacients presentaven títols inferiors al valor normal fixat en 1/80.

També es va fer el recompte d'eosinòfils, realitzant una extensió en porta i tenyint mitjançant la tècnica de MAY-GUINEALD-GIEMSA: el 73.5 % dels pacients presentaven eosinofília superior a un 3 %.

Per últim, cal considerar que en el primer pas del diagnòstic es va recollir la història al·lèrgica familiar i la immunològica personal, obtenint-se les dades tractades a la taula II a.

#### 3.1.4.- OBTENCIÓ DE LES MOSTRES

Les mostres varen ser preses abans de començar el tractament, després de tres mesos d'aquest i als set me-

TAULA II b : IMMUNOGLOBULINES PLASMÀTIQUES, A.C.T. I COMPONENTS DEL COMPLEMENT  
 ABANS I DURANT LA HIPOSENSIBILITZACIÓ

|                   | N.T.                     | 3 M.                    | 7 M.                    |
|-------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| IgE total (U/ml)  | 803.40 ± 595.71†<br>(28) | 772.80 ± 157.40<br>(23) | 803.00 ± 570.76<br>(17) |
| IgG (mg/100 ml)   | 988.32 ± 309.28<br>(34)  | 816.01 ± 328.31<br>(30) | 843.52 ± 174.83<br>(26) |
| IgM (mg/100 ml)   | 191.46 ± 61.26<br>(34)   | 115.74 ± 45.66<br>(30)  | 109.57 ± 62.08<br>(26)  |
| IgA (mg/100 ml)   | 95.87 ± 61.58<br>(34)    | 122.91 ± 65.56<br>(30)  | 130.88 ± 40.11<br>(26)  |
| A.C.T. (U/ml)     | 139.73 ± 50.85<br>(33)   | 167.68 ± 38.38<br>(27)  | 175.16 ± 25.03<br>(25)  |
| C3 (mg/100 ml)    | 105.14 ± 20.24<br>(33)   | 94.77 ± 12.03<br>(30)   | 102.82 ± 14.99<br>(26)  |
| C3 PA (mg/100 ml) | 15.78 ± 1.98<br>(34)     | 15.69 ± 1.14<br>(30)    | 15.55 ± 1.43<br>(26)    |
| C4 (mg/100 ml)    | 30.56 ± 4.33             | 28.46 ± 5.00            | 27.60 ± 4.13            |

† m ± s  
(N)

sos del principi.

En els tres casos, es retirà tot tipus de medicació als pacients 48 hores abans de l'extracció, per evitar les alteracions que haguessin pogut implicar. L'educació es va realitzar mitjançant una punció venosa, es va utilitzar l'EDTA disòdica com anticoagulant, es va centrifugar a 1,500 g durant 10 minuts i es varen congelar les mostres a  $-20^{\circ}$  C.

Els resultats que han donat aquests plasmes són els mateixos que hauriem obtingut utilitzant sèrums, fet que s'ha comprovat en el nostre Departament (BARBERA 1975).

### 3.2.- MÈTODES

#### 3.2.1.- "RADIOALLERGOSORBENT TEST" (RAST)

Aquest assaig quantifica la IgE al.lergen específica. S'ha fet utilitzant els reactius comercialitzats per la casa Phadebas.

##### 3.2.1.1.- Fonament

La prova "in vitro", Phadebas RAST<sup>R</sup>, es fonamenta en la reacció que té lloc entre l'al.lergen d'interès, unit per un enllaç covalent a un disc de paper i la IgE específica de la mostra problema. Després de rentar la IgE inespecífica, s'afegeixen anticossos anti-IgE marcats isotòpicament (<sup>125</sup>I) que formaran un complex. La radioactivitat d'aquest complex es mesura aleshores, mitjançant un comptador gamma. L'IgE específica present a la mostra és directament proporcional a la radioactivitat lligada al disc.

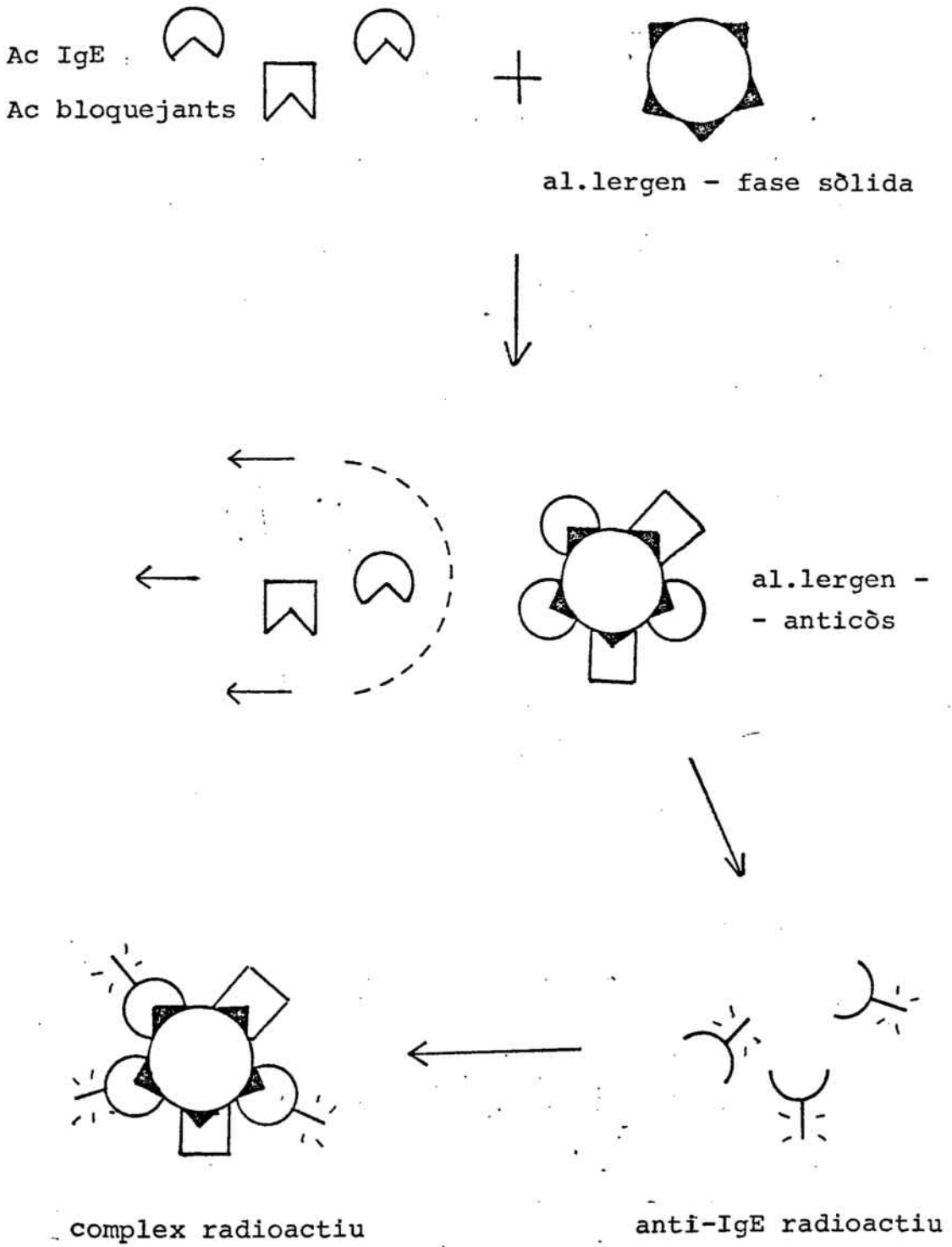
A la figura 4 es representa, esquemàticament, la valoració d'aquesta immunoglobulina.

##### 3.2.1.2.- Reactius

- Reactiu isotòpic: anti-IgE <sup>125</sup>I, provinent d'un antiserum de conill. Es va reconstituir amb aigua destil·lada i presentava una activitat d'aproximadament 5 µCi a la data de marcada.

- Solució de rentat per afegir al sèrum fisiolò-

FIGURA 4 : REPRESENTACIÓ ESQUEMÀTICA DEL R A S T



gic en una concentració de l'1 %, per extreure la IgE inespecífica.

- Reactius de referència: sèrums A, B, C i D i discs de referència. Els sèrums es reconstituïren amb aigua destil·lada i es varen al·licotar en dosis de 50 µl, congelades fins el moment d'utilitzar-les.

- Discs d'al·lergen de qualitat uniforme, d'estabilitat consistent i d'adsorció inespecífica mínima. En el nostre cas vam utilitzar al·lèrgens pols de casa tipus Bencard H3<sup>R</sup> per ser els que més s'adapten a la fauna pròpia de la ciutat de Barcelona. La concentració d'al·lergen en els discs és d'uns 3 mg de proteïna per disc, òptim per l'estudi.

#### 3.2.1.3.- Tècnica

S'ha seguit el procediment assenyalat per la casa Phadebas, amb alguna modificació, acoblant el RAST al RAST-neutralització.

A 150 µl de sèrum, tant d'abans com de després del tractament d'hiposensibilització, s'afegeix un disc d'al·lergen; es deixa incubar 24 hores a temperatura ambient i seguit d'aquest temps es succionen 100 µl de cada sèrum per realitzar, amb aquest volum, el RAST-neutralització, segons es descriurà més endavant (capítol 3.2.2.3), Els discs es renten tres vegades amb sèrum fisiològic i solució de rentat, després s'addicionen 50 µl d'anti-IgE <sup>125</sup>I deixant incubar tota la nit a temperatura ambient i,

posteriorment, s'elimina la radioactivitat no lligada per rentat.

El complex al·lergen-IgE específica-anti-IgE  $^{125}\text{I}$  es porta al comptador on es mesura directament la radioactivitat, durant 10 minuts. L'activitat total correspongué a un volum d'anti-IgE  $^{125}\text{I}$  igual a l'afegit als problemes.

#### 3.2.1.4.- Expressió dels resultats

Els comptes de radioactivitat mesurades per a cada sèrum (capítol 3.2.7.) s'expressen en referència a l'activitat total, segons la fórmula:

$$\text{Percentatge d'activitat lligada} = \frac{\text{cpm disc problema}}{\text{cpm activitat total}} \times 100$$

(% RAST)

#### 3.2.2.- ASSAIG DE LA NEUTRALITZACIÓ DEL RAST

L'assaig de la neutralització del RAST o RAST-N és una tècnica introduïda per WIDE (1976) per detectar la presència d'anticossos bloquejants en el sèrum de pacients al·lèrgics després del tractament. En aquest treball s'ha utilitzat aquest fonament, emprant els mateixos reactius aplicats en el RAST (capítol 3.2.1.)

##### 3.2.2.1.- Fonament

La valoració es basa en la competència que es crea entre els anticossos bloquejants i els anticossos reagf-

nicis IgE per a la unió amb l'al·lergen.

Quan els anticossos bloquejants són presents al sèrum, competeixen amb la IgE específica i això es tradueix en una disminució d'aquesta IgE unida a l'al·lergen i per tant, en un descens en la radioactivitat lligada.

El sèrum s'incuba dues vegades amb el disc per observar la resistència que ofereix la mostra posthiposensibilització a la neutralització. Aquesta tècnica està esquematitzada a la figura 5.

#### 3.2.2.2.- Reactius

S'han utilitzat els mateixos reactius esmentats al capítol 3.2.1.2.

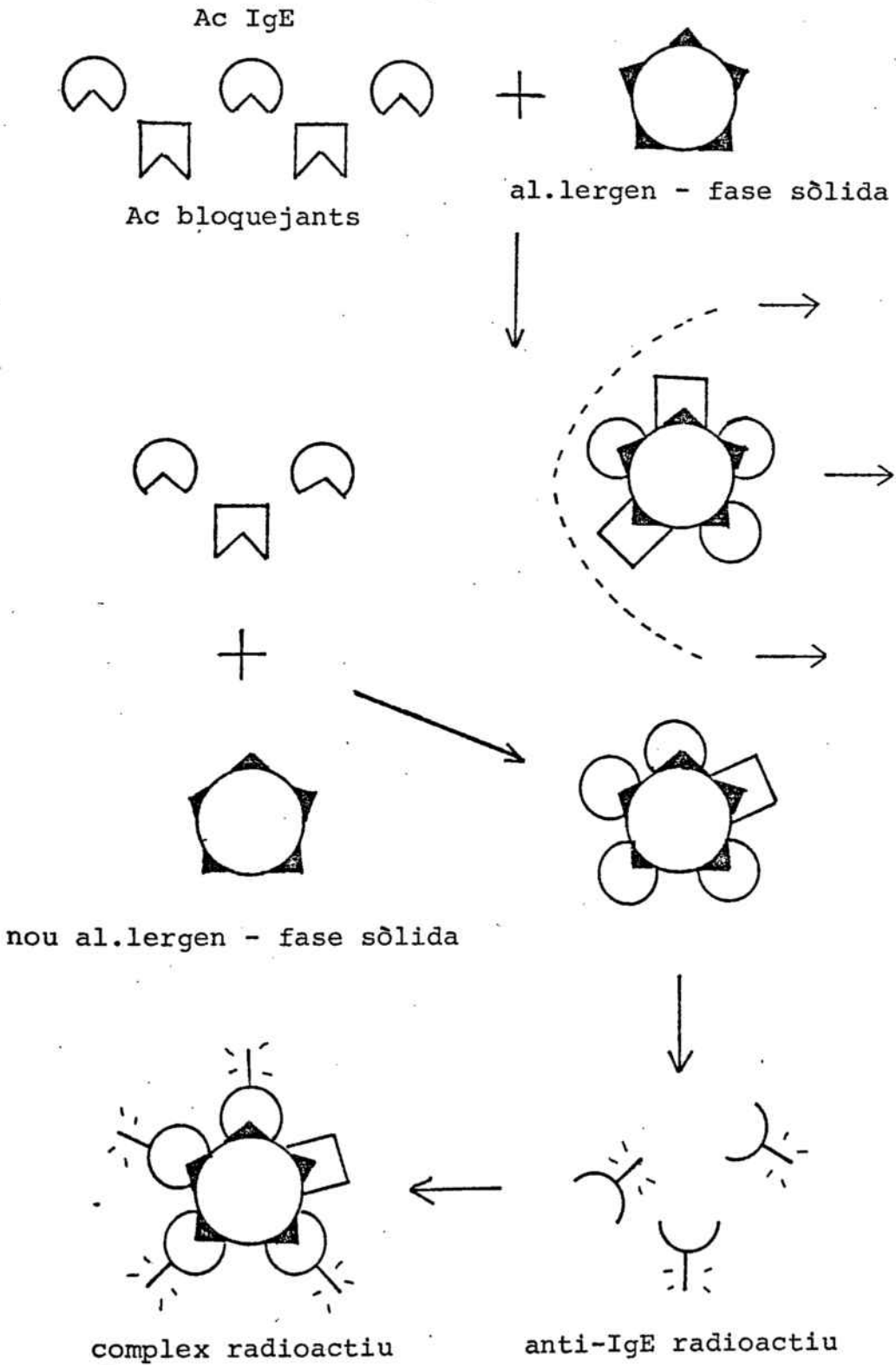
#### 3.2.2.3.- Tècnica

A 150 µl de cada sèrum s'incorpora un disc d'al·lergen i es deixa incubar 24 h a temperatura ambient. Després se separen 100 µl del líquid que s'incuben un mínim de 3 h a temperatura ambient, amb un nou disc. El primer disc segueix la tècnica del RAST.

Un cop finalitzada la incubació es renta el disc tres vegades, amb la solució de rentat en sèrum fisiològic, per eliminar la IgE lliure. Seguidament, s'afegeix una quantitat de reactiu isotòpic, deixant-lo tota la nit en contacte. Després es fa un segon rentat per eliminar l'excés d'anti-IgE  $^{125}\text{I}$  i es mesura la radioactivitat lligada al disc en el comptador gamma.



FIGURA 5 : REPRESENTACIÓ ESQUEMÀTICA DEL R A S T - N



#### 3.2.2.4.- Expressió dels resultats

Els comptes mesurats a la tècnica RAST-N s'expressen com a percentatge d'activitat lligada, tal com s'explica al capítol 3.2.1.4.

#### 3.2.3.- ASSAIG D'INTERFERÈNCIA DEL RAST

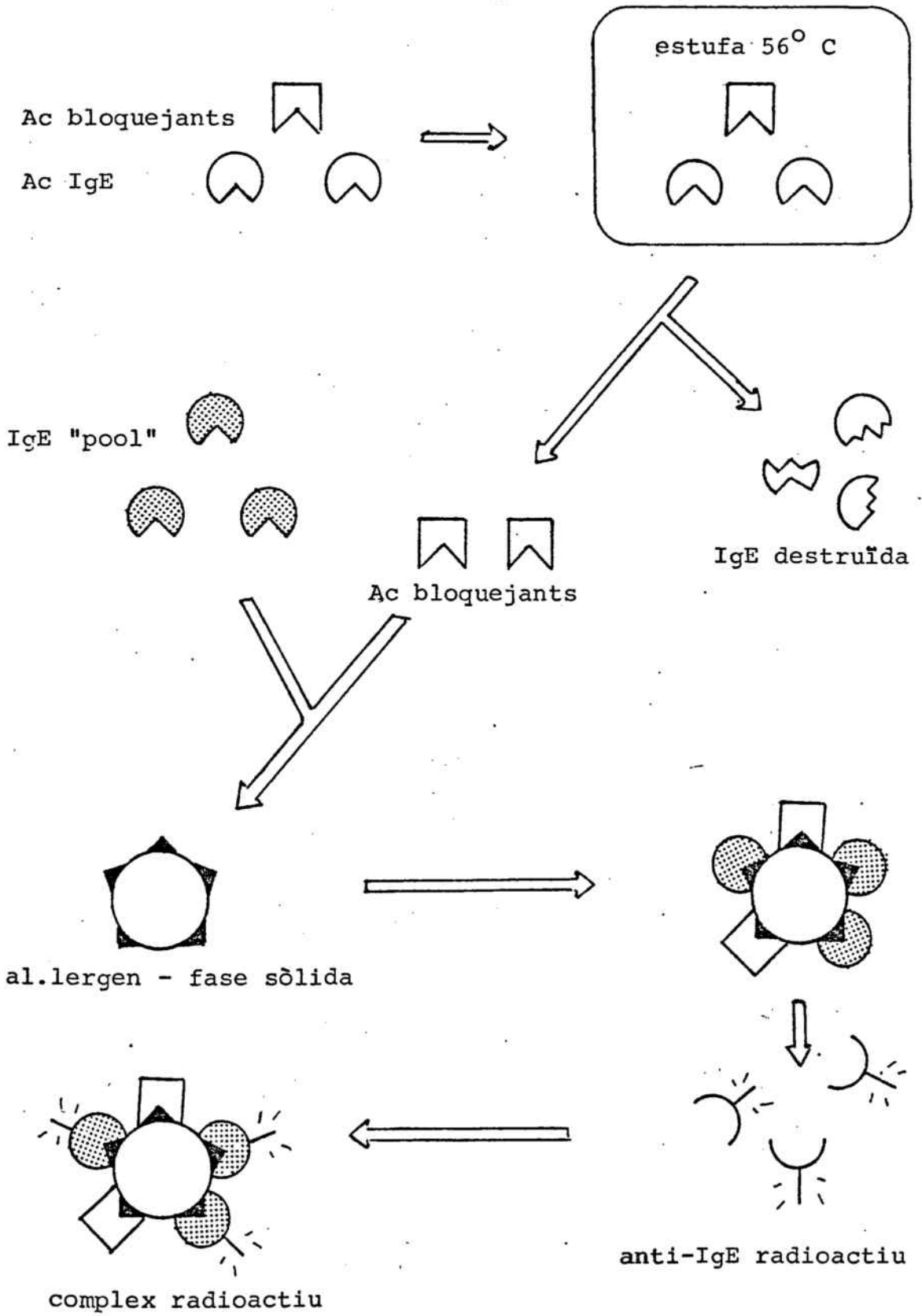
L'assaig d'interferència del RAST o RAST-I és una prova desenvolupada recentment per GLEICH i col.laboradors (1981) per detectar, a l'igual que el RAST-N, la presència d'anticossos bloquejants després del tractament hiposensibilitzant a individus al·lèrgics.

##### 3.2.3.1.- Fonament

Aquest assaig es basa en aïllar l'activitat bloquejant dels sèrums hiposensibilitzats i determinar-la posteriorment per la interferència que produeix a la unió d'anticossos IgE addicionats amb l'al·lergen fixat a una fase sòlida.

L'aïllament dels anticossos bloquejants es pot fer gràcies al caràcter relativament termoestable que presenten i a la destrucció dels determinants termolàbils Fc de la IgE a 56° C. La interferència es mesura mitjançant la tècnica del "radioal·lergosorbent test" per un colum del sèrum prèviament escalfat i una quantitat constant de sèrum al·lèrgic control, sense haver rebut cap tractament (fig.6).

FIGURA 6 : REPRESENTACIÓ ESQUEMÀTICA DEL R A S T - I



### 3.2.3.2.- Reactius

L'estudi es realitzà en el sèrum dels malalts després de la hiposensibilització, que en el nostre cas correspongueren a les mostres extretes als set mesos del tractament i, en el sèrum de referència, que per aquest treball va ésser un "pool" de sèrums dels mateixos malats d'abans de començar la teràpia.

La resta de reactius utilitzats van ésser els emprats en el RAST (capítol 3.2.1.2.).

### 3.2.3.3.- Tècnica

En un principi, tots els sèrums problemes s'escalfen a 56° C durant 4 h, espai de temps que, segons estudis anteriors, desproteïnitza aproximadament el 91.2 % de la IgE (GLEICH 1981). Posteriorment es centrifuga 15 min a 1,600 g per assegurar la bona separació del precipitat.

El sèrum resultant segueix el procediment del RAST, tal com s'indica al capítol 3.2.1.3., però, amb una petita modificació en el volum inicial: es parteix de 50µl del sèrum problema escalfat a on s'afegeixen 2.5 µl del "pool" de referència i un disc de l'al.lergen. S'incuba a temperatura ambient i se segueix tal com assenyala la tècnica.

A més a més es realitza el RAST per 2.5 µl d'aquest "pool" no hiposensibilitzat amb 50 µl de sèrum fisiològic, sota les mateixes condicions.

#### 3.2.3.4.- Expressió dels resultats

Els resultats es tracten matemàticament per determinar el percentatge d'interferència:

$$\% \text{ INTERFERÈNCIA} = \left( 1 - \frac{\% \text{ RAST sèrum escalfat} + \text{"pool"}}{\% \text{ RAST "pool"}} \right) \times 100$$

a on

% RAST sèrum escalfat + "pool" = tant per cent d'activitat lligada mesurada en el RAST de 50 µl de sèrum escalfat i 2.5 µl de "pool" de referència.

% RAST "pool" = idem per 50 µl de sèrum fisiològic i igual quantitat de "pool".

#### 3.2.4.- QUANTIFICACIÓ DEL RAST-INTERFERÈNCIA I D'ANTICOSSOS BLOQUEJANTS

A la fase experimental de l'assaig d'interferència del RAST es va fer un estudi complementari amb l'intent de quantificar l'activitat bloquejant que presentaven els sèrums posthiposensibilització.

##### 3.2.4.1.- Fonament

Aquest assaig té dues vessants fonamentades en els treballs realitzats per GLEICH (1981). Per una part mesura la interferència que produeixen quantitats creixents de sèrum prèviament escalfat a 56<sup>o</sup> C amb una dosi constant d'anticossos IgE. D'una altra banda, dona per a cada sèrum una concentració d'anticossos bloquejants, basant-se en una

equivalència establerta arbitràriament.

#### 3.2.4.2.- Reactius

Bàsicament aquesta prova és un RAST-I i, per tant, s'utilitzen els mateixos reactius esmentats al capítol

3.2.3.2.

#### 3.2.4.3.- Tècnica

La tècnica per mesurar la interferència que produeixen els anticossos bloquejants només es va realitzar en un sèrum, triat al atzar dels que s'havia deduït prèviament, mitjançant els resultats del RAST-N, presentaven certa activitat bloquejant.

La quantitat constant de "pool" no hiposensibilitzat va ésser de 2.5  $\mu$ l i els volums creixents del sèrum del pacient als set mesos de la teràpia correspongueren a 5, 25, 50, 100, 150 i 200  $\mu$ l, als quals s'hi va afegir l'esmentada dosi i es va procedir al RAST (capítol 3.2.3.3) En els dos primers casos es va corregir el volum, addicionant sèrum fisiològic.

#### 3.2.4.4.- Expressió del resultat

Als resultats aconseguits s'aplica la fórmula citada per calcular el percentatge d'interferència (capítol 3.2.3.4.).

Per quantificar els anticossos bloquejants s'atorga al valor mig d'interferència de tots els sèrums mesurats una concentració de 100 U/ml dels esmentats anticos-

sos i a partir d'aquí es calcula proporcionalment el nivell bloquejant sèric per a cada pacient després de set mesos d'immunoteràpia.

### 3.2.5.- ADSORCIÓ PER CROMATOGRÀFIA D'AFINITAT DE LA IgG I "RADIOALLERGOSORBENT TEST"

Amb el fi d'arrodonir els resultats sobre la presència d'anticossos bloquejants, encara es va fer un altre assaig: l'adsorció de la immunoglobulina G, fracció en que presumiblement es troben els anticossos bloquejants (LICHTENSTEIN 1968, AALBERSE 1976, SOBOTKA 1976, WIDE 1976, PAULL 1978, SHIMIZU 1978, HAMILTON 1979, ZIMMERMANN 1980, GLEICH 1981).

#### 3.2.5.1.- Fonament

L'adsorció de la IgG es va realitzar mitjançant la tècnica de cromatografia d'afinitat, que respon a un tipus de cromatografia d'adsorció on el material del llit presenta una afinitat específica per a la substància que s'ha d'aïllar. Les propietats adsorbents específiques del material del llit s'obtenen acoblant covalentment en una matriu insoluble, una molècula, en general una proteïna, capaç d'unir sota unes condicions determinades al material a separar. Canviant les condicions experimentals es pot eluir la substància adsorbida, però aquesta part no ha interessat en el nostre treball. La separació és ràpida i espe

cífica, perquè deriva de l'especificitat natural d'anti-gen-anticòs (fig. 7).

### 3.2.5.2.- Reactius

- Llit: Format per gel de Sepharosa 4B CNBr-activada, obtingut de la reacció de la Sepharosa 4B amb bromur de cianogen. El producte actiu es liofilitza en presència de dextrà i lactosa, per preservar la seva activitat i així pot conservar-se fins a 18 mesos a temperatura inferior a 8° C. Un cop inflat el gel, la Sepharosa 4B CNBr-activada és estable físicament i químicament en les condicions experimentals, permet un flux adequat i l'adsorció inespecífica és mínima.

Activació del gel: El bromur de cianogen reacciona amb els grups hidroxil de la Sepharosa formant grups imidocarbonats i carbamats, i es constitueixen enllaços creuats en la Sepharosa que contribueixen a millorar les estabilitats física i tèrmica de l'estructura del gel. Posteriorment, s'acobla la proteïna "lligant" mitjançant una reacció entre els grups amino d'aquesta i els grups imidocarbonats, donant lloc a enllaços covalents.

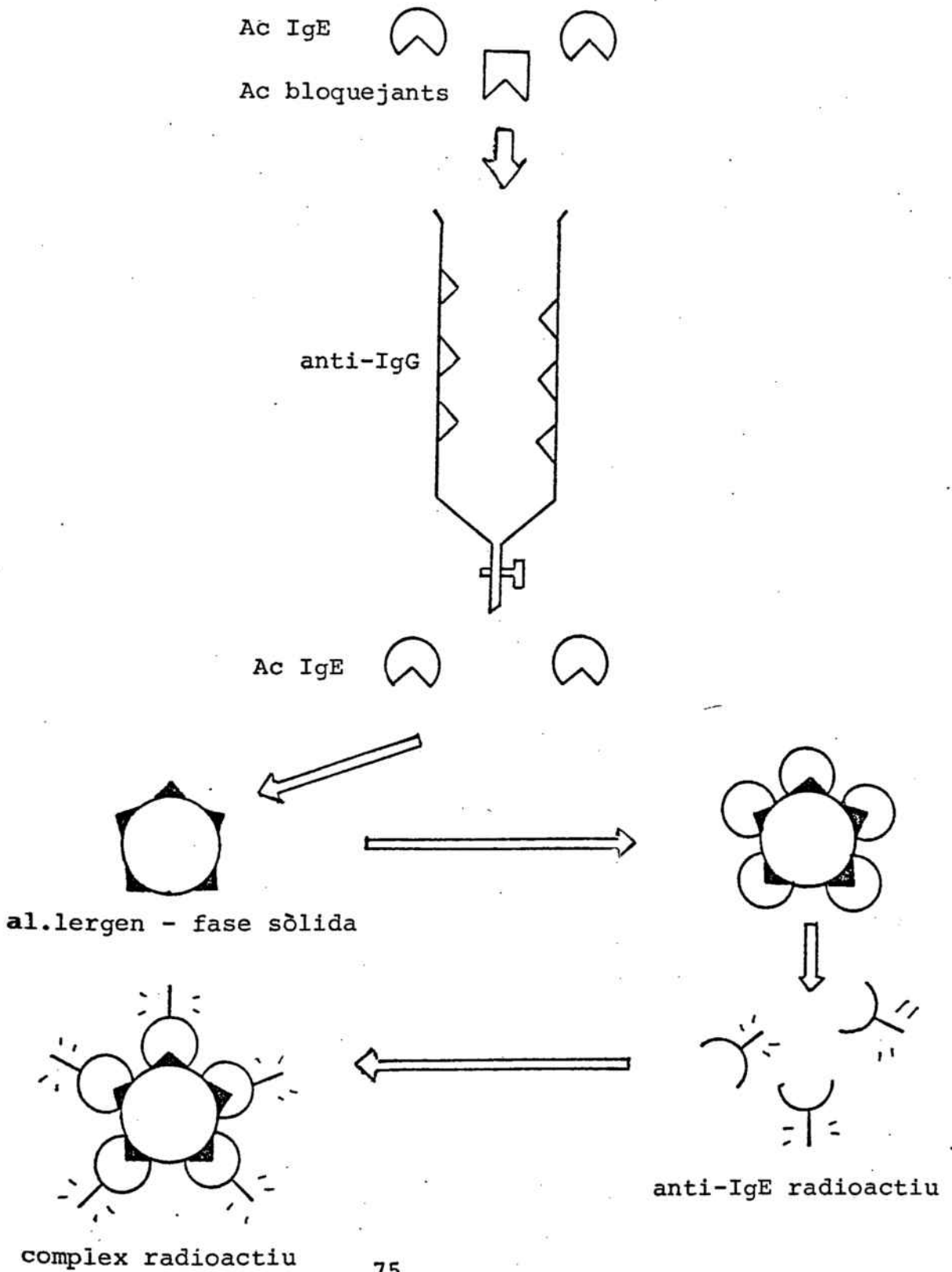
- Antisèrum anti-IgG: Compost per immunoglobulines de conill a IgG humana (cadena- $\gamma$ ) i conservat en una solució 0.1 M de NaCl i 15 mM de  $\text{NaN}_3$ . Es guarda a 4° C mentre no s'utilitza.

- Solució de HCl 1mM.

- Solució amortidora carbonat/bicarbonat 0.1 M de



FIGURA 7 : REPRESENTACIÓ ESQUEMÀTICA DEL R A S T - PA



pH 8-10 amb NaCl 0.5 M, que per la seva força iònica minimitza l'adsorció no específica dels grups carregats.

- Solució amortidora d'acetat 0.1 M, pH 4 amb NaCl 1 M, que també contribueix que hi hagi la mínima adsorció inespecífica.

- Solució amortidora de borat 0.1 M, pH 8.5 amb NaCl 1 M, que té el mateix efecte esmentat.

- Solució amortidora de fosfat (PBS), 0.15 M, pH 7.2; preparat a partir de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  i  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

- Etanolamina 1 M, pH 8.0; elaborada d'una solució mare al 100 % d'etanolamina.

- Reactiu de Biuret, subministrat pels Laboratoris Knickerbocker S.A., compost a base de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , KI, NaOH 2.5 N, NaCl.

- Tri-Partigen-IgG<sup>R</sup>, placa d'immunodifusió per a la quantificació d'IgG humana sèrica a concentracions de 16.4 mg/100 ml a 197.4 mg/100 ml, de l'Institut Behring.

- LC-Partigen-IgG, placa d'immunodifusió per a la dosificació d'IgG humana a baixes concentracions: 0.8 mg/100 ml - 13 mg/100 ml; comercialitzada per la mateixa casa.

### 3.2.5.3.- Tècnica

Es disposa d'una columna (1 x 20 cm) per cada sèrum.

- Inflat i rentat del gel: El dextrà i la lactosa que s'afegeixen abans de la liofilització es renten durant aquesta fase. Un gram de Sepharosa en pols s'infla

amb uns 200 ml de HCl 1 mM, dividits en aliquotes, ja que a baix pH es conserva millor l'activitat del gel. El procediment té lloc a la columna amb un filtre de fibra de vidre.

- Acoblament: 200  $\mu$ l d'anti-IgG per columna s'afegeixen, un cop inflat el gel, dissolts en solució carbonat/bicarbonat en proporció 1 : 25. La columna es deixa a temperatura ambient durant 2 hores, o bé, a 4° C 16 hores.

- Rentat: Amb solució carbonat/bicarbonat, fins que no quedin proteïnes al líquid eluït, fet que es pot comprovar per la reacció de BIURET: A 2 ml de sèrum fisiològic s'afegeixen 100  $\mu$ l del líquid problema i 8 ml de reactiu de BIURET, es deixa 30 minuts a temperatura ambient i es llegeix l'absorbància a 550 nm. Conjuntament, es fa un control positiu i un de negatiu. Posteriorment, s'addiciona etanolamina i es deixa 2 hores a temperatura ambient.

Aleshores, el producte final es renta amb solucions reguladores d'alt i baix pH: així es tracta una vegada amb solució carbonat/bicarbonat, tres amb solució acetat, tres amb solució borat i tres o més amb PBS fins que el pH estigui comprès entre 7.2 i 7.4.

- Experiment propiament dit: A la columna preparada com s'ha esmentat s'afegeixen 200  $\mu$ l de sèrum del pacient i es deixa incubar 1 h a temperatura ambient. Per eluir s'addicionen 800  $\mu$ l de sèrum fisiològic. Amb el producte resultant es realitzen dos controls per assegurar

la manca d'IgG: primer en plaques Tri-Partigen<sup>R</sup> i en observar la negativitat del resultat, en plaques LC-Partigen<sup>R</sup>.

Comprovada l'absència d'anticossos bloquejants, a partir dels sèrums diluïts es fa el RAST, tal com es descriu al capítol 3.2.1.3., amb la correcció de volum necessària.

#### 3.2.5.4.- Expressió dels resultats

Als comptes obtinguts de l'assaig s'aplica la fórmula proposada al capítol 3.2.1.4.

Els resultats del RAST-PA són superiors als del RAST, perquè no hi ha la competència dels anticossos bloquejants. Aquesta competència s'expressa per la diferència entre el RAST-PA i el RAST.

#### 3.2.6.- QUANTIFICACIÓ DE LES MOSTRES PER CENTELLEIG SÒLID

L'àtom de  $^{125}\text{I}$  es desintegra en un temps rapidísim donant emissions  $\gamma$  i X que es comporten com una sola radiació de baixa energia que es pot detectar per centelleig sòlid amb un grau d'eficiència acceptable.

El comptador gamma mesura la radioactivitat a través d'un detector de centelleig. Aquest detector és sensible a la radiació i serà capaç de transformar l'energia dipositada en ell pels fotons gamma, en impulsions elèc-

triques proporcionals, que un cop amplificades i classificades, seran enregistrades per un circuit electrònic, acoblat de forma que els resultats permetran conèixer l'energia i nombre de fotns gamma que han interaccionat amb el detector.

El detector de centelleig consta fonamentalment de dues parts, la substància luminiscent i el tub fotomultiplicador. La substància luminiscent més utilitzada és el iodur de sodi activat amb tali, perquè té un elevat rendiment de detecció. En el si d'aquesta substància, en incidir els raigs gamma. els àtoms s'exciten i en tornar al seu estat fonamental es produeixen llampades de llum que són captades pel tub fotomultiplicador. Aquest tub, essencialment, és una cèl.lula fotoelèctrica de gran sensibilitat, capaç d'ampliar els senyals lluminosos i convertir-los en impulsions elèctriques.

La radioactivitat lligada als discs provinents del RAST (tècnica 3.2.1.3.) ha estat determinada mitjançant un comptador de "Searle Analytic Inc", model 1197 "Series Automatic". Les condicions de la mesura varen ser: amplitud de la finestra 6.8, base 1,20 i "Coarse" 1. Cada mostra es comptà durant 10 minuts.

### 3.2.7.- TEST D'INACTIVACIÓ DEL COMPLEMENT

Aquesta tècnica va ser realitzada segons el mètode de BERRENS i col.laboradors (1978).

### 3.2.7.1.- Fonament

Bàsicament l'experiment vol establir si existeix una interacció "in vitro" entre al·lèrgens i el sistema del complement. Per manifestar això, es posa en contacte una dosi fixa de complement (1 CH50), amb el complex al·lergen-anticossos IgE i, posteriorment, es valora l'hemòlisi que produeix el complement, "hipotèticament modificat", a una concentració d'hematies de moltó òptimament sensibilitzats. Els resultats es comparen amb els obtinguts, sota les mateixes condicions, en un grup control.

### 3.2.7.2.- Reactius

- Discs d'al·lergen: han estat del mateix tipus que els utilitzats en el RAST (capítol 3.2.1.2.).

- Complement: preparat a partir d'un "pool" de sèrums de conillets d'Indies i subministrats per Miles Laboratories Inc. S'ha mantingut liofilitzat fins el moment de la seva titulació (capítol 3.2.8.) i la resta ha estat congelada en aliquotes destinada a posteriors assaigs de valoració o inactivació.

- Hematies de moltó òptimament sensibilitzats.

Els hematies provenien d'extraccions recents i estaven dissolts en solució Alsever. Per la seva sensibilització, un cop rentats amb solució amortidora de barbital, es van barrejar amb igual quantitat d'hemolisina, deixant incubar 15 minuts a 37° C. Aquesta hemolisina va ser subministrada per l'Institut Pasteur i consistia en sèrum hemolif-

tic de conill antihemàtiques de moltó.

- Solució amortidora de barbital amb calci i magnesi, pH 7.6, preparada a partir de NaCl, barbital, barbital sòdic,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  i  $CaCl_2$ . Es va conservar a 4° C.

- Discs d'albumina: guardats a 2-8° C, fabricats per Pharmacia Diagnostics i proveïts en flascons on es trobaven liofilitzats.

### 3.2.7.3.- Tècnica

Com a control l'assaig es realitzà sota les mateixes condicions i pels mateixos sèrums, amb discs d'albumina en lloc de discs d'al.lergen.

En començar l'experiment s'ha de disposar d'hemàtiques òptimament sensibilitzats i complement titulat.

A 500 l de solució reguladora de barbital en un tub d'assaig, s'afegeix un disc, ja sigui d'al.lergen o d'albumina, i després 25 l de cada sèrum. La barreja s'incuba a 37° C durant 20 minuts amb agitació suau.

Posteriorment, es renta el disc dues vegades amb solució amortidora i s'afegeix la dosi de complement establerta amb 500 l de barbital; es deixa incubar 30 minuts a 37° C i després s'addicionen 2 ml de la mateixa solució i 1 ml d'hemàtiques, portant un altre cop a 37° C durant 1 hora. Tot seguit es centrifuga a 1,250 g un temps de 10 minuts i es llegeix l'hemòlisi en el sobrenedant a 541 nm.

Conjuntament es realitza un tub blanc, tractat sota idèntiques condicions però només amb hemàtiques i solu-

ció barbital completant el mateix volum i, un control d'hemòlisi al 100 %, amb hematies i aigua destil·lada a les mateixes quantitats respectivament.

#### 3.2.7.4.- Expressió dels resultats

Els valors de l'absorbància obtinguts per cada problema s'expressen en forma de percentatge d'hemòlisi:

$$\% \text{ HEMÒLISI} = \frac{A_p}{A_{100}} \times 100$$

a on

$A_p$  = absorbància dels problemes.

$A_{100}$  = absorbància en el tub 100 % d'hemòlisi realitzat a les mateixes condicions.

#### 3.2.8.- TITULACIÓ DEL COMPLEMENT

A l'assaig d'inactivació del complement es fa servir una quantitat d'aquest establerta en 1 CH50. La determinació d'aquesta dosi es realitza per la titulació del complement.

##### 3.2.8.1.- Fonament

Es mesura l'activitat del complement segons el grau de lisi que produeix, en un temps determinat, a una suspensió patró d'eritròcits de moltó recoberts d'anticòsos en grau òptim (òptimament sensibilitzats).

Per això s'estudien varis volums de complement i



es construeix la corba dosi-hemòlisi i, segons ella, es pot conèixer la concentració que produeix el 50 % d'hemòlisi.

#### 3.2.8.2.- Reactius

Dels esmentats en el capítol 3.2.7.2., en aquesta tècnica es fan servir:

- Hematies òptimament sensibilitzats
- Complement de conillet d'Indies
- Solució reguladora de barbital.

#### 3.2.8.3.- Tècnica

La titulació del complement utilitzat va necessitar una dilució prèvia d'aquest a 1/100 amb sèrum fisiològic.

En començar l'assaig es preparaven diferents tubs on es va posar el complement diluït a quantitats de 0, 100, 150, 200, 300, 400, 500 i 700  $\mu$ l, solució amortidora per igualar tots els volums a 2 ml i 1 ml d'hematies òptimament sensibilitzats.

Tots els tubs es van incubar a 37<sup>o</sup> C durant 1 hora. Després es va centrifugar 10 minuts a 1250 g i amb el sobrenedant i 1 ml d'aigua destil·lada es va llegir l'absorbància en l'espectrofotòmetre, a una longitud d'ona de 541 nm.

A més a més es van fer tubs controls de 50 % i 100 % d'hemòlisi que contenien 0.5 i 1 ml d'hematies res-

pectivament i aigua destil·lada fins a un volum total de 4 ml.

La corba de calibrat s'obté expressant a les abscisses les concentracions de complement de conillet d'Indies aplicades i a les ordenades el percentatge d'hemòlisi trobat amb aquestes concentracions. A la figura 8 es mostra la corba de calibrat mitja obtinguda per nosaltres amb la desviació estàndard que informa de la seva variabilitat. Els coeficients de correlació (r) calculats en una sèrie de quatre corbes patró han oscil·lat entre 0.8411 i 0.9757 ( $p < 0.001$ ).

### 3.2.9.- TRACTAMENT ESTADÍSTIC DELS RESULTATS

#### 3.2.9.1.- Index del grau de dispersió

Com a index del grau de dispersió dels resultats experimentals, s'ha utilitzat la desviació estàndard i l'error estàndard o desviació estàndard del valor mig. Quan la mostra ofereix una distribució logarítmico-normal, com en el cas de les immunoglobulines, el càlcul es realitza sobre els valors obtinguts aplicant els logaritmes de la concentració plasmàtica. A les taules s'exposa el valor mig i la desviació estàndard segons les expressions (LICHTENSTEIN 1973):

$$m = \text{antilog} (\log m)$$

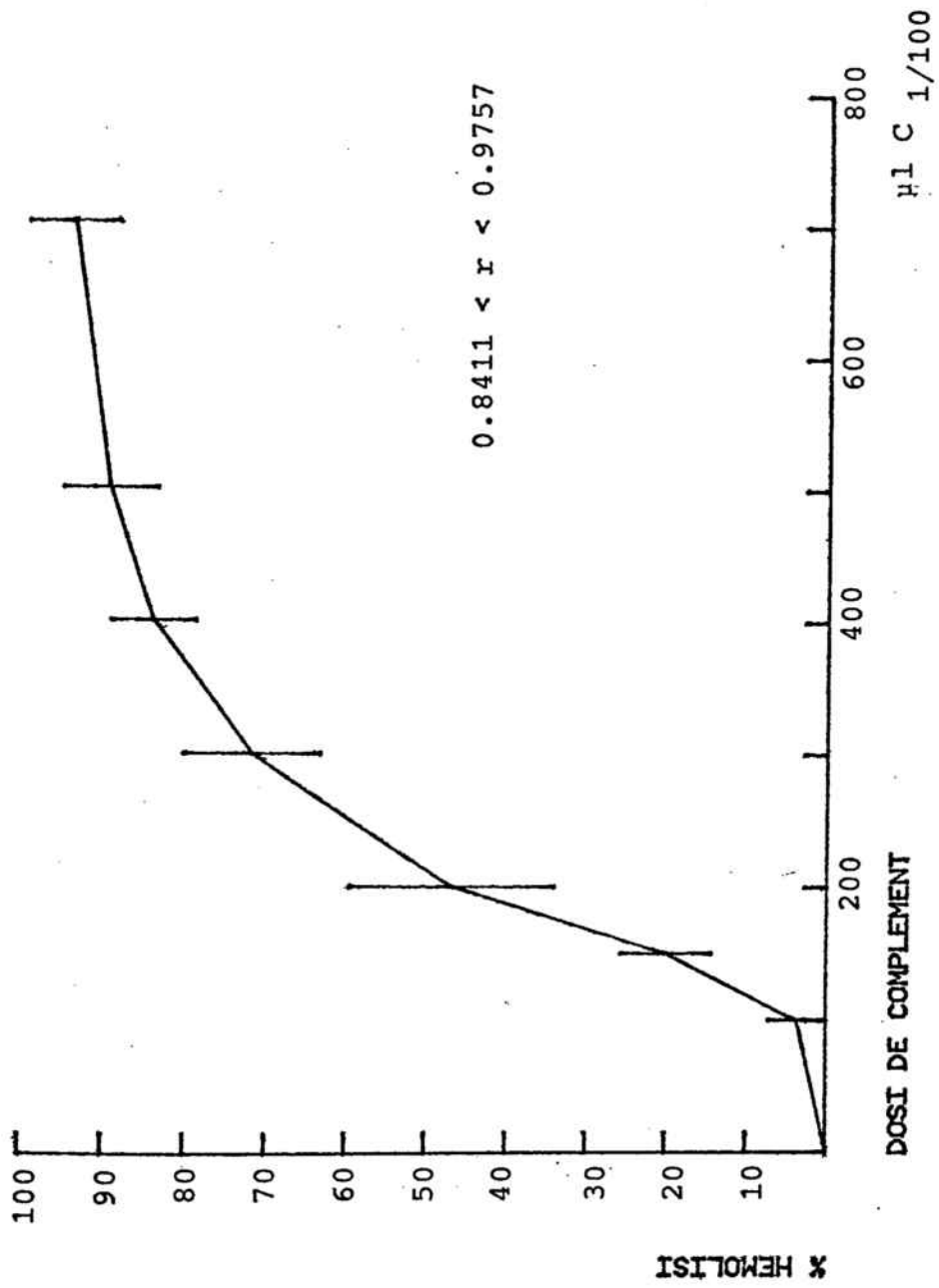


FIGURA 8 : CORBA DE TITULACIÓ DEL COMPLEMENT

$$s = \frac{\text{antilog}(\log m + 1.96 \log s) - \text{antilog}(\log m - 1.96 \log s)}{3.92}$$

Dels valors obtinguts s'han establert els límits fiducials, acceptant un risc d'error del 5 % on les poblacions eren de distribució normal o logarítmico-normal. El càlcul dels límits de confiança del valor mig trobat s'ha fet en funció de la mostra, que va ésser de  $N < 30$  i per tant es defineixen com  $m \pm t$ .

Paral·lelament s'ha realitzat el càlcul dels límits de confiança per a un individu,  $m \pm s \times 1.96$ , interval que es refereix a un subjecte i permet detectar els estats patològics.

### 3.2.9.2.- Recta de regressió i coeficient de correlació

S'han realitzat estudis de la relació o dependència entre dues variables quantitatives, basades en el càlcul d'un índex "r" (FISHER-YATES 1952).

El coeficient de correlació, "r", mesura la tendència a l'alineament dels punts obtinguts a partir de les dues variables. Es pot calcular per:

$$r = \frac{\sum (x - m_x) (y - m_y)}{\sqrt{\sum (x - m_x)^2 \sum (y - m_y)^2}}$$

El resultat es compara amb un valor teòric tabulat segons el risc acceptat i els graus de llibertat que en aquest cas són  $(N - 2)$ . Si el valor trobat per "r" és més petit que el teòric per a un risc del 5 % no hi ha

correlació; si el valor trobat es més gran sí que hi ha correlació, i direm que aquesta és molt significativa quan el valor teòric s'estableix per a un risc de l'1 %.

### 3.2.9.3.- Comparació entre percentatges d'activitat lligada en sèries aparellades

Amb el fi d'avaluar la possible significació estadística entre les quantitats d'IgE específica, d'abans i després de set mesos de tractament, expressades com a percentatge d'activitat lligada es va calcular, per a cada individu, la diferència entre els dos tants per cent aplicant el test de comparació de percentatges per a sèries que compleixen la distribució de POISSON. Per això, s'ha d'aplicar la fórmula següent:

$$\frac{a - b}{\sqrt{a + b}} \geq 2.57$$

a on

a = percentatge d'activitat lligada mesurat després dels set mesos de tractament.

b = idem mesurat abans d'iniciar la teràpia.

El valor obtingut a la relació ha d'ésser superior o igual a  $\epsilon = 2.57$  per a un risc de l'1 % si hi ha significació estadística.

3.2.9.4.- Comparació entre dos grups segons la diferència entre els valors migs ("t" de STUDENT)

L'anàlisi de la possible significació de la diferència entre dos valors migs s'aplica quan les distribucions dels conjunts d'on provenen els valors migs són normal o logarítmico-normals i quan ambdós grups tenen una variança del mateix ordre.

En el nostre cas, com  $N < 30$ , el valor "t" de STUDENT trobat, considerant el risc consentit i els graus de llibertat, es compara amb el valor "t" tabulat segons la llei de STUDENT-FISHER. En tots els casos el risc acceptat ha estat  $\alpha = 0.05$ .

Cal puntualitzar que l'absència de significació no és, en principi, un resultat absolut i potser en unes altres condicions experimentals es podria observar una diferència significativa. Per això, és preferible referir-se a la impossibilitat de demostrar una diferència en unes condicions experimentals concretes que parlar d'una absència de significació.

Al contrari, si s'observa una discrepància significativa entre dos valors migs, malgrat el nombre de casos sigui reduït, aquesta dada té valor absolut, de forma que en altres condicions experimentals es podrà, com a màxim, augmentar el grau de significació, però mai observar l'absència de significació.

### 3.2.9.5.- Prova de comparació entre dos grups amb dades aparellades

Amb el fi d'evitar la variació individual s'ha aplicat, de la mateixa manera, el test de "t-paired (correlated) samples", és a dir, una prova de comparació de dos grups amb dades aparellades, que no estudia les diferències entre les dispersions, sinó que analitza les diferències entre la tendència central d'ambdues mostres amb dades aparellades. En el nostre estudi s'ha aplicat a les dades dels pacients obtingudes al llarg del tractament.

Tots els càlculs s'han realitzat amb l'ajut d'un programador ATAI0 COMPUCORD 327 Scientist i un computador TEKTRONIX 4051, proveït d'"interactive digital plotter" Tektronix 4662.

#### 4. RESULTATS



#### 4.1.- DETERMINACIÓ DE LA IgE ESPECÍFICA

Com ja s'ha esmentat al capítol 3.2.1.4., els valors resultants referents a la IgE específica s'han expressat com a percentatge d'activitat lligada. A la taula III s'assenyalen els resultats individuals trobats a les tres fases del tractament estudiades i, també s'indiquen el valor mig i la desviació estàndard obtinguts.

En fer les comparacions estadístiques mitjançant la "t" de STUDENT per a dades aparellades, no s'han evidenciat diferències significatives al llarg del tractament, conservant-se els nivells d'IgE específica, del mateix ordre.

S'ha observat correlació entre la IgE específica i la IgE total, tant abans del tractament ( $p < 0.01$ ) com als set mesos d'iniciat aquest ( $p < 0.05$ ) i entre el component C4 i IgE específica als set mesos d'immunoteràpia ( $p < 0.05$ )

#### 4.2.- RESULTATS DE L'ASSAIG DE NEUTRALITZACIÓ DEL RAST (RAST-N)

A la taula III s'indiquen els resultats individuals trobats pel RAST-N en els pacients asmàtics abans i durant el tractament (capítol 3.2.2.).

Globalment, l'existència d'anticossos bloquejants als set mesos d'immunoteràpia no es manifesta, perquè de fer-ho s'observaria un increment significatiu del valor mig trobat als set mesos respecte a l'estat inicial. Aquest augment estaria originat a la competència que s'estableix, a la preincubació, amb l'al.lergen específic, entre la IgE específica i els anticossos bloquejants: a un nivell més gran d'aquests anticossos, correspon una quantitat més gran d'IgE específica capaç d'unir-se posteriorment a l'al.lergen.

Però, un estudi detallat dels valors individuals mostra que un 40 % dels pacients, presenten un increment significatiu ( $p < 0.01$ , capítol 3.2.9.3.) al percentatge d'activitat lligada, després dels set mesos del tractament respecte a l'estat inicial, fet que és indicatiu de l'existència d'anticossos bloquejants als esmentats malalts. Alguns d'aquests pacients es varen escollir per a un estudi posterior, amb l'objectiu d'establir la classe d'anticòs responsable de l'activitat bloquejant mitjançant el test RAST-PA descrit al capítol 3.2.5.

S'ha trobat correlació entre el RAST-N i el nivell d'IgE específica als set mesos del tractament ( $p < 0.001$ ).

TAULA III : RESULTATS DEL RAST I DEL RAST-N ABANS I DURANT EL TRACTAMENT  
(% ACTIVITAT L·LIGADA)

| N° | R A S T |        |        |        | R A S T - N |        |  |
|----|---------|--------|--------|--------|-------------|--------|--|
|    | N.T.    | 3 M.   | 7 M.   | N.T.   | 3 M.        | 7 M.   |  |
| 1  | 5.406   | 6.441  | 5.483  | 0.379  | 0.465       | 0.399  |  |
| 2  | 7.497   | 7.497  | 5.502  | 0.376  | 0.431       | 0.547  |  |
| 3  | 14.724  | 7.599  | 6.444  | 1.031  | 1.111       | 4.432  |  |
| 4  | 1.884   | 1.830  | 2.097  | 1.603  | 1.656       | 1.603  |  |
| 5  | 6.332   | 9.084  | 11.676 | 5.811  | 7.655       | 9.940  |  |
| 6  | 4.746   | 7.625  | 3.716  | 4.120  | 6.231       | 2.508  |  |
| 7  | 6.854   | 8.483  | 10.394 | 5.544  | 7.374       | 9.111  |  |
| 8  | 3.446   | 8.376  | 12.144 | 7.147  | 8.096       | 11.262 |  |
| 9  | 1.549   | 1.710  | 1.576  | 1.563  | 1.589       | 1.616  |  |
| 10 | 25.106  | 19.153 | 12.475 | 11.751 | 11.776      | 7.195  |  |

TAULA III . (Continuació)

| Nº | R A S T |        |        |        | R A S T - N |        |      |      |      |
|----|---------|--------|--------|--------|-------------|--------|------|------|------|
|    | N.T.    | 3 M.   | 7 M.   | N.T.   | 3 M.        | 7 M.   | N.T. | 3 M. | 7 M. |
| 11 | 22.880  | 23.295 | 24.874 | 13.614 | 12.682      | 15.323 |      |      |      |
| 12 | 13.847  | 11.052 | 8.515  | 10.405 | 9.240       | 9.654  |      |      |      |
| 13 | 17.419  | 20.836 | 21.198 | 15.944 | 16.332      | 16.202 |      |      |      |
| 14 | 3.856   | 3.856  | 3.908  | 2.562  | 2.821       | 3.002  |      |      |      |
| 15 | 9.033   | 9.887  | 11.466 | 5.073  | 5.435       | 5.694  |      |      |      |
| 16 | 2.717   | 3.442  | 2.795  | 2.407  | 3.054       | 3.054  |      |      |      |
| 17 | 19.257  | 16.513 | 14.701 | 17.367 | 17.989      | 17.341 |      |      |      |
| 18 | 8.216   | 11.773 | 10.663 | 2.825  | 5.977       | 5.651  |      |      |      |
| 19 | 9.421   | 13.407 | 15.633 | 13.567 | 14.753      | 15.763 |      |      |      |
| 20 | 5.590   | 4.814  | 4.141  | 5.357  | 4.245       | 3.856  |      |      |      |

TAULA III . (Continuació)

| Nº | R A S T |        |       |       | R A S T - N |       |      |      |      |
|----|---------|--------|-------|-------|-------------|-------|------|------|------|
|    | N.T.    | 3 M.   | 7 M.  | N.T.  | 3 M.        | 7 M.  | N.T. | 3 M. | 7 M. |
| 21 | 9.532   | 7.735  | 5.809 | 7.342 | 6.374       | 3.706 |      |      |      |
| 22 | 0.957   | 0.814  | 0.728 | 0.581 | 0.552       | 0.436 |      |      |      |
| 23 | 1.584   | 1.307  | 1.307 | 0.893 | 1.027       | 0.706 |      |      |      |
| 24 | 12.044  | 12.962 | 9.015 | 7.443 | 7.457       | 3.414 |      |      |      |
| 25 | 6.567   | 8.024  | 8.740 | 5.469 | 5.769       | 6.495 |      |      |      |
| m  | 8.809   | 9.100  | 8.598 | 6.006 | 6.043       | 5.356 |      |      |      |
| s  | 6.707   | 6.031  | 6.129 | 5.897 | 5.204       | 5.352 |      |      |      |
| ε  | 1.341   | 1.206  | 1.226 | 1.019 | 1.041       | 1.070 |      |      |      |
| N  | 25      | 25     | 25    | 25    | 25          | 25    |      |      |      |

#### 4.3.- RESULTATS OBTINGUTS A L'ASSAIG D'INTERFERÈNCIA DEL RAST (RAST-I)

A la taula IV s'indiquen els valors trobats per l'assaig del RAST-I en els pacients asmàtics als set mesos d'hiposensibilització. Amb aquesta prova s'han de posar de manifest els anticossos bloquejants, prèvia destrucció per escalfament i separació de la IgE. El obtenir un percentatge d'interferència elevat, respecte al valor resultant d'un "pool" de pacients asmàtics sense tractar, es tradueix en l'existència d'anticossos bloquejants. En el 88 % dels sèrums dels set mesos de teràpia es produeix un increment superior al 20 %. Per una altra banda, s'ha trobat correlació ( $p < 0.01$ ) entre els resultats d'aquest assaig i la tècnica de neutralització del RAST.

En relacionar els valors obtinguts del RAST-N i del RAST-I s'observa que la primera tècnica, per als mateixos malalts, només palesa l'existència d'anticossos bloquejants en un 50 % d'ells, mentre que el percentatge s'augmenta al 88 % en aplicar l'assaig del RAST-interferència. Aquells pacients en qui es va trobar en un principi, mitjançant la tècnica RAST-N, anticossos bloquejants, en mostren de nou en l'assaig RAST-I, realitzat posteriorment.

#### 4.4.- RESULTATS OBTINGUTS A L'ASSAIG DE QUANTIFICACIÓ DEL RAST-I. NIVELL D'ANTICOSSOS BLOQUEJANTS

A la figura 9 es mostra la regressió linial entre el valor logarítmic dels volums afegits a un sèrum posthi posensibilització escalfat prèviament a 56° C i el percentatge d'interferència respecte al RAST, realitzat amb una quantitat fixa d'un "pool" de pacients asmàtics abans d'iniciar el tractament. Com es pot observar a partir de 100 µl, els percentatges sobrepassen el valor de 100 fet que podria ésser degut a la gran variació de volum que representa al volum final de l'assaig.

Els nivells d'anticossos bloquejants s'han establert fixant un nivell arbitrari de 100 U/ml, de manera que cadascun dels valors individuals s'ha referit a aquesta equivalència. A la figura 10 es representa gràficament la concentració d'anticossos bloquejants dels sèrums estudiats.

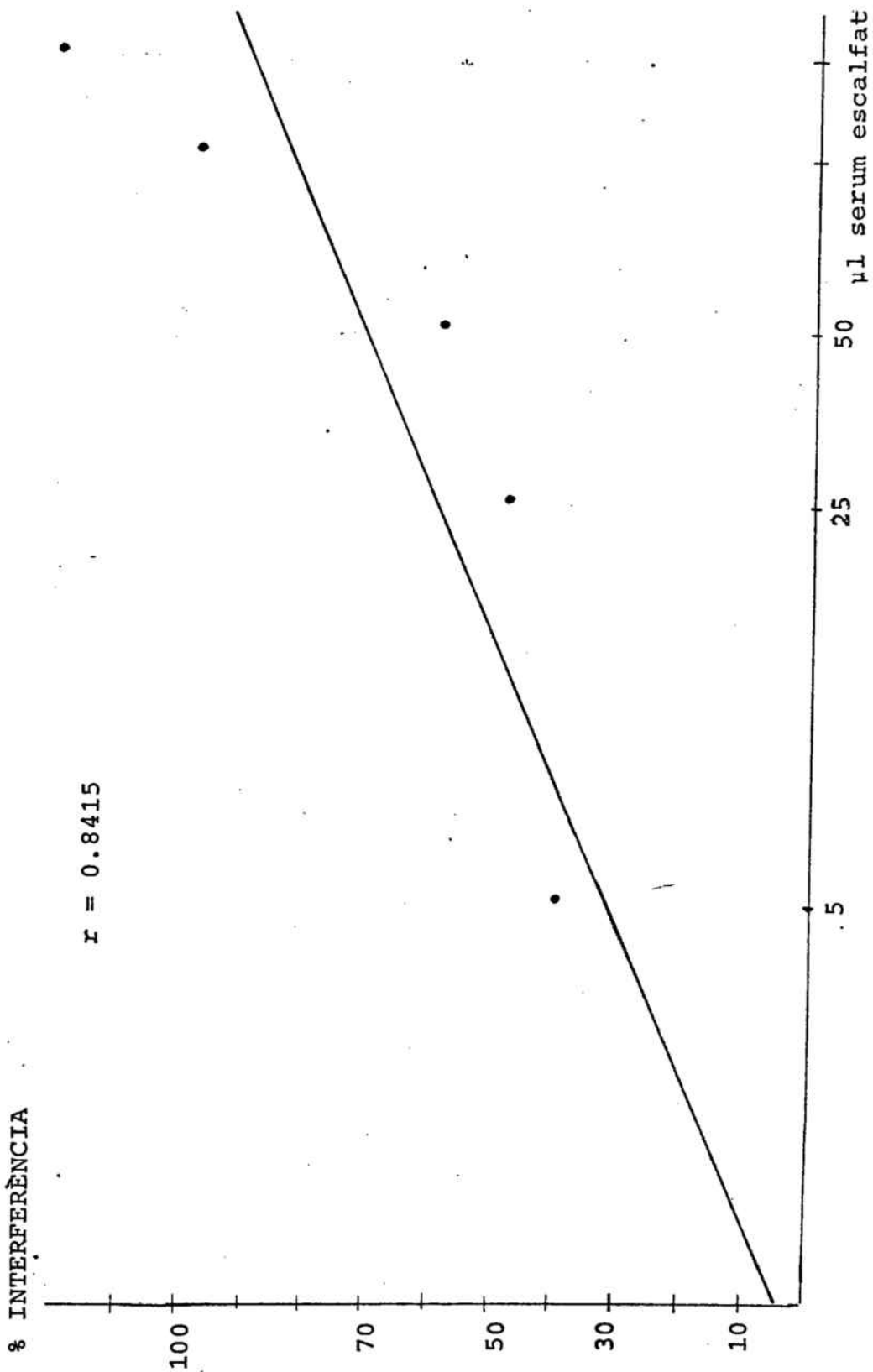
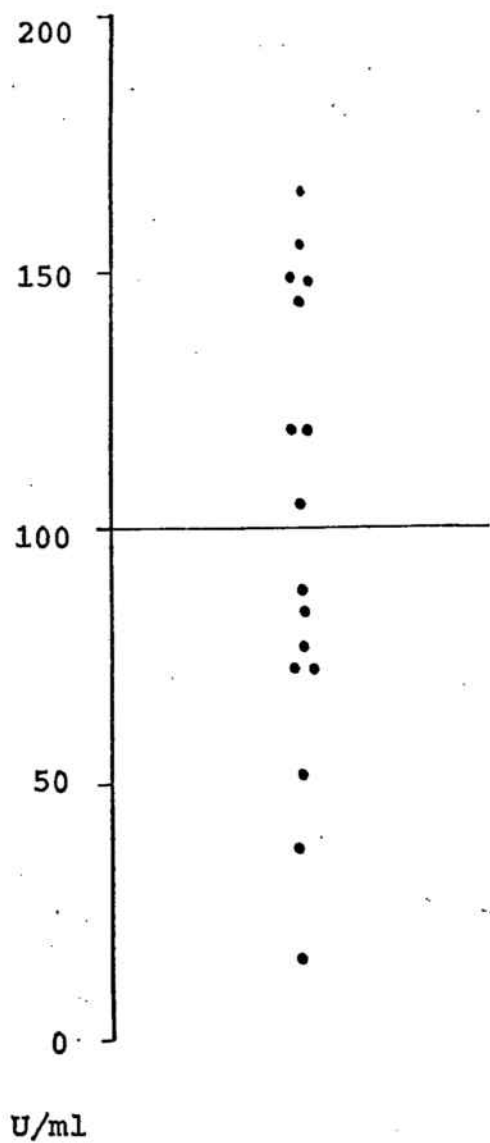


FIGURA 9 : RECTA DE REGRESSIO DE L'ASSAIG DE QUANTIFICACIO DEL RAST-I



FIGURA 10 : NIVELLS D ANTICOSSOS BLOQUEJANTS



#### 4.5.- RESULTATS DEL RAST-PRÈVIA ADSORCIÓ

A la taula IV s'indiquen els valors individuals d'aquells pacients que varen ser seleccionats, d'acord amb l'assaig RAST-N, als set mesos del tractament. En aquesta prova ha d'evidenciar-se la IgE específica, sense la interferència que produeixen els anticossos bloquejants, que hom suposa pertanyen a la classe IgG i que s'han separat mitjançant una cromatografia d'afinitat (capítol 3.2.5).

A la mateixa taula IV s'assenyalen les diferències entre RAST i RAST-PA. Aquests valors representen la competència que creen els anticossos bloquejants a la unió de la IgE amb el disc d'al.lergen. Aquesta competència no es correlaciona amb els resultats trobats a partir del RAST-I, resultats que a la vegada indiquen la taxa d'anticossos bloquejants.

S'ha observat una correlació (taula V a) entre el RAST-interferència i el RAST-neutralització ( $p < 0.01$ ), de la mateixa manera que entre el RAST-prèvia adsorció i el RAST ( $p < 0.01$ ). Però, per altra banda, no s'ha trobat una bona correlació entre RAST-I i RAST ni entre RAST-PA i RAST-N.

TAULA IV : RESULTATS DEL RAST-INTERFERÈNCIA (% INTERFERÈNCIA) I DEL RAST-PRÉVIA ADSORCIÓ (% ACTIVITAT L·LIGADA) ALS 7 MESOS DE TRACTAMENT

| Nº | R A S T - I | R A S T - PA | RAST-PA - RAST |
|----|-------------|--------------|----------------|
| 1  | 46.99       | -            | -              |
| 2  | 66.29       | 14.05        | 8.548          |
| 3  | 57.27       | 27.72        | 21.276         |
| 5  | 59.01       | 18.00        | 6.324          |
| 6  | 62.18       | -            | -              |
| 7  | 59.49       | 18.55        | 8.156          |
| 8  | -           | 19.15        | 7.006          |
| 11 | 28.48       | -            | -              |
| 12 | 29.74       | -            | -              |
| 15 | 28.00       | 23.87        | 21.080         |
| 16 | 34.17       | -            | -              |
| 17 | 6.01        | -            | -              |
| 18 | 14.71       | 16.25        | 5.587          |
| 19 | 35.28       | -            | -              |
| 23 | 41.77       | 30.00        | 28.690         |
| 24 | 20.63       | -            | -              |
| 25 | 46.67       | 24.90        | 16.160         |
| m  | 39.79       | 21.39        | -              |
| s  | 18.12       | 5.45         | -              |
| ε  | 4.53        | 1.82         | -              |
| N  | 16          | 9            | -              |

TAULA V : COMPARACIONS ESTADÍSTIQUES ENTRE ELS DIFERENTS PARÀMETRES ESTUDIATS

|                  | RAST (N.T.)          | RAST (7 M.)           | RAST-N (7 M.)        | RAST-I (7 M.)        |
|------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| IgE total (N.T.) | 0.3792<br>(P < 0.01) | N.S.                  | N.S.                 | N.S.                 |
| IgE total (7 M.) | N.S.                 | 0.3512<br>(P < 0.05)  | N.S.                 | 0.5019<br>(P < 0.01) |
| RAST - N (7 M.)  | N.S.                 | 0.8893<br>(P < 0.001) | -                    | N.S.                 |
| IgG (7 M.)       | N.S.                 | N.S.                  | 0.4526<br>(P < 0.05) | 0.5089<br>(P < 0.05) |
| RAST - PA (7 M.) | N.S.                 | 0.5716<br>(P < 0.01)  | N.S.                 | N.S.                 |

TAULA V . (Continuació)

|                | C3-PA (N.T.) | C4 (N.T.)            | C4 (7 M.)            |
|----------------|--------------|----------------------|----------------------|
| T.I.C. (N.T.)  | N.S.         | 0.4070<br>(P < 0.01) | N.S.                 |
| R A S T (7 M.) | N.S.         | N.S.                 | 0.3529<br>(P < 0.05) |

#### 4.6.- RESULTATS DEL T.I.C.

Els resultats obtinguts a partir del test d'inactivació del complement al grup control i als pacients asmàtics es troben a les taules VI a i VI b respectivament.

No s'ha observat correlació entre el T.I.C. i l'activitat complementària total, ni tampoc entre el component C3-PA i el T.I.C., però, s'ha trobat correlació entre el test d'inactivació del complement i el component C4 ( $p < 0.01$ ), representant de la via clàssica del sistema del complement (taula V b).

De les comparacions estadístiques efectuades (taula VII) resulta una diferència significativa en el T.I.C. entre els nens sans i els asmàtics, quan s'incubem en presència de discs d'al.lergen, mostrant-se reduït el consum als pacients atòpics.

Per una altra part, els nens sans presenten una inactivació menor amb el disc d'al.lergen en referència a la mesurada amb disc d'albúmina, fet que no es produeix als malalts asmàtics.

TAULA VI a : RESULTATS OBTINGUTS DEL T.I.C. EN EL GRUP CONTROL (% HEMÒLISI)

| Nº | amb AL.LERGEN | amb ALBÚMINA |
|----|---------------|--------------|
| 1  | 32.87         | 33.22        |
| 2  | 32.72         | 39.54        |
| 3  | 35.27         | 30.13        |
| 4  | 45.00         | 13.50        |
| 5  | 30.13         | 31.85        |
| 6  | 43.50         | 11.50        |
| 7  | 31.50         | 8.00         |
| 8  | 35.27         | 29.79        |
| 9  | 41.81         | 34.09        |
| 10 | 26.50         | 3.50         |
| 11 | 32.37         | 30.82        |
| 12 | 34.00         | 5.50         |
| 13 | 28.76         | 26.71        |
| 14 | 34.54         | 34.09        |
| 15 | 40.00         | -            |
| 16 | 38.63         | 40.45        |
| 17 | 40.91         | 48.18        |
| 18 | 42.27         | 33.63        |

TAULA VI a . (Continuació)

| Nº | amb AL.LERGEN | amb ALBÚMINA |
|----|---------------|--------------|
| 19 | 40.45         | 41.36        |
| 20 | 35.90         | 38.18        |
| 21 | 31.50         | 30.48        |
| m  | 35.88         | 28.22        |
| s  | 5.16          | 12.85        |
| ε  | 1.12          | 2.87         |
| N  | 21            | 20           |

- = no ha estat realitzat



TAULA VI b : RESULTATS OBTINGUTS DEL T.I.C. EN  
ELS PACIENTS ASMÀTICS (% HEMÒLISI)

| Nº | amb AL.LERGEN | amb ALBÚMINA |
|----|---------------|--------------|
| 1  | 24.00         | 32.00        |
| 2  | 42.00         | 41.00        |
| 3  | 30.00         | 39.00        |
| 4  | 19.50         | 38.00        |
| 5  | 45.50         | 8.00         |
| 6  | 47.00         | 12.50        |
| 7  | 34.24         | 35.00        |
| 8  | 35.91         | 34.54        |
| 9  | 33.18         | 36.81        |
| 10 | 33.63         | 38.18        |
| 11 | 34.54         | 39.09        |
| 12 | 35.00         | 35.91        |
| 13 | 30.00         | 38.63        |
| 14 | 37.72         | 34.54        |
| 15 | 32.72         | 38.63        |
| 16 | 28.76         | 30.82        |
| 17 | 32.53         | 31.16        |
| 18 | 34.24         | 31.16        |

TAULA VI b .(Continuació)

| Nº | amb AL.LERGEN | amb ALBÚMINA |
|----|---------------|--------------|
| 19 | 27.05         | 27.73        |
| 20 | 30.82         | 32.19        |
| 21 | 33.22         | 31.50        |
| 22 | 32.87         | 32.87        |
| 23 | 31.84         | 30.13        |
| 24 | 32.53         | 29.79        |
| 25 | 30.82         | 29.79        |
| m  | 33.18         | 32.36        |
| s  | 5.84          | 7.61         |
| ε  | 1.17          | 1.52         |
| N  | 25            | 25           |

TAULA VII : COMPARACIONS ESTADÍSTIQUES REALITZADES AMB ELS RESULTATS DEL T.I.C.

|          |  | AL. LERGEN |      |     |        |       | ALBÚMINA |        |        |  |  |
|----------|--|------------|------|-----|--------|-------|----------|--------|--------|--|--|
|          |  | m          | s    | N   | m      | s     | N        | t      | P      |  |  |
| CONTROLS |  | 38.88      | 5.16 | -21 | 28.22  | 12.85 | 20       | 2.5273 | < 0.01 |  |  |
| PACIENTS |  | 33.18      | 5.84 | 25  | 32.36  | 7.61  | 25       | 0.4298 | N.S.   |  |  |
| t        |  | 2.3978     |      |     | 1.3444 |       |          |        |        |  |  |
| P        |  | < 0.05     |      |     | N.S.   |       |          |        |        |  |  |

## 5. DISCUSSION

### 5.1.- DETERMINACIÓ DE LA IgE ESPECÍFICA

NALEBUFF i FADAL (1979) han proposat una sèrie de modificacions al RAST, descrites al capítol 2.4.3.5., per a una mesura més sensible dels nivells d'IgE específica, però, posteriorment, SANTRACH (1981) i HOFFMAN (1980), han assenyalat que el fet d'ampliar el rang de detecció comporta una disminució a l'especificitat de l'assaig amb un increment de falsos positius.

GLEICH (1980), ha comparat les tècniques mini-RAST, maxi-RAST i RAST, en què la fase sòlida és un disc de paper (Phadebas RAST<sup>R</sup>). Al primer assaig s'utilitzen quantitats d'anti-IgE radioactiva i d'al.lergen acoblat a una fase sòlida més petites i això representa, d'entrada, una disminució del cost de la tècnica. La sensibilitat és igual per al mini-RAST i maxi-RAST i superior a la del Phadebas RAST<sup>R</sup>, però, en canvi, aquest últim assaig té l'avantatge de trobar-se estandaritzat i portar-se a terme en un temps considerablement inferior.

DE FILIPPI (1981), ha realitzat un estudi de la sensibilitat i especificitat en el Phadebas RAST<sup>R</sup> i dues modificacions d'aquest (capítol 2.4.3.5.). En general, els dos paràmetres considerats són millors a les variacions que al RAST convencional i entre les dues primeres, s'observa una sensibilitat superior i una especificitat inferior en la tècnica que només canvia les solucions isotòpica i de rentat.

D'una altra banda, els treballs realitzats amb la tècnica MSPRIA o "Microtiter Solid Phase Radioimmunoassay" (capítol 2.4.3.5.), presenten una correlació amb els resultats del RAST de l'ordre de 0.95 i també assenyalen que respecte a aquest últim, el primer és més fàcil de manipular i el seu cost és més petit.

La majoria de les modificacions proposades fins ara intenten aconseguir una sensibilitat més gran (NALEBUFF 1979, GLEICH 1980, DE FILIPPI 1981, REID 1981). Al present treball, com hem estudiat pacients amb elevats nivells d'IgE total, en qui esperaven una alta concentració d'IgE específica, no ens calia una tècnica de gran sensibilitat i també ens hem trobat, que els mètodes proposats requereixen una preparació més laboriosa. Només hem utilitzat les modificacions de NALEBUFF-FADAL (1979) i DE FILIPPI (1981), en el sentit d'allargar el temps de la incubació del sèrum amb l'al·lergen, ja que optimitza, segons aquests autors, l'especificitat de l'assaig.

En quant els resultats obtinguts amb el RAST sobre la taxa d'IgE específica, no trobem, a l'igual que WIDE (1976) cap variació amb el tractament hiposensibilitzant, ja que un 64 % dels malalts mantenen elevats els seus nivells.

## 5.2.- DÈTECCIÓ D'ANTICOSSOS BLOQUEJANTS

Diferents autors han intentat adaptar la tècnica del RAST per posar de manifest anticossos bloquejants. Així, WIDE (1976) utilitza aquest mètode amb la variant d'una segona incubació amb un nou al·lergen. L'autor troba resultats positius en un 84 % de pacients asmàtics després de quatre mesos d'immunoteràpia i demostra que la resistència a la neutralització s'incrementa en presència de la fracció IgG de sèrums posthiposensibilització.

L'existència d'un factor bloquejant al sèrum palesa en un 40 % dels nostres pacients als set mesos d'immunoteràpia. La diferència entre el nostre percentatge i el trobat per WIDE (1976), ha d'atribuir-se als reactius utilitzats a la tècnica del RAST; així, nosaltres hem emprat al·lergen acoblat a la fase sòlida a una concentració estandaritzada i el sobrenedant romanent de la primera incubació, seguia el RAST segons les indicacions de la casa subministradora, diferenciant-nos de l'esmentat autor, que utilitza un mètode desenvolupat per ell mateix (WIDE 1967).

Una altra variant del RAST per a la quantificació d'anticossos bloquejants és la tècnica descrita per GLEICH (1981), anomenada "RAST-interference assay for blocking antibody" (RAST-I) i basada a la interferència que produeix l'addició d'un sèrum posthiposensibilització, lliure d'IgE prèvia termòlisi i separació, a un "pool" de sèrums de pacients asmàtics no tractats, és a dir, que no

té, presumiblement, anticossos bloquejants. Nosaltres hem seguit la mateixa tècnica a excepció del volum de "pool" que al nostre cas ha estat més gran. Mitjançant el RAST-I, GLEICH palesa un factor capaç d'interferir la unió IgE-al·lergen en un 80 % dels pacients. Els nostres resultats evidencien un 88 % de casos amb un percentatge d'interferència superior al 20 %. Segons GLEICH, aquesta interferència té lloc a nivell de l'al·lergen i no per una unió anticòs bloquejant-IgE, doncs va observar que al realitzar l'assaig amb una incubació prèvia de l'al·lergen en el sèrum tractat, després de la qual addicionava el "pool", el percentatge d'interferència era del mateix ordre.

En analitzar els percentatges dels resultats positius obtinguts a partir del RAST-N i el RAST-I per als mateixos pacients, el RAST-neutralització només demostra l'existència d'una activitat bloquejant en un 50 % d'ells, mentre que augmenta al 88 % quan s'aplica l'assaig d'interferència del RAST. Aleshores, segons aquestes dades, la tècnica del RAST-I es mostra més sensible per evidenciar els esmentats anticossos bloquejants, coincidint així amb la tesi de GLEICH. A més a més, cal assenyalar que té l'avantatge en front el RAST-N, que permet determinar, a la vegada, IgG i IgE, utilitzant només un al·lergen en fase sòlida i no requereix una purificació excessiva de l'antigen per a la determinació de la IgG.

No hem trobat autors que hagin emprat una tècnica semblant a la utilitzada per nosaltres i anomenada RAST-



prèvia adsorció o RAST-PA. En aquest assaig es manifesta la IgE específica sense la competència que produeixen els anticossos bloquejants, ja que aquests han sigut separats mitjançant una cromatografia d'afinitat, basant-se en el fet que pertanyen a la fracció IgG (LICHTENSTEIN 1968, AALBERSE 1976, SOBOTKA 1976, WIDE 1976, PAULL 1978, SHIMU ZU 1978, HAMILTON 1979, ZIMMERMANN 1980, GLEICH 1981). La tècnica s'ha realitzat en sèrums provinents de pacients hiposensibilitzats que segons el RAST-N demostraven una activitat bloquejant i s'hi ha observat un increment de l'activitat lligada al disc d'al.lergen en absència d'IgG, fet que recolza la teoria que el factor bloquejant està inclòs a la fracció IgG.

L'augment d'IgE lligada a l'al.lergen en absència d'anticossos bloquejants, expressat per la diferència RAST-PA - RAST, no es correlaciona amb els resultats obtinguts a partir del RAST-N i RAST-I, dades que indiquen els nivells d'anticossos bloquejants. Però, encara que no es pot parlar d'una correlació entre els nivells de bloqueig, és a dir, resultats del RAST-I i RAST-N, i competència amb IgE, que es manifesta a les diferències relatives del RAST-PA en front el RAST, es podria pensar que la milloria clínica que s'observa en els malalts després del tractament, sigui deguda als anticossos bloquejants, ja que els nivells d'IgE específica no disminueixen amb el tractament a la majoria dels pacients (64 %).

En quant a les correlacions realitzades entre els

resultats de les tècniques assajades (RAST, RAST-N, RAST-I i RAST-PA, taula V a), s'obté una bona correlació entre RAST-N i RAST-I, procediments que reflecteixen la presència d'un factor bloquejant, ja que els dos mesuren la resistència a la neutralització i la interferència, respectivament, que produeixen els esmentats anticossos. També entre RAST i RAST-PA es troba correlació, ja que ambdues tècniques determinen nivells d'IgE específica amb IgG i sense IgG respectivament. Es podria aleshores afirmar que la tècnica del RAST-PA, un cop estandaritzada, ofereix una alternativa en el camp de la mesura d'anticossos bloquejants en sèrums posthiposensibilització.

També s'ha trobat una correlació significativa entre la concentració d'immunoglobulina G plasmàtica als set mesos del tractament i els nivells d'anticossos bloquejants mesurats mitjançant el RAST-N i el RAST-I al mateix sèrum.

Coincidim amb BERG (1971) i LICHTENSTEIN (1971) en afirmar que existeix una relació entre els nivells d'anticossos bloquejants i la milloria clínica que s'observa als malalts.

La correlació entre RAST i RAST-N, és a dir, entre els nivells d'IgE específica i la taxa d'anticossos bloquejants, indica que la formació dels esmentats anticossos es realitza proporcionalment a la concentració d'IgE específica i, per tant, els nivells d'IgE específica no estan en contradicció amb una milloria clínica.

Als resultats obtinguts a l'assaig del RAST-interferència, la relació lineal que hi ha entre el valor logarítmic dels volums afegits d'un sèrum hiposensibilitzat, escalfat prèviament a 56° C, i el percentatge d'interferència a què dona lloc, indica que l'assaig d'interferència del RAST podria ésser estandaritzat mitjançant l'ús d'un "pool", on s'assignarien unitats arbitràries. Tanmateix, els anticossos bloquejants s'han quantificat en aquest procés establint unitats arbitràries de manera semblant a la descrita per GLEICH (1981), (capítol 3.2.4.).

### 5.3.- INACTIVACIÓ "IN VITRO" DEL COMPLEMENT PER L'AL.LERGEN

En referència a l'estudi realitzat sobre la inactivació "in vitro" de complement, hem comprovat, a l'igual que ETIEVANT (1975), WEEMAES (1977) i BERRENS (1978), que els sèrums de pacients asmàtics són més sensibles a una inactivació del complement, en posar-se en contacte amb l'al·lergen, ja que existeix una diferència significativa amb el grup control, encara que fins ara es desconeixen les raons d'aquesta sensibilitat més gran als pacients atòpics.

Amb el fi de determinar si es tractava d'un fenomen inespecífic, es van realitzar assaigs amb discs d'al·lergen i d'albumina per separat. Els resultats mostren que en nens sans es produeix un consum "in vitro" de complement més gran en icubar en presència d'al·lergen que amb albumina. Cal assenyalar que la pols domèstica és l'al·lergen inhalant amb una capacitat d'inactivació més gran i aquesta és dosi-dependent, segons l'estudi fet per BERRENS (1973), encara que, basant-se en el treball d'aquest autor, la potència d'un al·lergen per inactivar el complement està en relació amb el nombre de locus lisina-resta glucídica de la molècula, el que al nostre cas podria succeir al provenir la lisina de l'albumina (11 % de la seva composició aminoacídica) i formar-se els locus al unir-se l'albumina als discs de cel·lulosa.

WEEMAES (1977) i BERRENS (1978) observen correla-

ció entre el component C4 i el T.I.C.; ETIEVANT (1975) de mostra un consum de complement "in vitro" amb la participació de la via clàssica. Coincidim amb els esmentats autors, doncs els nostres resultats ofereixen una estreta correlació entre C4 i T.I.C., però no entre C3-PA i T.I.C., fet que recolza la hipòtesi que la inactivació es produeix amb la intervenció de la via clàssica. Finalment, tam poc trobem correlació entre el RAST i el test d'inactivació del complement i això, afegit als resultats dels ante riors autors, permet assegurar que el consum del complement per l'al·lergen no es realitza a través de la IgE es pecífica.

## 6. CONCLUSIONS

1.- La presència d'anticossos bloquejants, després de set mesos d'immunoteràpia s'ha detectat mitjançant tres tècniques isotòpiques de diferent disseny experimental.

2.- Als pacients asmàtics sotmesos a tractament hiposensibilitzant, la milloria clínica observada coexisteix amb la persistència d'elevats nivells d'IgE específica. Aquesta milloria està relacionada amb la taxa d'anticossos bloquejants.

3.- s'observa correlació significativa entre els resultats trobats mitjançant la neutralització del RAST i la interferència del RAST, tècniques que, amb fonament diferent, palesen l'existència d'anticossos bloquejants.

4.- La tècnica de la interferència del RAST es manifesta més sensible que la neutralització del RAST, per demostrar la presència d'un factor bloquejant.

5.- La tècnica prèvia adsorció del RAST desenvolupada en aquest treball, és una nova alternativa per a la detecció d'anticossos bloquejants, ja que, en absència d'IgG, determina nivells d'IgE específica que ofereixen bona correlació amb els valors del RAST.

6.- Els anticossos bloquejants són, segons la tècnica d'interferència del RAST, estables a 56° C i, segons l'assaig de prèvia adsorció del RAST, pertanyen a la classe IgG.

7.- Els nens asmàtics presenten un grau d'inactivació del sistema del complement per a la pols domèstica,

significativament augmentat respecte als nens sans.

8.- Els pacients asmàtics no discriminen la naturalesa de l'antigen utilitzat a l'assaig, sent la inactivació complementària produïda, del mateix ordre a l'obtinguda en el grup de referència amb l'albúmina.

9.- En presència d'al·lergen, els nens sans mostren una inactivació del complement "in vitro", significativament més petita que l'obtinguda en presència d'albúmina.

10.- Al procés d'inactivació "in vitro" del sistema del complement per l'al·lergen pols domèstica, no intervé la IgE específica i es realitza mitjançant la via clàssica.



## 7. BIBLIOGRAFIA

- AALBERSE, R.C.; REERINK-BRONGERS, E.E. i HOORWERG, E. (1976).- "Protides of Biological Fluids", 24<sup>th</sup> Colloquium. Pergamon Press, Oxford. Pag. 725-729.
- AAS, K. (1971).- Acta Paediat. Scand. 60, 264.
- AGNELLO, V i col. (1970).- Immunol. 19, 909.
- ALPER, C.A. i col. (1976).- Science 191, 1276.
- ALLEN, D.H. i col. (1979).- Chest. 75-S, 235-S.
- American Thoracic Society (1962).- Am. Rev. Resp. Dis. 85, 762.
- ARROYAVE, C.M. i col. (1977).- Clin. Allergy 6B 7, 173.
- ARSDEL, P. i col. (1961).- J. Allergy 32, 348.
- ASSEM, E.S.K. i col. (1976).- Clin. Exp. Immunol. 26, 67.
- AUGENER, W. i col. (1971).- Immunochem. 8, 1011.
- AUSTEN, R.F. (1977).- "Asthma, Physiology, Immunopharmacology and Treatment" Ed. Academic Press, New York. Cap. 7, pag. 111-130.
- BARBERÀ, G. (1975).- Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, Univesidad de Barcelona.
- BARBERÀ, G. i col. (1977).- Allergol. et Immunopathol. V, 653.
- BASTIDE, M. i col. (1980).- Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie 174, 814.
- BEAVEN, M.A. (1976).- New Eng. J. Med. 294, 30.
- BENNICH i col. (1974).- Prog. Immunol. Int. Congr. Immunol. 2<sup>nd</sup>, 1, 49.
- BERG, T. i col. (1971).- Int. Arch. Allergy 41, 434.
- BERRENS, L. i col (1973).- Int. Arch. Allergy 45, 30.
- BERRENS, L. (1975).- Acta Allergol. Dan. 30, 169.

- BERRENS, B. i col. (1978).- Allergol. et Immunopathol. VI, 45.
- BERRY, J.B. i col (1977).- Clin. Allergy 7, 401.
- BLAIR, H. (1977).- Arch. Dis. Childhood 52, 613.
- BOKISH, V.A. i col. (1970).- J. Clin. Invest. 49, 2427.
- BOUSQUET, J. i col. (1980).- Ann. Allergy 45, 316.
- BROSTOFF, J. i col. (1977).- Lancet II, 741.
- BROSTOFF, J. i col. (1979).- Lancet I, 1268.
- BRYANT, D.H. i col (1975).- J.All.Clin.Immunol. 56, 417.
- BUDZKO, D.B. i col. (1976).- Cell. Immunol. 22, 98.
- BUFFUM, W. i col. (1968).- Am. J. Dis. Child. 112, 214.
- CABABIEU, G. i col. (1972).- Rev. Fr. Allergol. 4, 323.
- CAPRA, J.D. i col (1977).- Scientific American 236, 50.
- CASTELLOTE, M.C. (1980).- Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.
- CASTELLOTE, M.C. i col. (1981).- Ann. Allergy 45, 281.
- CHIPS, B. i col (1979).- J.Allerg. & Clin. Immunol. 63, 179.
- COLLINS-WILLIAMS, C. i col. (1967).- Ann. Allergy 25, 177.
- COLLINS-WILLIAMS, C. i col. (1968).- Can. Med. Assoc. J. 99, 1069.
- COLOMB, M.G. i col. (1980).- Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie 174, 615.
- CONRAD, D.H. i col. (1978).- J.Immunol. 140, 429.
- CONROY, M.C. i col. (1976).- Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 35, 809.

- COOKE, R. i col. (1935).- J. Exp. Med. 62, 733.
- COOMBS, R.R.A. i col (1953).- Br. J. Exp. Pathol. 34, 525.
- COOMBS, R.R.A. i col. (1968).- Lancet 2, 1115.
- COOMBS, R.R.A. i col. (1974).- "Clinical Aspects of Immunology". Blackwell Scientific Publications, 3<sup>a</sup> Ed. Oxford. Anglaterra.
- DE FILIPPI, I. i col. (1981).- Ann. Allergy 46, 249.
- DORRINGTON, K.J. i col. (1973).- J. Biol. Chem. 248, 8378.
- ETIEVANT, H. i col. (1975).- Nouv. Presse Med. 4, 2599.
- FARRERONS-Co, F.J. i col. (1980).- Ann. Allergy 45, 180.
- FEINBERG, S. i col. (1940).- JAMA 115, 23.
- FISHER-YATES (1952).- "Tablas estadísticas para investigaciones científicas" Ed. Aguilar, Madrid.
- FORGACS, P. i col. (1968).- Brit. Med. J. 3, 774.
- FROHLICH, E.D. i col (1976).- "Pathophysiology" J.B. Lippincott Company, 2<sup>a</sup> Ed. Philadelphia.
- FROUCHTMAN, R. i col. (1971).- Rev. Clin. Esp. 122, 323.
- FUCHS, A. i col. (1959).- J. Allerg. 30, 66.
- FUDENBERG, H.H. i col. (1978).- "Manual de Inmunología clínica". Ed. El Manual Moderno, Méjico.
- GARCÍA, R. i col. (1978).- J. Immunol. 140, 429.
- GESSEN van der M. i col. (1976).- Int. Arch. & Appl. Immunol. 50, 625.
- GLEICH, G.J. i col. (1980).- J. Allergy Clin. Immunol.

- 65, 20.
- GLEICH, G.J. i col. (1981).- J. Immunol. 126. 575.
- GOETZL, E.J. i col. (1975).- Prec. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4123.
- GOLDSTEIN, S. i col. (1980).- J. Aller. & Clin. Immunol. 65, 164.
- GOOD, R. (1972).- "Immunobiology" 3<sup>a</sup> Ed. Sin. Assoc. Inc. Stamford.
- HADDEN, J.W.; COFFEY, R.G.; SPREAFICO, F. (1977).- "Immunopharmacology" Ed. Plenum Publishig Co. New York.
- HAM, A.W. (1977).- "Tratado de histología" Ed. Interamericana, 7<sup>a</sup> ed. Barcelona.
- HAMILTON, R.G. i col. (1979).- J, Immunol. 122, 1073.
- HAMILTON, R.G. i col. (1980).- J. Lab. Clin. Med. 96, 1022.
- HOFFMAN, D.R. (1980).- Ann. Allergy 45, 343.
- HONSINGER, R.W. i col. (1972).- J. All. Clin. Immunol. 49, 142.
- ISHIZAKA, K. i col. (1966).- J. Immunol. 97, 75.
- ISHIZAKA, K. i col. (1967).- J. Immunol. 98, 490.
- ISHIZAKA, K. i col. (1970).- J. Immunol. 105, 1459.
- ISHIZAKA, T. i col. (1973).- J. Immunol. 111, 500.
- ISHIZAKA, T. i col. (1975).- Prog. Allergy 19, 60.
- JOHANSSON, S.G.O. i col. (1967).- Immunol. 13, 381.
- JOHANSSON, S.G.O. (1967).- Lancet 2, 951.
- JOHANSSON, S.G.O. i col. (1972).- Prog. Clin. Immunol. 1, 157.

- JOHANSSON, S.G.O. (1975).- "Laboratori Diagnosis of Immunologic Disorders" Grune & Stratton, Inc. Uppsala.
- JOHNSTONE, D. (1968).- Am. J. Dis. Child. 115, 213.
- JOHNSTONE, D. i col (1968).- Pedia. 42, 793.
- JOHNSTONE, D. (1975).- Am. J. Dis. Child, 94, 1.
- JOHNSTONE, D.E. (1981).- Ann. Allergy 46, 59.
- KANOK, J.H. i col. (1978).- Ann. Allergy 41, 220.
- KEELING, M.M. i col. (1979).- Ann. Allergy 42, 319.
- KHUEL, F.A. i col. (1974).- Proc. Natl. Acad. Sci. 71, 1866.
- KJELLMAN, H.I. M. (1981).- Lancet 1, 993.
- KRAMPS, J.A. i col. (1981).- Int. Arch. Allerg. & App. Immunol. 64, 428.
- KUMAR, L. i col. (1971).- Pedia. 47, 848.
- LICHTENSTEIN, L.M. i col. (1966).- J. Clin. Invest. 45, 1126.
- LICHTENSTEIN, L.M. i col. (1966).- J. Immunol. 96, 169.
- LICHTENSTEIN, L.M. i col. (1968).- J. Immunol. 101, 317.
- LICHTENSTEIN, L. i col. (1971).- Ann. Intern. Med. 75, 663.
- LICHTENSTEIN, L.M. i col. (1973).- Nature 244, 287.
- LICHTENSTEIN, L.M. i col. (1978).- Chest. 73-S, 919-S.
- LIN, M.S. i col. (1977).- J. Pediatrics 91, 222.
- LOVELESS, M. (1940).- J. Immunol. 38, 25.
- LOVELESS, M. (1957).- J. Immunol. 34, 68.
- MARNEY, S.R. i col. (1975).- J. Immunol. 114, 696.
- MARSH, D. i col. (1970).- Immunol. 18, 705.

- MATHE, A.A. i col. (1977).- N. Engl. J. Med. 296, 850.
- MATHEWS, K. i col. (1980).- All. & Clin. Immunol. 65, 191.
- MAYER, M.M. (1973).- Scient. Am. 229, 2.
- Mc. ALLEN, J. i col. (1967).- Br. Med. J. 1, 22.
- Mc. CONNELL, I. (1976).- Prog. Roy. Soc. Med. 69, 15.
- Mc. DUFFIE, F.C. i col. (1978).- Clin. Exp. Immunol. 32, 218.
- MERLEN, E. i col. (1966).- N. Engl. J. Med. 275, 480.
- MERRET, T.G. i col. (1980).- Allergy 35, 491.
- MERRET, T.G. (1981).- Immunology Today, 2, 13.
- METZGER, W. i col. (1980).- J. Allerg. & Clin. Immunol. 65, 164.
- MILLER, W. i col. (1974).- Clin. Allergy 4, 49.
- MOGI, G. i col. (1977).- Arch. Otolaryngol. 103, 251.
- MUÑOZ-LOPEZ, F. (1974).- "Asma Bronquial Infantil" Ed. Espax, Barcelona.
- MUÑOZ-LOPEZ, F. i col. (1975).- Allergol. & Immunopathol. 3, 419.
- NAKAJIMA, S. i col. (1978).- Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 56, 563.
- NALEBUFF, D.J. i col. (1979).- Continuing Educ. Family Phys. 10, 64.
- NICKERSON, J. i col. (1980).- J. Allerg. & Clin. Immunol. 65, 192.
- NOON, L. (1911).- Lancet 1, 1572.
- NORMAN, P. (1980).- J. Allerg. & Clin. Immunol. 67, 87.

- OSTERBALLE, O i col. (1979).- Allergy 34, 187.
- PAGANELLI, R. i col. (1979).- Lancet I, 1270.
- PALMA-CARLOS, A.G. i col. (1971).- Acta Allergol 26, 161.
- PARISH, W.E. (1974).- Progr. Immunol. 4, 19.
- PAULL, B.R. i col. (1978).- J. Immunol. 120, 1917.
- PAUWELS, R. i col. (1980).- Allergy 35, 665.
- PEPYS, J. (1977).- Am. Rev. Resp. Dis. 116, 573.
- PEREZ-GUERRERO, J. i col. (1970).- J. Clin. Invest. 62,  
1113.
- PLATTS-MILLS, T. i col. (1976).- J. Clin. Invest. 57,  
1041.
- PLAYFAIR, J.H.L. (1979).- "Immunology at a glance", Black  
well Scientific Publications, Loncres.
- PORTUS, M. i col. (1977).- Allergol' et Immunopathol. 5,  
101.
- PRAUNITZ, C. i col. (1921).- Zbl. Bakt. Hyg. 86, 160.
- RACKEMANN, F. i col. (1952).- New. Eng. J. Med. 246, 858.
- REID, M.J. i col. (1981).- J. Allerg. & Clin. Immunol.  
67, 263.
- ROITT, I. (1975).- "Inmunología sencial" 2<sup>a</sup> Ed, Ed. JIMS  
Barcelona.
- SAGASHI, K. i col. (1978).- J. Neuropathol. Exp. Neural.  
37, 212.
- SANTRACH, P.J. i col. (1981).- J. Allerg. & Clin. Immu-  
nol. 67, 97.
- SCHEUERMAN, H.E. i col. (1963).- Allergie und Asthama 9,  
219.



- SHIMIZU, M. i col. (1978).- J. Immunol. Methods 19, 317.
- SMITH, W.R. i col. (1978).- Chest. 73, 471.
- SOBOTKA, A.K. i col. (1976).- J. Immunol. 117, 84.
- STEIN, J, (1973).- "Isotopos Radiactivos" Ed. Alhambra Madrid.
- STENDARDI, L. i col. (1980).- Clinical Allergy 10, 405.
- SUBIRA, M.L. i col. (1975).- Allergol et Immunopathol. III, 309.
- SULLIVAN, T. i col. (1980).- Allerg. & Clin. 65, 195.
- SVEDMYR, N. i col. (1978).- Pharmacol. & Ther. B. 3, 397.
- TAYLOR, B. i col. (1974).- Clin. Allergy 4, 35.
- TAYLOR, W. i col. (1978).- J. Allerg. & Clin. Immunol. 61, 283.
- VIJAY, H.M. i col. (1977).- Int. Arch. All. Appl. Immunol. 56, 417.
- WEEMAES, C.M.R. i col. (1977).- Clin. Allergy 7, 75.
- WELSH, P i col. (1980).- J. Allerg. & Clin. Immunol. 65, 191.
- WIDE, L. i col. (1967).- Lancet 2, 1105.
- WIDE, L. (1973).- Clin. Allergy 3-S, 583.
- WIDE, L. (1976).- Int. Arch. All. Appl. Immunol. 52, 219.
- WITTIG, H.J. i col. (1978).- Ann. Allergy 41, 84.
- WUTHRICH, B. i col. (1978).- Dtsch. Med. Wschr. 103, 603.
- ZIMMERMANN, E.M. i col. (1980).- J. Allerg. Clin. Immunol. 66, 386.