

Modificaciones de parámetros clínicos, celulares y moleculares al cabo de un año de inmunoterapia alérgeno específica

Parameters modified of allergy after immunotherapy

Ana María Maldonado¹, Laura N. Cariddi², Flavia Alaniz³

1. Médica, Especialista en Alergia e Inmunología, Dra. en Ciencias Biológicas. Prof. Asoc. Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC), Río Cuarto. 2. Microbióloga, Becaria post-Doctoral CONICET, Río Cuarto. 3. Microbióloga, tesista Escuela de Postgrado, Doctorado en Ciencias Biológicas, UNRC, Río Cuarto, Pcia. de Córdoba. Rep. Argentina.

ARCHIVOS DE ALERGIA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA 2010;41(4):12-136

Resumen

Antecedentes. En general, los pacientes alérgicos, después de un año de inmunoterapia (IT), muestran mejoría en la frecuencia e intensidad de los síntomas.

Objetivo. Demostrar que la IT tiene efectos moduladores sobre parámetros clínicos, celulares y moleculares de alergia de acuerdo con las edades.

Metodología. Se incluyeron 81 pacientes alérgicos asmáticos: 28 infantes, 36 niños, 17 adultos y 27 controles. En los niños y jóvenes se evaluó el pico flujo espiratorio (PEF), reactividad cutánea, se registró eosinofilia sanguínea y de exudado de mucosa nasal, liberación de enzima β -hexosaminidasa (β -H) de basófilos, proliferación de PBMC estimuladas con alérgeno específico o PHA; se cuantificaron las concentraciones de IgE, IL-13 y sCD23 en sueros y de IFN- γ en sobrenadantes de cultivos de PBMC.

Resultados. Niños y adultos sin IT empeoraron sus reducidos valores de PEF. Niños y adultos después de IT mostraron incremento en los volúmenes de PEF ($p < 0,0001$). Todos los grupos con IT redujeron la reactividad cutánea ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$ y $p < 0,02$) y la liberación de B-H de basófilos desafiados con el alérgeno específico ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$ y $p < 0,003$). Niños y adultos con IT observaron disminución en los niveles de IgE, ambos $p < 0,05$, y redujeron los niveles de células eosinófilas nasales ($p < 0,0001$ y $p < 0,01$). Solamente los niños tratados con IT redujeron los niveles de células eosinófilas sanguíneas ($p < 0,0001$). Las PBMC de infantes y niños con IT disminuyeron los índices de proliferación desafiadas con el alérgeno específico, ambos $p < 0,05$. Los pacientes alérgicos observaron menores niveles de IFN- γ ($p < 0,02$) y más altos niveles de IL-13 ($p < 0,05$) y sCD23 ($p < 0,001$) que los hallados en controles.

Conclusiones. La IT demostró efectividad terapéutica en pacientes asmáticos y cambios en parámetros clínicos celulares y moleculares. Algunos de esos parámetros fueron indicadores de la evolución de la enfermedad y ellos fueron diferentes de acuerdo con las edades.

Palabras clave: inmunoterapia, pico flujo espiratorio, reactividad cutánea, eosinófilos y basófilos en alergia, proliferación celular alérgeno-específica, citoquinas en alergia.

Abstract

Background: Most allergic patients, after a year of specific immunotherapy (SIT), show improvement in the frequency and intensity of the symptoms.

Objective. The objective was to demonstrate that specific immunotherapy has modulating effects on clinical, cellular and molecular parameters, of allergy.

Methods. The study included 81 asthmatic allergic patients and 27 healthy controls from 2 to 50 years of age. Peak expiratory flow, skin reactivity, blood and nasal smear eosinophilia was conducted. β -hexosaminidase enzyme (B-H) release assays and Peripheral Blood Mononuclear Cells cultures stimulated with specific allergens, were realized. Total IgE, sCD23 and IL-13 were measured in serum and IFN- γ , in culture supernatants.

Results. In all the cases a reduction in the frequency and intensity of the asthma attacks and a decrease in medical consultations and antiallergic drugs consumption were observed. The patients without SIT diminished low PEF values. Children and adult people with SIT increased the volumes of peak expiratory flow, ($p < 0.0001$). Skin reactivity was reduced in all the SIT groups'. Skin reactivity were $p < 0.0001$, $p < 0.0001$ y $p < 0.02$ respectively, and B-H released were $p < 0.0001$, $p < 0.0001$ y $p < 0.003$) to each group. The infants without SIT increased IgE levels. Nasal smear eosinophilia fell from children and adults, $p < 0.0001$. In Infants and children with SIT, the cellular expansion by the allergen was reduced ($p < 0.05$). In allergic patients IFN- γ values were lower than controls, ($p < 0.02$). IFN- γ synthesis did not vary after a year of allergen-specific immunotherapy. Allergic patients observed higher serum levels of IL-13 ($p < 0.05$) and sCD23 ($p < 0.001$) than controls.

Conclusions. SIT after a year demonstrated therapeutic effectiveness in asthmatic patients with changes in multiple parameters: clinical, cellular and molecular.

Key words: specific immunotherapy, peak expiratory flow, skin reactivity, eosinophils and basophiles in allergy, cell cultures and cytokines in allergy.

1. Antecedentes

La inmunoterapia alérgeno específica (IT) es utilizada desde hace casi un siglo, de manera habitual, para el tratamiento de las enfermedades alérgicas causadas por alérgenos inhalantes [1]. La aplicación de alérgenos o extractos alérgicos modificados reduce la unión de IgE a sus receptores, la producción de células T alérgeno específicas y la liberación de citoquinas [2]. Este tratamiento permite la tolerancia de larga vida para prevenir alergias y restaurar la inmunidad contra los alérgenos. La tolerancia periférica que desarrollan las células T reguladoras (Treg) se caracteriza principalmente por suprimir la respuesta de proliferación y producción de citoquinas inducidas específicamente por un alérgeno. Las células Treg son productoras de citoquinas supresoras IL-10 y TGF- β 1 que actúan sobre mastocitos, basófilos y eosinófilos. Además pueden suprimir la producción de IgE e inducir la síntesis de IgG4 e IgA específica. La histamina, vía su receptor 2, liberada de mastocitos y basófilos puede contribuir a la regulación, durante la IT, y estimular a las células Treg a producir citoquinas supresoras [3]. La IT provee eficacia clínica prolongada después de terminado el tratamiento, y este beneficio no se observa con la terapia farmacológica. La administración subcutánea de dosis desensibilizantes ha sido hasta hoy la vía convencional y de elección [4].

Los efectos de la IT han sido investigados por diversos autores que identificaron dos poblaciones de células dendríticas (CD): las CD maduras, estimuladas por el Ag, indujeron a LTh2 a cooperar para la síntesis de IgE; y las CD reguladoras (CDreg), que inhibieron la producción de IgE, suprimieron la patogénesis inflamatoria, aumentaron la síntesis de IgG1 e IgG2a y la producción de IL-21 por estimulación de LTh1 [5]. La unión de CD40 de las CD a su ligando CD40L de las células T, en presencia del alérgeno, activó a las CD para producir citoquinas proinflamatorias, eosinofilia y activación de células Th2 [6].

Se sabe que los LTh2 producen IL-4 que estimula a las células B para la conmutación de isotipo y la producción de IgE. La respuesta de células Th2 lleva a la síntesis de IgE, reclutamiento y maduración de eosinófilos, basófilos y mastocitos. La estrategia de la IT incluye la supresión de la respuesta Th2 a través de mecanismos antagonistas Th1 y la producción de IL-10 y TGF- β 1 [7]. Los eosinófilos también participan en los mecanismos inflamatorios que suceden en el asma y expresan en su superficie receptores para IgE. El receptor de baja afinidad para la IgE (FcRII/CD23) se ha implicado en la regulación de la síntesis de IgE, por lo que es posible que los pacientes asmáticos alérgicos presenten una mayor expresión de CD23 en eosinófilos, mastocitos, basófilos y células B [8].

Es conocido que sCD23 participa en la regulación de la síntesis de IgE y que IL-4 induce la expresión de CD23 en células B y monocitos y la liberación de sCD23. Se ha demostrado que, durante la IT, el alérgeno regula, en forma dosis dependiente, la expresión de CD23 en monocitos y células B mediante la síntesis de IFN- γ e IL-10 [9].

La anergia, tolerancia y supresión pueden involucrar células y mecanismos similares. La IT puede activar células Treg alérgeno-es-

pecíficas, que inhiben la proliferación, inducida por el alérgeno, de células Th1 y Th2 y la producción de citoquinas [10]. Las células Treg utilizan múltiples mecanismos supresores: IL-10, TGF- β , CTLA4, TGF- β R, IL-10R, regulan el isotipo de anticuerpos (Ac) IgE a IgG4 e IgA, suprimen a eosinófilos, mastocitos y basófilos, células efectoras de la inflamación alérgica [11]. El desarrollo de la tolerancia periférica depende del balance entre células T reg y células Th2 [12]. Se observó que las células Treg CD4+CD25+Foxp3+ estimuladas por las CDreg suprimieron la producción de IgE específica y suprimieron la patogénesis inflamatoria [5].

Nigo Y et al (2006) investigaron el asma en un modelo experimental en ratón y encontraron que la inflamación y eosinofilia de la vía aérea inducida por un LPS no se producía en animales deficientes en mastocitos o en TLR4. La inflamación resultaba por activación de NF- κ B que inducía la expresión de GATA1 y GATA2, genes que incrementaban la producción de IL-4, IL-5, IL-13 y de eotaxina 2. Es así que los mastocitos pueden controlar la inflamación de la vía aérea después de su activación y modulación a través de los TLR4, inducción de GATA1 e incremento de la producción de citoquinas Th2 [13].

Recientemente Mantel P et al (2007) han revelado que un gen conocido como GATA3 inhibe la producción de células Treg bloqueando la acción de otro gen FOXP3 que es clave para la formación de nuevas células Treg. La neutralización de la actividad de GATA3 aumentaría la producción de células Treg y mejoraría la tolerancia en las personas alérgicas [14].

En alérgicos, IL-4 inhibe la síntesis de IFN- γ por parte de LTh1, IL-5 activa a eosinófilos e IL-9 favorece la producción de moco. IL-13 inhibe a células Th1, para síntesis de IFN- γ y estimula a células Th2 para síntesis de IL-4. Se ha demostrado que la mayoría de los pacientes alérgicos, después de más de un año de IT, muestran mejoría por reducción en la frecuencia e intensidad de los síntomas. Además, se ha observado que al año del tratamiento con IT se reducen los niveles de IgG1, se incrementan los niveles de IgG4, disminuyen los valores de IL-10, IL-12, TGF- β 1 y las concentraciones de sCD23 e IgE muestran resultados variables (Ye Y et al 2006). Sin embargo no siempre se observa, en el curso de la IT, que IgG4 específica incremente sus niveles durante la fase inicial de la IT [15].

Se comprobó además, que el tratamiento con IT realizado durante al menos 6 meses reduce significativamente los costos de medicamentos [16].

Diversos autores han comprobado la eficacia de la IT por la evaluación de parámetros clínicos y de las modificaciones a nivel celular y molecular [8,21,22,23], utilizando las vías subcutáneas sublingual en diferentes grupos de pacientes, con resultados variables.

2. Objetivos

El objetivo de esta investigación fue demostrar que la IT, administrada a infantes, niños y adultos asmáticos durante más de un año, tuvo efectos moduladores sobre algunos parámetros de alergia: a)

clínicos: pico flujo espiratorio y reactividad cutánea; b) celulares: eosinofilia sanguínea y de exudado de mucosa nasal, desgranulación de basófilos alérgico específica con liberación de la enzima β -hexosaminidasa y proliferación alérgico específica de PBMC y c) moleculares: niveles de IgE, sCD23, IL-13 e IFN- γ .

3. Materiales y métodos

3.1. Pacientes

Se estudiaron 108 pacientes de ambos sexos. De ellos 81 eran alérgicos asmáticos y 27 controles. Se formaron 3 grupos etarios. El primer grupo era de 36 infantes (2-4 años), de los que 15 fueron tratados con IT por 12 meses o más, 13 cuyos padres no aceptaron realizar el tratamiento de IT y 8 no alérgicos, que constituyeron el grupo control. El segundo grupo, de 45 niños de 5-14 años: 26 fueron tratados con IT por más de 12 meses, 10 cuyos padres o responsables no aceptaron realizar el tratamiento de IT y 9 niños no alérgicos, que formaron el grupo control. El tercer grupo estuvo constituido por 27 adultos de 15 a 50 años de edad: 9 fueron tratados con IT por más de 12 meses, 8 no aceptaron realizar el tratamiento de IT y 10 sanos no alérgicos, controles. El diagnóstico de alergia se realizó por la historia clínica, examen físico y pruebas de laboratorio. Los 81 pacientes que integraron el estudio tenían antecedentes de más de 3 crisis de asma e historia personal y familiar de alergia. Cada uno de ellos fue evaluado en oportunidad de la primera consulta y después de 12 meses. Los pacientes que no realizaron IT fueron asistidos por diferentes profesionales, los que indicaron: anti-histamínicos durante períodos prolongados y esteroides y broncodilatadores en ocasiones de crisis de asma.

En cada caso, para las pruebas *in vitro* se tomaron muestras de sangre y exudado nasal. De cada individuo se extrajeron aproximadamente 10 ml de sangre venosa periférica con jeringa y aguja estériles, que fueron colocados en tubos heparinizados.

3.1. a. Ética

En todos los casos los padres de los pacientes dejaron por escrito su conformidad firmada para los estudios a realizar a partir de una muestra correspondiente a una alícuota de la sangre extraída para hemocitológico y otros exámenes de rutina. Se informó además de la utilidad diagnóstica del exudado nasal, de la eficacia de las pruebas cutáneas para la determinación del alérgico y se explicaron los mecanismos biológicos de la IT. Se informó acerca de los ocasionales riesgos de estas pruebas y de las medidas de prevención y tratamiento a adoptar. Este estudio fue aprobado por las autoridades de la UNRC. Los procedimientos éticos fueron aprobados por las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de la UNRC, constituida en Comisión de Ética.

3.2. Pico flujo espiratorio (PFE)

La hiperreactividad bronquial fue evaluada por medio del PFE en niños de más de 4 años de edad. Los valores fueron determinados por medio de un medidor de flujo espiratorio: Vitalograph, según Canny et al 1994 [24].

En cada caso se determinaron los índices porcentuales de los valores individuales, con respecto a los considerados normales de acuerdo con la altura, edad y sexo.

Las pruebas de la función pulmonar se usaron para certificar el diagnóstico de asma, controlar la evolución de la enfermedad y su respuesta al tratamiento. Se evaluó la hiperreactividad bronquial por medición de pico flujo espirado (PFE) según tabla de Polgar G & Promadhat V (1971) [25] en los niños mayores de 4 años. Fue necesario conocer en cada paciente el mejor valor personal de PFE, ya que las cifras de las tablas de normalidad son sólo orientadoras. En ningún caso habían usado broncodilatadores.

Los PFE fueron determinados mediante flujómetros Vitalograph, Assess o Personal Best, con los niños en posición de pie y sin oclusión nasal. Se registró el mayor valor logrado en tres o más pruebas sucesivas. De acuerdo con las investigaciones de Capano A et al (2007) [26], se determinó la talla sin calzado y con un pedímetro digital. Se utilizaron piezas bucales cilíndricas descartables para cada niño. Previo a la determinación, los niños fueron instruidos brevemente en el procedimiento por el equipo. Las zonas del flujo pico facilitaron la evaluación del estado de la enfermedad.

- **Zona verde:** entre el 80% y el 100% del mejor registro personal. *Normal.*
- **Zona amarilla:** entre el 50% y el 80% del mejor registro personal. *Espasmo bronquial.*
- **Zona roja:** Menos del 50% del mejor registro personal. *Broncoespasmo severo.*

3.3. Pruebas cutáneas

Las pruebas cutáneas se llevaron a cabo empleando la técnica *prick* sobre la piel de la espalda. Los controles positivos se realizaron con fosfato de histamina con 0,1 mg/cc de solución 1:1000 (Eli Lilly Co Ind USA). Los controles negativos se prepararon con una solución de 0,5% fenol en agua destilada [27].

Todos los alérgicos usados en las pruebas cutáneas IT eran de origen comercial (Diater Laboratorios, IPI SA y Allergo-Pharma SRL). Se aplicaron dosis diluidas 1:10. La reactividad cutánea fue determinada para inhalantes y alimentos. Se evaluaron las reacciones después de 20 minutos. Se consideraron positivas las reacciones con eritema mayor de 3 mm al diámetro de la roncha producida por el control negativo o reacción testigo, roncha y pápula cualquiera fuera su diámetro y las reacciones de eritema igual a 10 mm o mayor. Se consideró la siguiente escala:

- – (**negativo**). Sin modificación o igual al testigo.
- \pm (**dudoso**). Pápula menor que el doble tamaño de la reacción testigo.
- + (**positivo**). Edema igual al doble de la reacción testigo.
- ++ (**positivo dos cruces**). Edema mayor que el doble de la reacción testigo.
- +++ (**positivo tres cruces**). Edema similar al anterior pero de bordes irregulares.
- ++++ (**positivo cuatro cruces**). Reacción más notable [27].

3.4. IgE sérica total

La cuantificación de los niveles de IgE se determinó en sueros. El equipo comercial Human IgE ELISA Quantization Kit from Bethyl Laboratories Inc. Montgomery, Texas, fue utilizado de acuerdo con el instructivo. Los Ac IgE de los sueros reaccionaron con Ac monoclonales anti-IgE inmovilizados en el fondo de los pocillos de una placa. Una anti-IgE elaborada en ratón conjugada con la enzima peroxidasa de rábano reaccionó con la IgE del complejo durante la segunda incubación. A dicha enzima se le agregó el sustrato 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina y se incubó a temperatura ambiente, virando el color de amarillo a azul. La absorbancia fue medida a 405-450 nm con un espectrofotómetro LabSystem Multiskan MS (Multiskam SA, Finland). Los valores obtenidos con los sueros de concentración conocida fueron utilizados para confeccionar una curva, sobre la que se extrapolaron los valores de absorbancia de los sueros problemas, para obtener las concentraciones de IgE en UI/ml de cada muestra. Los valores normales se consideraron según las edades de los pacientes [28,29].

3.5. Eosinófilos en sangre y en exudado nasal

En cada caso se consideraron los valores absolutos de eosinófilos por mm³ de sangre periférica. Se aplicó el método convencional de la fórmula sanguínea de determinación de los índices porcentuales de eosinófilos, en relación con el recuento de leucocitos totales. La eosinofilia de mucosas se determinó en exudado nasal, aplicando la técnica de Hansel con la tinción de Wright-Giemsa. Se tomaron 5 muestras con papel parafinado frotando la mucosa y arrastrando las secreciones líquidas y transparentes que se extendieron sobre la superficie de los portaobjetos preidentificados. Cada muestra se fijó a la llama y luego un minuto con alcohol etílico 95%. Se cubrió 3 minutos con colorante Wright, mezcla de eosina y azul de metileno, y luego Giemsa por 15 minutos. Se observó con objetivo de inmersión (aumento 1000X). Se interpretó de 0 a 4+, según el promedio de eosinófilos en 10 campos [30].

3.6. Ensayo de liberación de la enzima beta-hexosaminidasa (B-H)

Para evaluar el efecto de diferentes alérgenos sobre la desgranulación de basófilos, se realizó el ensayo de liberación de la enzima β-hexosaminidasa. Los basófilos de los pacientes alérgicos fueron desafiados con el alérgeno específico solo.

Los basófilos se obtuvieron por separación de células en gradiente de densidad de dextrán 70 al 6%. Se depositó una alícuota de 50 ml a una concentración de 1×10^5 , de la suspensión de basófilos, en cada pozo de una microplaca de 96 pozos. Cada pozo ya seco había contenido una dilución del alérgeno específico. Así los basófilos fueron incubados con cada alérgeno. Para obtener y concentrar los basófilos se aplicó la técnica de Benveniste J. modificada [31].

Las células se incubaron por 15 minutos a 37°C con el alérgeno específico. Después de la incubación se agregaron 50 ml del sustrato cromogénico para la enzima β-hexosaminidasa (4-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminida) (Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis,

USA) 1 mmol/l, disuelto en 0,1 mol/l de buffer citrato, pH 5. El sistema se incubó a 37°C por una hora. El producto del clivaje (4-nitrofenol) se interpretó por lectura espectrofotométrica a 405 nm [32]. La reacción fue detenida con 200 ml de buffer carbonato 0,1 M, pH 10,5 por pocillo. La placa fue leída a 405 nm en un lector ELISA (LabSystems Multiskan MS). El porcentaje de la liberación de β-hexosaminidasa fue calculado usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de liberación} = (A - B) \times 100/A$$

donde **A es la cantidad de B-H liberada por las células estimuladas** por el alérgeno (en OD) y **B es la cantidad de B-H liberada espontáneamente** (en OD) por basófilos [33]. Los valores de controles negativos se obtuvieron usando los basófilos aislados sin estimulación alérgica, en medio RPMI-1640, a fin de observar la desgranulación espontánea inespecífica.

3.7. Cultivos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Efectos de la estimulación de células mononucleares con PHA o alérgeno.

Se evaluó la proliferación celular en cultivos de células mononucleares estimuladas con 10 µg/ml de PHA-M, con el alérgeno involucrado y sin mitógenos ni antígenos.

Los linfocitos fueron separados de sangre periférica por gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (Hystopaque® - 1077; Sigma, St. Louis, USA) y se analizó su viabilidad mediante la técnica de exclusión al azul de tripán. Para realizar el ensayo de proliferación se empleó el método colorimétrico del MTT, utilizando un equipo comercial (Vybrant®; MTT Cell Proliferation Assay Kit, Molecular Probes Invitrogen Detection Technologies, Eugene, Oregon, USA). El MTT es una sal de tetrazolio [3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromuro], la cual es clivada por las mitocondrias de las células vivas, dando origen a un producto (formazán) de color azul, el cual puede ser detectado en un espectrofotómetro a 570 nm.

En una placa estéril de 96 pocillos (NUNCLO®; Delta Nunc Inter Med, Dinamarca) se colocaron los linfocitos en una concentración de 2×10^5 por pocillo en un volumen total de 200 µl. Las células fueron cultivadas con RPMI-1640 completo y estimuladas en ensayos independientes con:

- 10 µg/ml de PHA
- 10 PNU/ml de cada uno de los alérgenos correspondientes.
- Sin adición de alérgeno o mitógeno.

Las células fueron incubadas durante 72 horas a 37°C con 5% de CO₂ en atmósfera húmeda. A las 60 horas se separaron los sobrenadantes, que fueron colocados en tubos Eppendorf a -80°C para realizar la determinación de las citoquinas. Se agregaron 100 µl de RPMI-1640 completo y 10 µl de solución MTT (1 mg/ml de MTT en PBS 0,01 M, pH 7,2) a cada pocillo y la placa fue incubada a 37°C con 5% de CO₂ durante 4 horas. Al cabo

de ese tiempo, se agregaron 50 μ l de DMSO por pocillo, para disolver los cristales de formazán producto de la conversión del MTT. Se interpretó el resultado por lectura en espectrofotómetro (Labsystems Multiskan MS) a 570/690 nm. La expansión celular alcanzada por el mitógeno clásico PHA y la producida por el alérgeno de mayor reactividad fueron comparadas con la proliferación espontánea de las células sin agregado de mitógeno o alérgeno. Se calculó el índice de proliferación (IP) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$PI = \text{células estimuladas} / \text{células no estimuladas} > 1,20 [34].$$

Según Tuchscherer M, et al. (2002) [34], un IP > 1,20 es indicativo de proliferación celular.

3.8. IFN-gamma

La síntesis de IFN- γ se determinó en sobrenadantes obtenidos de cultivos de PBMC de pacientes y de individuos controles, con y sin estímulo de PHA. Los sobrenadantes de dichos cultivos celulares fueron recolectados después de 60 horas de incubación de las PBMC, tiempo que requiere el IFN- γ para ser secretado. Las experiencias se realizaron por duplicado. El ensayo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del equipo comercial Human Interferón Gamma (Hu- IFN- γ) ELISA kit (PBL Bomedical Laboratories, USA) que cuantifica IFN- γ humano utilizando un inmunoensayo sándwich. El límite de detección del kit para IFN- γ , fue <10 pg/ml [35].

3.9. IL-13

La IL-13 sintetizada por células mononucleares, principalmente células Th2, es una citoquina pleiotrópica que tiene actividad inmunorreguladoras sobre la síntesis de IgE. Los niveles de IL-13 fueron cuantificados en sueros de un grupo de pacientes alérgicos antes y después de la IT y en sanos controles. Las experiencias se realizaron por duplicado. El ensayo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del equipo comercial EHIL13 Human Interleukin-13 ELISA Kit (Pierce Endogen, Francia) que cuantifica IL-13 humana utilizando un inmunoensayo sandwich. El límite de detección del kit para esta citoquina fue <7pg/ml [36].

3.10. CD23 soluble (sCD23)

Los niveles de sCD23 en ng/ml se evaluaron en un grupo de niños y jóvenes con y sin IT y en controles. Se realizó el EIA con equipo Bindazyme TM soluble CD23-EIA Kit MK 112 (The Binding IT Birmingham, UK), de acuerdo con el procedimiento indicado en prospecto adjunto. Los pozos de microtitulación se coactaron con Ac monoclonales anti sCD23 humana elaborada en carnero. Se agregaron las muestras de los pacientes. El sCD23 se unió al Ac monoclonal. Después de una incubación y lavado se agregó, a cada pozo, anti-IgG de carnero conjugada con peroxidasa. Se adicionó tetrametil-bencidina, que dio una reacción azul. Se detuvo la reacción

con el agregado de solución de frenado de ácido fosfórico. El producto se tornó amarillo y la cantidad de color producida resultó proporcional a la concentración de sCD23 de cada muestra. La absorbancia se leyó a 450 nm en lector Labsystem Multiskan MS (Multiskam SA, Finlandia). Se consideraron elevados los valores superiores a 60 ng/ml [37].

3.11. Inmunoterapia

Los tratamientos de IT fueron preparadas con alérgenos estandarizados. Según los alérgenos se prepararon: unidades alergénicas: AU, unidades alergénicas bio-equivalentes: BAU, unidades de nitrógeno proteico: PNU, o diluciones peso/volumen: w/v. Los alérgenos fueron preparados en concentraciones crecientes, en viales de 5 cc: 0,1 PNU/ml, 1 PNU/ml, 10 PNU/ml, 100 PNU/ml y 1000 PNU/ml, a partir de cada extracto alergénico que contenía 10000 PNU/ml o sus equivalentes en las otras unidades estandarizadas. Las diluciones de los extractos acuosos fueron realizadas en solución buffer fenol 0,5%. Se aplicaron en cada caso, dosis subcutáneas cada 7 días. Se comenzó con 0,05 ml y se incrementó la dosis cada semana a: 0,1 ml, 0,02 ml, 0,3 ml, 0,4 ml y 0,5 ml. Se continuó con dosis de mantenimiento de 0,5 ml hasta finalizar las 12 dosis del frasco 1. Se repitió este procedimiento con los frascos 2, 3, 4 y 5. Posteriormente se administraron dosis de mantenimiento similares a las del frasco 5 [38-40].

Los alérgenos administrados en el IT, de procedencia comercial (Diater Laboratorios, IPI SA y Allergo-Pharma SRL) fueron similares a los aplicados en las pruebas cutáneas. Los pacientes hipersensibles a múltiples alérgenos fueron tratados con IT de hasta tres alérgenos específicos, de acuerdo con la mayor reactividad en las pruebas cutáneas.

3.12. Análisis estadístico

Todos los valores obtenidos en los ensayos de esta investigación se expresaron como promedio \pm desviación estándar. Los parámetros fueron evaluados con el programa Graph Pad Prism versión 4.0 (Inc. San Diego, USA, 2004) y comparados con las pruebas paramétricas de la *t* de Student para muestras apareadas. Se consideraron diferencias estadísticas significativas cuando el valor fue de $p < 0,05$.

4. Resultados

En todos los casos de pacientes tratados con IT, lactantes, niños y adultos, se observó una reducción en la frecuencia e intensidad de los ataques de asma. No se determinaron reacciones adversas ni síntomas de empeoramiento durante o después de la aplicación de IT.

Los niños alérgicos con asma sin IT agravaron su enfermedad después de un año, mientras que los tratados con IT mejoraron significativamente.

Los niños y adultos sin IT disminuyeron los índices porcentuales de valores individuales en PFE con respecto a aquellos considera-

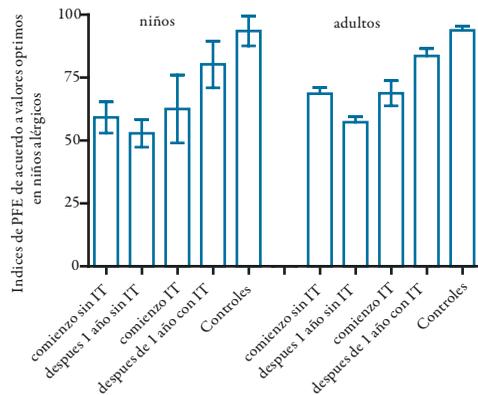


Gráfico 1. En niños y adultos sin IT, los índices de PFE disminuyeron ($p < 0,03$ y $p < 0,01$, respectivamente). Después de un año de IT se observaron incrementos en los volúmenes de PFE ($p < 0,0001$ en ambos grupos). Los valores siempre fueron menores que los de los controles ($p < 0,001$).



Figura 1. Reactividad cutánea inmediata a múltiples alérgenos observada en una paciente de 3 años de edad con diagnóstico de rinitis y asma.

dos normales de acuerdo con edad y altura, empeorando sus bajos valores de PFE ($p < 0,03$ y $p < 0,01$, respectivamente). En ambos grupos se observó un incremento significativo en los volúmenes de PFE en aquellos pacientes con más de un año de IT ($p < 0,0001$). En estos pacientes los valores de PEF mejoraron significativamente, aunque no alcanzaron los valores promedio de los controles ($p < 0,001$) (**Gráfico 1**).

Al cabo de un año, los pacientes sin IT no modificaron la reactividad cutánea específica al alérgeno, mientras que los niños y adultos con IT redujeron significativamente la reactividad cutánea alérgeno ($p < 0,001$ y $p < 0,05$, respectivamente) (**Figura 1** y **Gráfico 2A**). Observamos que los infantes sin IT mostraron incremento de los niveles de IgE ($p < 0,05$), mientras los niños y adultos

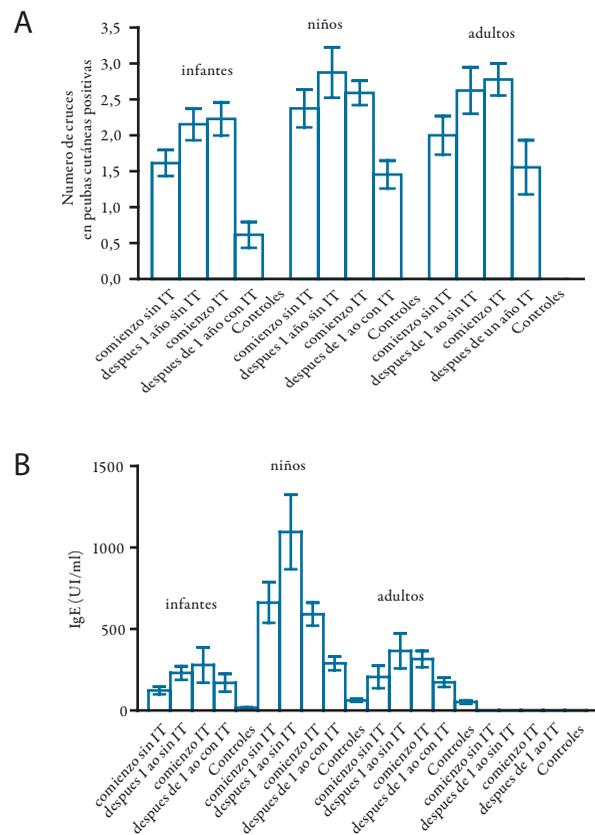


Gráfico 2. A. Infantes, niños y adultos sin IT no modificaron la reactividad cutánea después de un año. Los pacientes con IT redujeron la reactividad cutánea después de un año ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$ y $p < 0,02$, respectivamente). La menor reactividad cutánea no logró la ausencia de reactividad observada en los controles ($p < 0,0001$). **B.** Los infantes sin IT incrementaron los niveles de IgE después de un año ($p < 0,05$) aunque los tratados con IT no modificaron los valores del inicio. Niños y adultos sin IT no observaron modificaciones en las concentraciones de IgE después de un año pero estos pacientes con IT disminuyeron los niveles de IgE ($p < 0,001$ y $p < 0,05$, respectivamente). Los valores obtenidos fueron más altos que los de los controles ($p < 0,02$ en los dos grupos).

no observaron modificaciones en esos valores. Al cabo de un año, los infantes con IT no mostraron diferencias en los niveles de IgE, mientras los niños y adultos con IT observaron significativa reducción en los niveles de IgE ($p < 0,001$ y $p < 0,05$, respectivamente).

En los tres grupos los valores de IgE después del tratamiento de IT fueron significativamente más altos que los de los controles ($p < 0,02$) (**Gráfico 2B**).

Niños y adultos tratados con IT redujeron significativamente los índices de eosinofilia en exudados nasales ($p < 0,0001$ y $p < 0,01$, respectivamente). Los infantes con o sin IT así como los niños y adultos sin IT no modificaron los valores del año anterior. Los promedios de los valores obtenidos fue-

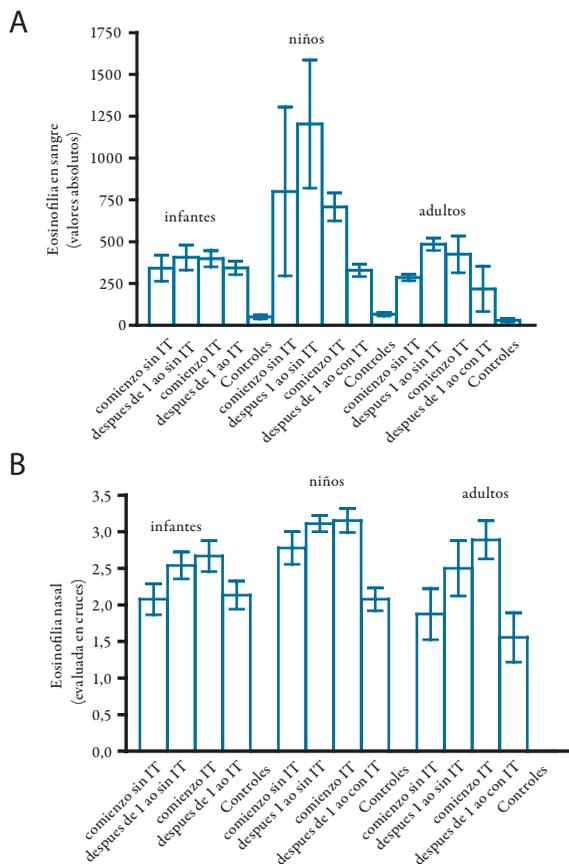


Gráfico 3.A. Infantes, niños y adultos sin IT no modificaron la eosinofilia de mucosa nasal después de un año. Niños y adultos con IT redujeron los índices de eosinofilia de mucosa nasal después de un año ($p < 0,0001$ y $p < 0,01$, respectivamente). Sin embargo, los valores alcanzados fueron más elevados que los de los controles ($p < 0,01$ en ambos grupos). Los infantes con IT no modificaron los valores iniciales. **B.** Los infantes y niños sin IT no modificaron los valores de eosinofilia sanguínea. Los adultos sin IT empeoraron, alcanzando niveles de eosinofilia sanguínea más altos que los iniciales ($p < 0,01$). Después de un año, los niños con IT redujeron los índices de eosinofilia sanguínea ($p < 0,0001$), y los infantes y adultos con IT no modificaron los valores después de un año. Sin embargo, los valores alcanzados fueron más altos que los de los controles en los tres grupos ($p < 0,01$).

ron más altos que los observados en los controles ($p < 0,01$) en los tres grupos (**Gráfico 3A**).

Los infantes y adultos con IT y niños sin IT no modificaron los valores de eosinofilia sanguínea. Los adultos sin IT incrementaron los valores de eosinofilia sanguínea inicial ($p < 0,01$). Los niños con IT redujeron los valores de eosinofilia sanguínea ($p < 0,0001$). En los tres grupos con IT los valores fueron más altos que los de los controles ($p < 0,01$) (**Gráfico 3B**).

Nuestros pacientes sin IT no modificaron los índices de liberación de B-H después de un año. Sin embargo, los otros tres grupos de pacientes con IT redujeron la liberación de B-H: infantes, niños y adultos ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$ y $p < 0,003$, respectivamente) (**Gráfico 4**).

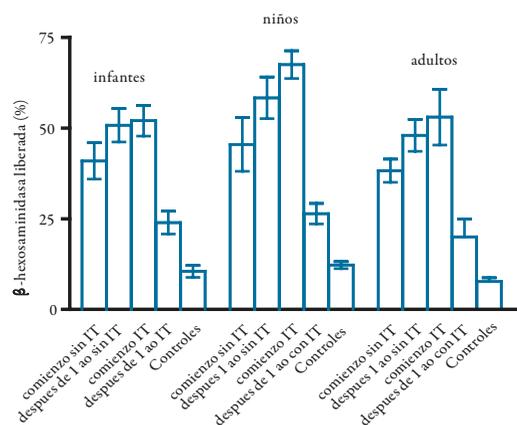


Gráfico 4. Se muestran las tasas de liberación de B-H de basófilos desafiados por el alérgeno específico, respecto a la liberación espontánea de B-H en ausencia del alérgeno. Infantes, niños y adultos sin IT no modificaron los índices de liberación de B-H después de un año. Los pacientes con IT redujeron la liberación de B-H ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$ y $p < 0,003$, respectivamente). Los promedios de los niveles obtenidos fueron más altos que los de los controles ($p < 0,02$, en los tres grupos).

Las PBMC de infantes, niños y adultos sin IT no modificaron los índices de proliferación desafiadas con el alérgeno específico. Las PBMC de infantes y niños con IT redujeron los índices de proliferación frente al alérgeno (ambos $p < 0,05$) (**Gráficos 5A y 5B**).

Los niveles de IFN- γ en sobrenadantes de PBMC de niños no se modificaron con la IT. Los niveles de IFN- γ de los alérgicos fueron menores que los observados en los controles: antes de la IT, $p < 0,02$ y después de la IT, $p < 0,05$. Las PBMC estimuladas con PHA de pacientes sin o con IT y de controles respondieron con similares índices de expansión celular, demostrando una idéntica funcionalidad (**Gráfico 6A**).

En nuestra investigación, aunque los niveles de IL-13 no se redujeron al cabo de un año de IT, la mejoría clínica fue evidente. Los niveles de IL-13 de los alérgicos antes de la IT fueron más altos que los de los controles ($p < 0,05$); estos valores no se modificaron después de un año de IT (**Gráfico 6B**).

Los niños y jóvenes alérgicos mostraron mayores niveles de sCD23 en suero que los controles ($p < 0,001$). Los valores de sCD23 no se modificaron en pacientes sin o con IT (**Gráfico 7**).

5. Discusión y conclusiones

La evaluación del PFE es un reflejo de la calidad de vida de los niños asmáticos y permite predecir las exacerbaciones o crisis [38]. En nuestro estudio observamos incremento en los volúmenes de PFE en los pacientes con más de un año de IT. Estos resultados coinciden con los hallazgos de Ajduk et al. (2008) [19] y Des Roches et al. (1996) [39].

Otros autores demostraron que la IT con *Dermatophagoides pteronyssinus*, redujo el riesgo de asma en niños. Ellos vieron después de 24 meses de IT que los valores de PEF fueron iguales o mayores

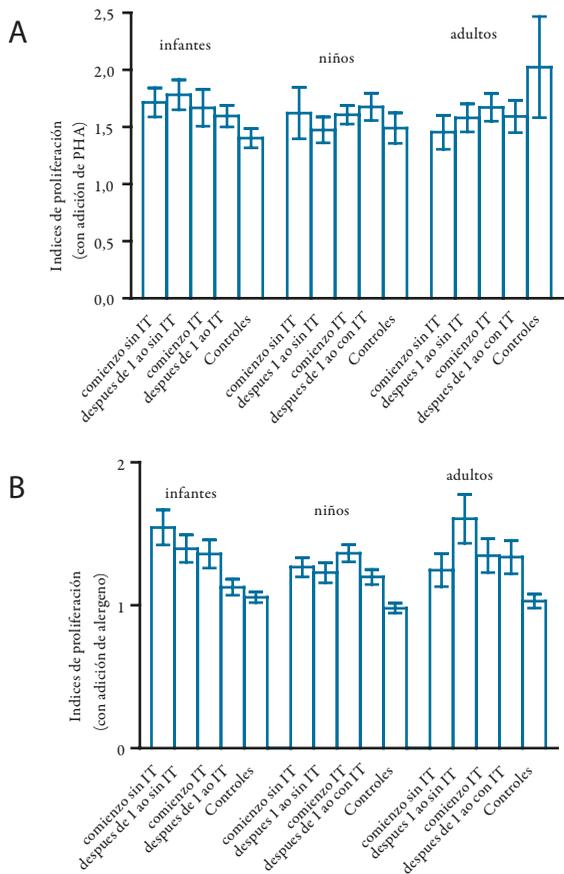


Gráfico 5. A. Las PBMC de niños adultos, estimuladas con PHA, después de un año sin o con IT no modificaron los índices de proliferación (PI). **B.** Las PBMC de infantes, niños y adultos sin IT, cultivadas y desafiadas por el alérgeno específico, no modificaron los PI. Las PBMC cultivadas de infantes y niños con IT disminuyeron los PI frente al alérgeno específico, después de un año, para ambos grupos ($p=0,05$). Las PBMC cultivadas de adultos con IT, al cabo de un año, no modificaron los PI.

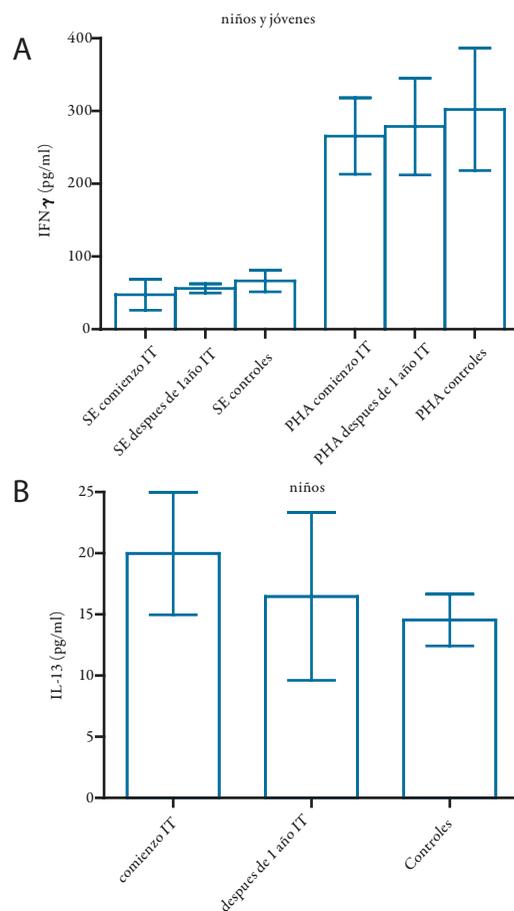


Gráfico 6. A. Los niveles de IFN- γ en sobrenadantes de cultivos de PBMC sin estímulo (WS) de niños y jóvenes con IT no se modificaron. Los pacientes alérgicos mostraron niveles de IFN- γ menores que los observados en los controles ($p<0,02$ antes de la IT y $p<0,05$ después de la IT). Las PBMC de pacientes con IT, cultivadas y estimuladas con PHA, antes o después o de los controles, liberaron similares niveles de IFN- γ . **B.** Los niveles de IL-13 en sueros de pacientes antes del tratamiento fueron más altos que los de los controles ($p < 0,05$). Los niveles de IL-13 en sueros de niños y jóvenes con IT no se modificaron. Además, los valores de IL-13 después de un año de IT fueron similares a los de los controles.

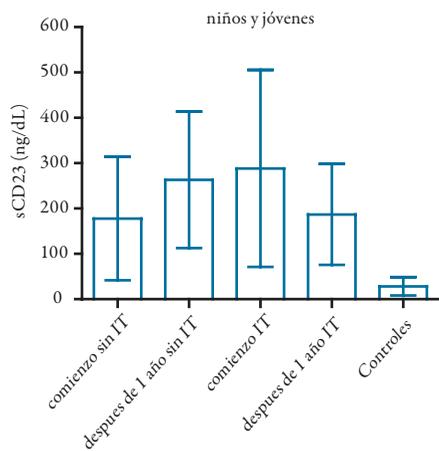


Gráfico 7. Los niveles de sCD23 (ng/dl) en sueros de niños y jóvenes, con o sin SIT no se modificaron. Los pacientes alérgicos mostraron más altos niveles de sCD23 respecto de los controles ($p<0,001$).

al 80% en 76% de los niños. Nuestros resultados coinciden con algunos autores que encuentran después de IT mejoría en todas las variables clínicas, tasa de PEF y niveles de IgE. [8, 9, 39,40]. Encontramos que la reactividad cutánea específica fue reducida después de un año de IT. Estos datos coinciden con los hallazgos de Cevit et al. Ellos sugieren que las pruebas cutáneas pueden ser usadas como un indicador de la eficacia de la inmunoterapia [20]. En pacientes con más de un año de IT, nosotros observamos una reducción en los niveles promedios de IgE del suero. Es bien conocido que la aplicación de extractos alérgicos modificados reduce la síntesis de IgE, como se ve en nuestros hallazgos [12]. Muchos autores han demostrado la mejoría de parámetros inmunológicos y clínicos en niños alérgicos asmáticos después de diferentes períodos de IT [40].

Ebo D et al. comprobaron la eficiencia de IT con óptimos resultados a los 3 años y reducción de los niveles de IgE específica a valores normales [41].

Por otro lado Cevit O et al. no lograron modificar los valores de IgE específica y total después de un año de IT [20].

Niños y adultos tratados un año con IT redujeron los índices de eosinofilia en mucosa nasal. En nuestro estudio, solamente los niños redujeron los niveles de eosinofilia sanguínea. Estos resultados coinciden con los de otros autores [10-12]. Akdis (2008) demostró que después de IT la actividad de células Treg que producen IL-10 y TGF- β , permiten la tolerancia al alérgeno [12].

Observamos que la liberación de B-H alérgeno específica de basófilos fue reducida después de un año de IT. Ebo D et al. (2007) [41] vieron, después de 3 años de IT, que el 60% de los pacientes tenían la prueba de activación de basófilos negativa; esta técnica es una herramienta útil para el diagnóstico del alérgeno involucrado en la reacción de hipersensibilidad. En nuestro estudio, la prueba de la B-H fue de eficiencia diagnóstica para evaluar la evolución de la enfermedad y la eficacia de la IT.

Los índices de proliferación de PBMC de niños y adultos, estimuladas con PHA después de un año sin o con IT, no se modificaron. Estos resultados concuerdan parcialmente con los de Burastero et al. (2008) [21].

Los índices de proliferación con PHA al comienzo y después de un año de IT proliferaron como sin estímulo. Sin embargo, después de un año la expansión celular producida por el alérgeno específico fue similar a la de las células cultivadas sin estímulo.

En los pacientes evaluados no cambiaron los valores de IFN- γ después de un año de IT. Antúnez C et al. (2008) [42] estudiaron pacientes alérgicos tratados con IT sublingual o subcutánea por 2 años; observaron significativa reducción de IgE en ambos grupos y una leve desviación Th1 en el grupo con IT subcutánea debido al incremento en las tasas de IFN- γ .

En nuestro estudio, después de un año de IT, la mejoría clínica fue evidente aunque no se observaron diferencias en los niveles de IL-13. Nuestros hallazgos no concuerdan con los de Plewako H et al. (2006) [43], quienes encontraron una correlación entre la liberación de histamina de basófilos y la producción de IL-4 e IL-13, y notaron que la síntesis de esta citoquina se reducía después de la IT. Observamos que los niveles de sCD23 en sueros de niños y jóvenes no se modificaron después de un año con IT. Estos resultados concuerdan con los de Ye Y et al. (2006) [44].

En nuestro caso, los niveles de sCD23 de pacientes alérgicos alcanzaron valores más altos que los de los controles. Sin embargo, Klabusay M et al. (2006) [22] encontraron niveles similares de sCD23 en alérgicos e individuos sanos. Roever A et al. (2003) verificaron que sCD23 participa en la regulación de la síntesis de IgE. Otros autores observaron que la expresión de CD23 en eosinófilos fue similar en alérgicos y no alérgicos [8,9].

En conclusión, la reactividad cutánea reducida y la baja liberación de B-H fueron parámetros indicadores útiles de la evolución favorable en los tres grupos de pacientes con IT. Las observaciones realizadas sugieren la elección de diferentes parámetros para mo-

nitorear la evolución de la enfermedad y la eficacia de la IT a cada edad. Los parámetros de elección en los infantes fueron: la determinación de la liberación de B-H de los basófilos desafiados por el alérgeno y la proliferación de las PBMC estimuladas con el alérgeno específico.

En niños, los principales parámetros indicadores de la evolución favorable de la enfermedad fueron: incremento del índice PFE, descensos de eosinófilos en sangre y mucosa nasal, reducidos niveles de IgE y escasa reactividad cutánea. En ellos, después de un año con IT, hubo incremento de la tolerancia por la disminución de la proliferación celular inducida por el alérgeno.

En los adultos podrían ser más útiles el incremento del índice PFE, la determinación de los niveles de IgE, eosinófilos de mucosa nasal, reactividad cutánea y la liberación de B-H alérgeno-específica.

Es posible que la inmunomodulación de IT sobre la síntesis de IL-13 e IFN- γ , así como la reactividad celular frente a PHA hubiera requerido un mayor tiempo de tratamiento. Sería necesario evaluar después de un período más prolongado los parámetros que no se modificaron en un año de IT.

La IT demostró eficacia terapéutica en pacientes asmáticos y cambios en algunos parámetros clínicos, celulares y moleculares. Algunos de esos parámetros fueron indicadores de la evolución de la enfermedad y otros se modificaron de acuerdo con las edades.

Bibliografía

1. Becker A, Bérubé D, Chad Z, et al. Canadian Network For Asthma Care; Canadian Thoracic Society Canadian Pediatric Asthma Consensus guidelines, CMAJ. 2005 13 (6):12-14.
2. Gafvelin G, Parmley S, Neimert-Anderson T, et al. Hypoallergens for Allergen-specific Immunotherapy by Directed Molecular. Evolution of Mite Group 2 Allergens. The Journal of Biological Chemistry 2007. (282)6:3778-3787.
3. Jutel M, Akdis M, Blaser K, Akdis CA. Are regulatory T cells the target of venom immunotherapy? 2005 Curr Opin Allergy Clin Immunol. 5(4):365-9
4. Esch RE. Sublingual immunotherapy. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2008 16(3):260-264.
5. Fujita S, Yamashita N, Ishii Y, et al. Regulatory dendritic cells protect against allergic airway inflammation in a murine asthmatic model. J Allergy Clin Immunol. 2008. 121(1):95-104
6. Hellings PW, Kasran A, Bullens D, Overbergh L, Mathieu C, Heremans H, Matthey P, Boon L, Jorissen M, Ceuppens JL. IL-10- and IL-12-independent down-regulation of allergic sensitization by stimulation of CD40 signaling. 2006J Immunol. 15;177(8):5138-44
7. Larché M. Immunoregulation by targeting T cells in the treatment of allergy and asthma. 2006. Curr Opin Immunol. 2006 Dec;18(6):745-50
8. Corominas M, Cardona V, Rodríguez-Sanchóna B, et al. Expression of the low-affinity IgE receptor (Fce RII/CD23) in the eosinophils of asthmatic patients Alergol Immunol Clin 2000.15: 310-316
9. Roever AC, Heine G, Zuberbier T, et al. Allergen-mediated modulation of CD23 expression is interferon-gamma and interleukin-10 dependent in allergic and non-allergic individuals. Clin Exp Allergy. 2003. 33(11):1568-75.

10. Taylor A, Verhagen J, Akdis CA, Akdis M. 2004. T regulatory cells in allergy and health: a question of allergen specificity and balance. *Int Arch Allergy Immunol.* (1):73-82.
11. Verhagen J, Blaser K, Akdis CA, Akdis M. 2006. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: T-regulatory cells and more. *Immunol Allergy Clin North Am.* 26(2):207-231.
12. Akdis M. T cell tolerance to inhaled allergens: mechanisms and therapeutic approaches. *Expert Opin Biol Ther.* 2008 Jun;8(6):769-77
13. Nigo YI, Yamashita M, Hirahara K, Shinnakasu R, Inami M, Kimura M, Hasegawa A, Kohno Y, and Nakayama T 2006 Regulation of allergic airway inflammation through Toll-like receptor 4-mediated modification of mast cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 103: 2286-2291.
14. Mantel PY, Kuipers H, Boyman O, Rhyner C, Ouaked N, Rückert B, Karagiannidis C, Lambrecht BN, Hendriks RW, Cramer R, Akdis CA, Blaser K, Schmidt-Weber CB. 2007. GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. *PLoS Biol.*;5(12):e329: 2847-2861.
15. Barber D, Moreno C, Ledesma A, et al. Degree of Olive Pollen Exposure and Sensitization Patterns. *Clinical Implications J Investig Allergol Clin Immunol* 2007. 17(1): 63-68.
16. Hankin CS, Cox L, Lang D, et al. Allergy immunotherapy among Medicaid-enrolled children with allergic rhinitis: patterns of care, resource use, and costs. *J Allergy Clin Immunol.* 2008. 121(1):227-32.
17. Tahamiler R, Saritzali G, Canakcioglu S, et al. Comparison of the long-term efficacy of subcutaneous and sublingual immunotherapies in perennial rhinitis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2008. 70(3):144-50. Epub 2008
18. Guimarães Junqueira de Queirós M, Oliveira Silva DA, Alves R, et al. Mite-specific immunotherapy using allergen and/or bacterial extracts in atopic patients in Brazil. : *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2008; 18(2):84-92.
19. Ajduk J, Marinic I, Aberle N, et al. Effect of house dust mite immunotherapy on transforming growth factor beta1-producing T cells in asthmatic children *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2008 (4):314-22.
20. Cevit O, Kendirli SG, Yilmaz M, et al. Specific Allergen Immunotherapy: Effect on Immunologic Markers and Clinical Parameters in Asthmatic Children *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007; Vol. 17 (5): 286-291
21. Burastero SE, Mistrello G, Falagiani P, et al. Effect of sublingual immunotherapy with grass monomeric allergoid on allergen-specific T-cell proliferation and interleukin 10 production. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2008. 100(4):343-50.
22. Klabusay M, Kohutova V, Coupek P, et al. Simultaneous Analysis of Cytokines and Costimulatory Molecules Concentrations by ELISA Technique and of Probabilities of Measurable Concentrations of Interleukins IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, CXCL8 (IL-8), IL-10, IL-13 Occurring in Plasma of Healthy Blood Donors *Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation* 2006, Article ID 65237, Pages 1–7 DOI 10.1155/MI/2006/65237 Research Article
23. Di Lorenzo G, Mansueto P, Melluso M, et al. 1996 Serum levels of total IgE and soluble CD23 in bronchial asthma *Mediators of Inflammation.* 5, 43-46
24. Canny, G.; Levinson, H. 1994. Asthma: En Loughlin G.M. and Eigen H. *Respiratory Disease in children: Diagnosis and management.* Williams and Wilkins. 223-260.
25. Polgar G, Promadhat V. 1971. *Pulmonary Function Testing in children: Techniques and Standards.* Philadelphia, WB Saunders Company,
26. Capano A, Saráchaga MJ, Estol P, Orsi S, Lapides C, Ferreira N. 2007. Peak expiratory flow in healthy Uruguayan children. *Rev Soc Bol Ped;* 46 (2): 131 – 7
27. Dreborg S. Standardization of allergenic preparations by in vitro and in vivo methods. Position paper: Allergen standardization and skin testing. *The European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Allergy* 1993; 48:63-70
28. Kjellman N-I. M, Johansson S. G. O., Roth A. Serum IgE, Levels In Healthy Children Quantified By A Sandwich Technique (Prist*) *Clinical & Experimental Allergy* 1976. 6 (1):51- 59.
29. Bora U, Kannan K, Nahar P. Heat-mediated enzyme-linked immunosorbent assay procedure on a photoactivated surface. *J Immunol Methods.* 2004. 293 (1-2):43-50.
30. Jallowayski AA: A procedural guide for diagnostic nasal cytology. *Rhino Technics Inc. Department of Pediatrics Pediatric. Respiratory Unit. Nasal Function Laboratory. Univ of California San Diego.,* 1984
31. Davenas E, Beauvais F, Amara J, et al. Human basophil degranulation triggered by very dilute antiserum against IgE. *NATURE*, 1988. 333-816-818.
32. Shibata H, Yagi T. Rate assay of N-acetyl-beta-D-hexosaminidase with 4-nitrophenyl N-acetyl-beta-D-glucosaminide as an artificial substrate. *Clin. Chim. Acta.* 1996. 251(1): 53-64.
33. Na HJ, Jeong HJ, Bae J, et al. Tongkyutang inhibits mast cell-dependent allergic reactions and inflammatory cytokines secretion. *Clín. Chim. Acta* 2002. 35-41.
34. Tuchscherer M, Kanitz E, Otten W, et al. Effects of prenatal stress on cellular and humoral immune responses in neonatal pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 2002. 86: 195-203
35. Kelder B, Rashidbaigi A, Petska S.A. Sandwich Radioimmunoassay for Human IFN-g, in *Methods in Enzymology.* (S. Petska, ed.), Academic Press, New York, 1986. 119: 582-587.
36. Ly NP, Li Y, Sredl DL, Perkins DL, et al. Elevated allergen-induced IL-13 secretion predicts IgE elevation in children ages 2-5 years. *J.Clin. Immunol.* 2005. 25(4):314-319.
37. Yanagihara Y, Sarfati M, Marsh D, et al. Serum levels of IgE-binding factor (soluble CD23) in disease associated with elevated IgE. *Clin Expt Allergy* 1990. 20:345-401
38. Tierney WM, Roesner JF, Seshadri R, Lykens MG, Murray MD, Weinberger M. . 2004 Assessing symptoms and peak expiratory flow rate as predictors of asthma exacerbations. *J Gen Intern Med-Mar;*19(3):237-42.
39. Des Roches, A.; Paradis, L.; Knani, J.; et al. Immunotherapy with a Standardized Dermatophagoides Pteronyssinus Extract. V. Duration of the Efficacy of Immunotherapy after its Cessation. *Allergy: European Journal of Allergy & Clinical Immunology* 1996. 51(6):430-433
40. Bussmann C, Maintz L, Hart J, et al. Clinical improvement and immunological changes in atopic dermatitis patients undergoing subcutaneous immunotherapy with a house dust mite allergoid: a pilot study. *Clin Exp Allergy.* 2007. 37(9):1277-85
41. Ebo DG, M. M. Hagendorens, A. J. Schuerwegh, et al. Flow-Assisted Quantification of In Vitro Activated Basophils in the Diagnosis of Wasp Venom Allergy and Follow-up of Wasp Venom Immunotherapy. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2007. (72):196–203
42. Antúnez C, Mayorga C, Corzo JL et al.. Two year follow-up of immunological response in mite-allergic children treated with sublingual immunotherapy. Comparison with subcutaneous administration. *Pediatr Allergy Immunol.* 2008.;19(3):210-8
43. Plewako H, Wosińska K, Arvidsson M, et al. Basophil interleukin 4 and interleukin 13 production is suppressed during the early phase of rush immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2006. 141(4):346-53.
44. Ye YM, Lee SK, Kim SH, et al. Changes of Serum Cytokines After the Long Term Immunotherapy with Japanese Hop Pollen Extracts *J Korean. Med Sci* 2006 (21): 805-810.

Anexo.

Tablas I a 9. Casuística.

Tabla I. Grupo de los infantes alérgicos asmáticos tratados con inmunoterapia.

Infantes con IT	Edad	Diagnóstico	Eosinófilos en sangre	Eosinófilos en exudado	IgE	Liberación de β -hexosaminidasa	MTT E/PHA/alérgeno	Pruebas cutáneas	IL-13
1 AF	2	As Ri	6-396	++	245	LV17, PH21, HA10	1,347/2,896/1,709	PH+	
	4	Ri	5-340	++	199	PH11	1,874/2,979/2,012	PH-	
2 BJ	4	As Ri	1-50	++	90	PH46	1,544/1,799/1,679	HA+++	
	5	Ri	1-52	++	98	PH11	1,137/2,455/2,115	HA+	
3 CA	4	As Ri	4-480	++	378	HA28, PH8, LV34	2,143/2,568/2,435	PH++	
	5	As Ri	4-510	++	172	HA28	2,097/2,759/2,112	neg	
4 DT	2	As	1-55	++	198	HA45	1,455/1,840/1,804	HA++	
	4	Sin síntomas	2-100	-	85	HA23	1,907/2,143/1,894	neg	
5 EF	4	As Ecc	4-610	++	1770	PH45, LV30	0,552/0,732/0,729	HA++++	20
	6	Ecc leve	4-288	++	879	PH43	0,895/1,432/0,952	++	21,9
6 GB	4	As Ri	4-384	+++	193	HA38	2,720/3,532/2,845	HA++	
	5	Asx2 Ri <frec	5-365	++	71	HA13	2,569/3,659/2,444	HA+	
7 GF	4	As sever	4-446	+++	122	PH41, HA63	0,541/1,875/1,434	PH++, HA++	18,5
	5	As	4-484	++	34	PH13, HA31	0,988/2,051/1,153	neg, +	18,5
8 MA	4	As Ri	3-280	++	102	PH-, HA28	1,482/2,229/2,054	HA+	
	6	As Ri	4-432	++	312	HA10	1,659/1,971/1,697	+	
9 NL	4	As Ri	5-370	+++	217	HA52	1,440/1,798/1,664	HA+++	
	6	As Ri	12-320	+++	163	HA25, LV3	1,702/2,418/1,935	+	
10 PL	3	Ri As Ecc	5-532	++++	196	HA54	0,778/1,505/1,213	HA+	
	4	Ri As Ecc	2-518	+++	64	PH8, HA20, G22, LV31	1,127/1,863/1,211	HA neg	
11 PP	3	As Ecc Pr	2-210	++++	221	PH71, HA71, G61, LV92	1,445/2,117/2,014	HA+++	
	5	Ecc	3-180	+++	115	PH44, HA39	1,856/2,739/1,864	HA+	
12 PI	2	As Ri	4-348	++	84	LV21, PH35, HA65	0,568/0,965/0,755	HA++	
	3	Ri Ecc	5-306	++	52	HA32	0,894/1,542/1,002	HA neg	
13 RJ	2	As	4-244	++	45	HA59	1,190/2,276/1,543	HA+++	
	3	Asx1 leve	4-168	++	48	HA3, HA22, LV3	1,278/1,793/1,521	HA+	
14 RL	3	As Ri Ecc	4-516	++++	245	HA63, PH72	1,995/2,467/2,594	PH++	
	4	Asx3 leves Ri	5-324	++	199	HA46, PH39	1,971/2,709/1,989	PH+	
15 VA	2	As Ri	8-640	+++	93	PH63, HA34	0,782/1,425/0,968	PH++	
	3	As Ri	3-363	+++	56	PH7, HA12	0,720/1,738/0,886	PH-	

Tabla 2. Grupo de los infantes alérgicos asmáticos que no recibieron inmunoterapia.

Infantes sin IT	Edad	Diagnóstico	Eosinófilos en sangre	Eosinófilos en exudado	IgE	Liberación de β -hexosaminidasa	MTT E/PHA/alérgeno	Pruebas cutáneas positivas	IL-13
1 AA	3	As Ri	5-250	++	124	PH23, HA3, LV62	1,867/2,568/2,342	PH+	
	4	As Ri	7-490	+++	267	PH31, LV67	1,917/2,893/2,119	PH+	
2 BC	2	As RGE	5-360	+	69	HA30	1,327/2,803/2,561	HA+	
	3	As Ri Ecc	4-515	++	95	HA45	1,231/2,956/1,872	HA++	
3 CE	3	As	4-270	++	44	PH72, HA74	1,418/1,635/1,440	HA+++	
	4	As	5-402	++	45	HA76	1,655/1,893/1,741	HA+++	
4 GR	4	Ri Ecc	1-112	++	111	HA45	2,197/2,584/2,213	HA+	
	5	Ri Ecc	3-189	++	197	HA48	2,078/2,642/2,153	HA+	
5 GMG	2	Ri As	5-350	+++	346	HA35, PH37, LV3	0,389/0,814/0,778	PH++	
	4	Ri As	5-360	+++	430	PH 48	0,478/1,032/0,561	PH+++	
6 GO	3	Ri As		+++	84	Pc22	0498/1,163/1,185	Pc++	
	4	Ri As		+++	108	Pc35	0,877/1,978/1,342	Pc++	
7 JS	3	As Ri	8-416	+++	221	PH18, HA52, G3, LV3	1,127/1,870/1,456	HA++	
	4	As Ri	6-384	+++	572	HA71	1,585/2,437/2,117	HA+++	
8 LM	4	As	2-234	+	190	PH28, HA28, LV25	1,899/2,567/2,589	PH++	
	5	As Ri	5-420	+++	274	PH27	1,765/2,855/2,658	PH++	
9 LS	4	Ri As	3-268	++	124	HA41, G17	1,076/2,753/2,293	HA++, Pc++	108
	5	Ri As	5-445	+++	222	HA63	1,126/2,654/2,437	HA++, Pc+++	221
10 MA	2	As Ri	5-387	++	98	HA18, PH26, V84	2,143/2,586/2,459	PH+	572
	4	As Ri Ecc	5-400	++	231	PH53	1,993/2,644/2,087	PH+	
11 PD	3	Ri As	2-120	+	43	HA70, PH71, LV9	0,717/1,573/1,006	PH+	
	4	As Ri	3-180	+	38	PH77	0,867/1,895/1,462	PH+++	
12 QS	2	Ecc As Ri	3-363	++	98	PH58	1,269/2,085/1,853	PH++	
	3	As Ri Ecc Prur	2-270	+++	296	HA34, PH49, LV76	1,654/2,122/1,997	PH++	
13 RA	2	Ri	2-680	+++	58	PH25 resto neg	1,204/2,206/1,959	PH+	
	3	As	4-720	+++	215	PH37	1,102/2,389/1,980	PH++	

Tabla 3. Grupo control, integrado por infantes no alérgicos.

Infantes controles	Edad	Diagnóstico	Eosinófilos en sangre	Eosinófilos en exudado	IgE	Liberación de β -hexosaminidasa	MTT E/PHA/alérgeno	IL-13
1 BJ	4	Sin síntomas	2-72	-	23	HA11	1,896/2,798/1,875	
2 BT	3	Sin síntomas	1-61	-	27	HA10, G10	0,956/1,054/0,897	
3 CM	2	Sin síntomas	0,5-36	-	18	HA13, G13, PH11	1,539/2,502/1,522	
4 ML	3	Sin síntomas	0,5-29	-	15	HA6, G9, PH14	1,203/1,745/1,488	
5 NJ	4	Sin síntomas	1-50	-	5	PH5, HA9	0,573/0,865/0,674	
6 RP	2	Sin síntomas	0,5-40	-	21	HA6, LV12, LC 7	1,547/2,653/1,534	
7 ST	1	Sin síntomas	1-62	-	11	PH18, HA13, LV12	1,482/1,913/1,529	
8 SM	1	Sin síntomas	0,5-38	-	13	HA3, LV3	1,614/1,701/1,769	

Tabla 4. Grupo de los niños alérgicos asmáticos tratados con inmunoterapia.

Niños c/IT	Edad	Diagnóstico	Eosinófilos en sangre	Eosinófilos exudado	IgE	Liberación de β-hexosaminidasa	MTT E/PHA/alérgeno	Pruebas cutáneas	PFE	IL-13				
1 BG	11	Ri Sin As	13-474	+++	193	PH78, HA73	1,265/1,598/2,122	PH+++	41	10,60	21,17	222.090	45	
	13	As	2-180	+++	107	PH35, HA42	1,539/2,502/2,015	+++	63	15,7	50,80	299.630	9	
2 BF	5	As	5-560	+++	697	HA65	0,530/1,193/0,700	HA++++	54	17,50	50,86	310.400	60	
	6	Ri	5-255	+	218	HA12	0,983/1,521/1,106,	++	75	16,8	52	311.240	9	
3 CE	5	As Ot	3-157	++++	112	HA3, PH67	0,890,1,510/1,020	HA+++	61	25	70,58	214.250	122	
	6	S/síntomas	2-154	+	63	PH14	0,865/1,589/0,890	++	75	16,6	63,5	350.400	25	
4 EA	11	As Ri	5-300	++++	780	PH69, HA92, LV73	0,700/1,455/1,200	PH++, HA++	50	17,80				
	12	Ri	5-449	++++	390	PH45, HA54, LV47	1,300/2,006/1,280	++, ++	73	7,0				
5 EM	9	As Ri	10-450	++	1590	HA72, PH70, G68, A59	1,193/1,530/1,600	G++, A++	54	15,40			131	
	10	Ri	4-308	++	222	HA32, PH34, G18, A23	1,450/2,465/1,760	Neg, +	88	7,00			40	
6 FL	6	As Ri	23-1219	+++	256	PH65, HA74	0,635/1,869/1,502	PH++, HA++	50	19,20			162	
	8	As Ri	5-475	++	92	PH29, HA19, G41, LV12	0,472/1,778/0,989	+, +	75	7,5			39	
7 FS	8	As	15-1162	+++	415	PH17, HA48, G13, LV3	1,421/1,771/1,444	HA++	50				180	
	9	As	4-750	++	253	PH28, HA23, G36	1,950/2,353/2,015	+	64				60	
8 FL	8	Asx3	27-1431	+++	1000	PH74, HA79, HP79, G76	2,267/2,246/2,367	HA+++	62	23,3			250	
	10	Asx1	7-560	++	877	PH55, HA43	2,159/2,879/2,099	++	87	23,5			63	
9 GM	7	As Ri	8-1044	++++	627	PH3, HA65	1,482/2,229/1,826	HA+	81	23,5	21,17	322.090	381	
	8	Ri	4-340	+++	330	HA38	1,745/2,178/1,797	neg	81	16,4	66,8	199.630	70	
10 GJ	12	As	7-616	+++	726	PH43, HA23	0,583/1,209/0,910	PH+++	82	15	50,86	210.400	385	
	13	As	5-434	+++	487	PH3, HA6	0,530/1,870/0,729	+	86	10	60	211.240	120	
11 JM	6	As Ri	20-1200	++++	680	HA28, G38	0,655/0,869, 0,899	G++++	75	70,58	70,58	314.250	388	
	10	Ri	8-400	++	137	HA12, G30	1,184/1,596	+	86		45,50	350.400	130	
12 IF	11	Ri Si As	4-474	+++	588	PH48, HA18, G 90	0,925/1,853/1,113	PH++	63	25,13	21,17	222.090	430	
	12	Ri	4-270	+	219	PH26, HA22, G27	0,389/0,814/0,620	+	79	28,6	55,50	299.630	150	
13 MD	8	As Ri	13-1280	+++	920	PH57, HA80, G25	1,112/1,762/1,376	A+++	77	28,8	50,86	310.400	448	
	10	Ri	7-290	+++	380	PH22, HA30, G2	0,938/1,320/1,430	+++	86	26,2	61,1	211.240	190	
14 NL	5	Ri As	10-600	++	554	HA55, PH83, G21, A20	2,229/2,798/2,540	PH++++	83					
	6	Ri	5-350	+	142	HA31, PH25	2,187/2,754/2,109	+	88	11,8				
15 OG	10	As Ri	10-550	++++	726	PH69, HA85, G76	0,792/1,31/0,925	Pc++++	77					
	11	As Ri	1-48	++	487.4	PH23, HA33, G21	0,672/0,969/0,983	++	89					
16 OS	5	As	12-1100	+++	940	LV3, LC3, PH75, HA78	0,478/0,976/0,588	PH+++	79		70,58	214.250	472	
	6	As	5-200	++	445	PH37, HA36	1,035/1,635/1,013	++	100		53,3	350.400	290	
17 PP	5	As Ri Derm	2-194	+++	180	PH71, HA71, G87, LV92	1,980/2,333/2,012	Pc++	59		21,17	322.090		
	6	As Ri Derm	2-104	+	94	PH42, HA38, G32, LV39	2,188/2,678/2,102	neg	86		55,50	199.630		
18 PA	5	Ri Sin As	8-620	++	86	PH24, HA28, G34	0,865/1,177/1,165	G+++	55					
	6	Ri Sin	5-460	++	67	PH17, HA18, G 3	0,943/1,468/1/212	++	80					
19 RV	9	Asx7 crisis	5-400	++++	601	PH54, HA85, G45	1,636/ 2,771/2,496	Pc+++	45		50,86	210.400	497	
	10	Asx1 crisis	5-350	++	424	PH41, HA42	1,865/2,557/2,103	++	71	19,4	48,20	211.240	316	
20 RG	11	Ri Sin Asx8	7-498	+	812	PH77, HA80	1,122/1,986/1,404		48					
	13	Ri Sin	10-535	++	213	PH63, HA36, G3	1,079/1,700/1,227,		78					
21 RM	8	As	7-328	++	170	PH45, HA55, G74, LV60	2,090/3,214/2,359	A++	80					
	9	S/síntomas	3-210	±	37	PH38, HA34, G41, LV22	2,154/3,199/2,201	neg	91					
22 SJ	8	As Ri	2-410	++++	387	PH37, HA42, G25	2,198/3,124/2,602	HA++	78				650	
	9	Ri	3-180	+++	190	PH12, HA23, G8	2,089/2,988/2,111	++	90				320	
23 TM	6	As Ri	6-303	++++	662	PH74, HA56, G36	2,065/3,343/2,871	G+++	46		70,58	314.250		
	7	Ri	4-240	++	600	PH43, HA45, G30	2,114/3,128/2,423	neg	67		57,8	350.400	370	
24 VD	9	As	8-328	+++	422	HA43, HP53, G20	0,932/1,534/1,470	HA, A+++ , Pc+++	54					
	11	Tos nocturna	6-340	+++	241	HA3, HP3, G20	0,884/1,472/0,892	HA, A++ , Pc+	68					
25 VF	5	As Ri Sin Pr	6-842	++++	1133	HA74, LV51, PH78, G76	1,087/2,122/1,856	G+++ , HA+++	62					
	7	Pr, As	8-332	++	680	HA13, LV33, PH24, G3	1,126/2,249/1,677	G++ , HA++	75		390			
26 VS	12	As Sin	10-775	++++	109	HA31, HP25, EnT	1,269/1,866/1,667	HA+++	60					
	13	Ri Sin	2-180	++	116	HA3, HP3, LV52	1,261/1,281/1,416	+	85					

Tabla 5. Grupo de los niños alérgicos asmáticos que no recibieron inmunoterapia.

Niños sin IT	Edad	Diagnóstico	Eosinófilos en sangre	Eosinófilos en exudado	IgE	Liberación de β -hexosaminidasa	MTT E/PHA/alérgeno	Pruebas cutáneas positivas	Pico flujo espiratorio
1 AC	5	As Ri	8-660	+++	785	PH18, HA3	1,049/1,225/1,558	PH+	54
	6	As Ri	12-680	+++	568	PH32, HA28	1,377/1,890/1,656	PH+	46
2 BA	5	As Ri	8-824	++	512	HA49, PH44, G26	1,413/1,705/1,447	HA++	57
	6	As Rino Sin	7- 630	+++	1000	HA60, PH27, LV57	1,379/2,021/1,863	HA++	52
3 CN	11	As	8-440	+++	1320	PH3, HA14, G38	1,445/2,129/1,878	G+++	59
	12	As Dermat	12-1210	+++	2000	G44	1,563/2,359/2,127	G+++	53
4 PJ	11	As	19-1016	+++	656	PH29, HA30, HP17, G17	1,300/1,586/1,552	HA++	57
	12	As Ri	14-1265	+++	976	PH65, HA55, G45	1,547/1,978/1,867	+++	50
5 PM	7	As	2-180	+++	312	HA72, A73, G72, PH25	0,950/2,133/1,036	+++	59
	8	As Ri Ecc	7-630	+++	514	HA77, A71, G68	1,125/2,549/1,855	+++	55
6 RP	6	Ri Sin	5-240	+++	723	PH26, HA10, G40	0,573/1,124/0,865	G++	64
	7	Ri Sin As	4-280	+++	754	PH 56, HA 32, G48	0,875/1,090/0,774	G+++	44
7 RJ	7	As Ri	5-177	++	156	PH52, HA54, HP57	0,620/1,897/0,967		58
	9	As Ri Sin	9-540	+++	674	PH61, HA70	0,786/1,746/0,861		56
8 RR	6	Ecc	8-424	++	395	PH15, HA23, LN9	1,072/1,141/1,192	G+++ , Pc+++	69
	8	As, Ri, Ecc	121-200	+++	872	PH37, HA52	1,154/1,967/1,388	++++, +++	57
10 VI	8	As Dermat	17-1800	++++	1100	HA72, PH83, G85	1,530/1,840/1,729	HA++++, G+++	68
	9	Dermatitis	18-1970	++++	2500	HA81, PH88, G87	1,698/2,050/1,893	HA++++, G+++	64

Tabla 6. Grupo control, integrado por niños no alérgicos.

Niños controles	Edad	Diagn	Eosinófilos en sangre	Eosinófilos en exudado	IgE	Liberación de β -hexosaminidasa	MTT E/PHA/alérgeno	Pico flujo	IL-13	IFN- γ s/mitógeno o antígeno	IFN- γ PHA	sCD23
1 AD	5	S/sínt	0,5-34	-	65	HA12, HP11, PH3	0,969/1,596/0,996	83				9,2
2 AG	10	S/sínt	0,5-22	-	78	HA12	0,985/2,212/0,853	90				
3 BA	7	S/sínt	0,5-74	-	38	HA12, LV8, LC9	0,925/1,853/1,006	98				
4 CJ	6	S/sínt	0-15	-	90	PH8, HA4, G4, LV8	1,183/1,455/1,147	90				
5 CT	6	S/sínt	1-56	-	54	PH11, HA6	1,620/1,888/1,794	102				
6 GJ	10	S/sínt	0,5-30	-	13	PH5, HA18	0,874/1,292/0,951	90				
7 MM	5	S/sínt	1-50	-	111	PH10, HA3, HP11	0,296/0,320/0,409	94				
8 MA	5	S/sínt	1-88	-	62	PH12, HA6, G3	1,482/1,826/1,329	95				
9 VL	12	S/sínt	1-62	-	49	PH10, HA15, Pc15	1,896/2,547/1,814	100				

Tabla 7. Grupo de los adultos alérgicos asmáticos tratados con inmunoterapia.

Adultos con IT	Edad	Diagnóstico	Eosinófilos en sangre	Eosinófilos en exudado	IgE	Liberación de β -hexosaminidasa	MTT E / PHA / Alérgeno	Pruebas cutáneas positivas	PFE
1 BG	34	As Ri Anaf	2,5-150	++	199	PH23, HA28, G26	1,212/2,670/2,002	HA++	75
	35	Sin síntomas	2-120	-	96	PH12, HA11, G10	1,322/1,970/1,778	+	87
2 BG	14	Ri Sin As	3-390	++	252	HA74, G76, Ph74	1,539/2,502	HA++++, G++++	79
	17	Ri	3-200	+	141	HA53, G33, PH57	0,935/1,439	++, +++	90
3 DJ	19	As Angioed	6-372	++++	600,80	HA53	1,106/1,336/1,521	HA, G+++ , Pc+++	60
	21	Sin síntomas	2-150	++	224	G52, HA52, PH50	1,766/2,879/2,097	+, ++	78 360
4 FE	16	Ri Sin As	1-59	+++	219	PH61, HA74, G49	0,570/0,876/1,044	G+++ , HA+++	87
	17	Ri Si	2-105	+++	261	PH32, HA23, G43	1,206/1,474/1,487	+++ , ++++	91 410
5 GC	32	Ur As Ri	3-280	++++	534	PH54, HA82, G48	1,207/2,450/1,036	HA+++	72
	33	Ripocascrisis	3-180	+++	213	PH34, HA45, G41	0,918/2,298/2,110	++	80
6 OF	23	As Ri	3-183	+++	398	PH44, HA54, HP62	0,784/1,065/0,964	HA++	65
	24	Ri Si	4-103	++	247	PH12, HA3	1,750/3,528/2,258	HA++	75
7 OD	13	Ri Sin As	8-642	+++	170	PH15, HA30, G38	1,324/1,989/1, 502	HA++ , G+++	86
	14	Sin síntomas	7-480	+	37	PH14, HA20, G20	1,178/1,412/1,259	++ , ++	100
8 RR	40	Ri As	6-350	+++	387	HA28, PH42	0,748/1,607	PH+++ , Plu+++	50
	42	Algunas Ri	3-135	+	266	HA3, PH8	1,111/1,622/1,271	neg, ++	75
9 SC	16	Ri As	1-282	++	152	HA30	1,697/2,439/1,828	PH++	45
	17	Ri As	3-37	+	37	PH3, HA17, HP20, LV3	1,583/2,014/1,590	neg	77

Tabla 8. Grupo de los adultos alérgicos asmáticos que no recibieron inmunoterapia.

Adultos sin IT	Edad	Diagnóstico	Eosinófilos en sangre	Eosinófilos en exudado	IgE	Liberación de β -hexosaminidasa	MTT E / PHA / Alérgeno	Pruebas cutáneas positivas	PFE
1 CI	21	As Ri	2-650	++++	682	HA10, PH51, G4	2,470/2,807/2,346	PH+++	72
	23	As Ri	4-680	++++	1200	PH71, HA28, G39	2,079/2,865/2,454	++++	64
2 FME	26	As	5-385	+	120	HA14, G33, PH28, res-	1,301/2,803/2,561	HA+	65
	27	As Ri Sin	7-355	+++	214	HA34, G45	1,601/2,909/2,518	HA++	62
3 GJ	15	Ri Sin As	2-120	+	186	HA39, HP30, G38	2,143/2,586/2,459	G++ , Pc++	58
	16	Ri Sin As	7-420	++	290	PH86, HA56	1,301/2,813/2,561	++ , +++	47
4 GC	20	As Ri Sin	2-280	++	135	PH51, HA63, G38	1,391/1,977/1,721	PH+ , Pc+	69
	21	As Ri Sin Anaf	7-375	+++	376	HA43, PH44	1,209/2,096/1,987	++ , +++	60
5 LE	48	Ri Sin	3-315	++	145	PH14, HA29, G46	1,967/2,339/1,980	G+++ Pc+++	73
	50	Ri Sin As	12-658	+++	321	PH43, HA41	1,518/1,635	G++++ , Pc+++	55
6 PC	44	Ri As	8-348	++	95	HA37	0,684/1,432/0,941	HA++ , G+	62
	45	Dermatitis As	20-800	+	145	HA28, PH44	0,488/0,866/1,170	HA++ , G++	50
7 RA	20	Ri As	3-267	+	152	HA33, HA24	1,220/1,526/1,564	HA++ , G+++ , PC+++	80
	21	HVSCr As	5-520	+	230	PH42, HA44, HP52, G38	1,209/1,688/1,587	+++ , +++ , +++	65
8 RA	14	Pr Ri As	4-304	++	128	HA31, LV4, HP5	2,407/2,870/2,433	HA++ , G+++	70
	15	Pr Ri As	3-448	+++	341	PH29, HA47, G17	2,210/2,888/2,576	++ , ++	55

Tabla 9. Grupo control, integrado por adultos no alérgicos.

Adultos controles	Edad	Diagnóstico	Eosinófilos en sangre	Eosinófilos en exudado	IgE	Liberación de β -hexosaminidasa	MTT E / PHA / Alérgeno	Pico flujo
1 CM	44	Sin síntomas	1-60	-	79	PH3, HA3	2,324/3,576/2,350	87
2 FH	50	Sin síntomas	0.3-15	-	15	PH3, HA3, HP3	2,433/2,896/2,345	90
3 LV	34	Sin síntomas	1-70	-	91	PH9, HA8	1,218/2,830/1,432	88
4 MF	24	Sin síntomas	0.5-35	-	61	PH6, HA1, HP5, G8	1,545/1,672/1,165	90
5 MJ	50	Sin síntomas	0.2-14	-	16	HA8 G3 A5 Pc5	0,833/1,052/0,918	100
6 MC	33	Sin síntomas	0.5-52	-	14	PH4, HA6, G5	1,659/2,674/1,344	100
7 SB	48	Sin síntomas	0.5-22	-	25	HA13, HP3, PH2	1,950/2,463/2,014	98
8 SJ	31	Sin síntomas	0.3-20	-	100	PH12, HA7, G9	1,745/3,806/1,836	92
9 SM	15	Sin síntomas	0.4-16	-	32	PH7, HA3	0,895/2,754/1,114	93
10 VM	49	Sin síntomas	1-65	-	82	PH8, HA5	1,782/2,451/2,049	100