

Original

Utilidad diagnóstica de la determinación de Sulfidoleucotrienos (slt) tras estimulación antigénica *in vitro*

M. Ferrer, M.L. Sanz, I. Prieto, A. Oehling

*Departamento de Alergología e Inmunología Clínica
Facultad de Medicina. Universidad de Navarra. Pamplona.*

Los Sulfidoleucotrienos (slt) (LTC₄, LTD₄, LTE₄) son mediadores lipídicos derivados del metabolismo oxidativo del ácido araquidónico por acción de la 5-lipoxigenasa, que poseen una potente capacidad broncoconstrictora, incrementan la permeabilidad vascular y aumentan la secreción de moco. En este estudio hemos pretendido valorar la posible producción y liberación de slt tras estimulación Ag-específica *in vitro* de leucocitos aislados de sangre periférica mediante la técnica CAST-ELISA, procedentes de 92 pacientes con sensibilización comprobada a *L. perenne* y *D. pteronyssinus*, y sus posibles modificaciones en función del grado de sensibilización, características clínicas y diagnóstico, así como la correlación con la liberación de histamina. Hemos observado una producción Ag-específica de slt tras estímulo con *L. perenne* y *D. pteronyssinus in vitro*, que no se obtiene en condiciones basales, y es significativamente mayor en los pacientes atópicos que en controles sanos y controles atópicos no sensibles a estos alérgenos. La concentración óptima para el alérgeno *L. perenne* ha sido la de 2 ng/ml, y de 20 ng/ml para *D. pteronyssinus*, con una gran variabilidad individual en la respuesta. En la liberación de histamina los resultados son semejantes, observando una correlación significativa y positiva entre el test de liberación de histamina y producción de slt. Existe, asimismo, una correlación positiva y significativa entre la prueba cutánea y producción de slt, y, en el caso de *D. pteronyssinus*, también existe dicha correlación entre producción de slt y niveles de IgE específica. No hemos encontrado correlación con niveles de IgE total.

Con relación al diagnóstico, hemos encontrado diferencias significativas en pacientes sensibles a *D. pteronyssinus* con una mayor producción de slt en pacientes con rinitis y asma más rinitis que en el grupo que sólo presentaba asma. Hemos observado, así mismo, una correlación significativa y negativa entre producción de slt y la edad. Con relación al sexo, fue significativamente mayor en hombres que en mujeres. En el grupo de polínicos los resultados no fueron estadísticamente significativos si bien mostraron la misma tendencia que en el caso de pacientes sensibles a *D. pteronyssinus*.

Concluimos que la determinación de producción de slt es un método útil para diagnóstico alérgico *in vitro* de las enfermedades mediadas por una hipersensibilidad tipo I. Tiene la ventaja de que nos ayuda a mostrar si una sensibilización manifestada por la presencia de IgE específica o por unas pruebas cutáneas, es clínicamente relevante y además nos permite valorar la respuesta celular.

PALABRAS CLAVE: Sulfidoleucotrienos (SLT)/Producción de SLT/Liberación de SLT/Leucocitos de sangre periférica/Estimulación *in vitro* /Alergia/Sensibilización específica/*D. pteronyssinus*/*L. perenne*/Relevancia clínica/CAST-ELISA.

Diagnostic usefulness of sulphidoleukotriene determination after *in vitro* stimulation

Sulphidoleukotrienes or SLT (LTC₄, LTD₄, LTE₄) are lipidic mediators derived from the oxidative metabolism of arachidonic acid through the 5-lipoxygenase pathway. They are powerful bronchoconstrictors and increase vascular permeability and mucus secretion. The aim of the present study was to assess the possible production and release of SLT after specific antigen stimulation *in vitro* from isolated peripheral blood leukocytes using the CAST-ELISA technique, as well as the possible modifications associated to degree of sensitization, clinical features and diagnosis and the correlation to histamine release. The study population comprised 92 patients with demonstrated sensitization to *L. perenne* and *D. pteronyssinus*. We have observed an antigen-specific production of SLT after *in vitro* challenge with *L. perenne* and *D. pteronyssinus*, which is not achieved under baseline conditions and which is significantly greater in sensitized atopics than in healthy controls and in control atopics not sensitized to these allergens. The optimal concentrations were

2 ng/ml for *L. perenne* and 20 ng/ml for *D. pteronyssinus*, with a large individual variability in the responses. The results have been similar for histamine release, and positive and negative correlations were seen between the histamine release test and SLT production. There was also a significant positive correlation between skin prick test and SLT production and, in the case of *D. pteronyssinus*, between SLT production and the specific IgE levels. No correlation was seen with the total IgE levels. As regards the diagnosis, significant differences were seen among the patients sensitive to *D. pteronyssinus*, with a greater SLT production in the group with isolated rhinitis and rhinitis plus asthma than in the one with isolated asthma. We have also observed a significant negative correlation between SLT production and age. Regarding gender, SLT production was significantly greater in males than in females. In the pollinosis group the results did not achieve statistical significance, although they evidenced the same trends as in the *D. pteronyssinus*-sensitive patients. We conclude that the assessment of SLT production is a useful method for the *in vitro* diagnosis of conditions mediated by type I hypersensitivity. It has the advantage that it helps demonstrate if a sensitization detected by the presence of specific IgE or skin prick tests is also clinically relevant, and further helps in the assessment of the cell-mediated response.

KEY WORDS: Sulphidoleukotrienes (SLT)/SLT production/SLT release, Peripheral blood leukocytes/*In vitro* stimulation/Allergy/Specific sensitization/*D. pteronyssinus*/*L. perenne*/Clinical relevance/CAST-ELISA.

INTRODUCCION

El basófilo constituye una de las células más importantes en la respuesta inflamatoria alérgica. Este tipo celular se involucra tanto a continuación de la fase inmediata como en la fase tardía, a través de la liberación de histamina y de otros mediadores. La histamina se almacena en gránulos y es liberada tras estimulación celular IgE específica. Por otra parte, los leucotrienos son mediadores de importancia comprobada en los fenómenos inflamatorios que acompañan a la reacción alérgica; a diferencia de la histamina no se almacenan en las células, sino que son formados *de novo*. Son ácidos grasos derivados del metabolismo oxidativo del Acido Araquidónico por acción de la 5-lipoxigenasa¹. Los slt (LTC₄, LTD₄, LTE₄), poseen una potente capacidad broncoconstrictora, incrementan la permeabilidad vascular y aumentan la secreción de moco, mientras que el leucotrieno LTB₄ tiene capacidad quimio-táctica para leucocitos de sangre a tejidos.

Estas acciones de los leucotrienos han podido ser demostradas tanto *in vitro*^{2,3,4} como *in vivo*⁵, comprobándose además su liberación durante exacerbaciones de la enfermedad alérgica⁶, tras estimulación alérgica^{7,8} o tras ejercicio⁹. Todo ello ha sido confirmado mediante el uso de inhibidores o antagonistas de receptores que atenuan estos efectos¹⁰.

En este estudio pretendemos valorar la posible producción y liberación de slt y de histamina tras estimulación antígeno-específica *in vitro* de leucocitos aislados de sangre periférica procedentes de pacientes con patología rinusinubronquial con sensibilización demostrada a *D. pteronyssinus* o

L. perenne, y sus posibles modificaciones en función del grado de sensibilización, características clínicas y diagnóstico, así como su posible correlación con la liberación de histamina.

En nuestro departamento tenemos una larga experiencia en el estudio de la liberación de histamina en diferentes enfermedades alérgicas mediadas por mecanismos de hipersensibilidad inmediata^{11,12}, por lo que consideramos de gran interés evaluar otros mediadores que se liberan en el curso de dichas reacciones. Por otra parte decidimos estudiar la posible correlación de esta técnica con otros métodos de diagnóstico alergológico *in vitro* así como su correlación con parámetros clínicos y espirométricos.

MATERIAL Y METODOS

Pacientes

Hemos estudiado 92 pacientes atópicos, de los cuales 62 eran sensibles a *D. pteronyssinus*, y 54 sensibles a polen de la gramínea *L. perenne*, (de cada uno el grupo de monosensibilizados a un alérgeno fue utilizado como control atópico para el otro), frente a 12 controles sanos. El diagnóstico se realizó mediante anamnesis, pruebas cutáneas frente a los antígenos implicados, determinación de IgE total y específica (CAP FEIA Pharmacia, Upsala) y pruebas espirométricas. De ellos, 63 eran varones y 41 mujeres. Con relación a la clínica que presentaban, 31 presentaban rinitis exclusivamente, 5 asma, 53 rinitis y asma y 3 asma más dermatitis atópica. La distribución según edades fue con una media 26.7±10.9 años. La distri-

bución según rango de edades fue de menores de 20 años (n=30), entre 20 y 40 años (n=59) y mayores de 40 años (n=15). Respecto al grado de severidad del asma, hemos dividido a los pacientes en cuatro grupos: 14 presentaban asma asintomático, definido como aquel paciente previamente diagnosticado de asma y que ha permanecido libre de síntomas sin necesidad de medicación un mínimo de tres meses, más otros tres grupos definidos en ref.¹³: 25 grado leve, 16 en grado moderado, y 6 severo. Hemos establecido esta división con el fin de evaluar si la determinación de sIt tras estimulación alérgica *in vitro*, ofrece un parámetro objetivo de la evolución clínica y se correlaciona con la sintomatología.

Todos ellos estaban libres de medicación 24 horas antes de la extracción de las muestras de sangre.

Pruebas cutáneas y extractos alérgicos

Para las pruebas cutáneas empleamos la técnica de Prick mediante el método descrito por Pepys¹⁴ modificado por Østerballe y Weeke¹⁵, presionando con una lanceta (Dome Hollister, Bayer, UK) de 1mm en la piel con un ángulo de 90° a través de una gota del extracto a testar. Consideramos positivas¹⁶ aquellas pápulas que tras la punción realizada con una concentración de 0.1% de los extractos de *D. pteronyssinus* y del polen de la gramínea *L. perenne* (Ifidesa Arístegui, Bilbao), resultan mayores de 3 mm de diámetro. Empleamos como control positivo histamina a una dilución de 0.1% y como control negativo CINA a una dilución de 0.9%.

Determinación de sulfidoleucotrienos en sobrenadantes de células

Se realizó mediante la técnica CAST (Cellular Stimulation Allergen Test)¹⁷, técnica ELISA de los laboratorios Bühlmann (Allschwil, Suiza). Esta técnica consiste en determinar la producción de sIt tras 40 minutos de estimulación antigénica en leucocitos aislados tras sedimentación en Dextrano y contrastando los resultados con la producción basal (sin estímulo antigénico) y tras la estimulación con una anti-IgE monoclonal (Le27, Bühlmann) como control positivo a una concentración de 0.2 ng/ml. Esta técnica ELISA utiliza un anticuerpo monoclonal que posee una misma afinidad por los tres sIt.

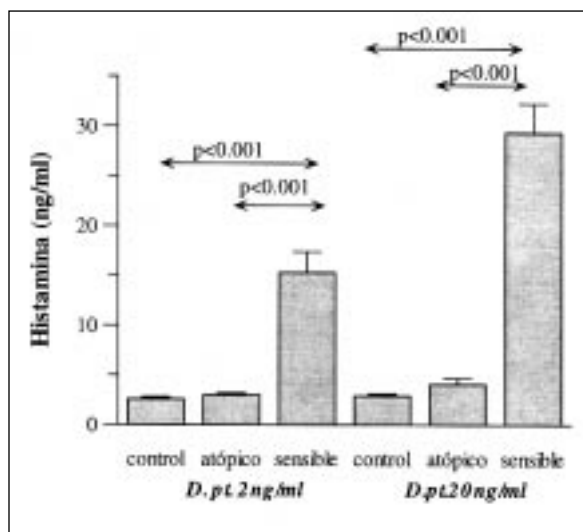


Fig. 1. Producción de sIt tras estímulo Ag-específico en controles sanos (n=12), controles atópicos (n=30) y sensibles a *D. pteronyssinus*.

La prueba se realizó por duplicado: los antígenos utilizados fueron *D. pteronyssinus* y *L. perenne* (Bühlmann) a una concentración final de 2 y 20 ng/ml (unidades masa de materia prima).

Determinación de histamina

Para la determinación de la liberación de histamina antígeno-específica empleamos la técnica descrita por Shore¹⁸, automatizada por Siraganian^{19,20,21} y modificada por nosotros²², utilizando el autoanalizador Bran Lübbe Analyzer, empleando los mismos antígenos y a las mismas concentraciones.

Pruebas espirométricas

Realizamos pruebas de flujo-volumen, valoran-

Tabla I. Producción de sIt (pg±DE) en controles, atópicos y sensibles

	controles sanos	controles atópicos	sensibles
<i>D. pteronyssinus</i>			
2 ng/ml	55.3±16.7	226.7	1568±191
20 ng/ml	54.4±17.3	297±102.2	1731±162
<i>L. perenne</i>			
2 ng/ml	63.4±20.1	940.4±187.5	2123±211.9
20 ng/ml	71.5±24.8	1024±191.8	1777±171

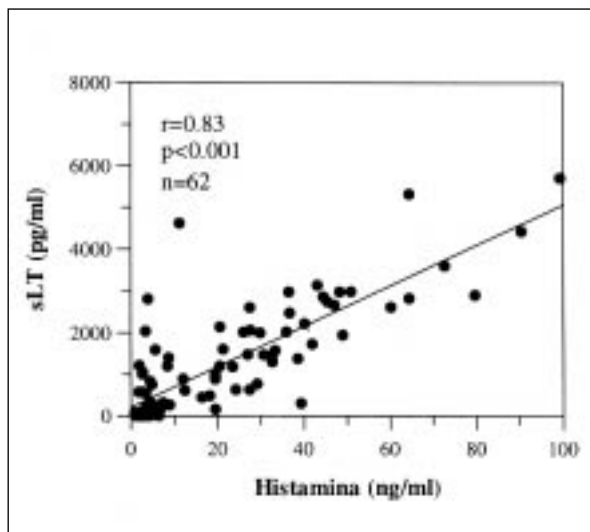


Fig. 2. Correlación entre producción de slt y liberación de histamina Ag-específica en pacientes sensibles a *D. pteronyssinus* (20 ng/ml de *D. pteronyssinus*).

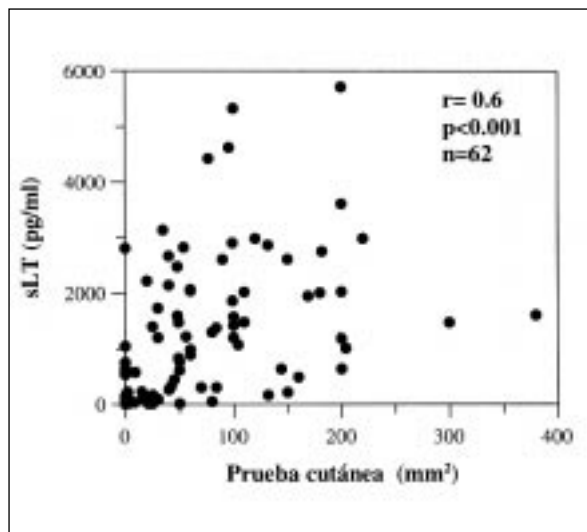


Fig. 4. Correlación entre slt y prueba cutánea en pacientes sensibles a *D. Pteronyssinus*.

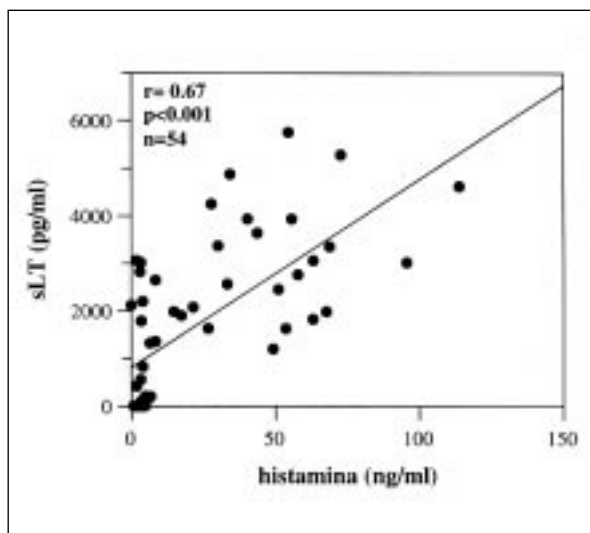


Fig. 3. Correlación entre producción de slt y liberación de histamina Ag-específica en pacientes sensibles a *L. perenne* (2 ng/ml de *L. perenne*).

do los parámetros FEV1 y MEF50. Para ello empleamos el equipo Master Lab (Jaeger. Wurzburg. Alemania)

Análisis estadístico

Para el estudio de correlación se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. Para la comparación de medias, en el caso de muestras pareadas, se utilizó la t de Student de muestras pareadas. Para la comparación de medias entre más de dos grupos independientes, se empleó ANOVA de un criterio, seguido del test de Student-Newman-Keuls, como análisis *a posteriori*. Hemos considerado como significativa una $p < 0.05$.

RESULTADOS

Liberación de mediadores

Hemos observado que, tanto para producción de slt como liberación de histamina, tras la estimulación alérgica con extracto de *D. pteronyssinus*, se produce una liberación significativa de mediadores con relación a la basal (sin alérgeno). Con un efecto sin ser significativo en producción de slt, posee un efecto dosis-respuesta, siendo la concentración óptima para este alérgeno la de 20 ng/ml. Asimismo hemos evidenciado diferencias significativas entre pacientes atópicos y controles sanos y entre pacientes atópicos y controles atópicos, sin diferencia entre controles sanos y atópicos (Fig. 1).

En el caso de *L. perenne* se reproducen los resultados, si bien curiosamente, la producción de slt fue mayor para 2 ng/ml que para 20 ng/ml. En libera-

Tabla II. Producción de slt (pg±DE) según el grado de severidad del asma

<i>D. Pteronyssinus</i>	asintomático	leve	moderado	severo	
2 ng/ml	1236,4±293,2	1026±223	1615±304	2245±787	n.s.
20 ng/ml	1185,0±682	1315±227	1459±251	2134±610	n.s.
<i>L. perenne</i> 2 ng/ml	1080,6±342,5	2030±286,4	1598±460	1690±1015,5	n.s.

Tabla III. Producción de slt (pg±DE) según la clínica (*p<0.05 entre grupos 1 y 3 y grupos 1 y 4, resto no diferencias significativas)

	grupo 1 rinitis sin asma	grupo 2 asma sin rinitis	grupo 3 asma con rinitis	grupo 4 rinitis y/o asma+otros	
<i>D. Pt.</i>	2764,0±401,5*	2284,8±733,7	1357,4±134,2*	511,3±343,2*	*
<i>L. perenne</i>	2124,3±299,4	1719,0±1298,5	2153,0±317,4		n.s.

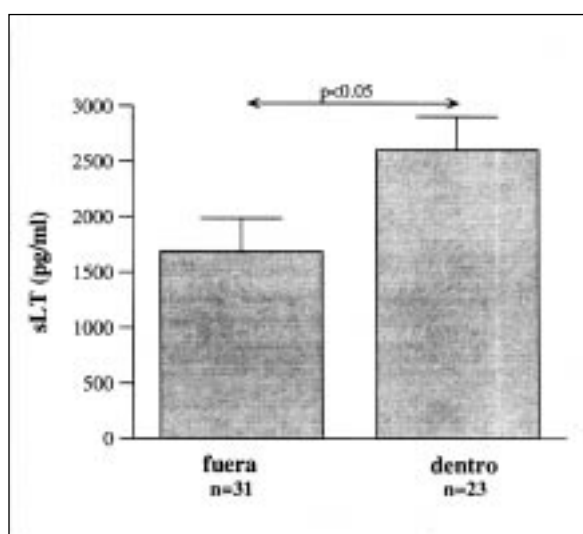
ción de histamina fue mayor a 20 ng/ml que a 2 ng/ml. Concentraciones por encima o por debajo no produjeron liberación significativa. Además de existir diferencias entre pacientes polínicos y controles sanos y atópicos, hemos encontrado diferencias significativas entre controles sanos y atópicos no sensibles a *L. perenne* (Tabla I).

Correlación con otras técnicas

Hemos obtenido una correlación positiva y significativa entre la liberación de histamina antígeno-específica y la producción de slt antígeno-específica ($r=0.71$, $p<0.001$ para *D. Pt.*=2 ng/ml y $r=0.83$, $p<0.001$ para *D. Pt.*=20 ng/ml (Figura 2), ($r=0.67$, $p<0.001$, para una concentración de extracto de *L. perenne* de 2 ng/ml (Figura 3) y $r=0.57$, $p<0.001$, para la de 20 ng/ml).

Así como una correlación positiva significativa entre el test cutáneo (medido en mm²) y la producción de slt tras estímulo antigénico ($r=0.49$, $p<0.001$ para *D. Pt.*=2 ng/ml (Figura 4) y $r=0.44$, $p<0.001$ para *D. pt.*=20 ng/ml) ($r=0.5$, $p<0.001$ para la concentración de alérgeno de 2 ng/ml y $r=0.46$, $p<0.001$ para la de 20 ng/ml).

Existe también una correlación positiva y significativa entre producción de slt antígeno-específica y niveles de IgE específica ($r=0.4$, $p=0.001$ para *D. Pt.*=2 ng/ml y $r=0.34$, $p=0.003$ para *D. pt.*=20 ng/ml). En el caso de pacientes alérgicos a *L. perenne* no hemos obtenido correlaciones positivas y significativas con los niveles de IgE específica. Con ninguno de los dos alérgenos hemos

**Fig. 5.** Producción de slt Ag-específica dentro y fuera de la estación polínica.

obtenido correlación significativa entre niveles de IgE total y liberación de slt antígeno-específica.

Correlación con parámetros clínicos

No hemos encontrado correlación entre niveles de producción de slt y grado de severidad de asma, si bien en el caso de pacientes sensibles a *D. pteronyssinus*, hemos observado que la producción de slt es de mayor magnitud en asma severo y moderado que en asma de grado leve y asintomático, si bien estas diferencias no son estadísticamente significativas (Tabla II). No hemos

encontrado correlación entre parámetros espirométricos (FEV1, MEF50) y la producción de slt.

Con respecto al diagnóstico clínico, las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$) únicamente a la concentración de *D. pteronyssinus* de 20 ng/ml, entre el grupo de pacientes que presentaban rinitis y asma más rinitis y el grupo de rinitis frente al grupo de asma más otra enfermedad alérgica. En el caso de pacientes polínicos, los grupos con una mayor liberación han sido los de pacientes con rinitis y asma más rinitis (Tabla III).

Producción de mediadores según edad y sexo

Al comparar el comportamiento en la liberación de mediadores según la edad, en pacientes sensibles a *D. pteronyssinus* hemos observado una correlación negativa y significativa ($r = 0.3$ $p < 0.001$) entre la edad y producción de slt. En pacientes polínicos, sin obtener una correlación negativa, al dividir a los pacientes en tres grupos (menores de 20 años, de 20 a 40 años y mayores de 40 años), la producción de slt, disminuye con la edad.

En el caso de pacientes sensibles a *D. pteronyssinus* la producción de slt y de histamina ha sido significativamente mayor en varones que en mujeres ($p < 0.05$).

Diferencias dentro y fuera de la estación

Al comparar el grupo de pacientes polínicos estudiados dentro de la estación con aquellos que se encontraban fuera de la misma, la producción de slt fue significativamente mayor ($p = 0.03$) en los que se encontraban dentro de la estación que aquellos que estaban fuera de la misma, tras la estimulación con una concentración de 2 ng/ml de alergen (Fig. 5). En la liberación de histamina los resultados son semejantes, siendo la liberación mayor dentro de la estación que fuera de la misma, tanto para la concentración de 2 ng/ml de

alergen ($p < 0.001$), como para la concentración de 20 ng/ml de alergen ($p = 0.04$) (Tabla IV).

DISCUSION

A la vista de los resultados obtenidos existe una liberación antígeno específica de slt tras 40 minutos de estímulo antigénico. Esta liberación es dependiente del antígeno ya que no se da en condiciones basales en nuestros pacientes ni en controles atópicos. Tiene un comportamiento ligeramente dosis dependiente, aunque no llega a ser significativo. En cuanto a la dosis óptima de antígeno para la producción *in vitro* de slt mediante esta técnica así como para la liberación de histamina, fue la de 20 ng/ml para *D. pteronyssinus* (siendo de 2 ng/ml también estimuladora aunque en menor grado) y de 2 ng/ml para *L. perenne*. Dosis inferiores (0.2 ng/ml) o superiores (200 ng/ml) no dieron liberación, quizá porque la dosis fuera insuficiente o tóxica.

Estos datos nos confirman que existe una producción Ag-específica de slt tras 40 minutos de estímulo alérgico, por otra parte superponibles a los de De Weck y cols.²³ y Mita y cols.²⁴ empleando la misma técnica.

En el caso de producción de slt en pacientes sensibles a *L. perenne*, se produjeron diferencias significativas entre controles sanos y controles atópicos, lo que podría explicarse por la existencia de una sensibilización latente.

Hemos obtenido correlaciones positivas y significativas entre la técnica CAST y liberación de histamina mediante TLH de la misma manera que obtuvieron Mita y cols.²⁴, McGlashan²⁵ y cols. y Scihiko y cols.²⁶; sin embargo, nuestra correlación es más alta frente a las obtenidas por estos últimos con una $r = 0.3$ y 0.47 . Shichijo obtuvo una correlación exponencial, por lo que cuando la liberación de histamina era mayor del 60%, la producción de slt se dispara.

En el caso de pacientes sensibles a *L. perenne*

Tabla IV. Producción de mediadores dentro y fuera de la estación polínica

<i>L. perenne</i>	slt (pg±DE)		histamina (ng±DE)	
	Dentro	Fuera	Dentro	Fuera
2 ng/ml	2604.0±299.8	1727.8±280.3	43.7±6.2	15.3±3.5
20 ng/ml	2002.9±239.0	1610.0±238.0	46.8±6.1	30.2±4.0

hemos obtenido también correlaciones positivas y significativas, de la misma forma que comunicaron Medrala y cols.²⁷ en el caso de pólenes, empleando la misma técnica. Este paralelismo entre liberación de mediadores preformados y *de novo*, probablemente sea debido a que ambos tipos de mediadores son secretados por la célula tras su activación por un mismo estímulo.

La correlación entre producción de slt y prueba cutánea podría reflejar la presencia de una posible concordancia entre la liberación de mediadores procedentes del basófilo y la sensibilidad del mastocito cutáneo. Pensamos además que es importante reseñar que la correlación entre CAST y prueba cutánea ha sido mayor que entre IgE específica y dicha prueba.

Cabe señalar que algunos pacientes –tanto del grupo de sensibles a *D. pteronyssinus* como en sujetos polínicos– estudiados en fase clínica asintomática o leve, poseen una gran capacidad para generar slt, superior a la que presentan los grados clínicos más severos. Debido a que en nuestro trabajo no hemos encontrado correlación entre la producción de slt y la gravedad del asma o la función pulmonar, pensamos que son necesarios estudios con casuísticas más altas para dilucidar si la determinación de slt, además de resultar útil en la detección de una sensibilización frente a un antígeno, lo es para monitorizar la severidad del cuadro clínico.

El hecho de que no se correlacione la producción de slt o liberación de histamina con los valores espirométricos -FEV1, MEF50-, en ninguno de los grupos estudiados, evidencia la hipótesis formulada por otros autores, de que la liberabilidad celular y el grado de reactividad bronquial inespecífica, son factores que actúan de una forma independiente tras un estímulo alérgico²⁸.

En cuanto a la interpretación de los resultados dependientes de la patología que presentan los pacientes, observamos que aquellos pertenecientes al grupo afecto de rinitis producen más slt; los resultados obtenidos por distintos grupos en este sentido son muy diversos. Mientras que Casolaro y cols.²⁹ por ejemplo, no encontraron diferencias entre ambos grupos, Gamboa y cols.³⁰ refieren una mayor liberación de histamina en el grupo de asmáticos con respecto al grupo de pacientes que padecían rinitis. En los pacientes polínicos, el grupo de mayor liberación fue el de pacientes que presentaban rinitis, quizá porque la rinitis sea la afección más frecuente entre los enfermos polínicos.

Con relación al comportamiento según la edad, los datos están en concordancia a los obtenidos en liberación de histamina en trabajos realizados en nuestro departamento en Test de liberación de histamina³⁰ y en los trabajos de Fleisch³¹ en liberación de histamina y producción de slt en cobayas. Quizá se deba al declive fisiológico de la respuesta inmune con la edad, o bien a que con la edad decrezca el número de mastocitos y basófilos y que se hace efectivo a partir de los 40 años³².

Con relación a las diferencias halladas entre sexos, quizá podría explicarse a que de la misma manera que se implica a los leucotrienos en la ovulación –incluso se ha demostrado que inhibidores de leucotrienos impiden la ruptura folicular– las hormonas como LH y hCG pudieran ejercer un papel de feedback negativo³³.

Resulta de gran interés el hecho de que la liberación de mediadores sea mayor dentro que fuera de la estación polínica, coincidiendo con trabajos previos realizados en nuestro Departamento, en liberación de histamina³⁴; demuestra que una mayor exposición alérgica implica una mayor liberabilidad celular. Este hecho concuerda con la experiencia clínica en que conforme avanza la estación, menores exposiciones provocan síntomas más intensos. En este sentido un estudio realizado por Piacentini y cols.³⁵ en 1993, verifica cómo la liberación Ag-específica de histamina en niños sensibles a *D. pteronyssinus*, disminuye significativamente tras 40 días de permanencia en un ambiente montañoso libre de alérgeno. Gamboa y cols.³⁰ confirmaron en un estudio realizado en pacientes sensibles a *D. pteronyssinus*, que en las épocas del año en las que el nivel de ácaros es mayor, los niveles de liberación de histamina Ag-específica también eran significativamente más altos que el resto del año.

A nuestro juicio, la determinación de slt constituye un método útil en el estudio de las reacciones de hipersensibilidad mediadas por IgE. Nos ofrece un fiel reflejo de la reacción alérgica *in vivo* tras el estímulo antigénico, en cuanto a la liberación de mediadores farmacológicamente activos se refiere. Ofrece una buena correlación con otras técnicas de diagnóstico inmunológico de las reacciones alérgicas, especialmente con el test de liberación de histamina. Con relación a la liberación de histamina presenta la ventaja de que al tratarse de una técnica ELISA es de más fácil realización

que la técnica fluorométrica, si bien el coste es más elevado; como en la liberación de histamina, no requiere alérgenos especialmente manufacturados o procesados para la técnica como en el caso de la determinación de IgE específica, lo que resulta especialmente útil en el estudio de drogas o alérgenos alimentarios; finalmente, la producción de sIt parece comportarse como un parámetro más sensible ya que arroja mayores índices de correlación.

BIBLIOGRAFIA

- Samuelsson B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 1983; 220: 568-75.
- Dahlen SE, Hedqvist P, Hammarstrom S, Samuelson B. Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. *Nature* 1980; 288: 484-6.
- Marom Z, Shelhamer JH, Bach MK, Morton DR, Kaliner M. Slow-reacting substances, leukotrienes C4 and D4, increase the release of mucus from human airways in vitro. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126: 449-51.
- Drazen JM, Austen KF, Lewis RA, Clark DA, Goto G, Marfat A, et al. Comparative airway and vascular activities of leukotrienes C-1 and D in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 4354-8.
- Holroyde MC, Altounyan RE, Cole M, Dixon M, Elliott EV. Bronchoconstriction produced in man by leukotrienes C and D. *Lancet* 1981; 2: 17-8.
- Drazen JM, O'Brien J, Sparrow D, Weiss ST, Martins MA, Israel E, et al. Recovery of leukotriene E4 from the urine of patients with airway obstruction. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 104-8.
- Christie PE, Tagari P, Ford-Hutchinson AW, Charleson S, Chee P, Arm JP, et al. Urinary leukotriene E4 concentrations increase after aspirin challenge in aspirin-sensitive asthmatics subjects. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143:1025-29.
- Wenzel SE, Westcott JY, Larsen GL. Bronchoalveolar lavage fluid mediator levels 5 minutes after allergen challenge in atopic subjects with asthma: relationship to the development of late asthmatic responses. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 540-8.
- Kikawa Y, Miyamoto T, Inoue Y, Saito M, Nakai A, Shigematsu Y, et al. Urinary leukotriene E4 after exercise challenge in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 1111-9.
- Pauwels RA, Joos GF, Kips JC. Leukotrienes as therapeutic target in asthma. *Allergy* 1995; 50: 615-22.
- Oehling A, Ona J, Trento H, Sanz ML, Dominguez MA. The diagnostic value of the histamine release test in food allergy. *Allergol Immunopathol* 1984; 12: 439-48.
- Sanz ML, Prieto I, Oehling A. The histamine release test as an important complement to the diagnosis of allergic diseases. *Allergy Clin Immunol News* 1995; 7: 56-61.
- International consensus report on diagnosis and treatment of asthma. National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health. Bethesda, Maryland 20892. Publication no. 92-3091, March 1992. *Eur Respir J* 1992; 5: 601-41.
- Pepys J. Skin testing. *Brit J Hosp Med* 1975; 14:412-7.
- Østerballe O, Weeke W. A new lancet for skin prick testing. *Allergy* 1979; 34:209-12.
- Dreborg S. Methods for skin testing. *Allergy* 1989; 44 (10): 22-30.
- De Weck AL, Stadler BM, Urwyler A, Wehner HU, Buhlman RP. Cellular allergen stimulation test (CAST). A new dimension in allergy diagnostics. *Allergy Clin Immunol News* 1993; 5: 9-14.
- Shore P, Burkhalter A, Cohn VH. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 1959; 127: 182-6.
- Siraganian RP. Refinement in the automated-fluorimetric histamine analysis system. *J Immunol Methods* 1975; 7: 283-90.
- Siraganian RP. Automated histamine analysis for "in vitro" allergy testing. II. Correlation of skin test results with "in vitro" whole blood histamine release in 82 patients. *J Allergy Clin Immunol* 1977; 59: 214-22.
- Siraganian RP, Brodsky MS. Automated histamine analysis for "in vitro" allergy testing. *J Allergy Clin Immunol* 1976; 57: 525-40.
- Castillo JG, Gamboa PM, Oehling A, Wong E, de la Cuesta C. Variations in antigen specific histamine release related with immunotherapeutic treatment. *Allergol Immunopathol* 1989; 17: 149-53.
- De Weck AL, Furukawa K, Maly FE. A new cellular assay for the diagnosis of allergy (CAST-ELISA). En: Miyamoto T, Okuda M, eds. Progress in allergy and clinical immunology, Vol 2. Bern: Hogrefe & Huber, 1992:197-202.
- Mita H, Yui Y, Yasueda H, Kajita T, Saito H, Shida T. Allergen induced histamine release and immunoreactive leukotriene LTC4 generation from leukocytes in mite sensitive asthmatic patients. *Prostaglandins* 1986; 31: 869-86.
- Mac Glashan DW, Peters SP, Warner J, Lichtenstein L. Characteristics of human basophil sulfidopeptide-leukotriene release: releabilisability defined as the ability of the basophil to respond to dimeric cross-links. *J Immunol* 1986; 136: 2231-9.
- Shichijo M, Ebisawa M, Miura K, Toida Y, Onda T,

- Saito H, et al. Relationship between histamine release and leukotrienes production from human basophils derived from atopic dermatitis donors. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107: 587-91.
27. Medrala W, Malolepszy J, Wolanczyk-Medrala A, Litwa W, Pietrzak E, Gietkiewicz K, et al. Comparative study between skin tests and CAST-ELISA test in patients with pollinosis. *Allergy* 1995; 50 (26): 245.
 28. Howarth PH, Durham SR, Lee TH, Kay AB, Church MK, Holgate ST. Influence of albuterol, cromolyn sodium, and ipratropium bromide on the airway and circulating mediator responses to allergen bronchial provocation in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132:986-92.
 29. Casolaro V, Spadaro G, Marone G. Human basophil releasability. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 1108-11.
 30. Gamboa PM, Castillo JG, Oehling A, Wong E, de la Cuesta C. Variations of histamine release in atopic populations. I. Clinical situation and season. *Allergol Immunopathol* 1989; 17: 73-6.
 31. Fleisch JH, Clakins PJ, Hooker CS. Reduction in antigen-induced release of histamine and slow reacting substance of anaphylaxis from guinea pig lung with increasing age. *Biochem Pharmacol* 1978; 27: 2119-22.
 32. Hallgren HM, Yunis HM. Immune function, immune regulation, and survival in an aging human population. En: Segre D, Smith L, eds. New York: Marcel Dekker Inc, 1981:281-93.
 33. Tsafiri A. Ovulation as a tissue remodeling process. Proteolysis and cumulus expansion. *Adv Exp Med Biol* 1995; 377:121-40.
 34. Dieguez I, Sanz ML, Oehling A. Influence of seasonal variations on histamine release and other immunological parameters in pollinosis. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1991;1:101-8.
 35. Piacentini GL, Martinati L, Fornari A, Comis A, Carcereri L, Bocagni P, et al. Antigen avoidance in a mountain environment: influence on basophil releasability in children with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92:644-650.

Marta Ferrer
 Department of Medicine
 Division of Pulmonary and Critical
 Care, Allergy and Clinical Immunology
 Medical University of South Carolina
 171 Ashley Avenue
 Charleston, SC 29425
 USA