Tercera Ponencia **Moderador: R. Vives Conesa**

UTILIDAD DE LA PROVOCACIÓN BRONQUIAL CON ALERGENOS EN EL CONTROL DEL ASMA TRATADO MEDIANTE INMUNOTERAPIA

Introducción

R. Vives Conesa

Servicio de Alergia. Hospital «12 de Octubre». Madrid

La finalidad de los procedimientos diagnósticos en el asma alérgico debe ser la demostración de que la reacción está mediada por un mecanismo IgE, y además probar la importancia que tiene la sensibilización a ese alergeno en el órgano de choque. Este es, el único argumento válido para poder establecer luego un tratamiento específico. Realizado el diagnóstico etiológico el tratamiento médico se basa fundamentalmente en tres pilares: Evitar el alergeno, tratamiento farmacológico e inmunoterapia (IT).

Actualmente nadie duda de la importancia que la exposición alergénica tiene sobre el árbol bronquial. Los estudios comparativos entre los niveles de alergenos y los síntomas clínicos han resultado claves. La exposición alergénica ambiental juega un papel causal en el desarrollo de la hiperreactividad y la respuesta inflamatoria crónica bronquial. Su monitorización en el asma es básico. Lógicamente el primer tratamiento debe ser preventivo evitando el contacto con el factor etiológico responsable.

Los fármacos se limitan a eliminar o disminuir los síntomas. No hay estudios a largo plazo que hayan demostrado que el tratamiento farmacológico, incluyendo los corticoides, modifican el curso espontáneo de la enfermedad.

La evitación del alergeno y la IT representan los únicos tratamientos específicos que podemos ofrecer al paciente alérgico. Por múltiples trabajos se sabe que la IT mejora el curso evolutivo del asma alérgico.

El control y seguimiento del asma alérgico tratado con IT se basa fundamentalmente en la evolución clínica. La monitorización de la eficacia de la IT que se llevan a cabo en los ensayos clínicos realizados en doble ciego contra placebo incluye básicamente lo siguiente:

– Evaluaciones clínicas que se realizan con:
Puntuaciones de síntomas y medicación.
Mediciones del PFR.
Evaluaciones médicas.
– Parámetros de laboratorio:
– In vivo: Pruebas cutáneas.
Pruebas de provocación bronquial.
• Inespecíficas.
• Específicas.
Biopsias de piel y mucosas.
Lavados nasales.
Lavados broncoalveolares (BAL).
Cámaras cutáneas.
– In vitro: IgE específica.
IgG específica.
IgG1 e IgG4 específica.
Indice IgG1/IgG4.
IgA, IgD, IgM específicos.
IgA e IgG específicos en secreciones.
Liberación de histamina por leucocitos.
Anticuerpos anti-idiotipo.
Degranulación de basófilos.
Mediadores de la inflamación:
Eosinófilos, ECP, ECA, etc..., en sangre y BAL.
Linfocitos T.

No hay datos convincentes para poder reemplazar la Evaluación Clínica de la eficacia de la IT por parámetros in vivo o in vitro. Por tanto la autoevaluación del paciente con los scores clínicos y de medicación, y la evaluación médica son los métodos correctos y a utilizar en la práctica diaria. Hay que tener en cuenta que hay cambios en algunos parámetros causados por la IT que no se correlacionan con la mejoría clínica[1-3].

Los test de provocación bronquial específicos (TPBE) reproducen en condiciones de control los síntomas en el órgano diana, estableciendo una relación causa-efecto entre el alergeno y la respuesta bronquial. Los test de provocación específica nasal y conjuntival no se consideran útiles para el control de la IT en el asma. Los TPBE son altamente reproducibles y pueden usarse para confirmar el diagnóstico o probar que el órgano de choque está implicado. No hay ningún parámetro aislado (in vivo e in vitro) que nos indique de forma absoluta que la IT está siendo efectiva en el asma, y los TPBE no son una excepción a pesar de la importancia de la información que nos ofrece. Representan lo más aproximado a la exposición natural al alergeno que tenemos a nuestro alcance.

Algunos autores han sugerido que los TPBE se deberían de realizar y confirmar que son positivos antes del inicio de la IT en cualquier asmático, hecho inviable en la práctica diaria. Ahora bien, los TPBE no reproducen en el laboratorio las condiciones naturales de exposición a un alergeno, ya que ésta puede ser prolongada y con distintos niveles en la concentración del alergeno. A pesar de la controversia hay estudios en los que parece que hay una clara correlación entre la exposición natural al antígeno y los TPBE. Ohman obtuvo un retraso significativo en la aparición de los síntomas tras la exposición natural a antígeno de gato en un grupo de asmáticos tratados con IT comparado con el grupo tratado con placebo[4]. Van Metre demostró que la PD_{20}-VEMS obtenida tras exposición natural en una habitación a antígenos de gato, se correlacionaba significativamente con la PD_{20}-VEMS obtenida con las pruebas standard de exposición en el laboratorio[5].

Los TPBE no dan información sobre la atracción, acumulación y activación celular que tiene lugar tras la inhalación del antígeno, ni tampoco de las alteraciones morfológicas y estructurales que acontecen en el bronquio. Los TPBE miden el grado de obstrucción bronquial que aparece como consecuencia de la acción de los mediadores liberados tras la activación celular. Nos indica además de si la reacción ha sido inmediata de tipo broncoespático o tardía de carácter inflamatorio.

La unión del antígeno con la IgE específica de los mastocitos libera a los mediadores responsables de la reacción inmediata como son: histamina, prostaglandinas y tromboxanos. Los macrófagos alveolares participan también en la respuesta inicial[6].

De los mastocitos activados se liberan citoquinas pre-formadas que implican a linfocitos TH2, y a partir de estas, otras células como eosinófilos, basófilos, macrófagos y neutrófilos. Productos derivados de las mismas como PG, LTs, Tx, PAF, proteasas, radicales de oxígeno, y fundamentalmente los derivados del eosinófilo como MBP, ECP, EPO y EPX, provocan una reacción inflamatoria bronquial con infiltración eosinófila y daño epitelial característica de la respuesta tadía.

En el proceso inflamatorio se liberan citoquinas (IL-1, TNF-alfa, IL-4, IL-2, GM-CSF, IL-8, etc...) que estimulan la expresión de las moléculas de adhesión de las células endoteliales, linfocitos, eosinófilos, mastocitos, macrófagos, monocitos y neutrófilos con el fin de reparar el fenómeno inflamatorio[7]. Si no se consigue, las células epiteliales y los fibroblastos de la matriz participan en la inflamación crónica que está asociada a obstrucción bronquial e hiperreactividad bronquial. Si la actividad inflamatoria perdura se produce el proceso conocido como el «remodelamiento de las vías aéreas» y con él, el deterioro progresivo de la función pulmonar[8, 9].

Existe en la actualidad un amplio campo abierto a la investigación cuyo fin es el conocimiento de lo que sucede biológicamente en el bronquio en el asma alérgico. Las nuevas perspectivas en la monitorización de la inflamación bronquial tras TPBE incluye: Biopsias, BAL, análisis del esputo y marcadores sanguíneos.

Los TPBE representan un modelo útil para poder estudiar la reacción inmediata y tardía asmática. El análisis de los fluidos obtenidos por BAL tras el TPBE permite evaluar de una forma indirecta la inflamación bronquial. Gracias a ello se ha demostrado que existe liberación de mediadores de la inflamación, actividad de macrófagos y mastocitos, aparición de eosinófilos y aumento de un trasudado proteico[10]. Otros autores han detectado que la activación de linfocitos T y la aparición de ECA en el BAL, precede la aparición de eosinófilos y de la respuesta bronquial tardía[11].

Los test de provocación endo-bronquial específica (TPEBE) permiten conocer de una manera más directa la fisiopatología de la reacción alérgica.

En el TPEBE el antígeno se introduce a través del broncoscopio a nivel de un bronquio segmentario o subsegmentario de un lóbulo pulmonar. En el bronquio contralateral se inyecta suero salino que sirve como control. Tras el estímulo alergénico se observa la imagen de la mucosa y se recogen muestras del fluido del lavado broncoalveolar y/o biopsias para su estudio.

Las muestras recogidas entre 5-15 minutos después han permitido demostrar que en la respuesta inmediata se libera histamina, metabolitos del ácido araquidónico; PGD2[12], LTs y Tx de los mastocitos[13] y además existe una activación de los macrófagos alveolares[14].

Aunque los estudios de BAL aportan mucha información, no nos aseguran que reflejen de forma absoluta los eventos que ocurren en la propia pared del bronquio. Los estudios biópsicos nos acercan más a la realidad del fenómeno. En la respuesta tardía bronquial se visualiza un edema con exudación y obstrucción de la vía aérea. Los análisis realizados con técnicas de inmunohistoquímica en las muestras de biopsia recogidas a las 6 horas indican que existe una acumulación de leucocitos, con aumento de las moléculas de adhesión ICAM-1 endoteliales que se correlacionan significativamente con un aumento de los ligandos LFA + de los leucocitos a nivel del epitelio y de la submucosa. La unión ICAM-1/LFA aparecen en las reacciones inflamatorias que requieren contacto intercelular. Su importancia en la reacción alérgica está siendo estudiada. Los eosinófilos, LT y mastocitos también contribuyan en la acumulación de leucocitos[15].

Los estudios de Liu con BAL tras TPEBE con ragweed confirman un aumento significativo de histamina, PGD2 y TxB2 en la fase inicial. A las 19 horas se mantenían estos niveles aumentados, hay una elevación significativa de eosinófilos, LT y basófilos y además un aumento de albúmina y urea, utilizados como marcadores de permeabilidad vascular[16].

Los estudios experimentales llevados a cabo con monos por Wegner demuestran que la inhalación bronquial con *Ascaris* induce un aumento de la HRB y una eosinofilia prolongada en las vías aéreas. Por primera vez se demostró la presencia de moléculas de adhesión con un aumento importante de ICAM-1 sobre las células epiteliales tras la estimulación alergénica. La importancia de los hechos radican en las posibilidades terapéuticas con anticuerpos monoclonales anti-ICAM-1, pues el pre-tratamiento con ellos indujo una disminución de la HRB y del infiltrado eosinofílico[17].

S. Rak demostró que en un grupo de asmáticos alérgicos al polen de abedul no tratados con IT, aparecía en el período estacional, una elevación en el n.º de eosinófilos, ECP y ECA tanto en suero como BAL. Esta elevación era estadísticamente significativa comparada con el grupo asmático tratado con IT, por lo que atribuye a ésta una acción anti-inflamatoria[18].

Estudios controlados demuestran claramente que la IT disminuye significativamente la reactividad bronquial específica[4, 19-26]. Van Brever ha observado que tras IT, disminuye la frecuencia y severidad de la respuesta tardía[27, 28]. Los resultados sobre la reactividad bronquial inespecífica son contradictorios. Mientras unos autores han detectado una disminución de la reactividad inespecífica[21-23], otros no encuentran cambios[4, 24, 26]. Estos datos se han observado con IT realizada con epitelios, ácaros y pólenes. Los TPBE reflejan la sensibilidad del órgano de choque en condiciones artificiales y no siempre reflejan lo que ocurriría tras una exposición natural. Una disminución de la reactividad bronquial no significa que paralelamente el paciente presente una mejoría clínica. En la normativa del Comité de IT de al SEAIC se refleja que el TPBE es el método de elección en el asma para evaluar la eficacia de la IT[29].

Lo ideal sería conseguir u obtener un parámetro de seguimiento de la IT que estableciera una relación con la eficacia clínica y que sirviera como valor predictivo en la evolución de la enfermedad desde una fase inicial del tratamiento. Un parámetro de fácil acceso y bajo coste y que fuera un marcador que indicara lo que realmente está sucediendo en el árbol bronquial.

Las tendencias actuales de la IT parecen decantarse en la búsqueda de alergenos purificados identificados por immunoblotting. Suelen ser proteínas o glicoproteínas con un peso molecular entre 10-50 kD. Su secuencia se está obteniendo con técnicas de biología molecular, permitiendo conocer la estructura molecular de los alergenos mayores de diferentes alergenos (Dermatophagoides, epitelio de perro y gato, etc...). Detectados los epítopos se han desarrollado péptidos de epítopos con técnicas de clonaje molecular (rDNA). La IT realizada con los mismos se encuentra en los estadíos iniciales.

Queda mucho camino por recorrer e investigar. No existe nada concluyente ni contrastado definitivamente en el seguimiento de la IT. Por todo ello, en los ensayos clínicos, el TPBE como técnica que detecta los síntomas en el órgano diana, sigue siendo imprescindible y fundamental en el control de la IT.

BIBLIOGRAFIA

1. Malling, H. J.; Weeke, B.: EAACI Immunotherapy. Position paper. *Allergy* 1993; 48: 1-61.
2. Bousquet, J.; Hejjaoui, A., et al.: Specific immunotherapy in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86: 292-305.
3. Bousquet, J.; Michel, F., et al.: Specific immunotherapy in asthma. Is it effective? *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 1-11.
4. Ohman, J.; Steven, R., et al.: Immunotherapy in cat-induced asthma. Double-blind trial with evaluation of in vivo and in vitro responses. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 74: 230-239.
5. Van Metre, T.; Mash, D., et al.: Dose of cat *(Felis domesticus)* allergen 1 (Fel d 1) that induces asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 78: 62-75.
6. Wenzel, S.; Larsen, G., et al.: Elevated levels of leukotriene C4 in bronchoalveolar after endobronchial allergen challenge. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 112-119.
7. Calderón, E.; Lockey, F.: A possible role for adhesion molecules in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 852-865.
8. Bousquet, J.; Chanez, P., et al.: Asthma: a disease remodeling the airways. *Allergy* 1992; 47: 3-11.
9. Peat, J.; Woolcock, J., et al.: Rate of decline of lung function in subjects with asthma. *Eur J Respir Dis* 1987; 70: 171-179.
10. Bousquet, J.; Van Vyve, T., et al.: Cells and mediators in bronchoalveolar lavage of asthmatic patients: the sample of eosinophilic inflammation. *Allergy* 1993; 48: 70-76.
11. Schmekel, B.; Venge, P., et al.: Markers for eosinophils and T-lymphocytes as predictors of late asthmatic response. *Allergy* 1993; 48: 94-97.
12. Murray, J.; Tonnel, B., et al.: Release of prostaglandin D2 into human airways during acute antigen challenge. *N Engl J Med* 1986; 315: 800-804.
13. Miadona, A.; Tedeschi, A., et al.: Mediator release after endobronchial antigen challenge in patients with respiratory allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85: 906-913.
14. Tonnel, B.; Joseph, M., et al.: Stimulation of alveolar macrophages in asthmatic patients after local provocation test. *Lancet* 1983; 25: 1406-1408.
15. Montefort, S.; Gratziou, C., et al.: Bronchial biopsy evidence for leukocyte infiltration and upregulation of leukocyte-endothelial cell adhesion molecules 6 hours after local allergen challenge of sensitized asthmatic airways. *J Clin Invest* 1994; 93: 1411-1421.
16. Liu, M.; Hubbard, W., et al.: Immediate and late inflammatory responses to ragweed antigen challenge of the peripheral airways in allergic asthmatics. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 51-58.
17. Wegner, C.; Gundel, R., et al.: Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science* 1990; 247: 456-459.
18. Rak, S.: Effects of immunotherapy on the inflammation in pollen asthma. *Allergy* 1993; 48: 125-128.
19. Bousquet, J.; Calvayrac, P., et al.: Immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 76: 734-744.
20. Van Metre, T.; Marsh, D., et al.: Immunotherapy for cat asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 82: 1055-1068.
21. Lilja, G.; Sundin, B., et al.: Immunotherapy with cat –and dog– dander extracts. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 37-44.
22. Hedlin, G.; Graff-Lonnevig, et al.: Immunotherapy with cat –and dog– dander extracts. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 955-964.
23. Armentia, A.; Martín, J., et al.: Immunotherapy with storage mite *Lepidoglyphus destructor. J Allergy Clin Immunol* 1993; 91: 287.
24. García Ortega, P.; Merelo, A., et al.: Decrease of Skin and bronchial sensitization following short-intensive schedule immunotherapy in mite-allergic asthma. *Chest* 1993; 103: 183-187.
25. Van Metre, T.; Marsh, D., et al.: Immunotherapy for cat asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 79: 125.
26. Formgren, H.; Lanner, A. S., et al.: Effects of immunotherapy on specific and non-specific sensitivity of the airways. *J Allergy Clin Immunol* 1984: 73-140.
27. Van Bever, P.; Bosmans, J., et al.: Modification of the late asthmatic reaction by hyposensitization in asthmatic children allergic to house dust mite or grass pollen. *Allergy* 1988; 43: 378-385.
28. Van Bever, P.; Stevens, J., et al.: Evolution of the late asthmatic reaction during immunotherapy and after stopping immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86: 141-146.
29. Normativa sobre Inmunoterapia en Enfermedades Alérgicas. SEAIC. 1990.

Utilidad de la provocación bronquial específica en el seguimiento de la inmunoterapia aplicada al tratamiento del asma ocupacional

Alicia Armentia

Sección de Alergia. Hospital Río Hortega. Valladolid

El asma ocupacional es actualmente la enfermedad respiratoria que más problemas de compensaciones legales plantea y que es causa de un gran porcentaje de bajas laborales[1]. El incremento en el diagnóstico de esta enfermedad puede ser debido a un real aumento en su prevalencia y al reconocimiento de nuevos alergenos implicados en su etiología. Se han logrado avances en el tratamiento farmacológico de este problema, aunque no una solución definitiva. Desafortunadamente, la evitación del alergeno no es siempre posible y no se ha demostrado que el tratamiento farmacológico mejore la evolución natural de la enfermedad. Por ello, intentaremos defender nuestros argumentos en favor de la instauración de inmunoterapia como terapéutica más específica de dos tipos frecuentes de asma ocupacional: asma por cereales y por ácaros de almacenamiento en trabajadores sensibilizados a estos alergenos. En ambos casos, los tests de provocación bronquial específica con el alergeno responsable del asma, fueron útiles para demostrar de manera objetiva una disminución de la sensibilidad al mismo tras un curso adecuado de inmunoterapia.

INMUNOTERAPIA EN EL ASMA OCUPACIONAL POR CEREALES

La inhalación de harina de cereales es la causa de una enfermedad ocupacional conocida como asma del panadero, por su gran prevalencia en esta industria[2-4]. En países de nuestro entorno socioeconómico, como Alemania y Suiza, está considerada como la enfermedad pulmonar profesional más prevalente[3]. En el área donde trabajamos, la industria derivada de la manipulación de cereales y la agricultura son importantes fuentes de este tipo de asma ocupacional.

Hace 5 años, realizamos cuestionarios clínicos sobre esta patología en Valladolid[5]. El total de trabajadores encuestados fue de 1.395, distribuidos en 454 factorías. De ellos, 139 acudieron a nuestro hospital por presentar síntomas presumiblemente ocupacionales. Se demostró sensibilización a harina de trigo por prueba cutánea, RAST y provocación en el 25,17% de estos pacientes.

La mayoría de estos pacientes no podían dejar su trabajo ni mejorar las condiciones del mismo. Habían recibido tratamiento con diversos cursos de broncodilatadores y esteroides tópicos, pero su enfermedad proseguía y empeoraba ante nuevas exposiciones al alergeno. No existían en la literatura científica hasta el momento trabajos controlados de IT con cereales. Sin embargo, sí teníamos referencia de estudios realizados con pólenes, ácaros y epitelios de animales en los que la IT específica logró una disminución de la respuesta específica al alergeno, la respuesta inespecífica y las reacciones tardías. Esto podría indicar un efecto antiinflamatorio debido a una disminución de la respuesta inmunológica en las vías aéreas de estos pacientes, lo que supondría un efecto casi análogo al control ambiental cuando éste no es posible. En las figuras 1 y 2 recogemos todos los estudios doble ciego controlados con placebo que se han publicado hasta enero-94. Como vemos son más los que han demostrado una disminución de la HRBE. También vemos que la IT logró una disminución de la HRBI, lo cual indicaría que esta HRB era una consecuencia de la exposición al alergeno, y no un patrón previo del asma. Sin embargo, estos trabajos, tanto a favor como en contra son difíciles de interpretar debido al escaso número de población estudiada, diferente calidad y tipo de antígenos utilizados, pautas de administración y persistencia o no de control ambiental o tratamiento farmacológico acompañante. Por ejem-

Fig. 1. Variación de la hiperreactividad bronquial específica tras inmunoterapia controlada en estudios doble ciego.

Fig. 2. Variación de la hiperreactividad bronquial inespecífica tras inmunoterapia controlada en estudios doble ciego.

plo Ohman, Van Metre y Lilja[6-8], no obtuvieron mejoría de la HRBI pero sí mejoró la HRBE al cabo de 1 año de tratamiento. De todas formas, cuando un paciente con asma profesional deja su trabajo y su exposición, se observa una persistencia de la HRBI, durante un período considerable de tiempo, lo cual indica una lenta recuperación del tejido bronquial dañado. Sería necesario ver qué hubiera pasado con más tiempo de IT. Cuando el curso de la IT se mantuvo 2 años, como en el trabajo de Hedlin[9], sí se observó una disminución de la HRBI. Sin embargo, este mismo autor mantiene la IT 3 años sin observar ya variación en este último parámetro, lo cual invita a replantear una vez más la vieja cuestión sobre cuándo suspender la IT. Otros trabajos adolecen de escasez de muestra (8 casos en el de Ortolani[10]), o tratamientos concomitantes con esteroides, como el de Mosbech[11], lo cual podría dificultar la interpretación de los resultados.

Pero vamos a volver a nuestro estudio de IT en el asma del panadero, en el que trataré de hacer también una autocrítica que siempre es necesaria para llegar a conclusiones honestas.

De los pacientes afectados, que no podían dejar su trabajo, seleccionamos 30 con asma por sensibilización a harina de trigo demostrada por prick, RAST y provocación inhalativa, para la realización de un estudio doble ciego controlado con placebo de inmunoterapia (IT) con un extracto estandarizado de harina de trigo. Antes y a los 20

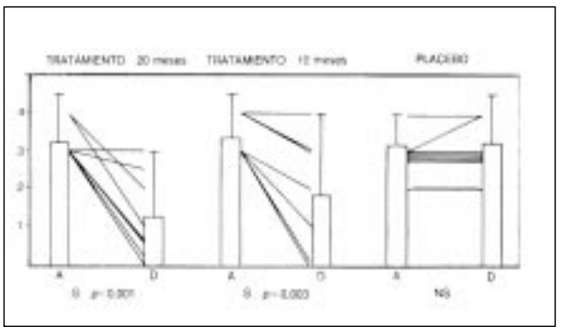

Fig. 3. Evolución de la hiperreactividad bronquial inespecífica tras IT con harina de trigo.

meses de IT, realizamos tests «in vivo» (papulometría, test de metacolina) e «in vitro» (IgE total y específica a harina de trigo).

Encontramos una disminución significativa de la sensibilidad cutánea, hiperreactividad bronquial inespecífica y de la IgE específica a harina de trigo tras 20 meses de IT (Fig. 3).

En este estudio, seleccionamos el test de metacolina como variable objetiva para estudio de la eficacia de la inmunoterapia, al considerar esta prueba reproducible, útil y de menor riesgo que el tests de provocación inhalativa, y evitar la interferencia que pudiera ocasionar en los parámetros inmunológicos una provocación con alergeno. Además, en estudios previos con IT con pólenes habíamos constatado una correlación

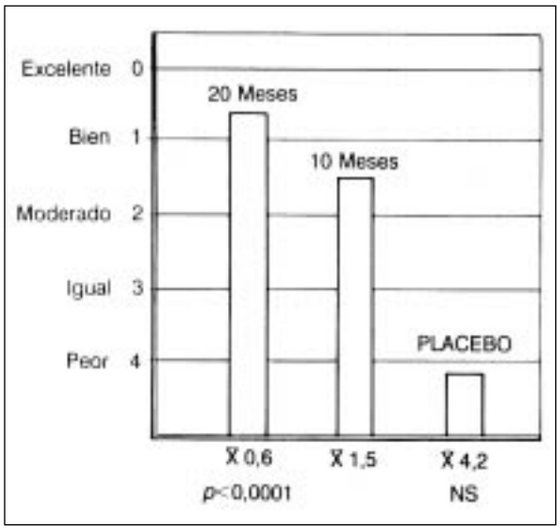

Fig. 4. Evolución del baremo clínico subjetivo.

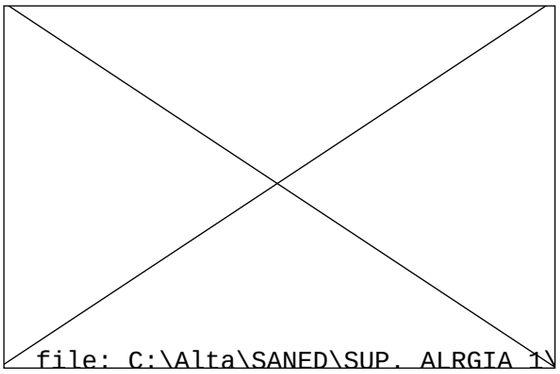

Fig. 5. *Lepidoglyphus destructor.*

significativa entre HRBE y HRBI, en acuerdo con otros autores[12-14]. No obstante, creemos que la provocación bronquial específica es necesaria para confirmar el agente etiológico del asma ocupacional previamente a incluir al paciente en un curso de IT.

Los enfermos respondieron con una mejoría clínica significativa en el baremo subjetivo y de toma de fármacos (Fig. 4). A este respecto hay que señalar que el paciente suele verse motivado ante un tratamiento que ataca al agente responsable de su enfermedad y que no es sólo un paliativo de la misma, y así como puede haber mala complianza en un tratamiento puramente medicamentoso, el paciente tratado con IT no suele alterar el curso de la misma.

Los pacientes incluidos en el grupo control no presentaron cambios significativos en estas variables. No obtuvimos respuestas adversas a la IT y sólo un paciente presentó urticaria con una dosis de 70 PNU, que posteriormente pudo superar.

Dos años después investigamos la presencia de inmunocomplejos circulantes, para descartar efectos adversos a largo plazo, como algunos autores habían sospechado. El nivel de ICC no difirió significativamente entre el grupo tratado y control y ninguno de nuestros pacientes desarrolló glomerulonefritis, vasculitis, hiperviscosidad ni síntomas que sugirieran enfermedad por depósito de inmunocomplejos[15].

Con estos resultados, podíamos concluir que la IT fue un tratamiento seguro y eficaz en cuanto a conseguir una disminución de la HRBI y un aumento de la calidad de vida de estos pacientes. No pretendemos decir que el tratamiento con IT sea superior en eficacia a los farmacológicos. Una de las mayores críticas a la IT es que su efecto en el asma es inferior al tratamiento farmacológico a corto plazo, pero la efectividad de un fármaco suele durar lo que dura su tiempo de actividad, y con la IT llegamos a conseguir una disminución de los síntomas a largo plazo, de hecho, la totalidad de los pacientes incluidos en este estudio han sido dados de alta y siguen trabajando en su misma profesión. Hemos observado sólo dos recaídas leves tras dos años de dejar la IT. Por otra parte, los fármacos tienen también sus efectos secundarios, y con la IT el paciente puede disminuir las necesidades de los mismos. De todas formas no creemos que la IT deba ser considerada como un tratamiento de primera elección cuando el agente responsable es conocido, y no sólo cuando otras medidas han fallado, dando tiempo al deterioro, muchas veces irreversible de la función pulmonar. El problema es si estamos seguros de cuál es el agente etiológico responsable.

A pesar de estos buenos resultados, a nadie se le escapa que esta inmunoterapia se aplicó bajo unos principios que pueden suponerse empíricos. Habíamos vacunado con harina de trigo, pero ¿con cuál o cuáles proteínas antigénicamente activas? Es conocido que la enfermedad del pana-

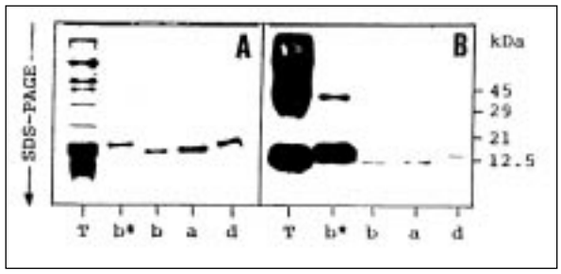

Fig. 6. Inmunodetección de IgE frente al componente CMb* y las subunidades de inhibidor tetramérico de la cebada.SDS-PAGE de las siguientes muestras: preparación mades de cebada (T): proteína purificada CMb* (b*) y subunidades de inhibidor tetramérico BTAI-CMb (b), –CMa (a) y –CMd (d). (A) tinción con azul de Coomassie. (B) Immunoblot de una réplica del gel en fig. 6A tratadas con un pool de sueros de pacientes con enfermedad del panadero y anti-IgE humana tratada con I.

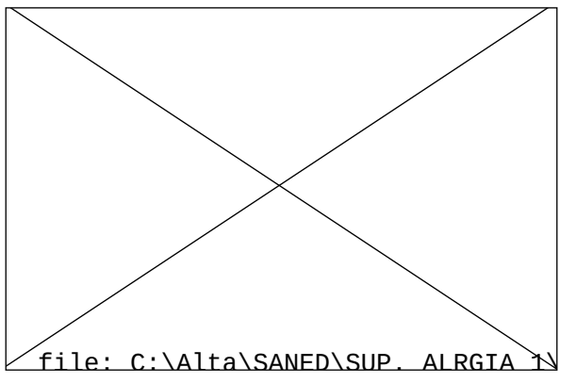

Fig. 7. *Tenebrio molitor.* Parásito del grano cereal.

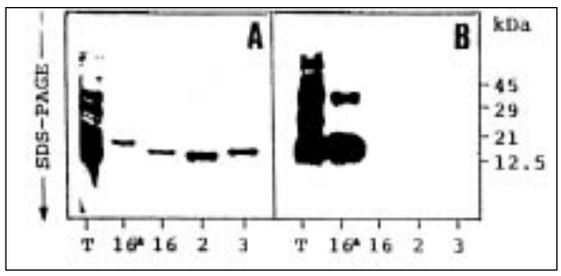

Fig. 8. Inmunodetección de IgE específica para los componentes purificados CM16* y subunidades tetraméricas de la harina para pasta.
SDS-PAGE realizado con las siguientes muestras: preparación cruda de inhibidor de T. turgidum (T); proteína purificada CM16* (16*) y subunidad de inhibidor tetramérico WTAI-CM16, –CM2 (2) y –CM3B (3). (A) tinción con azul de Coomassie. (B) Immunobloting de una réplica del gel en fig. 3B tratada con un pool de sueros de pacientes con enfermedad del panadero y anti-IgE humana marcada con I.

dero está mediada por Ac IgE[16-19], pero la identificación y purificación de los alergenos principales aún estaba sin lograr. Hay que tener en cuenta que la harina es en realidad un ecosistema complejo (Figs. 9-13), en el que entran a formar parte elementos vegetales: pólenes de cereales, proteínas del endosperma del grano, esporas y hongos, distintos aditivos como la alfa amilasa entre muchos otros mejorantes y proteínas animales: parásitos del grano, cucarachas y ácaros, principalmente de almacenamiento, que son considerados a su vez potentes alergenos[20]. Así, por ejemplo, encontramos que el 30% de nuestros pacientes sensibilizados a harina de trigo presentaban co-sensibilización a ácaros de almacenamiento y de forma principal a *Lepidoglyphus destructor*, lo cual nos animó a desarrollar IT específica contra este ácaro en pacientes cuyos síntomas eran debidos preferentemente a esta sensibilización, como después expondremos[21] (Fig. 5).

Las nuevas tendencias sobre inmunoterapia postulan la conveniencia de realizar la hiposensibilización con alergenos identificados y cuantificados por immunoblotting. Los más importantes componentes involucrados en la alergia a la harina de trigo incluyen proteínas solubles en sal. Un gran número de alergenos incluidos en este tipo de proteínas ya habían sido detectadas en trigo, sin embargo, hasta 1989[22] no se había purificado aún ninguna de ellas para su uso diagnóstico, y por lo tanto nadie había realizado pruebas in vivo utilizando alergenos purificados en pacientes alérgicos.

En un estudio de 4 años de duración en colaboración con miembros del departamento de Bioquímica de la ETS de Ingenieros Agrónomos de Madrid logramos identificar y purificar los alergenos principales de la harina de trigo y cebada[22-25]. Treinta y cinco sueros de RAST clase 4 a harina de trigo y cebada de nuestros pacientes fueron usados para analizar la reacción con las diferentes proteínas de trigo y cebada (Fig. 6). Nuestros primeros resultados nos permitieron constatar que se trataba de proteínas de PM entre 12-15 KD y con actividad inhibitoria enzimática contra alfa amilasas y tripsinas heterólogas. Todos ellos pertenecían a una misma familia de proteínas que está presente en muchos cereales y que son utilizados como

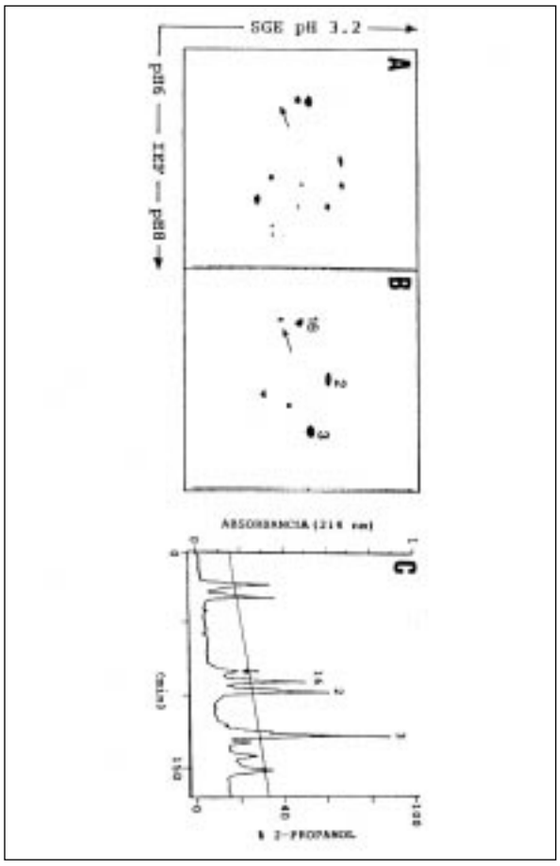

Fig. 9. Aislamiento de la proteína CM16* de la pasta de trigo: Electroforesis bi-dimensional (IEF x SGE) de la preparación madre de inhibidor (A) y de la filtración en gel de la fracción de 60 KDa que incluye inhibidores tetraméricos (B) de *Tritium turgidum Senatore capelli* (trigo para pasta). Fraccionamiento h.p.1.c. de la fracción de inhibidor tetramérico (Fig. 2B). Se señala la posición del componente CM16* en dos mapas de dos dimensiones y el perfil de elución de h.p.l.c. Están también indicadas las posiciones de las subunidades del inhibidor tetramérico WTAI-CM2 (2), CM16 (16) y CM3B (3).

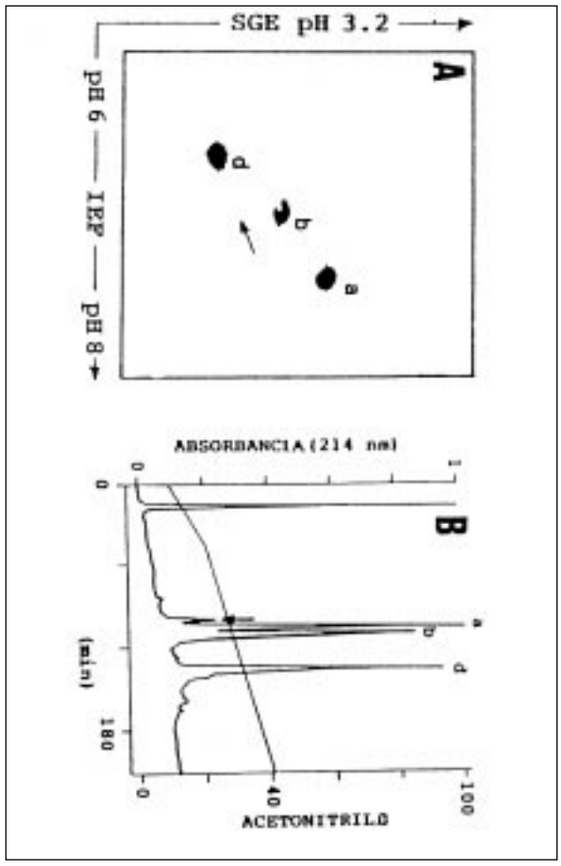

Fig. 10. Aislamiento de la proteína CMb* de la cebada. (A) Mapa de electroforesis bidimensional (IEFxSGE) de la fracción de filtración en gel correspondiente a inhibidores tetraméricos de *Hordeum vulgare* L. cv. Bomi. (B) fraccionamiento del inhibidor tetramérico mostrado en la figura 5A. Se señala en la posición del componente CMb* en el mapa dimensional y el perfil de elución. Las posiciones de subunidades de inhibidor tetramérico BTAI-CMa (a), –CMb (b) y –CMd (d) están también indicadas.

defensa biológica de la parasitación del grano por insectos que utilizan enzimas digestivas como mecanismo de infestación. Así, el alergeno mayor de la cebada era capaz de inhibir la alfa amilasa de *Tenebrio molitor,* parásito habitual del cereal (Fig. 7).

Muchos miembros de esta familia inhibidora de la alfa-amilasa-tripsina procedentes del endosperma del grano de trigo y cebada fueron reconocidos por la IgE específica de nuestros pacientes[23]. Posteriormente, con técnicas de extracción, filtración, electroforesis y HPLC se logró purificar 11 subunidades enzimáticas en cantidad suficiente y concentración adecuada para la realización de pruebas diagnósticas[24] (Figs.8, 9, 10).

Nuestro siguiente propósito fue el investigar en pacientes alérgicos la actividad alergénica de estas 11 proteínas que demostraban diferentes

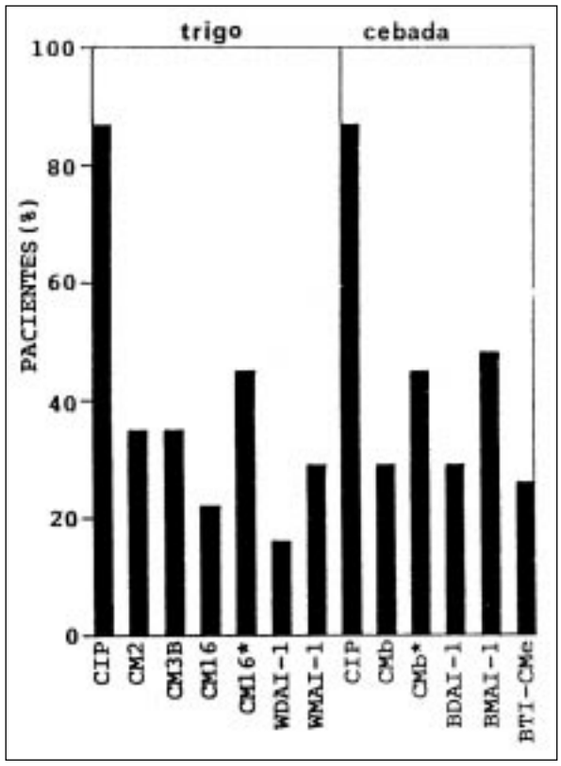

Fig. 11. Porcentaje de pacientes con pricks positivos (área de la pápula = 15 mm^2 a alergenos del trigo y la cebada). CIP: Preparación cruda de inhibidores. Proteínas purificadas del trigo: CM2, CM3B, CM16, CM16*. WDAI-1 y WMAI-1: Proteínas purificadas de la cebada.

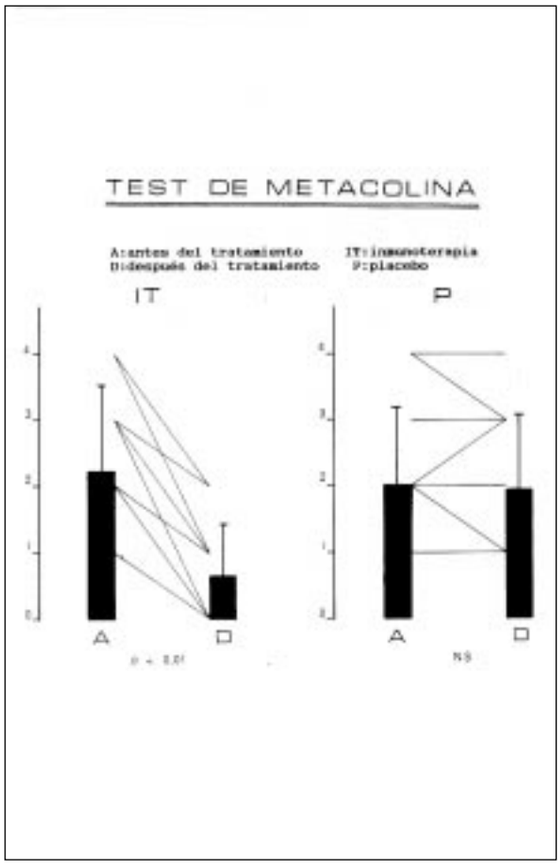

Fig. 12. Evolución de la hiperreactividad bronquial inespecífica tras inmunoterapia con *Lepidoglyphus.*

capacidades de unión de IgE específica en las técnicas de laboratorio, con el fin de demostrar una posible correlación entre la potencia alergénica de estas proteínas purificadas en vivo con nuestros hallazgos previos «in vitro», mediante una técnica objetiva y también en forma doble ciego. Para ello se realizó planimetría de las pápulas obtenidas con las diferentes proteínas en 31 pacientes alérgicos a harinas. Se demostró que las formas glicosiladas de una proteína del trigo llamada WTAI-CM16* y la BMAI de la cebada se comportaron como los alergenos más potentes con una diferencia significativa respecto a las otras proteínas, coincidiendo con las proteínas que habían sido más reactivas en los estudios previos in vitro[25] (Fig. 11).

En resumen, existen muchas proteínas involucradas en la patogenia del asma del panadero, con diferente capacidad de unión de IgE. Parece ser que el carbohidrato de la CM16* es esencial para conferir esta gran capacidad de unión con la IgE en comparación de la baja capacidad de la correspondiente forma no glicosilada. El que esta molécula sea por sí misma un epitopo está aún en investigación. Un hecho importante a destacar es que encontramos 6 pacientes asmáticos con contacto diario con harina que reaccionaban al menos a una proteína purificada de trigo, siendo la prueba cutánea con extracto comercial de trigo y el RAST negativos. Las pruebas a otros alergenos eran negativas, por lo que los pacientes estaban diagnosticados de asma intrínseco. Esto podría significar que un fallo en los medios diagnósticos, posible en extractos como en el de harinas, por su capaci-

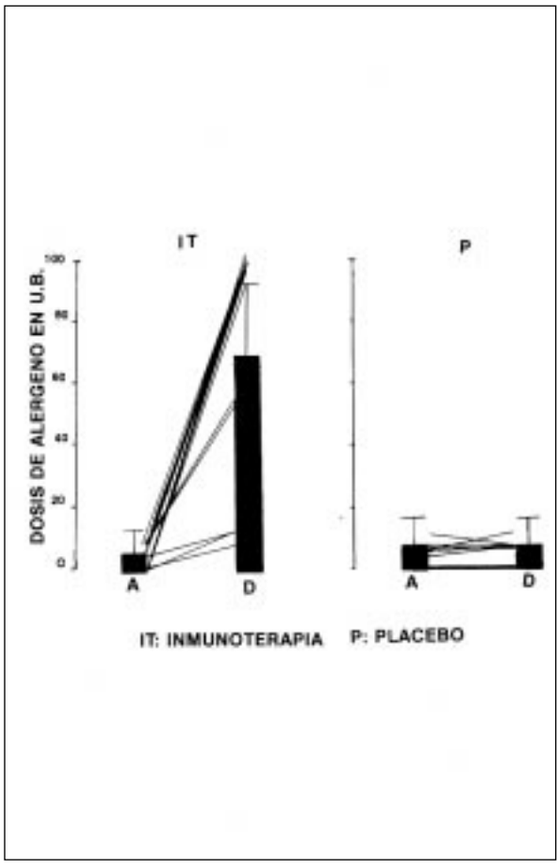

Fig. 13. Evolución de la hiperreactividad bronquial inespecífica tras inmunoterapia con *Lepidoglyphus.*

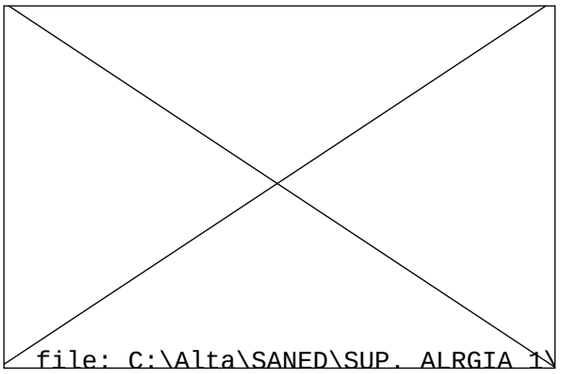

Fig. 14. Eosinófilos en esputo antes del inicio de la inmunoterapia.

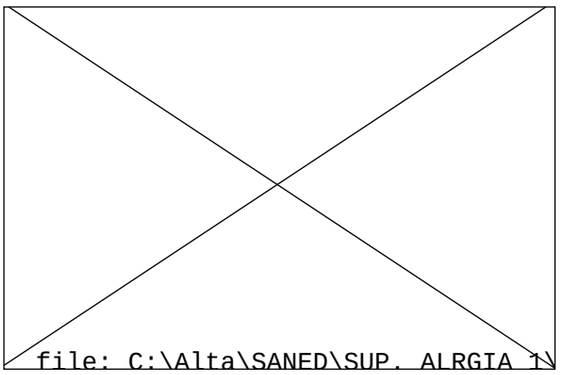

Fig. 15. Eosinófilos en esputo al año (B) del inicio de la inmunoterapia.

dad de autolisis mediada por su gran contenido enzimático, puede llevar a diagnósticos erróneos. En la actualidad, estamos realizando estudios de purificación y prueba in vivo con alergenos purificados de centeno, y nuestro siguiente propósito será valorar la eficacia de IT con estos extractos purificados.

Considerando nuestros datos previos sobre eficacia y seguridad de la IT con extracto crudo de harina de trigo en asma del panadero[5], creemos que la óptima purificación de los alergenos mayoritarios será relevante no sólo para un diagnóstico precoz, sino también para el desarrollo de un tratamiento hiposensibilizante más específico y seguro del asma ocupacional por inhalación de harina de cereales.

INMUNOTERAPIA CON *LEPIDOGLYPHUS DESTRUCTOR*

La eficacia y seguridad del tratamiento hiposensibilizante con *Dermatophagoides* (*Pteronyssinus* y *farinae*) ha sido comprobada en numerosos estudios[13, 14]. Sin embargo, aún no se ha realizado un estudio controlado de inmunoterapia con otros ácaros (ácaros de almacenamiento) de creciente interés alergológico. Los ácaros de almacenamiento más importantes en Alergia pertenecen a las familias Glycyphagidae (*Lepidoglyphus, glycyphagus*, Acaridae (*A. siro, Tyrophagus*) y Corthoglyphidae. En estudios recientes encontramos una importante prevalencia de sensibilización a ácaros de almacenamiento en nuestros agriculto-

Tabla I. Evolución de los diferentes parámetros objetivos utilizados en el control de la inmunoterapia

Parámetro	Grupo con IT X ds	Sf	Grupo con P X ds	Sf
Test Cutáneo	A: 79,27 ± 29,69 D: 31,04 ± 18,56	p<0,01	A: 73,30 ± 30,62 D: 63,54 ± 27,31	NS
Test Conjunt.	A: 28,18 ± 19,91 D: 90 ± 20	p<0,01	A: 46,15 ± 39,47 D: 45,77 ± 34,74	NS
Test Metacolina	A: 2,23 ± 1,31 D: 0,64 ± 0,77	p<0,01	A: 2 ± 1,18 D: 1,92 ± 1,14	NS
Eosinof. en Esp.	A: 27,63 ± 21,79 D: 1,66 ± 3,73	p<0,001	A: 30,54 ± 16,58 D: 29,25 ± 7,15	NS
Estado Subjetivo	A: 2,18 ± 0,65 D: 1,68 ± 0,55	p<0,05	A: 2,77 ± 0,42 D: 2,77 ± 0,42	NS
IgE Total	A: 523,82 ±313,4 B: 519 ±282	NS	A: 391 ±373,4 B: 357,73±223,2	NS
IgE Lp. d.	A: 6,08 ± 8,74 D: 11,64 ± 13,90	p<0,05	A: 5,75 ± 6,83 D: 3,77 ± 4,05	NS
IgG Lp. d.	A: 191,82 ±167,6 D: 305,04 ±161,3	p<0,05	A: 246,31±140,8 D: 209,08±126,8	NS
IgG1 Lp. d.	A: 168,97 ±222,7 D: 386,40 ±347,3	p<0,05	A: 232,08±169,2 D: 177 ±110	NS
IgG4 Lp. d.	A: 7,11 ± 11,55 D: 129,12 ±201,8	p<0,001	A: 35,74 ± 71,52 D: 22, 38 ± 46,28	NS
IgE Lep d I	A: 3,75 ± 4,94 D: 4,18 ± 5,35	NS	A: 1,86 ± 2,35 D: 1,24 ± 1,16	NS
IgG Lep d I	A: 57,5 ± 38,59 D: 133,68 ± 82,98	p<0,001	A: 71,62 ± 29,85 D: 77,25 ± 37,40	NS
IgG1 Lep d I	A: 66,76 ± 72,77 D: 203,14 ±156,3	p<0,01	A: 47,37 ± 46,02 D: 47,37 ±3 6,31	NS
IgG4 Lep d I	A: 5,27 ± 8,04 D: 66,04 ± 85,06	p<0,01	A: 13,20 ± 18,04 D: 26,87 ± 32,78	NS
IgE D. pt.	A: 5,59 ± 6,71 D: 4,78 ± 5,59	NS	A: 4,47 ± 5,07 D: 3,40 ± 3,59	NS
ICC c 1 q	A: 27,90 ± 14,36 D: 31,59 ± 13,41	NS	A: 23,80 ± 7,62 D: 22,07 ± 7,72	NS
ICC c 3d	A: 10,67 ± 11,70 D: 10,60 ± 13,35	NS	A: 11,16 ± 12,23 D: 10,02 ± 11,37	NS

IT: Inmunoterapia; P: Placebo; X: media; ds: desviación estándar; Sf: significación; A: antes del tratamiento; D: después del tratamiento; Conjunt.: conjuntival; Eosinof.: eosinofilia; Lep. d.: Lepidoglyphus destructor; D. pt.: Dermatophagoides pteronyssinus; Le. d. I: alergeno mayor del Lep. d. ICC: Inumunocomplejos; NS: no significativo.

res y panaderos (30% en una muestra de 43 pacientes sensibilizados a la harina de trigo[12]. Esto es lógico si consideramos que estos ácaros normalmente infestan alimentos y vegetales almacenados. Dentro de estos ácaros el mayor índice de sensibilización correspondió a *Lepidoglyphus* (38%)[21] (Fig. 5).

Este hallazgo unido a que este ácaro presenta una escasa reactividad cruzada con los *Dermatophagoides*[26] nos animó a la realización de un estudio de inmunoterapia controlado, basado en medidas objetivas mensurables de seguridad y eficacia[27].

El estudio se planteó en forma doble-ciego controlado con placebo. Se seleccionaron 50 pacientes, de edad comprendida entre 15-50 años (x=31), que presentaban prueba cutánea, IgE específica y provocación positiva a *Lepidoglyphus destructor* (Ld). Quince pacientes no completaron el protocolo de estudio y finalmente 22 pacientes fueron tratados con el extracto desensibilizante y 13 con placebo. Antes, a los 6 meses y a los 12 meses de immunoterapia, se realizaron tests in vivo (prueba cutánea con *Lepidoglyphus* por método Gleich, tests de metacolina por método Chatman, provocación conjuntival según técnica de Hosen, y bronquial de Chai[28], y también tests in vitro (determinación de IgE, IgG, IgG1, e IgG4 a *Lepidoglyphus* y a su alergeno mayoritario LepdI). Así mismo se monitorizó la eficacia y seguridad de la inmunoterapia con controles clínicos y analíticos (baremos de síntomas subjetivos y necesidad de medicación, eosinofilia tisular, detección de inmunocomplejos circulantes ICC).

El 71% de los pacientes eran asmáticos, pero el 60% de los que padecían rinoconjuntivitis tenían una reactividad bronquial inespecífica incrementada. La dosis media de provocación conjuntival positiva fue de 32,28 UB y de provocación bronquial 3,9 UB. Sólo un paciente presentó asma con la primera dosis de máxima concentración del extracto, que fue posteriormente tolerada.

Tras repetir estos tests tras un año de IT pudimos observar los siguientes resultados (Tabla I):

1. Encontramos una disminución significativa (p<0,01) en sensibilidad cutánea a Ld en el grupo de pacientes tratados con IT sin cambios en el grupo control.

Tabla II. Rentabilidad de los diferentes parámetros objetivos utilizados en el control de la inmunoterapia

	Sens. (%)	Espec. (%)	V. Pred + (%)	V. Pred – (%)	Efic. (%)	r	p
Prov. Bron.	76,9	50,0	90,9	25,0	73,7	0,6404	0,01
Metacolin.	87,5	33,3	77,7	50,0	72,7	0,6097	0,01
Eosinofil.	63,1	66,6	92,3	22,2	63,3	0,4919	0,05
Pápula	44,4	16,6	44,4	50,0	45,4	0,0426	n.s.
Prov. conj.	86,7	28,6	72,2	50,0	68,0	0,3409	n.s.
IgG T Ld	50,0	12,5	50,0	12,5	36,3	0,3750	n.s.
IgG4 Ld	53,0	14,0	57,0	12,5	40,0	0,0838	n.s.
IgG1 Ld	35,0	50,0	87,5	0,07	36,0	0,0760	n.s.
IgG T lepd 1	40,0	28,0	54,5	18,0	36,0	0,3351	n.s.
IgG4 lepd 1	72,7	10,0	47,0	10,0	40,0	0,2060	n.s.
IgG1 lepd 1	50,0	20,0	46,0	50,0	47,0	0,0830	n.s.

2. Encontramos disminución significativa en la HRB ($p<0,001$) y en la dosis de alergeno en UB necesaria para reproducir un test de provocación conjuntival positiva en los pacientes que habían recibido IT y no en el grupo control (Figs. 12, 13).

3. Se evidenció una disminución significativa en la eosinofilia tisular tras un año de IT ($p<0,001$), sin cambios en el grupo control (Figs. 14 y 15).

4. El análisis estadístico de la mejoría clínica subjetiva reveló una diferencia significativa entre el grupo tratado y el control ($P<0,01$). Esto se acompañó de un descenso del 89% en los días de baja laboral, sin variación en el grupo tratado con placebo.

5. Los pacientes que recibieron IT presentaron una elevación temprana en la IgE específica ($p<0,05$), IgG ($p<0,05$), IgG1 ($p<0,05$) e IgG4 ($p<0,001$) tras un año de IT. No hubo cambios en el grupo control.

6. Encontramos un aumento significativo de los anticuerpos IgG específicos al antígeno mayoritario de Ld (LepdI): IgG ($p<0,001$); IgG1 ($p<0,01$) e IgG4 ($p<0,01$). No hubo cambios significativos en los niveles de IgE específica.

7. Los niveles de ICC no cambiaron en ninguno de los dos grupos.

Los pacientes que habían recibido tratamiento con IT fueron tratados con dosis de mantenimiento durante 3 años y en el año en curso hemos realizado de nuevo todas las mediciones clínicas y de laboratorio, con el fin de evaluar cuál de los diferentes parámetros utilizados en el control evolutivo de la inmunoterapia era más rentable y cuál de ellos se correlacionaría mejor con la mejoría clínica alcanzada. Con ello, pretendíamos simplificar las pruebas de control de la inmunoterapia a las más específicas, sensibles y eficaces.

Se estudiaron la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y eficacia de las diferentes pruebas objetivas utilizadas en el control evolutivo de la IT. Se utilizó un programa R-Sigma tras aplicar la prueba de Shapiro-Wilk para estudiar la normalidad. Estudiamos las diferencias de las medias de los diferentes tests y lo expresamos a través del coeficiente de correlación de Pearson (que indica la probabilidad de que las pruebas se correlacionaran positivamente con el estadio clínico) (Tablas II y III).

Sólo las pruebas in vivo presentaron rentabilidad positiva. ¿Con qué parámetro nos quedaríamos? Teniendo en cuenta que la sensibilidad según Berkson puede ser denominada como *Utilidad* y la inespecificidad como *Coste*, la técnica más útil sería el tests de metacolina, pero también la de mayor coste. La eosinofilia en esputo es sensible y específica, con un elevado valor predictivo positivo pero es difícil de conseguir según el paciente se va encontrando mejor. La provocación bronquial específica incluye riesgo para el paciente. Para salir de dudas, aplicamos a estas tres pruebas un análisis de varianza. Se utilizó el modelo ANOVA que valoró las diferencias de las 3 pruebas en base a la dispersión de sus resultados, pero que desafortunadamente no demostró diferencias significativas entre las tres técnicas.

Tabla III. Parámetros que resultaron más rentables y eficaces en el control de la eficacia de la inmunoterapia

	Sens. (%)	Espec. (%)	V. Pred +	V. Pred –	Efic.	r	p
Prov. Bron.	76,9%	50,0%	90,9%	25,0%	73,7%	0,6404	0,01
Metacolina	87,5%	33,3%	77,7%	50,0%	72,7%	0,6097	0,01
Eosinofila	63,1%	66,6%	92,3%	22,2%	63,3%	0,4919	0,05

Resultados y conclusiones

Los parámetros que más se correlacionaron con la mejoría clínica subjetiva alcanzada fueron la provocación bronquial, tests de metacolina y eosinofilia en secreciones (Tabla III). Los cambios de los niveles de inmunoglobulinas no se correlacionaron significativamente con el grado de mejoría clínica alcanzada pero destacamos la determinación de IgG4 a Lep d I como la de mayor sensibilidad (72,7%).

Las conclusiones más importantes de este estudio parecen ser las siguientes:

– La provocación bronquial, el tests de metacolina y la eosinofilia en el esputo son los parámetros que mejor determinan la eficaca de la IT.

– El hecho de una mejoría de la hiperreactividad bronquial (HRB) tras tratamiento con IT apoya el que esta HRB era una consecuencia de la exposición al alergeno etiológico y no un patrón previo del asma.

– La IT produjo una disminución del 89% en los días de baja laboral. Al tercer año de IT el 44,5% de los pacientes han sido dados de alta y siguen trabajando en su profesión.

CONCLUSIONES FINALES Y CONSECUENCIAS DE FUTURO

La evitación del alergeno, el tratamiento farmacológico y la inmunoterapia constituyen las únicas medidas de control en la alergia profesional. En la mayoría de los casos, no es posible cambiar de profesión ni evitar el alergeno. No existen estudios que demuestren que el tratamiento medicamentoso únicamente, incluyendo los corticoides, modifique el curso espontáneo de la enfermedad[29]. Así, la morbilidad y mortalidad del asma va aumentando a pesar de los cada vez más potentes y eficaces fármacos antiasmáticos. En el asma crónica, la inflamación prolongada da lugar a obstrucción irreversible del flujo aéreo. La IT ofrece una alternativa útil y nuestros datos apoyan a estudios previos de IT que han demostrado una mejoría de los tests de función pulmonar. El problema de las críticas a la IT es que es un tratamiento aún en desarrollo y todavía poco utilizada. Actualmente, nadie duda de la eficacia y seguridad de las vacunas víricas. Sin embargo, y como ejemplo, uno de los mayores triunfos de la IT, la vacuna antivariólica de Jenner, a la que debemos la erradicación de esta grave enfermedad, sufrió en su época 1796 gran revuelo polémico, y Jenner fue ridiculizado y caricaturizado por la sociedad científica de su tiempo. Aún en nuestros días existen opiniones que ocasionalmente se amparan en el temerario rigor que imprime la ignorancia, y que sin estudios controlados y fiables se consideran como válidas.

Creemos que el principal argumento en pro de establecer un diagnóstico etiológico en las enfermedades alérgicas es la institución de un tratamiento específico. Demostrada la fuente de sensibilización, será necesario aislar y purificar el alergeno principal responsable del asma. Sólo así los alergólogos podremos realizar mejores diagnósticos y una inmunoterapia más específica. Nuestros estudios pretendieron demostrar, con las medidas objetivas más sensibles, que la IT es capaz de lograr una respuesta clínica e inmunológica significativa en nuestros pacientes y que esta respuesta se asocia a una reducción subjetiva de los síntomas y necesidades de tratamiento y a una reducción del absentismo laboral.

BIBLIOGRAFIA

1. Cockcroft, D. W.: Occupational asthma. *Ann Allergy* 1990; 65: 169-75.
2. Popa, V.; George, S. A.; Gavanescu, O.: Occupa-

tional and non-occupational respiratory allergy in bakers. *Acta Allergol* 1970; 25: 159-77.
3. Herxheimer, H.: The skin sensitivity to flour in baker's apprentices. *Acta Allergol* 1973; 28: 42-49.
4. Baldo, B. A.; Wrigley, C. W.: Allergies to cereals. *Adv Cereal Sci Technol* 1984; 6: 289-356.
5. Armentia, A.; Marín, J.; Quintero, A.; et al: Baker's asthma: prevalence and evaluation of immunotherapy with a wheat flour extract. *Ann Allergy* 1991; 65: 265-72.
6. Ohman, J. L.; Findlay, S. R.; Leitermann, K. M.: Immunotherapy in cat-induced asthma. Double-blind trial with evaluation of in vivo and in vitro response. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 82: 1055-68.
7. VanMetre, T.; Marsh, D. G.; Adkinson, N. F.: Immunotherapy with cat asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 82: 1055-68.
8. Lilja, G.; Sundin, B.; Graff-Lonnevig, et al.: Immunotherapy with cat and dog dander extracts. Effects of 2 years of treatment. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 37-44.
9. Hedlin, G.; Graff-Lonnevig, V.; Heilborn, H., et al.: Immunotherapy with cat and dog dander extracts. Effects of 3 years of treatment. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 955-64.
10. Ortolani Pastorello, E.; Moss, R., et al.: Grass pollen immunotherapy: a single year double blind placebo-controlled study in patients with grass pollen-induced asthma and rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 24: 421-31.
11. Mosbech, H.; Dreborg, S.; Frolund, I.: Hyposensitization in asthmatics with mPEG modified and unmodified house dust mite extract. *Allergy* 1989; 44: 499-509.
12. Armentia, A.; Blanco, A.; Martín, J. M., et al.: Rúsh Immunotherapy with a standardized Bermuda grass pollen extract. *Ann Allergy* 1989; 67: 12-21.
13. Bousquet, J.; Michel, F. B.: Specific Immunotherapy in asthma: Is it effective? *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 1-11.
14. Machiels, J. J.; Lebrum, P. M.; Jacquemin, M. G.; Saint-Rémy, J. M. R.: Significant reduction of nonspecific bronchial reactivity in patients with *Dermatophagoides pteronyssinus* sensitive allergic asthma under therapy with allergen-antibody complexes. *Am Rev Resp Dis* 1993; 147: 1407-12.
15. Armentia, A.; Arranz, M.; Martín, J.; et al: Evaluation of immune complexes after immunotherapy with inhalant food extracts. *Ann Allergy* 1992; 69: 441-4.
16. Baldo, B. A.; Wrigley, C. W.: IgE antibodies to wheat flour components. *Clin Allergy* 1978; 8: 109-124.
17. Baldo, B. A.; Krilis, S.; Wrigley, C. W.: Hypersensitivity to inhaled flour allergens. Comparison between cereals. *Allergy* 1980; 35: 45-56.
18. Theobald, K.; Thiel, H.; Kallweit, C.; Ulmer, W.; König, W.: Detection of proteins in wheat flour extracts thant bind human IgG, IgE and mouse monoclonal antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 78: 470-77.
19. Pfeil, T.; Schwabl, U.; Ulmer, W. T.; Konig, W.: Western blot analysis of water-soluble wheat flour (Triticum vulgaris) allergens. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990; 91: 224-31.
20. Panzani, R. C.: Inhalant allergy to arthropds (to the exclusion of mites). *Allergol Immunopathol.* 1994; 22: 28-38.
21. Armentia, A.; Tapias, J. A.; Barber, D.; et al: Sensitization to the storage mite *Lepidoglyphus destructor* in wheat flour respiratory allergy. *Ann Allergy* 1992; 68: 398-403.
22. Barber, D.; Sánchez Monge, R.; Gómez, L.; et al: A barley flour inhibition of insect alfa-amylase is a major allergen asociated with baker's asthma disease. *FEBS Lett* 1989; 284: 119-22.
23. Gómez, L.; Martín, E.; Hernández, D.; et al: Members of the α-amylase inhibitors family from wheat endosperm are major allergens associated with baker's asthma. *FEBS Lett* 1990; 261: 85-88.
24. Sánchez-Monge, R.; Gómez, L.; Barber, D.; López-Otín, C.; Armentia, A.; Salcedo, G.: Wheat and barley allergens associated with baker's asthma: glycosylated subunits of the α-amylase inhibitors family have enhanced IgE-binding capacity. *Biochem J* 1992; 281: 401-05.
25. Armentia, A.; Sánchez-Monge, R.; Gómez, L.; Barber, D.; Salcedo, G.: In vivo allergenic activities of eleven purified members of a major allergen family from wheat and barley flour. *Clin Exp Allergy* 1993: 23.
26. Puerta, L.; Fernández, E.; Caraballo, L.; Lockey, R.: Sensitization to *Blomia tropicalis* and *Lepidoglyphus destructor* in *Dermatophagoides spp*-allergic individuals. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 943-50.
27. Armentia, A.; Martín, J.; Tapias, J.; et al: Immunotherapy with the storage mite *Lepidoglyphus destructor. J Allergy Clin Immunol* 1993; 91: 287.
28. Chai, H.; Farr, R.; Froehlich, L. A.; et al: Standardization of bronchial inhalation challenge procedures. *J Allergy Clin Immunol* 1975; 56: 323-27.
29. Malling, H. J.; Weeke, B. (ed): EAACI Immunotherapy. Position paper. Copenhagen 1992.

Provocación bronquial con *Olea europaea* tras inmunoterapia en pacientes asmáticos monosensibilizados a este polen

A. Lezaun, S. Quirce, A. Beristain, I. Pérez, E. Losada

Servicio de Alergología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid

Desde 1873[1] hasta la actualidad los tests de provocación bronquial específica (TPBE) se han utilizado para el estudio del asma bronquial, contribuyendo al mayor conocimiento de la fisiopatología del asma y por tanto a su mejor tratamiento. El TPBE reproduce los síntomas en el órgano diana estableciendo una relación causa-efecto entre la exposición al alergeno y la respuesta. Sin embargo, su utilización para el diagnóstico etiológico del asma cada vez está más restringido por el continuo progreso de otras técnicas diagnósticas, aunque en algunos casos como el asma ocupacional es una herramienta de gran utilidad en el diagnóstico. Actualmente se utiliza fundamentalmente en investigación: estudios sobre fisiopatología del asma, evaluación de nuevos alergenos y evaluación de la eficacia de la inmunoterapia (IT) o nuevos fármacos antiasmáticos.

La estandarización de los TPBE ha hecho posible que se obtengan respuestas reproducibles, por lo que se utilizan, junto con otros parámetros, en la evaluación de la eficacia de la IT con diferentes alergenos. A pesar de las limitaciones del TPBE, al no reproducir de forma exacta la exposición natural al alergeno, es la forma más aproximada a nuestra disposición para valorar la reactividad bronquial de un paciente ante la presencia de determinado alergeno. Se han realizado estudios controlados en los que se sugiere que la IT con determinados alergenos puede disminuir la sensibilidad del órgano de choque al aumentar la cantidad de alergeno que necesita el paciente para producir una respuesta positiva en el TPBE. Concretamente el grupo de Ohman[2] observa una disminución significativa de PC_{20} alergeno en TPBE con extracto de epitelio de gato en un grupo tratado con IT en relación a un grupo placebo. Además esta disminución se correlacionó de forma significativa con la disminución de PC_{20} alergeno obtenida en los mismos pacientes tras su exposición en una habitación con gatos. Esta correlación lleva a pensar que probablemente la disminución de la reactividad bronquial al extracto de epitelio de gato tras IT indica una disminución de la respuesta bronquial ante la exposición natural a los gatos en los pacientes tratados. En otros estudios controlados se ha observado la disminución de la reactividad bronquial a epitelio de gato tras IT[3-12], aunque en alguno no se ha confirmado[13]. Los resultados con extracto de ácaros son más controvertidos[14-21], pero en la mayoría de los estudios se encuentra la disminución de la reactividad bronquial específica tras IT. Con polen de gramíneas se ha obtenido mejoría de la reactividad bronquial específica tras IT[22, 23].

Se han realizado estudios midiendo la reactividad bronquial inespecífica antes y después de tratamiento con IT. Para el estudio de la reactividad bronquial inespecífica se utilizan varios métodos, siendo el más empleado el que se realiza con agonistas farmacológicos (Metacolina, histamina). Los resultados se expresan como PC_{20} metacolina, aunque es de interés el estudio del nivel de máxima respuesta y de la curva dosis-respuesta. El test de provocación bronquial inespecífica (TPBI) tiene importancia diagnóstica en el asma sobre todo por su alto valor predictivo negativo, pues no es patognomónico del asma. También se utiliza en la valoración inicial y seguimiento de pacientes con asma ocupacional y con fines de investigación. Gran número de los estudios realizados para valorar el efecto de la IT sobre el TPBI no demuestran cambios tras el tratamiento, en concreto tras IT con extracto de ácaros[16, 18], epitelio de perro[6, 10, 13] y epitelio de gato[11-13]. Por otra parte, en otros estudios sí se observa una mejoría significativa del TPBI tras IT con extracto de polen de gramíneas[22, 24], polen de abedul[25] y epitelio de gato[5, 10]. En un estudio reciente[26] la administración de IT con extracto de salsola tuvo efecto protector del incremento postestacional de la hiperreactividad bronquial inespecífica. Los resultados más controverti-

Tabla I. Resultados de las Provocaciones Bronquiales

	PC_{20} Alergeno (BU/ml)						PC_{20} Metacolina (mg/ml)					
	Activo			Control			Activo			Control		
	T0	T2	T3	T0	T2	T3	T0	T2	T3	T0	T2	T3
Media Geométrica	1,05	9,37	6,79	2,64	2,06	3,28	6,45	10,1	7,63	2,96	2,96	2,12
Desviación Estándar	0,68	0,67	0,63	0,54	0,48	0,93	0,68	0,75	0,69	0,57	0,7	0,92
Tamaño	14	14	12	8	7	6	14	14	13	8	8	7

dos de estos estudios se pueden deber a que no se ha podido establecer asociación entre el TPBI y la gravedad del asma o la necesidad de medicación para su control[27-30]. Esto se debe a que lo que medimos con el TPBI es uno de los factores (grado de sensibilidad bronquial) que determinan la severidad de la obstrucción las vías aéreas y que junto con la percepción de cada individuo de esa obstrucción da lugar a la intensidad de los síntomas del asma[31, 32].

Presentamos un estudio sobre la reactividad bronquial inespecífica y específica a polen de Olea europaea en un grupo de pacientes asmáticos monosensibilizados, antes y después de ser tratados con IT con un extracto de *Olea europaea*, en relación a un grupo control no tratado.

MATERIAL Y METODOS

Participaron 22 pacientes (35,5±13,6 años) diagnosticados de asma bronquial extrínseco por hipersensibilidad exclusivamente a polen de olivo. Los pacientes fueron reclutados en el área de Madrid durante los años 1990-92 y no habían sido tratados con IT. Desde octubre de 1992 se administró a 14 pacientes IT convencional con extracto de polen de *Olea europaea* adsorbido en hidróxido de aluminio y estandarizado biológicamente. El contenido en Ole e I del extracto fue medido con anticuerpos monoclonales: 10 BU/ml = 5,5 µg/ml Ole e I (Alergia e Inmunología Abelló S.A.). La dosis media acumulada el primer año fue de 423±293 BU. Posteriormente se administraron dosis de mantenimiento mensuales de 20 BU, excepto de mayo a septiembre en que la dosis fue la mitad. Ocho de los pacientes formaron el grupo control no tratado.

Realizamos test de provocación bronquial con metacolina (TPBI) y TPBE antes del tratamiento (T0-octubre 92), al año (T2-octubre 93) y a los 2 años de inciar el tratamiento (T3-octubre 94).

El TPBI se realizó con metacolina usando el método de inhalación continua a volumen corriente descrito por Cockcroft[33] utilizando un nebulizador DeVilbiss 646 a flujo de entrada de 7 L/min. Se inició la prueba con una concentración de 0,125 mg/ml hasta una concentración máxima de 16 mg/ml y se calculó la PC_{20} metacolina.

El TPBE se realizó 2-3 días después del TPBI. Utilizamos un extracto acuoso de polen de *Olea europaea* del mismo lote y con un contenido en Ole e I igual al utilizado para IT. Se conservó liofilizado siendo reconstituido con suero salino al 0,9% en el momento de realizar la prueba. Se utilizó un método de inhalación de flujo continuo a volumen corriente con nebulizador DeVilbiss 646 a flujo de entrada 7 L/min. y de salida de 0,28 ml/min. Al acudir el enfermo, por la mañana, se realiza espirometría basal comprobando que su FEV_1 es >80%. Se realizan diluciones 1/2 del extracto alergénico en suero salino a partir de la madre (150 BU/ml). Se realiza la titulación punto final en prick y se selecciona la concentración de alergeno con la que se va a iniciar la provocación bronquial, que es aquella con la que se obtiene una pápula de 3 mm. de diámetro. Se inicia la provocación administrando durante 2 minutos suero salino 0,9%. Se realiza espirometría a los 5 y 10 minutos y si no se registra un descenso del FEV_1 >10% se procede a la administración del alergeno. En este momento se realiza una determinación del

Tabla II. Comparación de grupos (Test de Mann-Whitney)

	PC_{20} alergeno	**PC_{20} Metacolina**
T0	p=0,109	p=0,266
T2	**p=0,025**	p=0,076

Tabla III. Evolución de grupos

		T0-T2	**T0-T3**	**T2-T3**
PC_{20} Alergeno	**Activo**	**0,0052**	**0,0076**	0,6969
	Control	0,5781	0,4375	0,6250
PC_{20} Metacolina	**Activo**	0,0858	0,9594	0,1386
	Control	1	0,8438	0,8125

PEFR con el mismo medidor portátil (Mini-Wright) que posteriormente usará el enfermo para realizar las lecturas tardías en su domicilio. Se administran durante 2 minutos concentraciones de alergeno, en orden ascendente, hasta obtener un descenso del FEV_1 >20%. Las mediciones del FEV_1 se realizan a los 5, 10 y 15 minutos de la administración de cada concentración del alergeno. Tras obtener una caída del FEV_1 >20% o tras administrar los 2 minutos de la última concentración se repetirán las espirometrías a los 20, 30 y 60 minutos. En caso de que la caída del FEV_1 se encuentre entre el 15 y 20% se repetirán las espirometrías cada 5 minutos hasta que la caída sea >20% o inferior a 15%. Una vez registrados valores inferiores al 15% se administra la siguiente concentración y si cae >20% la prueba es positiva. Se entrega al enfermo el medidor portátil del PEFR con instrucciones de medirlo cada hora hasta que se acueste y posteriormente a primera hora de la mañana del día siguiente. Al enfermo se le da hoja con instrucciones para el tratamiento y actitud ante posibles reacciones tardías. Se considera reacción tardía positiva cuando la caída del PEFR es >25% del basal.

RESULTADOS

1. TPBE

Todos los pacientes presentaron respuesta inmediata y en el 54% de ellos se acompañó de respuesta tardía.

En T0 la PC_{20} alergeno del grupo activo (media geométrica±desviación estándar) fue de 1,05 BU/ml±0,68 BU/ml con un rango de 0,14 BU/ml a 30,7 BU/ml. En el grupo control fue de 2,64 BU/ml±0,54 BU/ml, con un rango de 0,24 BU/ml a 11 BU/ml (Tabla I). No existieron diferencias estadísticas entre los dos grupos en T0 en PC_{20} alergeno (Tabla II). En T2 la PC_{20} alergeno fue significativamente mayor (p=0,0052, test de Wilcoxon) en el grupo activo (9,37±0,67 BU/ml) que en el grupo control (2,06±0,48 BU/ml) (Tabla III). En el tiempo T3 no hubo cambios significativos en PC_{20} alergeno en el grupo activo (6,79±0,53 BU/ml) ni en el control (3,28±0,93 BU/ml) respecto a T2, aunque la muestra se vio reducida en dos pacientes en cada grupo (Tabla III). Las diferencias entre T0 y T3 se mantienen de forma significativa con p=0,0076 (Test de Wilcoxon) en el grupo activo. En el grupo control no hay diferencias significativas entre T0 y T3.

En T0 el grupo activo presentó reacciones tardías en el 57% (8/14) de los casos y el control en el 37,5% (3/8). Tras un año de IT el grupo activo presentó el 14% (2/14) de reacciones tardías y el control el 14% (1/7) (Tabla IV). Apuntar que uno de los pacientes del grupo control con reacción tardía positiva en T0 se realizó TPBE en T2. La disminución del número de reacciones tardías en el grupo activo de T0 a T2 fue estadísticamente significativa (p=0,014, Test de McNemar). En el grupo control las diferencias no fueron significativas (Tabla V).

2. TPBI

Los resultados de los TPBI (Tabla I) muestran que en T0 las diferencias en la PC_{20} metacolina entre los grupos activo y control no son significativas (Tabla II). Aunque en T2 y T3 la tendencia que se observa es de aumento de la PC_{20} metacolina, y por tanto disminución de la reactividad bronquial inespecífica en el grupo activo, las diferencias entre el grupo activo y el control en PC_{20} metacolina no significativas (Tabla III).

DISCUSION

Este estudio confirma para el polen de olivo (no tengo constancia de otros estudios previos de TPBE tras IT con polen de olivo) los resultados

Tabla IV. TPBE. Reacciones tardías

	T0	T2
Activo	8/14 (57,1%)	2/14 (14,3%)
Control	3/8 (37,5%)	1/7 (14,3%)

Tabla V. TPBE. Reacciones tardías

Evolución grupos	T0-T2 (McNemar)
Activo	p=0,014
Control	p=0,317

obtenidos en otros trabajos sobre la reactividad bronquial específica tras la administración de IT con extracto de otros alergenos (epitelio de gato, polen de gramíneas, ácaros). Se observa que ya en el primer año de tratamiento se produce un aumento significativo de la PC_{20} alergeno y por lo tanto un descenso en la reactividad bronquial ante el estímulo con polen de olivo, en nuestros pacientes. El aumento de la PC_{20} alergeno se mantiene durante el segundo año de tratamiento. A pesar de la gran importancia de esta observación, y debido a que el TPBE no reproduce la exposición natural al polen, la disminución de la reactividad bronquial específica no necesariamente significa que el paciente tenga controlado su asma ante la exposición ambiental (esta exposición puede ser muy prolongada y con niveles variables de granos de polen). Aunque probablemente el que disminuya su reactividad bronquial específica a polen de olivo en TPBE sea indicativo de que también tolere mejor la exposición al polen atmosférico.

En nuestro estudio, tras 1 año con IT con polen de extracto de olivo, la reactividad bronquial inespecífica (medida en PC_{20} metacolina) no experimenta cambios significativos en relación a un grupo control no tratado. Son difícilmente extrapolables los cambios que experimenta el TPBI a mejoría o agravamiento del asma en los pacientes, pues no hay asociación entre la gravedad del asma en cuanto a sintomatología o necesidad de medicación y el grado de reactividad bronquial frente a metacolina. La intensidad de síntomas del asmático está determinada por la severidad de la obstrucción de las vías aéreas y por la percepción subjetiva de esta obstrucción. A su vez la obstrucción de las vías aéreas depende de la intensidad del estímulo, del grado de sensibilidad bronquial y del máximo nivel alcanzable de estrechamiento de la vía aérea. Con la provocación con metacolina sólo medimos una de las facetas de la sensibilidad bronquial. Por tanto, la PC_{20} metacolina sólo nos aporta un dato acerca de la sensibilidad bronquial, que a su vez es sólo uno de los determinantes de la obstrucción de las vías aéreas, que junto con la percepción propia da lugar a la sintomatología del asma. En conclusión, aunque el aumento de la PC_{20} metacolina sería un dato positivo, el que no cambie no significa que no se haya producido un cambio en el asma pues sólo nos aporta una parte de otra parte de los factores involucrados en el asma.

No hay ningún parámetro aislado (in vivo o in vitro) que indique de forma absoluta que la IT esté siendo efectiva en el asma, y los TPB no son una excepción, a pesar de la importancia de la información que nos brindan. Para controlar la eficacia de la IT hay que tener en cuenta otros factores, sobre todo la clínica. Se debe realizar un control de los síntomas, PEFR y consumo de medicación de los pacientes durante la polinización. Además es aconsejable realizar el control de la reactividad cutánea (Prick) que es sencillo de practicar. Por otro lado, dentro de lo posible es conveniente llevar a cabo mediciones de laboratorio que permitan avanzar en el conocimiento de los cambios inmunológicos que ocurren durante la IT cuando esta es efectiva.

En el TPBE nosotros hemos cuantificado las reacciones tardías y la PC_{20} alergeno que mide los cambios de calibre de la vía aérea. El modelo ideal de valoración del TPBE debería incluir mediciones del cambio de la reactividad inespecífica y mediciones de los marcadores de inflamación bien en suero bien en muestras de lavado broncoalveolar o esputo inducido[34].

En conclusión, el tratamiento con IT con extracto de polen de olivo reduce la reactividad bronquial específica (PC_{20} alergeno y reacciones tardías) en los pacientes asmáticos monosensibilizados a polen de olivo. No se observan cambios significativos en la reactividad bronquial inespecífica (PC_{20} metacolina) en estos mismos pacientes tras IT.

BIBLIOGRAFIA

1. Blackey, C. H.: Experimental researches on the cause and natures of catarrhus aestivus. Bailliere, Tindal and Cox, London 1873.
2. Ohman, J. L.; Findlay, S. R.; Leiterman, M.: Immunotherapy in cat-induced asthma: double-blind trial with evaluation of in vivo and in vitro responses. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 74: 230.
3. Bertelsen, A.; Andersen, J. B.; Christensen, J., et al.: Immunotherapy with dog and cat extracts in children. *Allergy* 1989; 44: 330-5.
4. Bousquet, J.; Hejjaoui, A.; Michel, F. B.: Specific immunotherapy in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86: 292-305.
5. Bucur, J.; Dreborg, S.; Einarson, R., et al.: Immunotherapy with dog and cat allergen preparations in dog-sensitive and cat-sensitive asthmatics. *Ann Allergy* 1989; 62: 255-61.
6. Lilja, G.; Sundin, B.; Graff-Lonnevig, V., et al.: Immunotherapy with cat and dog dander extracts. IV. Effects of 2 years of treatment. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 37-44.
7. Valovirta, E., Viander, M.; Koivikko, A., et al.: Immunotherapy in allergy to dog: immunological and clinical findings of a double-blind study. *Ann Allergy* 1986; 57: 173-9.
8. Van Metre, T. E.; March, D. G.; Adkinson, M. F., et al.: Immunotherapy for cat asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 82: 1055-68.
9. Taylor, W. W.; Ohman, J. L. Jr.; Lowell, F. C.: Immunotherapy in cat induced asthma. Double-blind trial with evaluation of bronchial responses to cat allergen and histamine. *J Allergy Clin Immunol* 1978; 61: 283.
10. Sundin, B.; Lilja, G.; Graff-Lonnevig Hedlin, G., et al.: Immunotherapy with partially purified and standardized animal dander extracts. I. Clinical results from a double study on patients with animal asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77: 478.
11. Alvarez Cuesta, E.; Cuesta, J.; Carrillo, T.: Las pruebas de exposición en el seguimiento de la eficacia de la inmunoterapia con neumoalergenos. In: Esp. Alergia (Eds.) Libro de ponencias Madrid 1988: 81-90.
12. Alvarez, E.; Cuesta, J.; Puyana, J.; Cuesta, C.; Blanco: Monoclonal antibody-standardized cat extract immunotherapy: risk-benefit effects from a double-blind placebo study. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 556-66.
13. Rohatgi, N.; Dunn, K.; Chai, H.: Cat or dog induced immediate and late asthmatic responses before and after immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 82: 389-397.
14. Newton, D. A. G.; Maberly, D. J.; Wilson, R.: House dust mite hyposensitization. *Br J Dis Chest* 1978; 72: 21-8.
15. Warner, J. O.; Price, J. F.; Soothill, J. F., et al.: Controlled trial of hyposensitization to *Dermatophagoides Pt* in children with asthma. *Lancet* 1978; 2: 912-5.
16. Formgren, H.; Lanner, A.; Linholm, N., et al.: Effects of immunotherapy on specific and nonspecific sensitivity of the airways. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73: 140.
17. Bousquet, J.; Calvarirac, P.; Guerin, B., et al.: Immunotherapy with a standarized *Dermatophagoides Pt* extract. In vivo and in vitro parameters aftera short course of treatment. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 76: 734-44.
18. Mosbech, H.; Dreborg, S.; Pahlman, I., et al.: Modifications of dusts house allergens by monoethoxypolyethylene glycol. Allergenicity measured by in vitro methods. *Int Arch Applied Immunol* 1988; 85: 145-9.
19. García Ortega, P.; Nerelo, A.; Marrugat, J.; Richart, C.: Decrease of skin and bronchial sensitization following short-intensive scheduled immunotherapy in mite-allergic asthma. *Chest* 1993; 103: 183-87.
20. Van Bever, H. P.; Stevens, W. J.: Suppression of the late asthmatic reaction by hyposensitization in asthmatic children allergic to house dust mite. *Clin Exp Allergy* 1989; 19: 399-404.
21. Van Bever, H. P.; Stevens, W. J.: Evolution of the late asthmatic reaction during immunotherapy and after stopping immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86: 141-6.
22. Armentia, A.; Blanco, A.; Martín, J, M., et al.: Rush immunotherapy with a standardized Bermuda grass pollen extract. *Ann Allergy* 1989; 63: 127.
23. Van Bever, H. P.; Bosmans, J.; De Clerk, L. S.; Stevens, W. J.: Modification of the late asthmatic reaction by hyposensitization asthmatic children allergic to house dust mite *(Dermatophagoides pteronyssinus)* or grass pollen. *Allergy* 1998; 43: 378.
24. Kuna, P.; Alam, R.; Kuzmiska, B.; Rozniecki, J.: The effect of preseasonal immunotherapy on the production of histaminereleasing factor (HRF) by mononuclear cells from patients with seasonal asthma: Results of a double-blind, placebo-control, randomized study. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 816.
25. Rak, S.; Lowhagen, O.; Venge, P.: The effect of immunotherapy on bronchial hyperresponsiveness and eosinophil cationic protein in pollen-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 82: 470.
26. De la Hoz, B.: Rinoconjuntivitis y asma por hipersensibilidad al polen de Salsola, K. (Cheno-

podiaceae): aspectos clinicoinmunológicos y valoración de la inmunoterapia. Tesis doctoral. Madrid 1995.
27. Josephs, L. K.; Greg, I.; Mullee, M. A.; Holgate, S. T.: Non specific bronchial reactivity and its relationship to the clinical expression of asthma. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 350-7.
28. Chabra, S. K.; Gaur, S. N.; Khana, A. K.: Clinical significance of nonspecific bronchial hyperresponsiveness in asthma. *Chest* 1989; 96: 596-600.
29. Brooks, S. M.; Bernstein, I. L.; Raghuprasad, P. K.; Maccia, C. A.; Mieczkowski, Z.: Assessment of airway hyperresponsiveness in chronic stable asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85: 17-26.
30. Olaguibel, J. M.; García Figueroa, B. E.; Quirce, S., et al.: Provocación bronquial con metacolina de acuerdo a un método abreviado y su relación con la expresión clínica del asma. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin* 1992; 7: 119-24.
31. Pauwels, R.; Joos, G.; Van der Straeten, M.: Bronchial hyperresponsiveness is not bronchial asthma. *Clinical Allergy* 1988; 18: 317-21.
32. Sterk, P. J.; Bel, E. H.: Bronchial hyperresponsiveness: the need for the distinction between hypersensitivity and excesive airway narrowing. *Eur Respir J* 1990; 2: 267-74.
33. Cockcroft, D. W.; Killian, D. N.; Mellon, J. J. A.; Hargreave, F. E.: Bronchial reactivity to inhaled histamine: a method and clinical survey. *Clin Allergy* 1977; 7: 235-243.
34. Olaguibel, J. M.; Gacía Figueroa, B. E.; Alvarez, M. J.; Tabar, A. I.: Pruebas de provocación bronquial. Utilidad en el diagnóstico clínico. *Rev Esp Alergol Immunol Clin* 1995; 10: Núm. Extr. 2: 120-129.

Pruebas de provocación bronquial con alergenos en el asma. Aspectos controvertidos

L. Prieto, V. Gutiérrez, J. M. Bertó

Sección de Alergología. Hospital Dr. Peset. Valencia

INTRODUCCION

Las pruebas de provocación bronquial con alergenos comunes[1-4] y con agentes ocupacionales hidrosolubles de alto peso molecular[5], se realizan en clínica mediante la nebulización de concentraciones progresivamente crecientes de los mismos. Para detectar la respuesta se utilizan determinaciones del funcionalismo pulmonar (generalmente el FEV_1). En los asmáticos sensibilizados a un determinado alergeno pueden observarse tres tipos básicos de respuesta durante la prueba de provocación bronquial: inmediata, tardía o dual. La respuesta inmediata se detecta a los 15 a 30 minutos de la inhalación del alergeno y se resuelve habitualmente al cabo de 2-3 horas. Un porcentaje de pacientes desarrollan con posterioridad un nuevo deterioro del funcionalismo pulmonar, que alcanza su grado máximo a las 6-12 horas y que se resuelve generalmente en 24 horas.

Como se esquematiza en la Figura 1, mientras que la respuesta inmediata es predominantemente broncoespástica[6], la respuesta tardía es inflamatoria e induce aumentos persistentes de la hiperrespuesta bronquial inespecífica[7-9]. Estas características de la respuesta tardía han condicionado el que se la considere como un modelo de asma en el laboratorio. En consecuencia, el efecto de determinados fármacos[10-14] y de la inmunoterapia[15] sobre esta respuesta tardía ha recibido gran atención durante los últimos años.

Diferentes autores han investigado la repetibilidad de la respuesta a la provocación bronquial con alergenos[16-19] y los factores que condicionan la intensidad y las características de la misma[20-25]. Parece que la intensidad de la respuesta inmediata está relacionada con el grado de sensibilidad alérgica y de hiperrespuesta bronquial inespecífica[20], pero los datos de la literatura al respecto de la respuesta tardía son discordantes. Algunos estudios han encontrado que los pacientes que presentan respuesta tardía a la provocación con el alergeno son aquellos que muestran un mayor grado de hiperrespuesta inespecífica previo[24, 25] y que la intensidad de la respuesta tardía al alergeno puede predecirse a partir de la respuesta a metacolina,

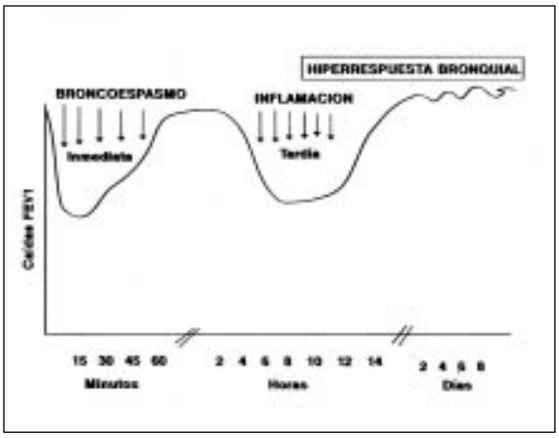

Fig. 1. Conceptos clásicos acerca de la respuesta bronquial a los alergenos. La respuesta inmediata es predominantemente broncoespástica, mientras que la respuesta tardía es inflamatoria e induce aumentos de la hiperrespuesta bronquial inespecífica, que se mantienen durante los días siguientes.

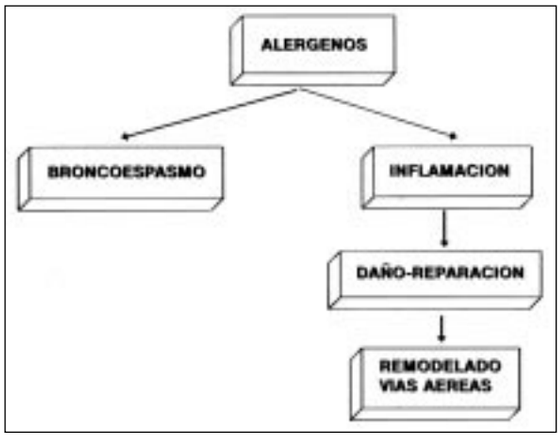

Fig. 2. El papel de los alergenos en el asma. Ver texto.

los valores de IgE específica y el FEV_1 basal[21]. Por el contrario, otros autores no han podido detectar relación entre el grado de hiperrespuesta bronquial inespecífica y la intensidad de la respuesta tardía a la provocación con el alergeno[22, 23].

Durante los últimos años, los conceptos acerca del papel de los alergenos en el asma han cambiado sustancialmente, de forma que, en la actualidad, se les atribuyen dos grandes efectos (Fig. 2).

1. Actuar como desencadenantes de episodios agudos.

2. Inducir y mantener el proceso inflamatorio y los fenómenos de daño-reparación en las vías aéreas[26-37], que conducen al «remodelado» de las mismas[38] y al mantenimiento de la enfermedad.

En la Figura 3 se señalan las alteraciones estructurales que la exposición repetida a los alergenos induce en las vías aéreas y la forma en la que estas modifican la respuesta a estímulos inespecíficos[39, 40].

La protocolización e interpretación de los resultados de las pruebas de provocación bronquial con alergenos se han realizado sin tener en cuenta el papel de estos agentes en el mantenimiento de la inflamación y del daño estructural en las vías aéreas. Además, algunos datos experimentales recientes permiten dudar de ciertas afirmaciones axiomáticas. En la presente revisión nos hemos propuesto reflexionar sobre tres aspectos de la provocación bronquial con alergenos:

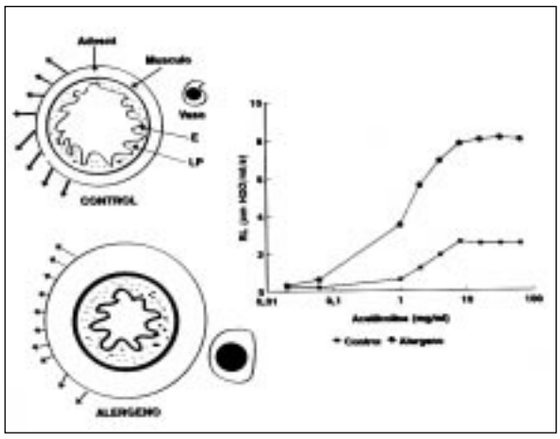

Fig. 3. Alteraciones en las vías aéreas inducidas por exposiciones repetidas a los alergenos. En la parte superior de la figura se representa una vía aérea normal. En la parte inferior se señalan las alteraciones que produce la exposición repetida a los alergenos: vasodilatación, hipertrofia del músculo liso, engrosamiento de la adventicia, fibrosis subepitelial, infiltrado inflamatorio en la lámina propia y reducción de la resistencia ofrecida por el parénquima (flechas) al acortamiento del músculo liso. Estas alteraciones se traducen en un aumento de la respuesta de las vías aéreas a la estimulación mediante agonistas farmacológicos. Tomado de Paré y Bai. *Thorax* 1995; 50: 328-332.

1. La respuesta tardía como inductora de inflamación e hiperrespuesta bronquial.

2. La forma de evaluar la respuesta tardía.

3. Las similitudes y diferencias entre provocación bronquial y exposición natural a los alergenos.

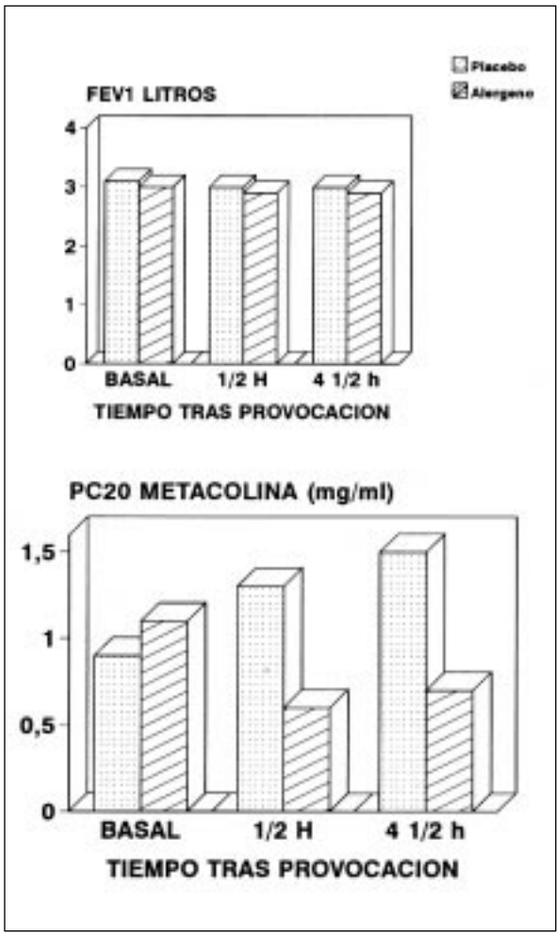

Fig. 4. Un total de 10 pacientes con rinitis y asma alérgicos fueron sometidos a provocación nasal con el alergeno, que no indujo modificaciones del funcionalismo pulmonar (parte superior). Sin embargo, se detectaron descensos significativos de la media geométrica de la PC_{20} metacolina (panel inferior), es decir, aumentos de la respuesta bronquial inespecífica. Por tanto, los alergenos pueden inducir aumentos de la reactividad bronquial sin que se detecte respuesta inmediata ni tardía a los mismos. Modificado de Corren et al. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 611-618.

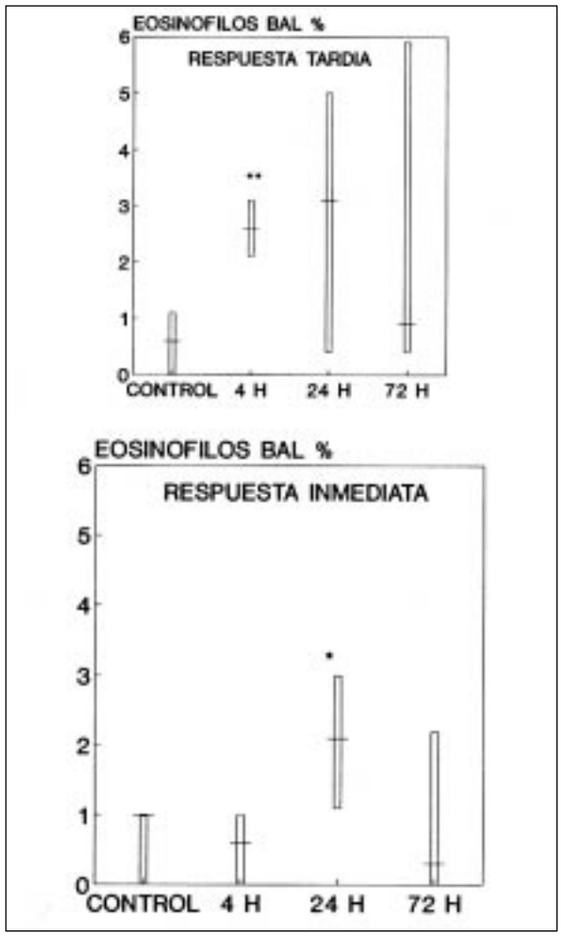

Fig. 5. Proporción de eosinófilos en el BAL en diversos momentos tras la provocación bronquial con el alergeno. Los valores se representan como mediana (línea horizontal) y rango intercuartil. Ver texto.
*: P < 0,05 con respecto a los restantes grupos.
**: P <0,01 con respecto a los controles.
Tomado de Rossi et al. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 379-383.

RESPUESTA TARDIA AL ALERGENO COMO INDUCTORA DE INFLAMACION E HIPERRESPUESTA BRONQUIAL

Se acepta que las características fundamentales del asma son la inflamación y la hiperrespuesta bronquial inespecífica. Puesto que, como se ha señalado anteriormente, la respuesta tardía al alergeno es inflamatoria e induce aumentos de la respuesta bronquial inespecífica, parece razonable aceptar que representa un modelo de asma en el laboratorio.

No obstante, algunos datos recientes permiten dudar de esta afirmación. Son varios los estudios que han detectado aumentos significativos de la respuesta bronquial inespecífica en pacientes con respuestas inmediatas aisladas al alergeno[41-46]. Por

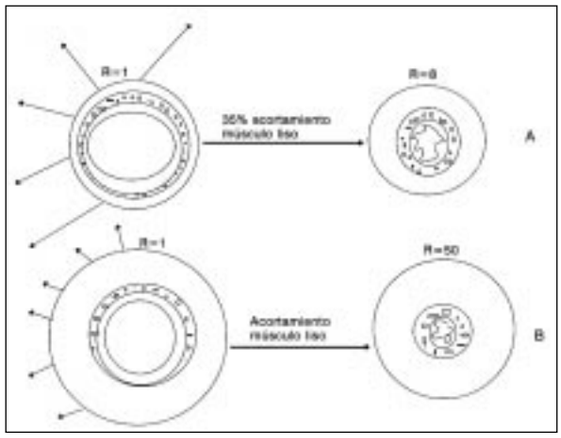

Fig. 6. Alteraciones secundarias al engrosamiento de la adventicia. En la figura se representa una vía aérea intraparenquimatosa. A = Vía aérea control: las flechas representan la resistencia a la contracción ofrecida por el parénquima circundante. La resistencia (R) de esta vía aérea se ha definido arbitrariamente como 1. Si el músculo liso se acorta en un 35% habrá una disminución en el área de la luz y un aumento de la resistencia (R = 8). B = Si la adventicia está engrosada, se distorsionan los anclajes de la misma con el parénquima circundante, con lo que la resistencia a la contracción ofrecida por este último es menor. En consecuencia, una estimulación del músculo liso producirá un mayor acortamiento del mismo y una mayor resistencia (R = 50). Tomado de Paré y Bai. *Thorax* 1995; 50: 328-332.

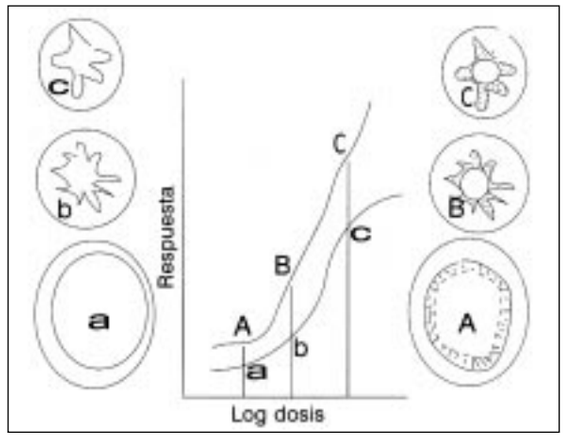

Fig. 7. Influencia de la presencia de líquido intraluminal sobre la respuesta de las vías aéreas a la estimulación mediante agonistas farmacológicos. La contracción del músculo liso bronquial genera recesos en la mucosa bronquial (parte izquierda de la figura). Cuando existe líquido intraluminal (parte derecha de la figura) éste ocupa estos recesos, con lo que disminuye aún más la luz de las vías aéreas. Esto se traduce en una mayor respuesta (parte central de la figura) a la estimulación mediante un agonista farmacológico, que se concreta en un desplazamiento hacia la izquierda de las curvas dosis-respuesta y en una alteración de su morfología. Tomado de Yager et al. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143 (Suppl.): S2-S4.

otra parte, se ha encontrado que las respuestas tardías a la provocación con el alergeno no se siguen sistemáticamente de aumentos de la respuesta bronquial inespecífica[42, 44] y que los incrementos de esta última preceden al inicio de la respuesta tardía[43, 47]. Además, se han podido demostrar aumentos de la respuesta bronquial inespecífica tras la provocación bronquial con el alergeno, en pacientes que no presentaron respuesta inmediata ni tadía[48, 49]. Finalmente, se han detectado aumentos de la respuesta bronquial inespecífica, en pacientes con asma alérgico, tras la provocación nasal con el alergeno al que estaban sensibilizados (Fig. 4), a pesar de que la misma no indujo deterioros valorables del funcionalismo pulmonar[50].

Por otra parte, existen algunos datos experimentales que cuestionan la necesidad de que ocurra respuesta tardía al alergeno para que se detecte la presencia de células inflamatorias en las vías aéreas. En 1991, Rossi et al.[51] publicaron los resultados de un estudio realizado en pacientes asmáticos sensibilizados a ácaros. Les sometieron a provocación bronquial con *D. pteronyssinus* y, al cabo de 4, 24 y 48 horas de la misma, realizaron broncoscopia y lavado broncoalveolar (BAL). Como grupo control se estudiaron pacientes asmáticos, a los que se realizó BAL al cabo de 1 hora de una prueba de provocación bronquial con metacolina. Aquellos pacientes (Fig. 5) con respuesta tardía a la provocación bronquial con *D. pteronyssinus* mostraban porcentajes de eosinófilos en el BAL significativamente mayores que el grupo control al cabo de 4 horas de la provocación, pero no al cabo de 24 y 72 horas. Por el contrario, en los pacientes con respuesta inmediata aislada a la provocación bronquial, el porcentaje de eosinófilos en el BAL estaba significativamente aumentado al cabo de 24 horas de la provocación, con respecto al grupo control, pero no al cabo de 4 y 72 horas. Además, en este último grupo de pacientes, el porcentaje de eosinófilos en el BAL, a las 24 horas de la provocación, fue significativamente más alto que a las 4 y 72 horas. Por tanto, la provocación bronquial con el alergeno se

asoció con un aumento de eosinófilos en el BAL, tanto en los asmáticos con respuesta tardía como en aquellos con respuesta inmediata aislada. La única diferencia observada entre los pacientes con uno u otro tipo de respuesta residía en una acumulación más precoz de eosinófilos en las vías aéreas con respuesta tadía.

Más recientemente, Aalbers et al.[52] encontraron que los asmáticos que presentan respuesta dual a la provocación con *D. pteronyssinus* son aquellos que muestran proporciones mayores de eosinófilos totales y activados (EG2+) en el lavado bronquial (BL). No obstante, estas diferencias no se observaban en el BAL y tampoco hubo diferencias (ni en el BL ni en el BAL) en el número de células CD4+, CD8+ o HLA–DR+ entre uno y otro grupo. Por tanto, parece que el grado y la actividad de la inflamación eosinofílica en las vías aéreas condiciona, en cierta medida, el tipo de respuesta a la provocación con el alergeno.

Con mucha frecuencia, la inflamación del asma se ha identificado con la presencia de células inflamatorias. Sin embargo, la inflamación tiene un importante componente no celular, integrado por la vasodilatación, el edema de la submucosa y adventicia, la fibrosis subepitelial y la presencia de líquido intraluminal. Cada uno de estos componentes no celulares de la inflamación modifican de manera decisiva la geometría de las vías aéreas, su interrelación con el parénquima pulmonar y, en consecuencia, su respuesta a diferentes estímulos[53, 54]. En la Figura 6 se esquematiza el efecto del engrosamiento de la adventicia sobre la resistencia al flujo aéreo, para un determinado grado de acortamiento del músculo liso bronquial[39] y en la Figura 7 se representan las modificaciones que la presencia de líquido intraluminal puede inducir en las curvas dosis-respuesta a la estimulación mediante agonistas farmacológicos[55-57]. Ninguno de estos componentes no celulares del proceso inflamatorio puede identificarse mediante estudios de BAL, BL e incluso biopsia bronquial.

Por otra parte, la presencia de respuesta tardía a la provocación con el alergeno no es un hallazgo constante en cada paciente, sino que, en un mismo individuo, puede detectarse o no en función de la dosis de alergeno que se pueda administrar[58-60], del grado de exposición natural al alergeno en cuestión durante los días previos[61], de la presencia de infecciones respiratorias víricas concomitantes[41, 62] e incluso del momento del día en el que se realiza la exploración[63]. La influencia de algunos de estos factores se ha resumido en las Figuras 8 a 10.

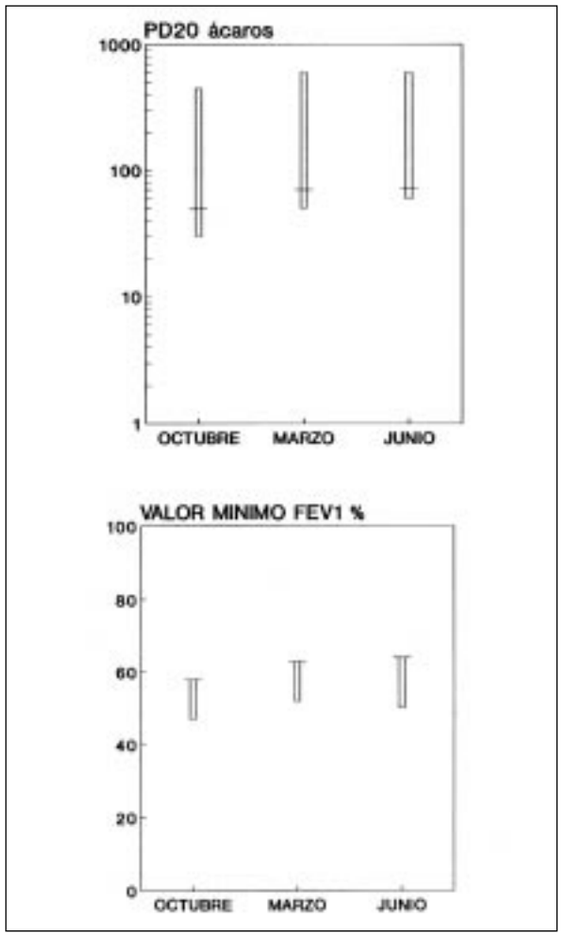

Fig. 8. Influencia de la exposición natural a los ácaros sobre la respuesta a la provocación bronquial con este alergeno.
Se estudió un grupo de niños con asma por ácaros en condiciones de exposición natural (mes de octubre) y tras 6 y 9 meses (marzo y junio) de ausencia total de exposición a este alergeno (a partir del mes de octubre, los niños residieron en alta altitud). Durante los períodos de ausencia de exposición a los ácaros disminuyó la intensidad de la respuesta inmediata (parte superior de la figura) como de la tardía (pate inferior) a la provocación bronquial. Por tanto, parece que la respuesta a la provocación bronquial con el alergeno depende en parte del grado de exposición natural al mismo.
Tomado de Peroni et al. *Am J. Respir Crit Care Med.* 1995; 149: 1442-1446.

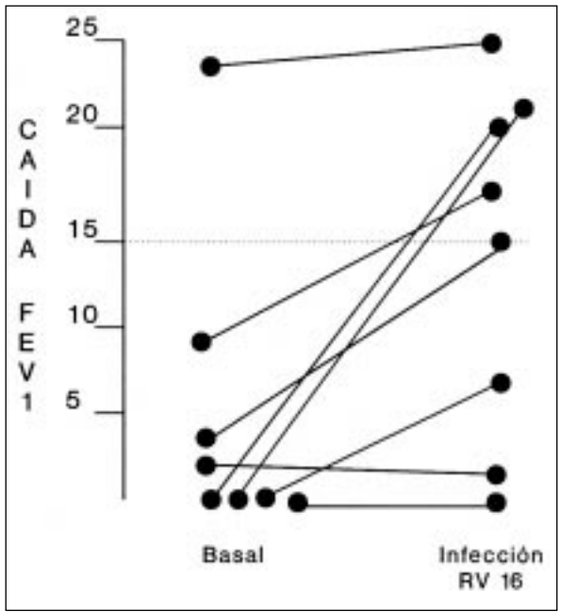

Fig. 9. Modificaciones de la respuesta tardía a la provocación con alergeno, en pacientes con rinitis alérgica, inducidas mediante la infección experimental con rinovirus 16. Cada punto representa la caída máxima del FEV_1 durante la respuesta tardía. Se observa que durante la infección vírica aumenta la intensidad y la prevalencia de esta respuesta.
El gráfico se ha elaborado con los datos de Calhoun et al. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 1267-1273.

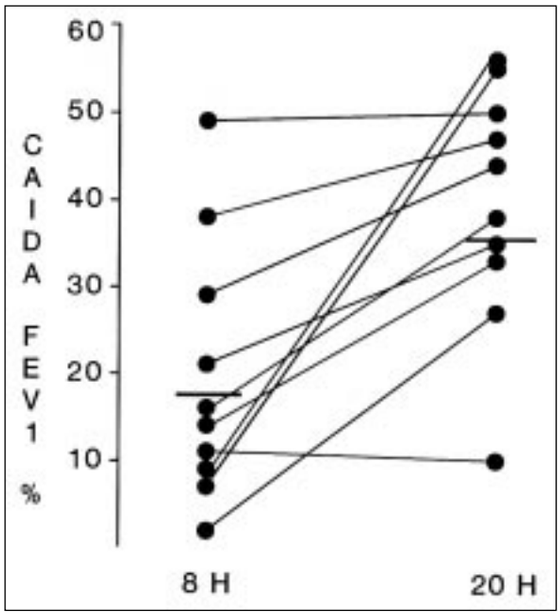

Fig. 10. Variabilidad circadiana de la respuesta tardía a la provocación con el alergeno en 10 pacientes con asma alérgica. La provocación bronquial se realizó por la mañana (8 h) y se repitió por la tarde (20 h). En la figura se representan los deterioros máximos del FEV_1 durante la respuesta tardía al alergeno. Los valores medios (líneas horizontales) de las caídas del FEV_1 por la mañana fueron significativamente menores ($P< 0,05$) que por la tarde. Además, en la exploración de la mañana se detectaron respuestas tardías valorables (caídas del $FEV_1 \geq 15\%$) en 4 pacientes, mientras que por la tarde se observaron en 9 pacientes ($P< 0,05$).
La figura se ha elaborado con los datos de Mohiddin y Martin. *Am Rev Respir Dis* 1990; 132: 1153-1157.

Finalmente, el hecho de que las respuestas tardías al alergeno reviertan casi totalmente mediante la adminsitración de un beta-adrenérgico inhalado[46, 64] permite dudar de que el deterioro del funcionalismo pulmonar durante la respuesta tardía sea achacable al proceso inflamatorio y no sea consecuencia de una respuesta predominantemente broncoespástica.

EVALUACION DE LA RESPUESTA A LA PROVOCACION BRONQUIAL CON EL ALERGENO

La forma de evaluar la respuesta a la provocación bronquial con alergenos es similar a la que se utiliza para detectar la respuesta a otros agentes eminentemente broncoconstrictores, como los agonistas farmacológicos (histamina, metacolina, acetilcolina, carbacol). Por puro mimetismo, se consideran valorables caídas del FEV_1 del 20% para la respuesta inmediata, mientras que, para la respuesta tardía, la mayoría de los autores aceptan un 15% de deterioro del FEV_1 como valorable. Ambos valores se han establecido empíricamente, aunque su utilización sistemática los ha consagrado. Recientemente, se han aportado pruebas de que alteraciones del FEV_1 durante la provocación bronquial con el alergeno inferiores a las señaladas anteriormente pudieran ser relevantes[65].

Independientemente de lo anterior, un aspecto de importancia crucial, en nuestra opinión, es el estudio de la relación entre la intensidad de las alteraciones fisiológicas (funcionalismo pulmonar) y el grado de inflamación aguda inducida por el alergeno durante la prueba de provocación

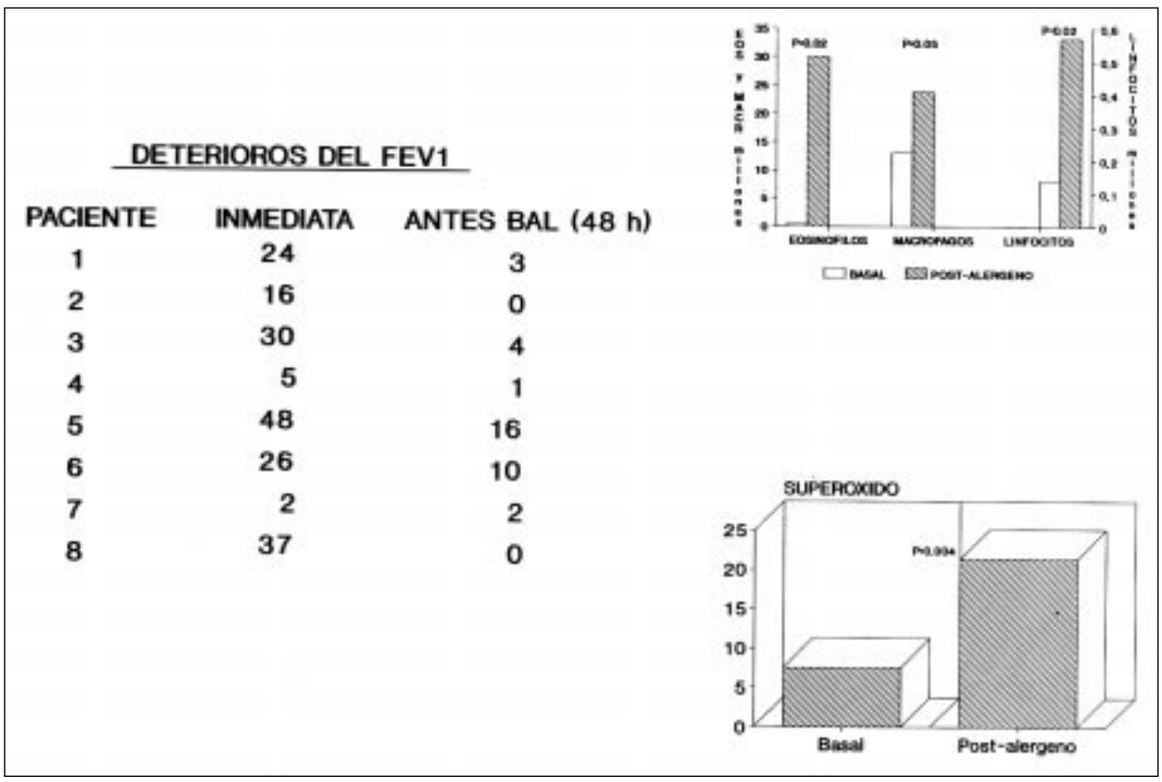

Fig. 11. Efecto de la provocación bronquial con el alergeno sobre parámetros biológicos (número de células y producción de superóxido por células del BAL) y parámetros fisiológicos (FEV_1) al cabo de 48 horas. A pesar de que en el momento en el que se realizó el BAL no se observaban deterioros valorables del FEV_1 (tabla de la izquierda), se detectaba actividad inflamatoria en las muestras del BAL, tanto en lo que se refiere a número de células (eosinófilos, macrófagos alveolares, linfocitos) como a la producción de superóxido. Los datos de producción de SO se expresan en nanomoles/$5x10^6$ células/h.
La figura se ha elaborado con los datos de Calhoun et al. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1465-1471.

bronquial. Es decir, la información que la fisiología aporta acerca de una respuesta eminentemente biológica. Son muy escasos los datos de la bibliografía acerca de esta relación y la mayoría proceden de estudios no diseñados con este objetivo. En 1993, Calhoun et al.[66] publicaron los resultados de un estudio realizado sobre 8 pacientes con rinitis alérgica, sin asma. Estos individuos fueron sometidos a provocación bronquial con el alergeno y se les realizó broncoscopia y BAL basalmente y al cabo de 48 horas de la provocación. Inmediatamente antes de cada BAL se realizó espirometría y, de esta manera, se pudieron comparar funcionalismo pulmonar y células en el BAL. Como se observa en la Figura 11, se detectaron aumentos significativos del número de eosinófilos, macrófagos alveolares y linfocitos en el BAL, así como de la producción de anión superóxido por las células del BAL al cabo de 48 horas de la provocación con el alergeno. Sin embargo, en el momento del BAL, el FEV_1 no mostraba deterioros significativos con respecto al basal. Los resultados de este estudio parecen indicar que las determinaciones del FEV_1 no son suficientemente sensibles como para detectar la presencia de inflamación en las vías aéreas inducida por el alergeno.

Los datos publicados por otros autores parecen orientar también en el mismo sentido. Maestrelli et al.[67] no pudieron encontrar correlación entre el deterioro máximo del FEV_1 durante la respuesta inmediata o tardía a la provocación con TDI y los incrementos en el número de eosinófilos en mues-

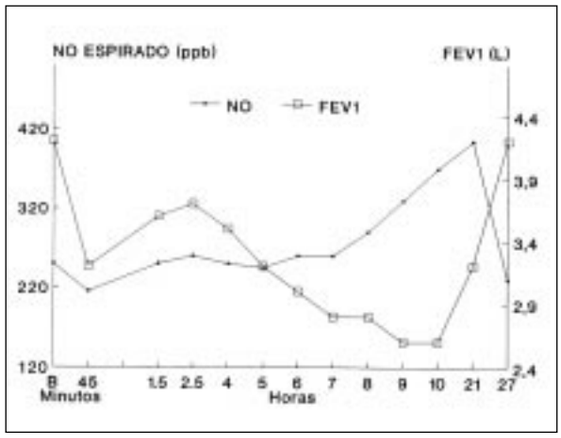

Fig. 12. Oxido nítrico (NO) en aire espirado durante la prueba de provocación bronquial con el alergeno. Ver texto. Tomado de Kharitonov et al. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1894-1899.

tras de esputo inducido obtenidas al cabo de 8 y 24 horas de la provocación. Pin et al.[68] detectaron que la provocación bronquial con el alergeno, en pacientes con asma alérgica, inducía aumentos en el número de eosinófilos y de células metacromáticas en las muestras de esputo inducido. Aunque hubo relación positiva entre el aumento de células metacromáticas y la intensidad de la respuesta tardía, esta última no se correlacionaba con los cambios en el número de eosinófilos. Aalbers et al.[69] detectaron aumentos del número de eosinófilos activados (EG_2+) en la submucosa bronquial al cabo de 3 y 24 horas de la provocación con el alergeno. Sin embargo, no pudieron demostrar relación entre la magnitud de este aumento y los deterioros del FEV_1 durante la respuesta tardía.

Sin embargo, algunos estudios han encontrado relación entre el deterioro del funcionalismo pulmonar durante la respuesta tardía a la provocación bronquial con el alergeno y ciertos marcadores de inflamación. Robinson et al.[70] detectaron relación entre la máxima caída del FEV_1 durante la respuesta tardía y el porcentaje de eosinófilos en el BAL al cabo de 24 horas de la provocación. Igualmente, se ha encontrado relación entre la severidad de la respuesta tardía a la provocación bronquial con el alergeno y los incrementos de células epiteliales en el BAL a las 3 horas de la prueba[71] o el porcentaje de neutrófilos y eosinófilos combinados en el BAL[72].

En conclusión, pueden mantenerse ciertas dudas acerca de que el estudio del funcionalismo pulmonar sea suficientemente sensible para determinar la intensidad de la inflamación, y del daño estructural inducido en las vías aéreas por el alergeno inhalado durante una prueba de provocación. Si se tiene en cuenta que los alergenos inducen en las vías aéreas alteraciones biológicas, que no necesariamente deben traducirse en modificaciones de la resistencia al flujo aéreo, parece evidente la necesidad de identificar marcadores biológicos de inflamación, que permitan monitorizar de manera fiable esta respuesta inflamatoria y que sustituyan a los parámetros fisiológicos, no demasiado sensibles[73, 74]. Aunque algunos marcadores de inflamación parecen potencialmente útiles con esta finalidad[67, 68, 75-77], son necesarios estudios para aclararlo.

Especialmente prometedores parecen los resultados de un estudio reciente publicado por Kharitonov et al.[78]. Estos autores sometieron a provocación bronquial con alergeno a un grupo de 24 pacientes con asma alérgica. Determinaron el FEV_1 y las concentraciones de óxido nítrico en el aire espirado con intervalos frecuentes tras la provocación. Un total de 16 pacientes presentaron respuestas duales a la provocación con el alergeno, mientras que los 8 restantes mostraron respuestas inmediatas aisladas. En los pacientes con respuesta inmediata aislada, no se detectaron modificaciones significativas del óxido nítrico en el aire espirado, excepto un aumento puntual y transitorio al cabo de 21 horas de la provocación. Por el contrario, los pacientes con respuesta tardía (Fig. 12) mostraban aumentos significativos del óxido nítrico en el aire espirado a partir de las 8 horas de la provocación, que se mantenían durante las 13 horas siguientes. Los incrementos de óxido nítrico, en este último grupo de pacientes, coincidían con la respuesta tardía espirométrica, aunque aparecían con un cierto retraso. Hubiera resultado interesante relacionar estas modificaciones del óxido nítrico con las modificaciones en el número y/o activación de las células inflamatorias en el BAL o biopsia bronquial inducidas por el alergeno.

A pesar de estos hallazgos prometedores, el estudio del funcionalismo pulmonar continuará utilizándose en clínica para determinar la respuesta a la provocación bronquial con alergenos, al

menos durante los próximos años. A la vista de las limitaciones de los estudios del funcionalismo-pulmonar, los resultados de la provocación con alergenos deberán de interpretarse con precaución y de manera crítica. En nuestra opinión, no puede mantenerse el que la provocación bronquial con un alergeno aporta una mayor información que el test cutáneo o la determinación de IgE específica acerca de la relevancia de un alergeno concreto en el mantenimiento del proceso. Debe tenerse en cuenta que el hecho de que no se observen deterioros del FEV_1 durante la provocación bronquial con un alergeno no implica que el mismo no haya podido inducir daño estructural en las vías aéreas, que no se manifieste mediante alteraciones en el calibre de las mismas[59].

PROVOCACION BRONQUIAL VERSUS EXPOSICION NATURAL AL ALERGENO

La provocación bronquial con el alergeno en el laboratorio se parece muy poco a la exposición natural. En el curso de la provocación bronquial[1-6, 79, 80] el paciente recibe dosis progresivamente crecientes de un alergeno nebulizadas directamente a la boca (alergenos comunes) o se expone a concentraciones ambientales controladas (agentes ocupacionales y algunos alergenos comunes). En cualquiera de los dos casos, los períodos de exposición son limitados. Por el contrario, durante la exposición natural a los alergenos, los pacientes se exponen de manera reiterada a concentraciones variables del alergeno, durante períodos de tiempo prolongados. Parece importante tener en cuenta las diferencias entre uno y, otro tipo de exposición y, por tanto, conocer que información aporta la provocación bronquial acerca de lo que ocurriría durante la exposición natural a los alergenos. Se dispone de muy pocos datos experimentales sobre este último aspecto.

Una importante proporción de pacientes con rinitis alérgica responden con obstrucción a la provocación bronquial con el alergeno al que se encuentran sensibilizados[81-84], a pesar de que no sufren obstrucción durante los períodos de exposición natural al mismo. Las causas de esta aparente discordancia no están definitivamente establecidas, pero pudieran residir en las diferentes condiciones de exposición.

Por otra parte, parece que la provocación bronquial con un alergeno induce un aumento de la respuesta frente a una segunda provocación con el mismo alergeno, practicada con posterioridad[85-87]. Por tanto, la inhalación del alergeno facilita la respuesta posterior al mismo. Es probable que, en los pacientes con asma alérgica que se exponen al alergeno durante períodos de tiempo prolongados, pueda ponerse en marcha un círculo vicioso, de forma que cada exposición al alergeno aumente la respuesta al mismo en exposiciones posteriores. Los datos publicados recientemente por Peroni et al.[61] parecen apoyar la afirmación anterior. Estos autores (Fig. 8) encontraron que la intensidad de la respuesta inmediata y tardía a la provocación bronquial con ácaros disminuía durante períodos en que los pacientes asmáticos sensibilizados no estaban expuestos a los mismos.

Por tanto, la provocación bronquial con el alergeno en el laboratorio puede no aportar una información adecuada acerca de la forma en la que el paciente responderá a inhalaciones repetidas del mismo, durante períodos de exposición natural. Algunos datos publicados recientemente parecen corroborar esta posibilidad. Ihre et al.[88] han encontrado que, en pacientes con asma alérgica, la exposición en el laboratorio a una dosis diaria de alergeno no suficiente para inducir deterioros del FEV_1 durante 7 días consecutivos, generaba aumentos de la respuesta bronquial inespecífica. Resultados similares se han comunicado más recientemente por Arshad et al.[89]. Estos datos sugieren que dosis de alergeno no suficientes para inducir obstrucción pueden producir cierto daño estructural sobre las vías aéreas. En consecuencia, puede dudarse del axioma de que, para que la sensibilización a un alergeno pueda considerarse relevante en el asma, ha de detectarse una relación entre los síntomas del paciente y la exposición al mismo.

CONCLUSIONES

1. El asociar inflamación e hiperrespuesta bronquial inespecífica a la presencia de respuesta tardía al alergeno puede no ser correcto.

2. Los parámetros fisiológicos (funcionalismo pulmonar) no parecen suficientemente sensibles para detectar la presencia de inflamación inducida por la inhalación del alergeno.

3. La información obtenida de la provocación bronquial con el alergeno en el laboratorio puede no reflejar adecuadamente la respuesta de las vías aéreas al alergeno durante períodos de exposición natural.

4. Los resultados de las pruebas de provocación bronquial con alergenos deben de interpretarse teniendo presentes sus importantes limitaciones.

5. La respuesta tardía a la provocación con el alergeno no parece un modelo aceptable de asma.

BIBLIOGRAFIA

1. Sterk, P. J.; Fabbri, L. M.; Quanjer, Ph. H.; et al: Standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. *Eur Respir J* 1993; (Suppl. 16): 53-83.
2. Melillo, G.; Aas, K.; Cartier, A.; et al: Guidelines for the standardization of bronchial provocation test with allergens. *Allergy* 1991; 46: 321-329.
3. Vives, R.; Hinojosa, M.; Cistero, A. M.: Pruebas de provocación bronquial específicas. En SEAIC (Eds.). Pruebas de provocación bronquial inespecíficas y específicas. Edicomplet. Madrid 1993: 87-109.
4. Spector, S. L.: Allergen inhalation challenges: En: Spector, S. L. (Eds). Provocation testing in clinical practice. Marcel Dekker. New York 1995: 325-368.
5. Cartier, A.; Malo, J. L.: Occupational challenge tests. En: Bernstein, I. L.; Chan-Yeung, M.; Malo, J. L.; Bernstein, D. I. (Eds). Asthma in the workplace. Marcel Dekker. New York 1993: 215-247.
6. Cockcroft, D. W.: Bronchial inhalation tests. II. Measurement of allergic (and occupational) bronchial responsiveness. *Ann Allergy* 1987; 59: 89-98.
7. Cockcroft, D. W.; Ruffin, R. E.; Dolovich, S.; Hargreave, F. E.: Allergen induced increase in non-allergic bronchial reactivity. *Clin Allergy* 1977; 7: 503-513.
8. Cartier, A.; Thomson, N. C.; Frith, P. A.; Roberts, R.; Hargreave, F. E.: Allergen-induced increase in bronchial responsiveness to histamine: relationship to the late asthmatic response and change in airway caliber. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 70: 170-177.
9. Boonsawat, W.; Salome, C. M.; Woolcock, A. J.: Effect of allergen inhalation on the maximal response plateau of the dose-response curve to methacholine. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 565-569.
10. Cockcroft, D. W.; Murdock, K. Y.: Comparative effects of inhaled salbutamol, sodium cromoglycate and beclomethasone dipropionate on allergen-induced early asthmatic responses, late asthmatic responses, and increased bronchial responsiveness to histamine. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 79: 734-740.
11. Burge, P. S.; Efthimou, J.; Turner-Warwick, M.; Nelmes, P. T. J.: Double-blind trials and inhaled beclomethasone dipropionate and fluocortin butyl ester in allergen-induced immediate and late asthmatic reactions. *Clin Allergy* 1982; 12: 523-531.
12. Crimi, E.; Brusasco, V.; Crimi, P.: Effect of nedocromil sodium on the late asthmatic reaction to bronchial antigen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 985-990.
13. Cockcroft, D. W.; Murdock, K. Y.; Gore, B. P.; O'Byrne, P. M.; Manning, P.: Theophylline does not inhibit allergen-induced increase in airway responsiveness to methacholine. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 913-920.
14. Bianco, S.; Pieroni, M. G.; Refini, R. M.; Tottoli, L.; Sestini, P.: Protective effect of inhaled furosemide on allergen-induced early and late asthmatic reactions. *N Engl J Med* 1989; 321: 1069-1073.
15. Van Bever, H. P.; Stevens, W. J.: Suppression of the late asthmatic reaction by hyposensitization in asthmatic children allergic to house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus. Clin Exp Allergy* 1989; 19: 399-405.
16. Crimi, E.; Brancatisano, M.; Villa, G.; Brusasco, V.: Dual asthmatic reactions to inhaled *Dermatophagoides pteronyssinus:* reproductibility and antagonism by cromolyn sodium. *Ann Allergy* 1986; 56: 183-186.
17. Frolund, L.; Madsen, F.; Svendsen, V. G.; Weeke, B.: Reproductibility of standardized bronchial allergen provocation test. *Allergy* 1986; 41: 30-36.
18. Cockcroft, D. W.; Ruffin, R. E.; Hargreave, F. E.: Effect of Sch 1000 in allergen-induced asthma. *Clin Allergy* 1978; 8: 361-372.
19. Frolund, L.; Madsen, F.; Svendsen, V. G.; Nielsen, N. H.; Weeke, B.: Reproducibility of responsiveness to standardised bronchial allergen provocation – Rt compared to FEV_1 as measurement of response to provocation. *Clin Allergy* 1987; 17: 217-228.
20. Cockcroft, D. W.; Ruffin, R. F.; Frith, P. A.; et al: Determinants of allergen-induced asthma: dose of allergen, circulating IgE antibody concentration, and bronchial responsiveness to inhaled histamine. *Am Rev Respir Dis* 1979; 120: 1053-1058.
21. Crimi, E.; Brusasco, V.; Losurdo, E.; Crimi, P.: Predictive accuracy of late asthmatic reaction to *Dermatophagoides pteronyssinus. J Allergy Clin Immunol* 1986; 78: 908-913.
22. Muller, B. A.; Leick, Ch. A.; Smith, R. M.; Snelzer, M. T.; Richerson, H. B.: Comparisons of specific and nonspecific bronchoprovocation in subjects

with asthma, rhinitis, and healthy subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91: 758-772.
23. Machado, L.; Stalenheim, G.: Factors influencing the occurrence of late bronchial reactions after allergen challenge. *Allergy* 1990; 45: 268-274.
24. Mac Intyre, D.; Boyd, G.: Factors influencing the occurrence of a late reaction to allergen in atopic asthmatics. *Clin Allergy* 1984; 14: 311-317.
25. Paggiaro, P. L.; Chan-Yeung, M.: Pattern of specific airway response in asthma due to western red cedar *(Thuja plicata):* relationship with length of exposure and lung function measurement. *Clin Allergy* 1987; 17: 333-339.
26. Rak, S.; Björnson, A.; Häkanson, L.; Sörenson, S.; Venge, P.: The effect of immunotherapy on eosinophil accumulation and production of eosinophil chemotactic activity in the lung of subjects with asthma during natural pollen exposure. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 878-888.
27. Liu, M. C.; Hubbard, W. C.; Proud, D.; et al: Immediate and late inflammatory responses to ragweed antigen challenge of the peripheral airways in allergic asthmatics. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 51-58.
28. Gratziou, Ch.; Carroll, M.; Walls, A.; Howarth, P. H.; Holgate, S. T.: Early changes in T lymphocytes recovered by bronchoalveolar lavage after local allergen challenge of asthmatic airways. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 1259-1264.
29. Crimi, E.; Chiaramondia, M.; Milanese, M.; Rossi, G. A.; Brusasco, V.: Increased numbers of mast cells in bronchial mucosa after the late-phase asthmatic response to allergen. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 1282-1286.
30. Dupuis, R.; Collins, D. S.; Koh, Y. Y.; Albertine, K. H.; Fish, J. E.; Peters, S. P.: Effect of antigen dose on the recruitment of inflammatory cells to the lung by segmental antigen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 850-857.
31. Sedgwick, J. A.; Calhoun, W. J.; Gleich, G. J.; et al: Immediate and late airway response of allergic rhinitis patients to segmental antigen challenge. Characterization of eosinophil and mast cell mediators. *Am Rev Respir Dis* 1992; 144: 1274-1281.
32. Paggiaro, P.; Bucci, E.; Paoletti, P.; et al: Bronchoalveolar lavage and morphology of the airways after cessation of exposure in asthmatic subjects sensitized to toluene diisocyanate. *Chest* 1990; 98: 536-542.
33. Saetta, M.; Maestrelli, P.; Distefano, A.; et al: Effect of cessation of exposure to toluene diisocyanate (TDI) on bronchial mucosa of subjects with TDI-induced astma. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 169-174.
34. Mc Allister, P.; Calhoun, W. J.; Jarjour, N. N.; Sedgwick, J. B.; Busse, W. W.: Comparison of the eosinophil (EOS) response to airway antigen challenge in lavage fluid and mucosal biopsies in allergic rhinitis and asthma patients. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91 (Abstr.): 176.
35. Bentley, A. M.; Durham, S. R.; Robinson, D. S.; et al: Expression of endothelial and leukocyte adhesion molecule-1, E-selectin, and vascular cell adhesion molecule-1 in the bronchial mucosa in steady-state and allergen-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 852-864.
36. Kroegel, C.; Liu, M. C.; Hubbard, W. C.; Lichtenstein, L. M.; Bochner, B. S.: Blood and bronchoalveolar eosinophils in allergic subjects after segmental antigen challenge: surface phenotype, density heterogeneity, and prostanoid production. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 725-734.
37. Maestrelli, P.; Di Stefano, A.; Occari, P.; et al: Cytokines in the airway mucosa of subjects with asthma induced by toluene diisocyanate. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 607-612.
38. Bousquet, J.; Chanez, P.; Lacoste, J. Y.; et al: Asthma: a disease remodeling the airways. *Allergy* 1992; 47: 3-11.
39. Paré, P. D.; Bai, T. R.: The consequences of chronic allergic inflammation. Thorax. 1995; 50: 328-332.
40. Bai, T. B.; Wang, Z. L.; Walker, B.; Paré, P. D.: Chronic allergic inflammation induces replication of airway smooth muscle cells in vivo in guinea pigs. Chest. 1995; 107 (Suppl.): 93.
41. Lemanske, R. F.; Dick, E. C.; Swenson, Ch. A.; Vritis, R. F.; Busse, W. W.: Rhinovirus upper respiratory infection increases airway hyperreactivity and late asthmatic reactions. *J Clin Invest* 1989; 83: 1-10.
42. Malo, J. L.; L'Archevêque, J.; Cartier, A.: Significant changes in nonspecific bronchial responsiveness after isolated immediate bronchospecific reactions caused by isocyanates but not after a late reaction caused by plicatic acid. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 159-165.
43. Aalbers, R.; Kauffman, H. F.; Groen, H.; Koëter, G. H.: de Monchy, J. G. R.: The effect of nedocromil sodium on the early and late reaction and allergen-induced bronchial hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 993-1001.
44. Dellabianca, A.; Bertoletti, R.; Vinci, G.; Marraccini, P., Rossi, G. L.; Moscato, G.: Bronchial reactivity to methacholine increases after immediate response to specific bronchial challenge. *Am Rev Respir Dis*. 1992; 145 (Suppl.): A51 (Abstr.).
45. Tarlo, S. M.: Occupational asthma induced by tall oil in the rubber tyre industry. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 99-101.

46. Malo, J. L.; Ghezzo, H.; L'Archevêque, J.; Cartier, A.: Late asthmatic reactions to occupational sensitizing agents: Frequency of changes in nonspecific bronchial responsiveness and of response to inhaled ß2-adrenergic agent. *J Clin Immunol* 1990; 85: 834-842.
47. Durham, S. R.; Craddock, C. F.; Cookson, W. V.; Benson, M. K.: Increases in airway responsiveness to histamine precede allergen-induced late asthmatic responses. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 82: 764-770.
48. Bar-Sela, S.; O'Schlueter, D. P.; Kitt, S. R.: Sosman, A. J.; Fink, J. N.: Antigen-induced enhancement of bronchial reactivity. *Chest* 1981; 88: 114-116.
49. Kopferschmitt-Kubler, M. C.; Dieteman, A.; Mahr, L.; Frey, F.; Pauli, G.: Significant changes in non specific hyperresponsiveness after negative isocyanate bronchial challenge tests in exposed symptomatic workers. *Am Rev Respir Dis* (Abstr.). 1992; 145 (Suppl.): A504.
50. Corren, J.; Adinoff, A. D.; Irvin, Ch. G.: Changes in bronchial responsiveness following nasal provocation with allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 611-618.
51. Rossi, G. A.; Crimi, E.; Lantero, S.; et al: Late-phase asthmatic reactions to inhaled allergen is associated with early recruitment of eosinophils in the airways. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 379-383.
52. Aalbers, R.; Kauffman, H. F.; Vrugt, B.; et al: Bronchial lavage and bronchoalveolar lavage in allergen-induced single early and dual asthmatic responders. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 76-81.
53. Moreno, R. H.; Hogg, J. C.; Paré, P. D.: Mechanics of airway narrowing. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: 1171-1180.
54. Macklem, P. J.: A hypothesis linking bronchial hyperreactivity and airway inflammation: implications for therapy. *Ann Allergy* 1990; 64: 113-116.
55. Yager, D.; Shore, S.; Drazen, J. M.: Airway luminal lipid. Sources and role as an amplifier of bronchoconstriction. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143 (Suppl.): S52-S54.
56. Yager, D.; Cloutier, T.; Feldman, H.; Bastack, J.; Drazen, J. M.; Kamm, R. D.: Airway surface liquid thickness as a function of lung volume in small airways of the guinea pig. *J Appl Physiol* 1994; 77: 2333-2340.
57. Yager, D.; Kamm, R. D.; Drazen, J. M.: Airway wall liquid. Sources and role as an amplifier of bronchoconstriction. Chest 1995; 107 (Suppl): 105S-110S.
58. Lai, Ch. K. W.; Twentyman, O. P.; Holgate, S. T.: The effect of an increase in inhaled allergen dose after rimiterol hydrobromide on the occurrence and magnitude of the late asthmatic response and the associated change in nonspecific bronchial responsiveness. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 917-923.
59. Lai, C. K. W.; Beasley, R.; Holgate, S. T.: The effect of an increase in inhaled allergen dose after terfenadine on the occurrence and magnitude of the late asthmatic response. *Clin Exp Allergy* 1989; 19: 209-216.
60. Frolund, L.; Madsen, F.; Scharling, B.; Heinig, J. H.; Svendsen, V. G.: Bronchial allergen challenge: dose versus concentration. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 219-225.
61. Peroni, D. G.; Boner, A. L.; Vallone, G.; Antolini, I.; Warner, J. O.: Effective allergen avoidance at high altitude reduces allergen-induced bronchial hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 1442-1446.
62. Calhoum, W. J.; Swenson, Ch. A.; Dick, E. C.; Schwartz, L. B.; Lemanske, R. F.; Busse, W. W.: Experimental rhinovirus 16 infection potentiates histamine release after antigen bronchoprovocation in allergic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 1267-1273.
63. Mohiuddin, A. A.; Martin, R. J.: Circadian basis of the late asthmatic response. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 1153-1157.
64. Twentyman, O. P.; Holgate, S. T.: Reversibility of the allergen-provoked late asthmatic response by an inhaled ß2-adrenoceptor agonist. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 245-249.
65. Stenson, S. C.; Avery, A. J.; Walters, E. H.; Hendrick, D. J.: Statistical approaches to the identification of late asthmatic reactions. *Eur Respir J* 1994; 7: 806-812.
66. Calhoum, W. J.; Jarjour, N. N.; Gleich, G. J.; Stevens, C. A.; Busse, W. W.: Increased airway inflammation with segmental versus aerosol antigen challenge. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1465-1471.
67. Maestrelli, P.; Calcagni, P. G.; Saetta, M.; et al: Sputum eosinophilia after asthmatic responses induced by isocyanates in sensitized subjects. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 29-34.
68. Pin, I.; Freitag, A. P.; O'Byrne, P. M.; et al: Changes in the cellular profile of induced sputum after allergen-induced asthmatic responses. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 1265-1269.
69. Aalbers, R.; de Monchy, J. G. R.; Kauffman, H. F.; et al: Dynamics of eosinophil infiltration in the bronchial mucosa before and after the late asthmatic reaction. *Eur Respir J* 1993; 6: 840-847.
70. Robinson, D.; Hamid, Q.; Bentley, A.; Ying, S.; Kay, A. B.: Durham, S. R.: Activation of CD4+ T cells, increased T_{H2}-type cytokine mRNA expres-

sion, and eosinophill recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 313-324.
71. Aalbers, R.; Kauffman, H. F.; Vrugt, B.; Koëter, G. H.; de Monchy, J. G. R.: Allergen-induced recruitment of inflammatory cells in lavage 3 and 24 h after challenge in allergic astmatic lungs. Chest 1993; 103: 1178-1184.
72. Smith, H. R.; Larsen, G. L.; Cherniack, R. M.; et al: Inflammatory cells and eicosanoid mediators in subjects with late asthmatic responses and increases in ariway responsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 1076-1084.
73. Costabel, V.; Kroegel, C.: Pulmonary immune cells: villains and confederates: *Eur Respir J* 1993; 6: 1083-1084.
74. Barnes, P. J.: The fate of respiratory physiology. *Eur Respir J* 1994; 7: 635-636.
75. Dohlman, A. W.; Black, H. R.; Royall, J. A.: Expired breath hydrogen peroxide is a marker of acute airway inflammation in pediatric with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 955-960.
76. Alving, K.; Weitzberg, E.; Lundberg, J. M.: Increased levels of nitric oxide in exhaled air of asthmatic. *Eur Respir J* 1993; 6: 1368-1370.
77. Kharitonov, S. A.; Yates, D.; Robbins, R. A.; Logan-Sinclair, R.; Shinebourne, E.; Barnes, P. J.: Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994; 343: 133-135.
78. Karitonov, S. A.; O'Connor, B. J.; Evans, D. J.; Barnes, P. J.: Allergen-induced late asthmatic reactions are associated with elevation of exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1894-1899.
79. Eggleston, P. A.; Newill, C. A.; Ansari, A. A.; et al: Task-related variation in airborne concentrations of laboratory animal allergens: studies with Rat n I. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84: 347-352.
80. Wood, R. A.; Eggleston, P. A.: Environmental challenges to animal allergens. En: Spector S. L. (Eds). Provocation testing in clinical practice. Marcel Dekker. New York. 1995: 369-381.
81. Townley, R. G.; Dennis, M.; Itkin, I. M.: Comparative action of acetyl-beta-methylcholine, histamine, and pollen antigens in subjects with hay fever and patients with bronchial asthma. *J Allergy* 1965; 36: 121-137.
82. Bruce, C. A.; Rosenthal, R. R.; Lichtenstein, L. M.; Norman, P. S.: Quantitative inhalation bronchial challenge in ragweed hay fever patients: a comparison with ragweed-allergic asthmatics. *J Allergy Clin Immunol* 1975; 56: 331-337.
83. Ahmed, T.; Fernández, R. J.; Wanner, A.: Airway responses to antigen challenge in allergic rhintis and allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 67: 135-145.
84. Stevens, W. J.; van Bever, H. P.: Frequency and intensity of late asthmatic reactions after bronchial challenge in asthma and rhinitis. *Allergy* 1989; 44: 471-476.
85. Rasmussen, T. B.: Late airway response increases at repeated allergen challenge. *Allergy* 1991; 46: 419-426.
86. Koh, Y. Y.; Lim, H. S.; Min, Y. G.: Airways of allergic rhinitics are «primed» to repeated allergen inhalation challenge. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 337-346.
87. Cockroft, D. W.; Ruffin, R. E.; Hargreave, F. E.: Appearance of allergen-induced increases in airway responsiveness only after repeated allergen inhalations in two subjects. *Clin Exp Allergy* 1989; 19: 225-227.
88. Ihre, E.; Zetterström, O.: Increase in non-specific bronchial responsiveness after repeated inhalation of low doses of allergen. *Clin Exp Allergy* 1993; 23: 298-305.
89. Arshad, S. H.; Hamilton, R. G.; Adkinson, N. F.: Repeated exposure to small does of allergen in sensitized individuals. A model for chronic allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* (Abstr.). 1995; 95: 215.