

Expertos Invitados

● LINFOCITOS T COOPERADORES EN PACIENTES CON RINITIS ALERGICA Y ASMA EXTRINSECA TRATADOS CON INMUNOTERAPIA

Columnista Experto de SIIC

Dr. Daniel Aguilar Angeles

Jefe de Departamento. Alergia e Inmunología Clínica, México D.F., México

Introducción

La hiperfuncionalidad de los linfocitos Th2 es una característica inherente a las enfermedades alérgicas, en las que encontramos una elevación de las interleucinas (IL) proinflamatorias, entre ellas IL4, IL5, IL10, IL13 e IL18,¹⁻⁵ con una disminución de las interleucinas antiinflamatorias como la IL-2, interferón gamma (IFN- γ) e IL12, producidas por los linfocitos Th1.⁶⁻⁹

Esta disfunción celular se ha podido estudiar mejor en la alergia respiratoria, especialmente en la sensibilización a los ácaros del polvo casero¹⁰ y al polen de abedul.¹¹ Los pacientes que presentan rinitis alérgica (RA) o asma alérgica o extrínseca (AA) sensibles a estos alérgenos han sido un buen modelo para estudiar los mecanismos celulares y moleculares que regulan estas alteraciones.

La inmunoterapia específica es una importante opción de tratamiento en pacientes cuyas medidas de control del medio ambiente son ineficientes. La eficacia de la inmunoterapia a largo plazo se demostró en diversos estudios clínicos.^{12,13}

Se han logrado varias modificaciones en la respuesta inmune en enfermos sometidos a regímenes de inmunoterapia, se produce una estimulación de los linfocitos Th1 a expensas de una inhibición de los linfocitos Th2, lo que equilibra la inmunorregulación. Este efecto puede ser detectado midiendo la producción de sus respectivas citocinas.¹⁴⁻¹⁶

Las interleucinas 4 (IL-4) y 10 (IL-10) son las citocinas más relevantes producidas por los linfocitos Th2, cuyos efectos se ven reflejados principalmente en la hipergammaglobulinemia de IgE y la agresión eosinofílica a los tejidos de los órganos blanco.¹⁷⁻¹⁹ El IFN- γ es uno de los más importantes mediadores de las células Th1, al estimular la proliferación y diferenciación de los linfocitos Th1 y neutralizar la hiperrespuesta Th2 que se presenta en este tipo de pacientes;²⁰⁻²⁴ en los pacientes con RA y AA está disminuido el IFN- γ y con la inmunoterapia se restablece.

La inmunoterapia específica con el alérgeno es el único método curativo en la alergia también específica tipo I.²⁵⁻²⁷ Los cambios en la respuesta en las células T ante sus antígenos respectivos en esta hipersensibilidad han sido ampliamente corroborados,²⁸⁻³⁰ por lo cual nosotros quisimos sumarnos a estos hallazgos que nos indican la regulación entre los linfocitos.

Objetivos

Contabilizar los niveles de linfocitos Th1 y Th2 inicialmente y evaluar la forma de regularse la respuesta después del tratamiento con inmunoterapia mono-específica, mediante la cuantificación de citocinas intracelulares en pacientes con rinitis alérgica y asma extrínseca.

Material y método

Pacientes

Se seleccionaron 10 pacientes (6 con rinitis y 4 con asma) diagnosticados clínicamente y por análisis de laboratorio con edades entre 15 y 45 años, de uno u otro sexo, habitantes de la ciudad de México. Se incluyeron 10 testigos sanos, sin antecedentes de alergia, dentro del mismo rango de edad y sexo.

Tratamiento

Al grupo de pacientes se le administró por vía subcutánea dosis crecientes del alérgeno *D. pteronyssinus* (10 000 AU/ml [Dome-Hollister Stier]) empezando con una dosis dos veces por semana de una dilución 1:10 000 hasta llegar a una dilución de 1:100, lo que logramos en 52 semanas sin que los pacientes tuvieran efectos adversos.

Se tomó una muestra de sangre periférica con anticoagulante antes del tratamiento y al finalizar éste.

Evaluaciones inmunológicas

Se midió la síntesis de citocinas intracelulares en los linfocitos T. Para los Th1 se midió IFN- γ -FITC (B-D). Para los Th2 la IL4 -PE (B-D), IL-10-PE (Serotec) e IL13 -PE (B-D). También se evaluaron los linfocitos que sintetizaban IL-10, si expresaban CD4 (anti-CD4-FITC, B-D) o CD8 (anti-CD8-FITC, B-D). Se utilizó citometría de flujo y anticuerpos monoclonales para hacer estas evaluaciones.

Técnica para medir citocinas intracelulares

1 -

Obtener muestra de sangre periférica con anticoagulante (heparina).

2 - Colocar 0.5 ml de la muestra y 0.5 ml de medio de cultivo AIM-V en cuatro pozos estériles de una placa de cultivo.

3 - Adicionar a cada pozo los siguientes reactivos:

a) PMA (Phorbol 12 Myristate 13 Acetate), (25 ng) e ionomicina (1 μ g)

b) PMA, ionomicina y brefeldina (10 μ g)

c) El estímulo antigénico (*D. pteronyssinus*), previamente estandarizado.

d) Solo brefeldina (basal).

4 - Incubar durante cuatro horas en atmósfera de CO₂.

5 - Transcurrido ese tiempo, tomar una muestra de 60 μ l de cada pozo y colocarla en tubos a los cuales se les adicionó previamente el anticuerpo anti-CD3- PerCP.

6 - Incubar 15 min a temperatura ambiente.

7 - Adicionar el reactivo de lisis e incubar 10 minutos.

8 - Centrifugar y después adicionar PBS, centrifugar y eliminar el sobrenadante.

9 - Adicionar la solución permeabilizadora de la membrana e incubar 20 minutos.

10 - Lavar con PBS y adicionar 5 μ l de cada uno de los siguientes anticuerpos:

a) Al primer tubo control de isotipo γ -1-FITC, γ -2 PE (B-D) y CD3 - PerCP (B-D), la muestra sanguínea se tomó del pozo a.

b) Al segundo tubo, anti-CD69-PE (B-D), la muestra sanguínea se tomó del pozo b.

c) Al tercer tubo, anti-IFN- γ -FITC y anti-IL-10 -PE, la muestra sanguínea se tomó del pozo b.

d) Al cuarto tubo, anti-IFN- γ -FITC y anti-IL-10-PE, la muestra sanguínea se tomó del pozo c.

e) Al quinto tubo, anti-IFN- γ -FITC y anti-IL-10-PE, la muestra sanguínea se tomó del pozo d.

11 - Incubar 30 minutos a temperatura ambiente y lavar con PBS.

12 - Resuspender en solución de paraformaldehído al 1 % en PBS.

13 - Leer en el citómetro de flujo con un programa de tres colores.

Resultados

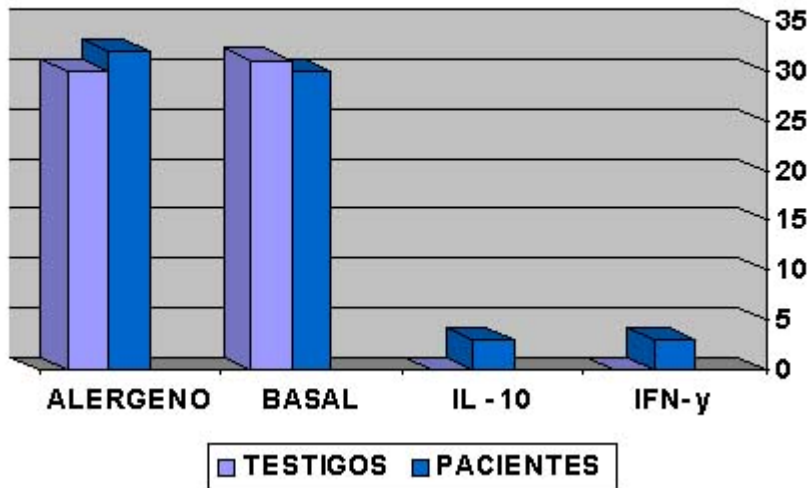
Los linfocitos Th2 de los pacientes –después de estimularlos con el alérgeno sin haber sido sometidos a inmunoterapia– no sintetizaron IL-4 (0.89 ± 1.4) ni IL-13 (0.80 ± 1.3), únicamente IL-10 e IFN- γ , la IL-10 obviamente no se sintetizó en el grupo de testigos sanos.

Los Th1 sólo produjeron bajas concentraciones de IFN- γ (Tabla I, Gráfica I).

TABLA 1. IL-10 E IFN- γ EN PACIENTES CON ASMA Y RINITIS ANTES DEL TRATAMIENTO.

	ALERGENO	BASAL	IL - 10	INF- γ
TESTIGOS	30.2	30.4	-0.2	0.0
PACIENTES	33.1	30.0	3.1	2.8

GRAFICA I. IL - 10 E INF γ CON RINITIS Y ASMA EXTRINSECA ANTES DEL TRATAMIENTO.

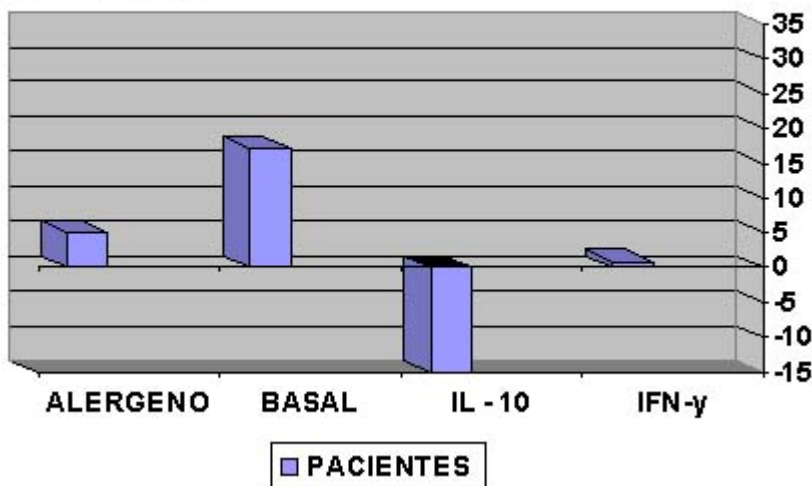


En ambas subpoblaciones de linfocitos T después de empleo de la inmunoterapia específica encontramos que la IL-10 disminuye hasta en un 28.3% en comparación con el valor de estimulación con el alergen (Tabla II, Gráfica II).

TABLA 2. IL-10 E INF- γ EN PACIENTES CON ASMA Y RINITIS DESPUES DEL TRATAMIENTO.

	ALERGENO	BASAL	IL - 10	INF- γ
PACIENTES	4.8	18.1	-13.5	0.01

GRAFICA II. IL - 10 E INF γ CON RINITIS Y ASMA EXTRINSECA DESPUES DEL TRATAMIENTO.



Observamos que INF- γ se detectó en niveles bajos antes del tratamiento y disminuyó aun mas después de la inmunoterapia (tabla I, Gráfica II, tabla II, Gráfica II). Al realizar estudios *in vitro* estimulando los linfocitos con PMA encontramos que los pacientes tienen clones capaces de responder a un estímulo que los induzca a dividirse y sintetizar citocinas (Tablas III y IV) (Gráficas III y IV).

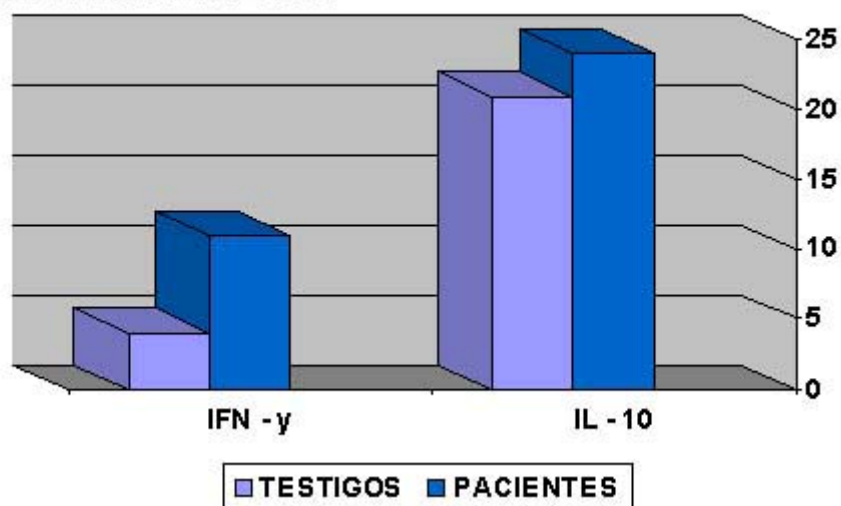
TABLA 3. ESTIMULACION DE LINFOCITOS COM PMA ANTES DEL TRATAMIENTO.

	IFN- γ	IL - 10
TESTIGOS	4.4 \pm 5	21.8 \pm 23
PACIENTES	11.4 \pm 8	24.3 \pm 18

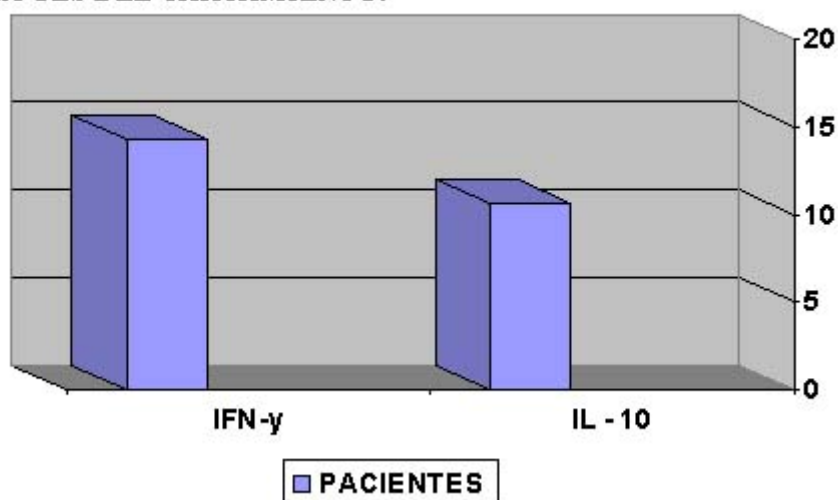
TABLA 4. ESTIMULACION DE LINFOCITOS COM PMA DESPUES DEL TRATAMIENTO

	IFN- γ	IL - 10
PACIENTES	14.3 \pm 8	10.6 \pm 15

GRAFICA III. ESTIMULACION DE LINFOCITOS T CON PMA ANTES DEL TRATAMIENTO.



GRAFICA IV. ESTIMULACION DE LINFOCITOS T CON PMA DESPUES DEL TRATAMIENTO.

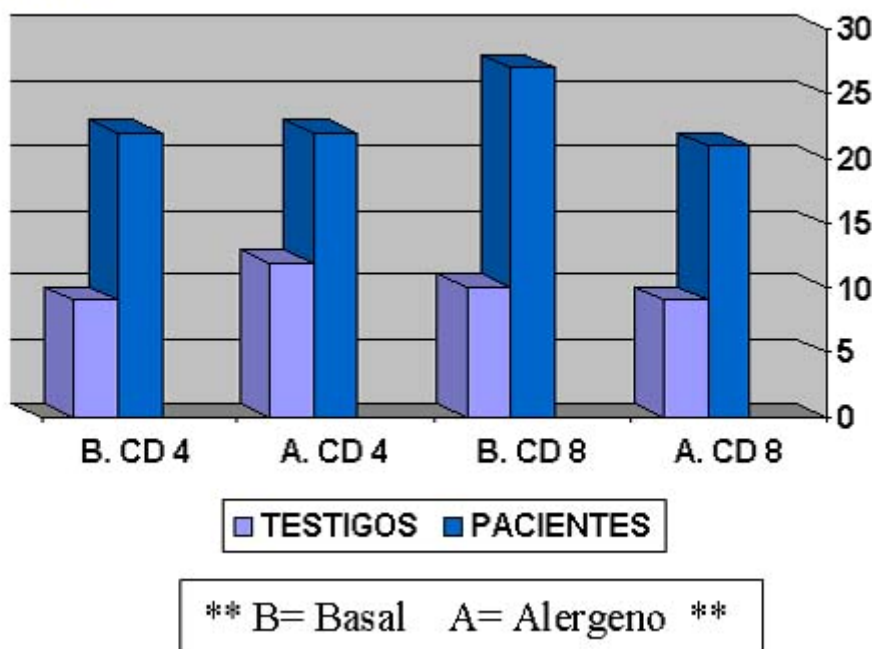


Lo que nos llamó la atención es encontrar que los linfocitos CD8 sintetizaron también IL-10 antes de iniciar la inmunoterapia (Tabla V, Gráfica V).

TABLA 5. SINTESIS DE IL – 10 POR LINFOCITOS T CD4 Y T CD8.

	CD 4	CD 4	CD 8	CD 8
	BASAL	ALERGENO	BASAL	ALERGENO
TESTIGOS	9.3 ± 3	12.7 ± 0.9	10.8 ± 6	9.3 ± 5
PACIENTES	22.1 ± 10	21.7 ± 17	28.8 ± 20	20.4 ± 13

GRAFICA V. SINTESIS DE IL – 10 POR LINFOCITOS TCD 4 TCD 8.



La diferencia que se encontró en el grupo de los pacientes respecto de los testigos sanos es notoria, tanto para los linfocitos T CD4 (diferencia basal 12.8%, alergeno 9.0%); como para los T CD8 (basal 18.0%, alergeno 11.1%); no así, cuando se compara con la basal del mismo grupo. Estos niveles no se midieron después de la inmunoterapia.

Discusión

De acuerdo con lo propuesto por Mosmann y Cofman,^{31,32} los linfocitos T cooperadores se pueden dividir en linfocitos T cooperadores (Th) 1 y 2, los resultados obtenidos por estos investigadores en modelos murinos también han sido aceptados y demostrados en humanos.^{30,31}

En los pacientes alérgicos se demostró la participación de linfocitos Th2 sintetizando principalmente las citocinas IL-4, IL-10, IL-13. La forma de evaluar la síntesis de estas citocinas ha sido por medio de la técnica de ELISA en suero, por ARNm (PCR); sin embargo, una forma más precisa de hacerlo es mediante la medición intracelular de las mismas en los linfocitos T usando citometría de flujo. Los resultados obtenidos en este estudio mediante citometría de flujo indican que la respuesta obtenida por los linfocitos Th2 se pudo medir únicamente mediante la síntesis de IL-10; se encontró que la IL-10 es sintetizada en forma basal y con el estímulo antigénico, tanto en el grupo de testigos sanos como en el de los pacientes.

En los linfocitos Th1 se demostró su funcionalidad únicamente por la presencia del IFN- γ , que se encontró en bajas concentraciones. No se encontraron niveles basales o de fondo de IFN- γ , como sucedió para la IL-10.

En el grupo de los pacientes, la IL-10 antes del tratamiento por hiposensibilización con *D. pteronyssinus*, no se encuentra en niveles altos, sin embargo, después del tratamiento su síntesis disminuye en forma notoria; si comparamos la lectura anterior al tratamiento con inmunoterapia y posterior a ello, para la IL-10 tenemos una diferencia de 28.3%, atribuimos esta diferencia al efecto de la inmunoterapia que lleva a una hipofuncionalidad de los linfocitos Th2. En cambio, para el IFN- γ producido por los linfocitos Th1, aunque está disminuido al inicio, nos llamó la atención que no se observaron cambios notorios, como los obtenidos para la IL-10. Estos datos nos hacen

plantear la hipótesis de que el proceso de regulación de la respuesta inmunológica hacia el alérgeno, después de la inmunoterapia específica, se lleva a cabo a través de la disminución de la síntesis de la IL-10 (disminuye la participación de los linfocitos Th2); no pudimos demostrar la síntesis del IFN- γ y con esto la participación de los linfocitos Th1.^{3,13,14,21}

Uno de los controles de veracidad de la técnica fue el estimular los linfocitos de los pacientes y de los testigos con PMA e incubar bajo las mismas condiciones que con el alérgeno; se obtuvo una buena respuesta tanto para el IFN- γ como para la IL-10. Esto indica que los linfocitos T de los individuos sanos incluidos en este estudio son capaces de responder a ese estímulo.

El resultado esperado es que los linfocitos T CD4+ sean los únicos que sintetizan la IL-10, sin embargo, en esta investigación se encontró que los linfocitos TCD8+ la sintetizan también; esto nos lleva a la reflexión de que la producción de diversas citocinas no es exclusiva de un clon celular y que estamos trabajando en un terreno muy labil como es el de la inmunorregulación, donde pueden intervenir diversos factores y en diferentes pasos de la respuesta inmune que influyan de tal manera que produzcan los resultados que estamos informando.

Nos surge otra pregunta que consideramos más importante:

¿Cuál es la participación de los linfocitos T CD8+, tanto en los individuos sanos como en los alérgicos?

Probablemente sean linfocitos TCD8+ en la subpoblación Tc-2 los que sintetizan la IL-10. Se puede atribuir este resultado a que los linfocitos TCD8 citotóxicos, también se pueden dividir en Tc1 y Tc2, sobre la base de las citocinas que sintetizan; de acuerdo con los informes de la literatura son las mismas que para los linfocitos T cooperadores.

Aun así, queda la incógnita acerca de la presencia y la posible participación de los linfocitos TCD8+ en los individuos alérgicos, cuyos niveles se encuentran aumentados tanto en el nivel basal, como al estimularlos con el alérgeno.

Conclusiones

Los linfocitos Th2 participan en la rinitis y el asma alérgica.

La inmunoterapia de hiposensibilización disminuye la síntesis de la IL-10.

El IFN- γ no se expresa después del tratamiento.

Los linfocitos de los pacientes responden al PMA.

Los linfocitos T cooperadores y citotóxicos, elaboran IL-10.

La inmunoterapia produce cambios muy complejos en la inmunorregulación, que requieren estudios posteriores.

Los autores no manifiestan "conflictos de interés".

BIBLIOGRAFÍA

1. Lee Ch, Rhee CS, Oh SH et al. Increase in expression of IL-4 and IL-5 mRNA in the nasal mucosa of patients with perennial allergic rhinitis during natural allergen exposure. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997; 106:215-19.
2. Yasdanbak HSH, Van Den B, Maizels RM. Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic diseases. *Trends Immunology* 2001; 22:372-77.
3. Akdis CA, Blaser K. Mechanisms of interleukin-10 mediated immune suppression. *Immunology* 2001; 103:131-36.
4. Jung T, Shauer U, Heusser C, Neuman C, Reiger C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry, *J Immunol Methods*, 1993; 159: 197-207.
5. Pedotti R, De Voss JJ, Steinman L, Gallis J. Involvement of both "allergic" and "autoimmune" mechanisms in EAE MS and other autoimmune diseases. *Trends Immunology* 2003; 479:84.
6. Kay AB. T Lymphocytes and their products in atopic allergy and asthma. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1991; 94:189-93.
7. Robinson DS, Hamid Q, Yings S, Tsicopoulos A, et al. Predominant Th2 like broncoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Eng J Med*, 1992; 326:298-304.
8. Bochner BS, Hudson SA, Yiao HQ, Liu MC. Release of both CCR4-active and CXCR3-active chemokines during human allergic pulmonary late-phase reactions. *J Allergy Clin Immunology* 2003; 112:930-34.
9. Christodoulopoulos P, Cameron L, Durham S et al. Molecular pathology of allergic diseases. II: Upper airways disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:211- 23.
10. Secrist H, Chelen CJ, Wen Y et al. Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+T cells from allergic individuals. *J Exp Med* 1993; 178:2123-30.
11. Klimek L, Dormann D, Jarman ER et al. Short-term preseasonal birch pollen allergoid immunotherapy influences symptoms, specific nasal provocation and cytokine levels in nasal secretions, but not peripheral T-cell responses in patients with allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:1326-35.
12. Akdis CA, Blaser K, Akdis M. Genes of tolerance. *Allergy*; 2004: (in press).
13. Jutel M, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszc M, Blaser K, Akdis CA. IL-10 and TGF- β cooperate in the

- regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Europ J Immunol* 2003; 33:1205-14.
14. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of IL-10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1998; 102:98-106.
 15. Fleisher TA, Oliveira JB. Functional and molecular evaluation of lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:229-34.
 16. Elson LH, Nutman TB, Metcalfe DD, Prussin C. Flow cytometric analysis for cytokine production identifies T helper 1, T helper 2, and T helper 0 cells within the human CD4+CD27- lymphocyte subpopulation. *J Immunol* 1995; 154:4294-301.
 17. Bochner BS. Systemic activation of basophils and eosinophil markers and consequences. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106 (suppl):S292-302.
 18. Moneret-Vautrin DAS, Sainte-Laudy J, Kanny G, Fremont S. Human basophil activation as measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE mediated food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999; 82:33-40.
 19. Bochner BS, Sterbinsky SA, Saini SA, Columbo MM, MacGlashan DW. Studies of cell adhesion and flow cytometric analyses of degranulation, surface phenotype and viability using human eosinophils, basophils and mast cells. *Methods* 1997; 13:61- 8.
 20. Chen YCH, Bieneman AJ, Creticos PS, Chichester KL, Schroeder J. IFN- γ inhibits IL-3 priming of human basophil cytokine secretion but not leukotriene C4 and histamine release. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:944-50.
 21. Munthe-Kaas MCH, Carlsen KHG, elms PJ, Gerritsen J et al. CTLA-4 polymorphisms in allergy and asthma and the Th1/Th2 paradigm. *J. Allergy Clin Immunol* 2004; 114:280-87.
 22. Maggi E, Biswas P, Del Prete M, Parronchi P et al. Accumulation of Th-2 like helper T cells in the conjunctiva of patients with vernal conjunctivitis. *J. Immunol* 1991; 146:1169-74.
 23. Borish L, Aarons A, Rumblyrt J, Cvietusa P, Negri J, Wenzel S. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97:1288-96.
 24. Bousquet J, Becker WM, Hejjaoui A et al. Differences in clinical and immunologic reactivity of patients allergic to grass pollen and to multiple pollen species. II Efficacy of a double-blind, placebo-controlled, specific immunotherapy with standardized extracts. *J Allergy Clin Immunol*, 1991; 88:43-53.
 25. Akdis CA, Blaser K. IL-10 induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: Two key steps in specific immunotherapy. *FASEB J* 1999; 13:603-9.
 26. Durham SR, Till SJ. Immunologic changes associated with allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:157-64.
 27. Walker SM, Varney VA, Gaga M et al. Grass pollen immunotherapy: efficacy and safety during a 4-year follow-up study. *Allergy*, 1995, 50:405-13.
 28. Keskin G, Inal A, Ali Sari R et al. Serum IFN-gamma and IL-10 levels before and after specific immunotherapy in patients with allergic rhinitis. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 1999; 27:261-64.
 29. Kakinoki Y, Ohashi Y, Nakai Y et al. Pollen immunotherapy inhibits T helper 1 and 2 cell responses, but suppression of T helper 2 cell response is a more important mechanism related to the clinical efficacy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 126:63-70.
 30. Benjaponpitak S, Oro A, Maguire P et al. The kinetics of change in cytokine production by CD4+T cells during conventional allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:467-75.
 31. Mosmann TH, Coffman RL. Two types of mouse helper T cell clones: implications for immune regulation. *Immunol Today*, 1987; 8:223-27.
 32. Mosmann TR, Coffman RI. Th1 and Th2 cells: different functional properties. *Ann Rev Immunol* 1989; 7:145-73.

HIPERSENSIBILIDAD A LA FLUORESCEINA SODICA



Columnista Experta de SIIC
Dra. Débora J. Seigelshifer

Jefa de Unidad de Alergia e Inmunología, Buenos Aires, Argentina

La fluoresceína sódica (FS) se utiliza desde hace más de 40 años como medio de contraste endovenoso para la angiografía retiniana. Cuando en 1961 Novotny y Alvin publicaron en *Circulation* este procedimiento desconocían sus reacciones adversas.¹

Es así que en los años siguientes comenzaron a aparecer informes aislados de reacciones anafilactoideas con su uso endovenoso, tópico y oral.

Posteriormente se publicaron trabajos retrospectivos sobre incidencia de reacciones adversas, y en la actualidad quienes estamos interesados en el tema comenzamos a investigar de qué forma se pueden predecir estas reacciones.

La fluoresceína sódica, sintetizada en 1871 por Von Bayer, es una xantina dibásica, luminiscente, soluble en agua. Su peso molecular es 376.28, circula débilmente unida a las proteínas en un 80%, principalmente albúmina, y muestra un color verde fluorescente a un Ph mayor de 6. Es metabolizada en hígado y riñón y eliminada en orina dentro de las 24 a 48 horas.^{2,3}

Comparte estructuras semejantes con la eosina y el mercurocromo; la FDA autoriza su uso en cosmetología y en medicina para los estudios oftalmológicos.²

En Oftalmología se la utiliza rutinariamente en forma tópica para evidenciar las lesiones de cornea y para la tonometría; en forma oral (en desuso) y endovenosa para la realización de retinofluoresceinografía (RFG).

Las reacciones adversas se clasifican en leves, moderadas y graves.⁴

Las leves son transitorias y resuelven espontáneamente: náuseas 3% a 15%; vómitos hasta 7%; prurito. Las moderadas resuelven con medicación, como urticarias 1:82; síncope 1:337; y otras como tromboflebitis, pirexia, necrosis tisular 1:769. Las reacciones adversas graves son aquellas que requieren intervención médica intensa, y pueden ser: respiratorias 1/3 800; cardíacas 1/5 300; convulsiones 1:13 900; fallecimiento 1/221 781.

Se han informado casos aislados de convulsiones durante la RFG;⁵ necrosis tisular por extravasación de la droga;⁶ crisis de dolor abdominal en un paciente con anemia falciforme después de realizada la RFG;⁷ rash, fiebre y escalofríos 2 horas después de realizada la RFG, descartándose bacteriemia o cualquier proceso infeccioso,⁸ erupción psoriasiforme posterior a la RFG,⁹ fotosensibilidad por exposición al sol durante las 24 horas posteriores al estudio.⁴ No se informaron reacciones adversas en embarazadas ni en el feto, principalmente durante el primer trimestre de gestación.⁴

La etiología de dichas reacciones es hasta el momento desconocida. Los intentos en encontrar IgE específica para la droga fracasaron. Se encontró aumento de la histamina plasmática y de la triptasa sérica en pacientes que tuvieron reacción anafilactoidea y no en los controles. En una serie de pacientes, tanto los asintomáticos como los que tuvieron algún síntoma durante la RFG, tuvieron disminución del complemento. Queda claro por todas las publicaciones que se produce una activación masiva de los mastocitos con liberación de sus mediadores que lleva al *shock* anafilactoideo, pero se desconoce qué los activa.¹⁰

Con la intención de predecir estas reacciones Matsuura y col. compararon el valor predictivo del *prick test* en relación con la intradermorreacción, ambos con FS al 1% y 10%. Entre 1 500 pacientes con intradermorreacción registraon 686 positivos con fluoresceína al 10% y sólo 13 con FS al 1%; con el *prick test* sólo tuvieron 2 positivos con FS al 10%, y fue uno de estos dos pacientes el único que sufrió un *shock* anafilactoideo durante la RFG, al segundo no se le realizó el estudio. Por lo tanto concluyeron que el *prick test* con FS al 10% es predictivo del *shock*.¹¹

Por otra parte, la intradermorreacción dio alta incidencia de positivos y dichos resultados llevarían a contraindicar un estudio necesario para los pacientes.

En 1998, López Sáez y col. publican el caso de un paciente que sufre un *shock* anafilactoideo en su quinta RFG; posteriormente se le realizó *prick test* con

FS (200 mg/ml) e intradermorreacción (2 mg/ml), ambas fueron positivas.

Además, en controles diabéticos que habían recibido FS y en sujetos sanos las pruebas fueron

negativas. Debido a la semejanza química con la eosina y el mercurocromo se realizaron pruebas cutáneas con estas sustancias, todas fueron negativas. También constataron elevación de la triptasa sérica en pacientes y no en controles.¹²

En la Argentina, la RFG fue introducida por los doctores Arturo Alessandrini y Carlos Nicoli en 1963.³ Si bien en nuestro país no existe un protocolo estandarizado para predecir estas reacciones, en el Servicio de Oftalmología del Hospital Eva Perón de San Martín (provincia de Buenos Aires) se realizan RFG desde 1995; inicialmente a todos los pacientes se los evaluaba previamente al estudio con una intradermorreacción con FS al 10% diluida 1/10 en solución fisiológica.

En una ocasión (caso sin publicar) una paciente presentó eritema, edema, prurito local e inyección conjuntival con la aplicación tópica de FS, posteriormente fue remitida a la Unidad de Alergia, donde al realizársele la intradermorreacción se produjo una reacción de 18 mm con prurito generalizado. Si bien no son frecuentes, se publicó el caso de una paciente que presentó urticaria periorbitaria con la aplicación de FS tópica y otro de un *shock* anafilactoideo con FS por la misma vía.^{13,14}

Esta observación nos llevó a sospechar un factor humoral responsable de la reacción y nos motivó a reproducir en nuestro hospital la experiencia de Matsuura.

Fue así que durante 2 años evaluamos con *prick test* con FS al 10% (Angiofluor TM 10%) a todos los pacientes que debían realizarse una RFG en el hospital. Aplicamos la prueba a 214 pacientes, presentaron *prick test* positivo sólo 4 de ellos, a quienes se les contraindicó el estudio. De los 210 que podían realizarse la RFG sólo 112 concurren a hacerse el estudio y, de éstos, solo 20 pacientes tuvieron alguna reacción adversa, que no requirió tratamiento. Si bien no se registró ningún *shock* anafilactoideo en estos 20 pacientes, 13 ya se habían realizado una o más RFG, lo que nos lleva a pensar que la repetición del estudio aumenta el riesgo de padecer alguna reacción adversa, al igual que con otras drogas cuyas reacciones son debidas a una IgE específica, aunque en este caso no pudo demostrarse.¹⁵

Contradictoriamente, las pruebas de Prautznitz-Kustner realizadas para evidenciar la presencia de anticuerpos fueron negativas.¹⁰

Se publicaron otros protocolos, como el del Servicio de Alergia del Hospital Clínico San Carlos, de Madrid, donde se realiza un *prick test* con

FS 200 mg/ml e intradermorreacciones con diluciones 1/1 000, 1/100, 1/10, con controles de histamina y solución glicerina. Si las pruebas cutáneas son negativas se realiza la provocación conjuntival. Durante 2 años se evaluaron 335 pacientes que –a excepción de 2– fueron negativos. Los 2 casos positivos fueron pacientes que en la primera RFG que se habían realizado sufrieron una reacción anafilactoidea grave que requirió tratamiento intensivo. A ambos pacientes se les realizó *prick test* posteriormente a la RFG, y ambos fueron francamente positivos.

Nuevamente nos encontramos ante la relación *prick test* positivo con la aparición de *shock*.¹⁶

Cabe destacar que en el examen oftalmológico de rutina se coloca fluoresceína en conjuntiva, por lo que en cierta forma todos los pacientes ya han sido sometidos a una primera provocación conjuntival antes de ser remitidos a los Servicios de Alergia para ser testeados, por lo que considero que en el protocolo del Hospital Clínico de San Carlos, de Madrid, con sólo realizar las pruebas cutáneas los pacientes se encontrarían bien estudiados. Por otra parte, si sucediera que un paciente tuviese pruebas cutáneas negativas y provocación conjuntival positiva, esta última prueba diagnóstica sería más sensible, lo que haría que las demás pruebas fueran innecesarias, y el diagnóstico lo harían los oftalmólogos al colocar las gotas de fluoresceína.

Nucera y col. publicaron el caso de un paciente que presentó angioedema facial y en manos durante una RFG. Se le realizó *prick test* con

FS 20%, que fue positivo (pápula de 4 mm), y test de parche, negativo. Como requería una segunda RFG, fue sometido a un procedimiento de desensibilización satisfactorio que permitió completar la RFG.¹⁷

La probabilidad de repetir las reacciones adversas en las RFG posteriores es del 31% para las náuseas, 10.6% para los vómitos, y 5.6% para las urticarias; para las reacciones anafilactoides no hay estadística publicada.¹⁰

Con el advenimiento del láser la angiografía retiniana con FS es un procedimiento realizado cada vez más frecuentemente. Es habitual encontrar pacientes a los que se les practica este estudio varias veces, con lo cual los alergistas debemos encontrar la forma más exacta de predecir y prevenir las reacciones adversas. La premedicación con corticoides y antihistamínicos demostró disminuir la intensidad de dichas reacciones, pero no las evita.¹⁸

En el Hospital Eva Perón de San Martín (caso sin publicar) se presentó un paciente diabético, sin antecedentes alérgicos, en que el *prick test* previo a su segunda RFG, fue positivo, por lo que se le contraindicó el estudio; al año siguiente se le repitió el *prick test*, que nuevamente fue positivo,

pero como la RFG era indispensable se lo premedicó con 40 mg de metilprednisolona 13 h, 7 h y 1 hora antes del estudio; 50 mg de difenilhidramina cada 8 horas desde 24 horas antes del estudio y una hora antes; 300 mg de ranitidina 24 horas antes del estudio, con lo que pudo realizarse la RFG.

Con todo lo antedicho, hasta la fecha son varias las publicaciones donde el *prick test* con fluoresceína sódica al 10% o 20% fue útil para demostrar hipersensibilidad a la droga y descartó los falsos positivos que podrían generar las intradermorreacciones.

En relación a qué conducta tomar en un paciente que ya sufrió una reacción anafilactoidea habría que plantearse cuál es la mejor opción a seguir, si la desensibilización o la premedicación, al igual que con los medios de contraste radiológicos iodados.

En un futuro tendremos que aumentar la estadística y publicar todas nuestras experiencias para llegar a aunar criterios y establecer un protocolo uniforme a realizarse en todos los Servicios de Alergia.

La autora no manifiesta "conflictos de interés".

BIBLIOGRAFÍA

1. Novotny HR, Alvis DL. A method of photographing fluorescence in circulating blood in the human retina. *Circulation* 1961; 24:82-6.
2. The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Susan Budavari, editor. 11va ed. Rahway. Merck 1989:4090.
3. Argento C, Donato OB, Mayorga Argañaraz Ep. Historia, principios y técnica. Retinofluoresceinografía, su interpretación racional. Editorial Panamericana 1983. (1):20-35.
4. Mandava N, Reichel E, Guyer DR, et al. Fluorescein and ICG angiography. *Ophthalmology*. 2nd ed. Mosby. 2004 (106):800-808.
5. Kelly SP, MacDermott NJG, Saunders DC, et al. Convulsion following intravenous fluorescein angiography. *Br J Ophthalmol* 1989; 73:655-6.
6. Elman MJ, Fine SL, Sorenson J, et al. Skin necrosis following fluorescein extravasation: a survey of de Macula Society. *Retina* 1987; 7(2):89-93.
7. Acheson R, Serjeant G. Painful crises in sickle cell disease after fluorescein angiography. (Letter) *Lancet* 25 may 1985: I (8439):1222.
8. Johnson RN, McDonald HR, Schatz H. Rash, fever and chills after intravenous fluorescein Angiography. *Am J Ophthalmol* 1998; 126 (6):837-38.
9. Mayama H, Hirayama K, Nakano H, et al. Psoriasiform drug eruption induced by fluorescein sodium used for fluorescein angiography. *Br J Dermatol* 1999 May; 140 (5):982-4.
10. Nicklas et al. Anaphylactoid reactions to fluorescein. *J Allergy Clin Immunol*. 1998; 101; (6 part 2):519.
11. Matsuura M, Ando F, Fukumoto K et al. Usefulness of the prick test for anaphylactoid reaction in intravenous fluorescein administration. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1996 Apr; 100:4, 313-7.
12. López Sáez MP, Ordoqui E, Tornero P, et al. Fluorescein-induced allergic reaction. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998; 81:428-430.
13. Valvano MN, Martin TP. Periorbital urticaria and topical fluorescein. *Am J Emerg Med* 1998; 16:525-526.
14. El Harrar N, Idali B, Moutaouakkil S, et al. Choc anaphylactique par application de Fluoresceine sur la conjonctive oculaire. *Presse Med* 1996; 25:1546-7.
15. Seigelshifer D, Frezza N, Rimini S. Prick test con fluoresceína sódica, un metodo predictivo del shock anafiláctico producido por su uso endovenoso? *Archivos Argentinos de Alergia e Inmunología Clínica* 1993; 34; 3:89-93.
16. Trindade-Porto C, Alonso-Llamazares A, Robledo T, et al. Fluorescein-induced adverse reaction *Allergy* 1999 Nov; 54(11):1230.
17. Nucera E, Schiavino D, Merendino E, et al. Successful fluorescein desensitization. *Allergy* 2003 May; 58(5):458.
18. Rohr AS, Pappano JE. Prophylaxis against fluorescein-induced anaphylactoid reactions. *J Allergy Clin Immunol* 1992(90); 3 part 1:407-408.