

## Consideraciones acerca del diagnóstico "in vitro" del asma bronquial

*Doctora M. L. Subirá*

El asma bronquial se definió por la American Thoracic Society como "una enfermedad caracterizada por una respuesta aumentada de la tráquea y de los bronquios a diversos estímulos y manifestada por un estrechamiento de las vías respiratorias, y que suele remitir, bien espontáneamente, o bien como resultado de una terapéutica específica y generalmente invariable en todos los casos". Esencialmente se trata de un desorden inmunológico, aunque pueden actuar también en su producción factores no específicos.

Asimismo, se ha venido clasificando el asma bronquial en dos grandes grupos: asma extrínseca (producida por agentes externos, inhalantes, alimentos, etcétera) e intrínseca, en la que no existe evidencia de sustancias exógenas y que frecuentemente va asociada a una infección bacteriana. Sin embargo, generalmente nunca se dan estos dos estados en forma pura en fases crónicas, sino que se imbrican de manera tal que, por ejemplo, pueden encontrarse evidencias de factores exógenos en casos de asma calificados de intrínsecos.

Debemos considerar, pues, el asma bronquial como una reacción antígeno-anticuerpo de tipo inmediato, reacción localizada a nivel del pulmón. Generalmente se viene aceptando al asma bronquial como una

reacción anafiláctica incluida en el tipo I de la clasificación de Gell y Coombs, en la cual interviene únicamente un anticuerpo específico "sensibilizante" de la piel, denominado reagina, con propiedades características, las cuales pueden detectarse por diversos procedimientos. Sin embargo, y a pesar de los esfuerzos de numerosos investigadores, no se conoce todavía de una forma exhaustiva la naturaleza exacta de los anticuerpos en el suero alérgico, así como el mecanismo de sus interacciones "in vivo" e "in vitro". Se cree que estas dificultades se deben, por una parte, al fallo para encontrar anticuerpos en estado puro en el suero de los alérgicos, y, por otra parte, a la impureza o complejidad de los antígenos.

No vamos a extendernos en el estudio de la frecuencia y características de los antígenos capaces de producir una reacción asmática, ya que todos ustedes las conocen sobradamente.

Sin embargo, creemos que debemos hacer hincapié en lo referente a la naturaleza de los anticuerpos producidos en este tipo de reacción alérgica. Ya en el año 1964, Letterer (4), estudiando la anatomía patológica del asma bronquial y mediante la inmunofluorescencia, observó el gran aumento de células plasmáticas en el tejido

conjuntivo perivascular y bronquial, demostrando, asimismo, la existencia de otros anticuerpos, además de las reaginas (localizándose estos anticuerpos en la membrana celular de las células de los órganos de choque). Experimentalmente, en cobayas sensibilizados se sabe que la inyección intravenosa de antígenos marcados da lugar a que, durante el shock que se presenta en el animal, una importante cantidad de antígeno se concentre en los pulmones y en la zona edematosa de los vasos dilatados peribronquiales, llegando allí probablemente cedidos por el torrente circulatorio. Este autor llega a una conclusión importante sobre la localización de la reacción asmática en el pulmón, esto es, que tanto las reaginas como los anticuerpos humorales son capaces de provocar (y cito textualmente) una y la misma reacción asmática en el pulmón.

Por otra parte, estudios de diversos investigadores, entre los que citaremos a Arbesman (1), Frick (3), Perelmutter (7) y colaboradores, Malley (5), etcétera, demuestran en individuos alérgicos al polen la presencia de anticuerpos detectables por la técnica de hemaglutinación, así como la existencia de precipitinas en el suero de pacientes no tratados y sensibilizados al polen. Por otra parte, de todos son conocidos los trabajos de Rowe y colaboradores (10), los cuales detectan precipitinas en el suero de niños afectos de asma bronquial, producido por alimentos e inhalantes, así como las investigaciones de Reid y colaboradores (9) y Radenecker (8) acerca de la heterogeneidad de los anticuerpos encontrados en la reacción alérgico-anafiláctica. Así pues, parece probable que en la patogenia del asma bronquial alérgica intervengan no sólo las reaginas, sino también otras clases de anticuerpos, lo cual es bastante verosímil, ya que, incluso en teoría, es relativamente difícil de comprender cómo un estímulo exógeno pueda informar al sistema inmunocompetente en el sentido de "fabricar" únicamente un tipo de anticuerpos.

Así, pues, hemos enfocado el tema del diagnóstico "in vitro" del asma bronquial a base de dos tipos de determinaciones: a) Detección de reaginas. b) Técnicas de de-

terminación de otros anticuerpos y fiabilidad de las mismas.

Las reaginas se encuentran en muy escasa proporción, aproximadamente 0,001 mg/ml. en el suero de los alérgicos, y las técnicas más frecuentemente usadas para su detección "in vitro" se basan en métodos indirectos, ya que los mismos no detectan dichas reaginas, sino los productos químicos (test de liberación de histamina), o bien observando las reacciones celulares consecuentes a la "sensibilización" de células hemáticas y posterior reacción con el anticuerpo específico (test de degranulación basófila, test de cultivo de linfocitos, test de aglutinación de trombocitos, test de transformación linfoblástica y otros).

Todos estos métodos son bien conocidos y de fiabilidad variable, objetivando todos ellos la existencia de una unión antígeno-anticuerpo, pero sin especificar cuantitativamente la presencia de reaginas.

En nuestro Departamento, el problema de la detección de anticuerpos circulantes en el suero de pacientes alérgicos nos viene ocupando desde hace algún tiempo, ya que consideramos que el diagnóstico, en este caso del asma bronquial, debe hacerse de una manera exhaustiva, no sólo con las reacciones de fijación de complemento, hemaglutinación y precipitación, para poder aclarar de alguna manera la conducta de los anticuerpos en el asma bronquial, por una parte, y además para —si éstas se estandarizan— poder sustituir a las técnicas "in vivo", siempre traumatizantes para el paciente.

Hemos realizado trabajos publicados anteriormente, en los cuales los resultados obtenidos con estas técnicas han sido contradictorios. Sin embargo, y convencidos como estábamos de la utilidad de estas técnicas, estudiamos las causas de la negatividad de dichas pruebas obtenidas en nuestra última comunicación, averiguando que se debía a una inadecuada limpieza de las placas de lucita empleadas, la cual alteraba el pH de la reacción, produciendo como consecuencia resultados no valorables.

Después de laboriosas investigaciones respecto a los métodos de extracción y purificación de antígenos, concentración en que éstos debían ser empleados, así como

búsqueda de una óptima proporción antígeno-anticuerpo, hemos realizado en tres series de pacientes afectados de asma bronquial, no sometidos a tratamiento, y con pruebas alérgicas y test de provocación positivos al polen de gramíneas, polvo de casa y leche, los tests de fijación de complemento y hemaglutinación, así como la técnica de doble difusión de Outherlony, que está únicamente estandarizada por el momento para el polen. No nos detendremos en la explicación de las técnicas de extracción de antígenos, ya que, aunque de un valor decisivo a nuestro juicio, no son objeto de este tema.

Estas técnicas se realizaron en 17 pacientes alérgicos al polen, 19 con pruebas positivas al polvo de casa y 16 sensibilizados a la leche.

Los resultados se detallan en los cuadros

I, II y III, en los cuales se refieren comparativamente con los obtenidos en los controles de testigos no alérgicos.

En el caso de individuos con asma bronquial producido por pólenes (cuadro I), tanto la hemaglutinación como la fijación de complemento fueron positivas en todos los pacientes sometidos al test, con valores que oscilan entre 1/80 y 1/640 para la hemaglutinación y 1/16 a 1/256 en la fijación de complemento. De los 10 controles, dos dieron positivo en la fijación de complemento (título 1/2).

En el cuadro II, de los 19 pacientes, 18 dieron hemaglutinación positiva, con títulos menos elevados que en el caso anterior, pero con valores de hasta 1/160. La fijación de complemento fue positiva en 16 casos, con cifras, asimismo, inferiores a las obtenidas con gramíneas. De los diez con-

CUADRO I  
TECNICAS DIAGNOSTICAS PARA GRAMINEAS

PACIENTES	P. CUTANEA	T. BOYDEN	FIJACION C'
SUERO 186	++++	1:320	1:256
219	+++++	1:320	1:64
282	+++++	1:160	1:64
117	+++++	1:160	1:32
118	+++++	1:320	1:128
125	+++++	1:160	1:64
131	++++	1:320	1:32
143	+++++	1:60	1:64
186	+++++	1:320	1:128
298	+++++	1:160	1:32
354	+++++	1:160	1:64
109	+++++	1:320	1:32
110	+++++	1:80	1:64
416	++++	1:160	1:16
401	++++	1:160	1:64
403	++++	1:320	1:256
414	++++	1:640	1:128
CONTROLES	P. CUTANEA	T. BOYDEN	FIJACION C'
1	-	0	0
2	-	0	0
3	-	1:10	0
4	-	0	0
5	-	0	1:2
6	-	0	0
7	-	1:10	0
8	-	0	0
9	-	0	0
10	-	0	0

CUADRO II

TECNICAS DIAGNOSTICAS PARA EL POLVO DE CASA

PACIENTES	P CUTANEA	T BOYDEN	FIJACION C'
SUERO 99	+++	1:40	1:8
100	+++	1:40	1:4
101	++++	1:80	1:32
105	++++	1:80	1:16
107	+++++	1:20	0
108	+++	1:40	1:16
112	++++	1:10	0
115	+++	1:160	1:32
149	+++	1:80	1:8
154	++++	1:40	1:16
159	++++	1:20	1:8
168	++++	1:80	1:32
180	+++	0	0
343	++++	1:40	1:8
344	++++	1:80	1:8
345	++++	1:40	1:16
346	++++	1:80	1:4
348	++++	1:20	1:8
421	++++	1:160	1:32
CONTROLES	P. CUTANEA	T. BOYDEN	FIJACION C'
SUERO 1	-	0	0
2	-	0	0
3	-	0	0
4	-	1:10	0
5	-	0	0
6	-	0	0
7	-	0	0
8	-	0	0
9	-	0	0
10	-	0	0

troles, sólo uno dio un título de 1/10 en la hemaglutinación.

El cuadro III detecta los resultados en pacientes de asma bronquial con test de provocación positivos para la leche. En ellos se observa cómo en la hemaglutinación los resultados fueron positivos en 15 casos, con títulos variables entre 1/10 y 1/160, mientras que en la fijación de complemento la positividad se dio únicamente en 11 pacientes con títulos asimismo variables. Los controles fueron negativos en ambas pruebas, excepto uno que dio un título de 1/10 en la hemaglutinación.

En lo que respecta al test de determinación de precipitinas, según la técnica de Outherlony, como ya hemos dicho, ha sido estandarizado por el momento únicamente

para los pólenes, utilizando para ello agar al 1,2 por 100, antígeno a una concentración entre 3 y 6 gramos por 100 de proteínas totales y suero del paciente concentrado cuatro veces. Los resultados han sido positivos en todos los sueros utilizados en los tests en estas condiciones, apreciándose líneas de precipitación análogas a las obtenidas en la figura 1.

Hemos de constatar que todos los sueros fueron inactivados a 56°, con objeto de destruir las reaginas que pudieran existir. Así, pues, y a la vista de estos resultados, podemos concluir diciendo:

a) En pacientes con un asma bronquial se encuentran en mayor o menor porcentaje anticuerpos detectables por las técni-

CUADRO III

TECNICAS DIAGNOSTICAS PARA LA LECHE

PACIENTES	P. CUTANEA	T. BOYDEN	FIJACION C'
SUERO 318	+++	1:20	1:4
339	+++	1:10	0
355	++++	0	0
356	+++++	1:160	1:32
358	+++	1:40	1:8
359	++++	1:80	1:8
360	+++	1:20	0
362	+++++	1:160	1:16
363	+++	1:40	1:4
364	+++	1:160	1:64
371	+++	1:20	0
372	++++	1:80	1:16
373	+++	1:10	0
376	+++	1:40	1:8
379	++++	1:80	1:8
380	++++	1:160	1:32
CONTROLES	P. CUTANEA	T. BOYDEN	FIJACION C'
1	-	0	0
2	-	0	0
3	-	0	0
4	-	1:10	0
5	-	0	0
6	-	0	0
7	-	0	0
8	-	0	0
9	-	0	0
10	-	0	0

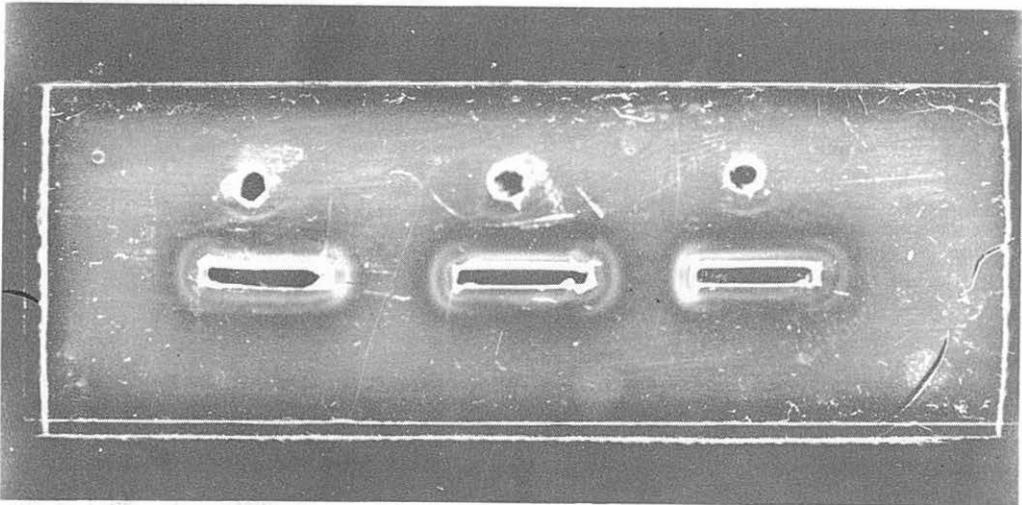


Figura 1.

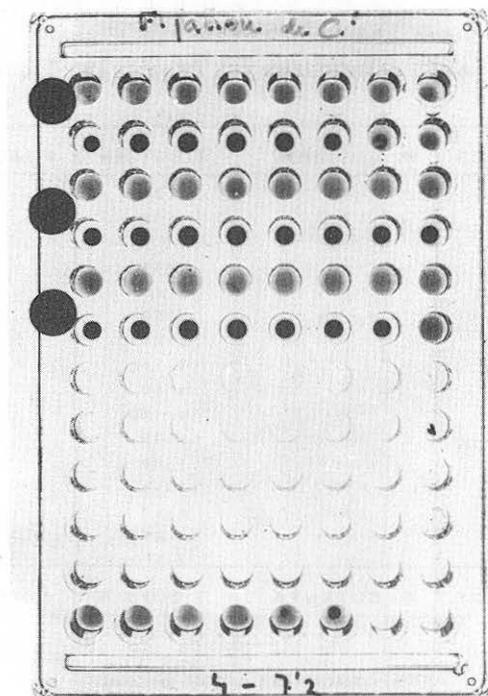


Figura 2.—Fijación de complemento.

cas de hemaglutinación, fijación de complemento y Gell difusión.

b) Los resultados variables obtenidos hasta el momento, creemos que se deben únicamente a la estandarización de los métodos de extracción de antígenos, variables, según nuestra experiencia, de acuerdo con la técnica a emplear, así como a la búsqueda de una óptima relación antígeno-anticuerpo.

c) Esperamos en un futuro próximo presentar una casuística con un número elevado de pacientes, tratando de objetivar de una forma estadística los resultados obtenidos, a fin de poder estudiar más profundamente la patogenia del asma bronquial.

Estos son los datos obtenidos por nosotros y que los exponemos a la consideración de ustedes.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Arbesman, C. E.; Rose, N. R.; Kantors, Z., y Beede, R. B.: "Immunologic Studies of Ragweed-Sensitive Patients". *J. of All.*, 31, 4, 317-332 (1960).
2. Chan, P. C., y Porter, R. R.: "In vitro assay of Reaginic Antibodies to Horse Serum Albumin". *Immunology*, 13, 633 (1967).
3. Frick, O. L.; Gyenes, L., y Sehon, A. H.: "Demonstration of Antibodies in the Sera of Grass-Sensitive Persons by the Bis-Diazotized-Benzidine Hemagglutination". *J. of All.*, 31, 3, 216-231 (1960).
4. Letterer, E.: "Anatomía Patológica del Asma Bronquial". II Coloquio de Alergología. Pamplona, págs. 85-97 (1964).
5. Malley, A.; Lietze, A., y Reed, Ch. E.: "The Separation of Substances in Timothy Pollen Extract producing Allergic Skin Reactions from Those producing Hemagglutination Reactions". *J. of All.*, 31, 5, 413-420 (1960).
6. Oehling, A.: "Bases inmunológicas en el diagnóstico de las enfermedades alérgicas". VII Congr. Esp. de Alergia. Ed. Liade, págs. 49-58 (1967).
7. Perelmutter, L.; Lea, D. Y.; Fredman, S. O., y Sehon, A. H.: "Demonstration of Precipitating Antibodies in sera of Ragweed-Sensitive Patients by Agar-Gel Technique". *Int. Arch. All.*, 20, 355-367 (1962).
8. Radermecker, M.: "Assesment of the Heterogeneity of Reagins according to Individuals and/or the Kind of allergens". *Int. Arch. All.*, 33, 1 (1968).
9. Reid, R. T.; Minden, P., y Farr, R. S.: "Biological and Chemical Differences among Proteins having Reaginic Activity". *J. Allergy*, 41, 326 (1968).
10. Rowe, A. H.; Rowe, A. H. Jr., y Sinclair, C.: "Bronchial Asthma in Infants and Children due to Food and Inhalant Allergies". *The J. of Asthma Res.*, 4, 189-195 (1967).