

J. Fernández y A. Esteban

Unidad de Investigación en
Alergia. Hospital General
Universitario de Elche y
Departamento de Medicina
Clínica. Facultad de Medicina.
Universidad Miguel
Hernández.

Seminario

Detección de marcadores de inflamación ¿Es útil en alergia a medicamentos?

INTRODUCCIÓN

Los reactantes de fase aguda como la VSG o proteína C-reactiva, que fueron los primeros marcadores biológicos utilizados, sólo indican que existe inflamación. Las proteínas y mediadores segregadas por las diferentes células (eosinófilos, neutrófilos, mastocitos, etc.) que intervienen en la inflamación nos permite valorar el tipo de célula implicada y el grado de actividad inflamatoria, y seguir mejor su curso clínico.

De todos los marcadores solubles destacan la ECP (Proteína Catiónica del Eosinófilo) y EPO (Peroxidasa del Eosinófilo) del eosinófilo, la elastasa y la MPO (miloperoxidasa) del neutrófilo, la histamina y la tryptasa del mastocito, así como diversas moléculas de adhesión y citoquinas como la IL-4, IL-5, IFN-gamma, ELAM-1, VCAM-1u otras. De los marcadores celulares destacan los CD que nos indican los subtipos de linfocitos T (CD4 y CD8) presentes, así como los marcadores de activación de membrana como el CD69, CD25, HLA-DR, CD45Ro y otros como los ligandos de "homing" cutáneo como el CLA.

En las reacciones inmediatas producidas por medicamentos la tryptasa y la N-MH (N-Metil Histamina) son marcadores muy útiles, especialmente en anafilaxias, aunque la N-MH resulta complicada a la hora de recoger las muestras por parte de los pacientes.

Si los marcadores solubles se combinan con los marcadores celulares se logra un buen espectro de lo que ocurre en las reacciones inflamatorias alérgicas por medicamentos, separando bien las anafilaxias, donde además de encontrar la tryptasa muy elevada, se encuentran % de CD69 elevados, o en las urticarias donde la tryptasa sigue elevada pero mucho menos que en la anafilaxia y aparece el % de CLA muy elevado, mientras que en las reacciones tardías ni el CLA ni la tryptasa están demasiado elevados.

En conclusión, aunque en su etapa inicial, el estudio de los marcadores solubles junto a los marcadores celulares nos permite comprender mejor los fenómenos que se producen durante la inflamación alérgica por medicamentos.

MARCADORES BIOLÓGICOS

La forma más habitual de confirmar si existe un incremento de actividad inflamatoria ha sido siempre a través de los reactantes de fase aguda. Éstos incluyen desde la simple velocidad de sedimentación a la medición de

Tabla I. Reactantes de fase aguda

Reactantes
VSG
Fibrinógeno
Haptoglobina
Orosomucoide
Proteína C-reactiva

proteínas, como puede verse en la Tabla I, en especial la proteína C-reactiva, sin que nos proporcionen una información detallada del tipo de inflamación o de las células implicadas¹.

Además, este tipo de reactantes no se suele alterar en ciertos procesos inflamatorios, como ocurre principalmente en las enfermedades alérgicas. Por ello, se han desarrollado ensayos o pruebas específicas para determinar proteínas segregadas por las diferentes células implicadas en los procesos alérgicos (eosinófilos, neutrófilos, mastocitos o basófilos, linfocitos T y monocitos/macrófagos), de tal forma que nos proporcionen información no sólo del tipo de célula implicada en cada momento, sino también del grado de actividad inflamatoria, lo que nos permite seguir mejor su curso clínico con o sin tratamiento.

Últimamente a estas proteínas se ha añadido la determinación del tipaje fenotípico o expresión de los marcadores de membrana de los linfocitos T u otras células como basófilos, lo que equivale a su actividad en ese momento, así como la determinación de las citoquinas que pudieran intervenir en el proceso inflamatorio.

MARCADORES SOLUBLES

Una cuestión importante es donde medir estos marcadores, si a nivel local, cerca del proceso inflamatorio, como en el lavado bronquio-alveolar, lavado nasal, etc.²⁻⁴, como la manera más directa de medir el proceso alérgico, o en sangre y orina, como fluidos más accesibles desde el punto de vista práctico. Las determinaciones a nivel local suelen emplearse más en el ámbito de investigación que a nivel clínico-práctico. De cualquier forma lo más importante es la separación cuidadosa de las células del fluido en el que estén, para que no se liberen mediadores inespecíficamente sólo por un mal procesado de las muestras¹.

En sangre, los marcadores se pueden medir en plasma

Tabla II. Proteínas granulares de los eosinófilos

Proteínas
Proteína Catiónica del Eosinófilo (ECP)
Peroxidasa del Eosinófilo (EPO)
Proteína X del Eosinófilo/Neurotoxina derivada del Eosinófilo (EPX/EDN)
Proteína Básica Mayor (MBP)

(EDTA), donde se encuentran a sus niveles circulantes o en suero, donde además se añade la liberación inespecífica que se produce en algunas células durante la coagulación, a pesar de lo cual la medición en suero está más extendida al resultar en realidad más discriminante y práctica.

Marcadores solubles de los eosinófilos

Los eosinófilos contienen en sus gránulos 4 proteínas principales (Tabla II), que son segregadas a su exterior por estimulación de inmunoglobulinas IgA o IgG, factores del complemento, PAF, GM-CSF factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos y sobre todo por la IL-5. Como otras muchas células pueden segregar sus proteínas diferenciadamente según el estímulo. Tanto ECP y EPO, al no encontrarse en otras células, son excelentes marcadores de activación de eosinófilos. En la mayoría de las enfermedades inflamatorias no alérgicas el grado de activación de eosinófilos va paralelo con el de neutrófilos, por lo que se asocian a niveles elevados de los más importantes marcadores de los neutrófilos, MPO y elastasa. Sin embargo, en la inflamación alérgica sólo se encuentran niveles elevados de ECP y no de MPO. La ECP se ha demostrado como un marcador muy útil en asma, rinoconjuntivitis y dermatitis⁵ y especialmente útil en la respuesta tardía de la reacción inmediata en el asma⁶ y en el seguimiento o control del asma⁷ y en la dermatitis atópica⁸. Estas proteínas se pueden medir tanto a nivel local^{9,10}, como en sangre¹¹.

Marcadores solubles de los neutrófilos

De todas las proteínas que segregan los neutrófilos (Tabla III), la elastasa y la MPO son las más importantes encontradas en diversas enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoidea¹² o en enfermedades inflamatorias del tubo digestivo⁹, etc. En el asma no se alteran los niveles de MPO, a no ser que concurra algún tipo de infección secundaria, para lo que sí puede tener utilidad su estudio.

Tabla III. Proteínas granulares de los neutrófilos

	Proteínas
Gránulos primarios	Cathepsina
	Elastasa
	Proteinasa 3
	Lysozima
	Defensinas
	Myeloperoxidasa (MPO)
	Azurocidina
Gránulos secundarios	Lactoferrina
	40-kDa proteína
	Gelatinasa

Tabla IV. Proteínas granulares de los mastocitos

	Proteínas
Mastocito tisular	Tryptasa
Mastocito tejido conectivo	Tryptasa
	Chymasa
	Cathepsina G
	Carboxipeptidasa

Marcadores solubles de mastocitos

De todos los marcadores de mastocitos de la Tabla IV, la histamina ha sido la más utilizada hasta la llegada de las determinaciones de las proteasas neutras^{13,14}. Pero la histamina refleja también la activación y su liberación por parte de basófilos, y puede ser importante especialmente en la anafilaxia producida por medicamentos, como veremos más adelante¹⁵.

De las proteasas neutras que contienen los gránulos de los mastocitos destaca la tryptasa (TRY), especialmente porque es única y fiel reflejo de la activación de los mismos. En los sujetos alérgicos no expuestos los niveles de tryptasa están habitualmente bajos, excepto en mastocitosis, pero cuando se exponen a los alérgenos, estos niveles aumenta considerablemente, en especial en la anafilaxia¹⁵.

Otros marcadores solubles de inflamación alérgica

De los ensayos sobre citoquinas y moléculas de adhesión realizados hasta ahora, sobresalen aquellas citoquinas que distinguen las subclases de linfocitos en Th1 (IL-2, IFN-gamma y TNF-beta) y Th2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13)¹⁶. Aunque hasta ahora los más utilizados

han sido la IL-5, como citoquina que interviene en el crecimiento y activación de eosinófilos y la IL-4, como regulador de la síntesis de IgE.

De las moléculas de adhesión destacan ELAM-1, como marcador específico de actividad de células endoteliales¹⁷ y el VCAM-1, que interviene en la acumulación selectiva de eosinófilos en el lugar de la inflamación¹⁸.

MARCADORES CELULARES

Citometría de flujo

La citometría de flujo está basada en el análisis de las células sanguíneas una a una, a través del haz de luz de un láser. La luz del láser es reflejada con diferente ángulo según las características de tamaño y complejidad del citoplasma de las células.

Además por medio de fotomultiplicadores se puede analizar la fluorescencia emitida por fluorocromos específicos que se utilizan para marcar una gran variedad de anticuerpos monoclonales, capaces de reconocer la expresión de diferentes marcadores de activación de las membranas celulares.

Esta técnica permite contar en menos de un minuto de 10.000 a 20.000 linfocitos, permite un control constante del conteo y puede ser utilizada para pequeñas o grandes muestras, a diferencia de los mediadores solubles. Las muestras se tratan para separar linfocitos en gradiente de ficoll, o se puede utilizar sangre completa, que mantiene mejor las proporciones fisiológicas de los leucocitos.

Análisis de activación celular por citometría de flujo

El primer paso consiste en seleccionar una ventana (gate), que representa una zona de particular interés en la distribución del tamaño de las células, que localice los linfocitos, donde además se encuentran los basófilos, y una pequeña proporción de monocitos y células NK. Después de seleccionar la ventana del tamaño, se pasa a seleccionar por emisión de fluorescencia utilizando anticuerpos marcados con fluorocromos para CD4 o CD8 o CD3/CD4 y CD3/CD8. Y una vez seleccionadas estas poblaciones, se separan por marcadores específicos expresados por las membranas de estos linfocitos, como marcador de activación temprano el CD69 y más tardío el CD25, HLD-DR, u otros (Figuras 1a y 1b). Así se puede considerar positiva

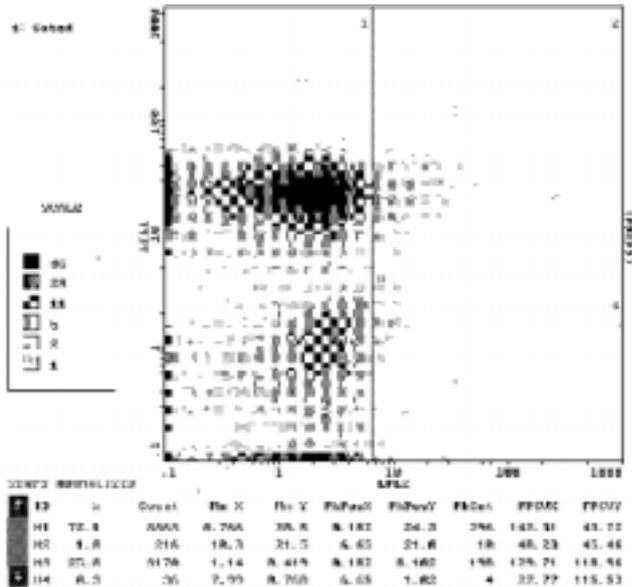


Fig. 1a. Control (CD3+/CD25+).

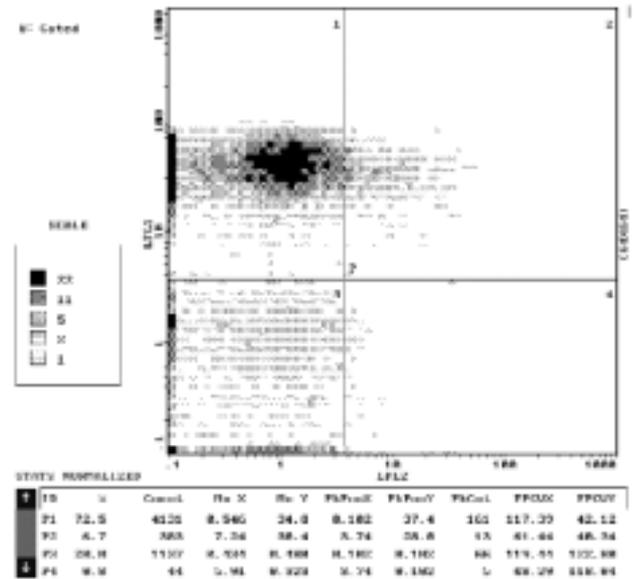


Fig. 1b. Caso (CD3+/CD25+).

una diferencia del 2% en la población de CD69 comparada con un control o consigo mismo cuando se encuentre asintomático, considerando ese momento como nivel basal, aunque se pueden considerar diferencias menores en función del nº de CD4 que se tengan¹⁹.

PAPEL DE LA TRYPTASA, PROTEÍNA CATIONICA DEL EOSINÓFILO E HISTAMINA EN LAS REACCIONES ALÉRGICAS INMEDIATAS POR MEDICAMENTOS

Los medicamentos pueden inducir reacciones alérgicas por diferentes mecanismos inmunológicos²⁰. Estas reacciones se pueden separar en inmediatas o tardías, las primeras habitualmente se producen por un mecanismo IgE mediado que reconoce el medicamento²¹, aunque en otras ocasiones se liberan mediadores de la inflamación alérgica sin encontrar IgE o con mecanismo todavía no conocido. Nuestro grupo utiliza el término de reacciones no inmediatas para aquellas que ocurren a un intervalo mayor de una hora desde la toma del medicamento y no son inducidas por IgE. A pesar de esta relativamente fácil división, muchas urticarias no se pueden encuadrar fácilmente en uno u otro tipo²². La medición de los mediadores inflamatorios ayuda a especular sobre los mecanismos que intervienen en la producción de las reacciones frente a los diferentes medicamentos, dado que no todos los mediadores se liberan en cualquier tipo de reacción.

Método

Desde 1992 y hasta ahora se vienen realizando estudios de marcadores solubles, en los sujetos que acuden a la Urgencia con reacciones producidas por medicamentos. La sangre se extrae cuando llegan, a las dos horas, 24 h después y al mes, cuando el sujeto ya se encuentra asintomático. Las muestras se almacenan a -20°C hasta su procesado. A la vez se recogen muestras de orina de forma secuencial a lo largo de 24 horas desde el inicio del episodio. Se determina Tryptasa (TRY) y Proteína Cationica del Eosinófilo (ECP) en suero y N-Metilhistamina (N-MH) en orina, bien por RIA o UniCAP con kits comerciales de Pharmacia-Upjhon o la orina por HPLC (método propio no publicado).

Con posterioridad abandonamos la recogida de orinas por los problemas que más adelante se comentan.

Resultados

En un estudio publicado en 1995²³, sobre 20 pacientes con anafilaxia y urticaria por medicamentos, se encontraron elevadas la tryptasa y la histamina en la mayoría de los casos, mientras que la ECP no se elevaba ni a las 2 h ni a las 24 h, lo que indicaba que las células implicadas en esta reacciones eran principalmente mastocitos y no eosinófilos, como se observa en las Tabla V y Figura 2.

Problemas

La mejoría en el monoclonal utilizado por Pharmacia ha conseguido mejorar la sensibilidad de la técnica

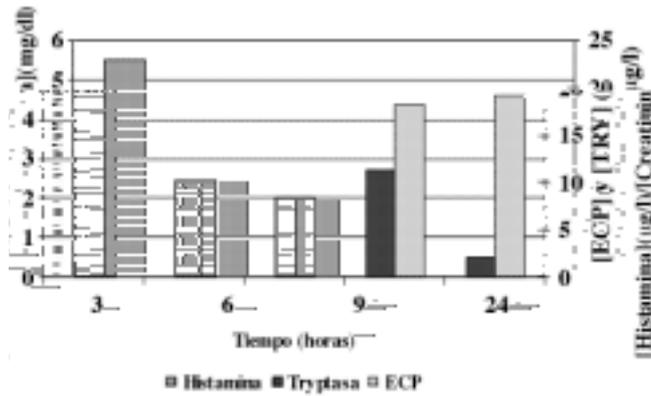


Fig. 2. Valores de histamina, tryptasa y ECP.

Tabla V. Reacciones inmediatas

Sujeto	Reacción	Medicamento
1	Shock anafiláctico	Amoxicilina
2	Shock anafiláctico	Amoxicilina
3	Shock anafiláctico	Penicilina G
4	Shock anafiláctico	Pirazolona
5	Shock anafiláctico	Pirazolona
6	Shock anafiláctico	Diclofenac
7	Shock anafiláctico	Trime-Sulfa
8	Shock anafiláctico	Vitamina B
9	Shock anafiláctico	Ciprofloxacino
10	Shock anafiláctico	Lidocaína
11	Shock anafiláctico	Contraste
12	Shock anafiláctico	Cloxacilina
13	Shock anafiláctico	Diclofenac
14	Urticaria	Amoxicilina
15	Urticaria	Pirazolona
16	Urticaria	Amoxicilina
17	Urticaria	Amoxicilina
18	Urticaria	Amoxicilina
19	Urticaria	Penicilina G
20	Urticaria	Penicilina G

de tryptasa, en especial con el uso del UniCAP, método no radiactivo, como apuntan Enrique et al.²⁴, si se toma > 8,23 ng/ml como valor para identificar a los pacientes con anafilaxia dentro de las 6 primeras horas de la reacción. Aunque sugieren que la utilidad de esta técnica se aumentaría si se realiza una extracción en condiciones basales como comparativa del incremento durante la reacción, lo que recomendamos nosotros.

La determinación de N-MH en orina (metabolito de la histamina eliminado en orina) es de fácil realización en el laboratorio. Sin embargo supone una enorme dificultad de recolección de las muestras a unas horas determinadas, incluso en sujetos normales o controles. Además, co-

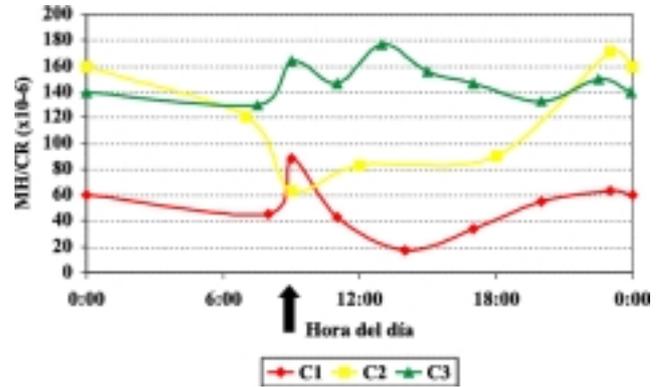


Fig. 3. Metil-histamina: controles.

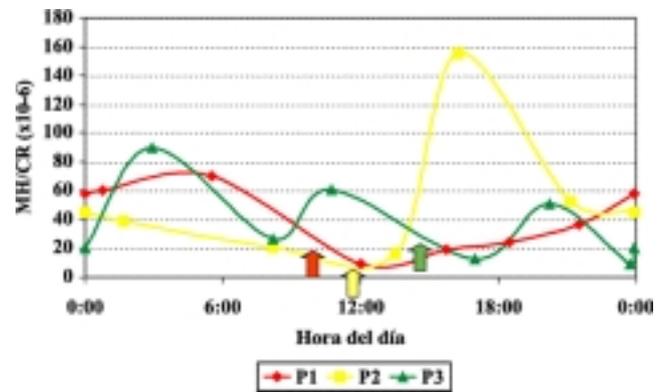


Fig. 4. Metil-histamina: pacientes.

mo se puede observar en las gráficas de orina de controles en la Figura 3, existe una variación diurna y nocturna, con un pico por la mañana y un aumento paulatino por la tarde, de tal forma que la hora de la reacción podía enmascarar subidas no muy intensas, sobre todo al tener que relativizarlas con la excreción de creatinina en pacientes, Figura 4. Otro factor importante era la dificultad de diferenciar los sujetos con niveles basales elevados de los episodios de urticaria que tenían estos sujetos especialmente con AINEs. Todo ello nos llevó a abandonar este marcador soluble de nuestros estudios.

PAPEL DE LOS MARCADORES DE LOS LINFOCITOS T EN LAS REACCIONES ALÉRGICAS INMEDIATAS POR MEDICAMENTOS

Desde la utilización de la citometría de flujo para el estudio de las reacciones por medicamentos, se nos han abierto unas expectativas interesantes para comprender mejor la participación de las diferentes células, especialmente subtipos de linfocitos T.

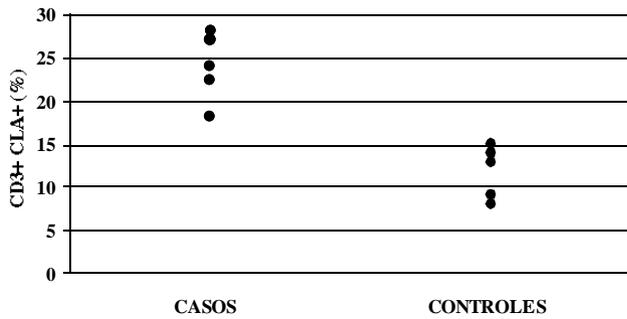


Fig. 5. Expresión de CLA en linfocitos CD3⁺ en pacientes alérgicos a medicamentos y controles. Modificado de Gonzalez et al. (1997).

En nuestros primeros trabajos, pensábamos que sólo podían mostrarse activados los linfocitos en las reacciones no inmediatas, como hemos definido antes²⁵. Así, se encontró que los linfocitos T intervenían en este tipo de reacciones como parecía obvio, pero además que representaban el primer componente del infiltrado celular de la piel en las reacciones tardías inducidas por betalactámicos²⁶.

Esta técnica nos permitía estudiar todo tipo de reacciones no inmediatas, como exantemas, urticarias, reacciones descamativas, etc., que representan más del 40% de las reacciones por penicilinas²⁷ como se presentó en el Simposium sobre medicamentos de Jerez de 1997²⁸.

Además, la mayoría de los linfocitos maduros recirculan entre la sangre y los tejidos, distribuyendo su repertorio de receptores de antígeno por todos los tejidos del organismo. En esta recirculación normal, las moléculas de adhesión juegan un papel muy importante, que se acrecienta cuando aparece la inflamación y la liberación de ciertas citoquinas que contribuyen a la regulación de la extravasación de los linfocitos, especialmente de aquellos con un ligando de "homing", por ejemplo el antígeno asociado a los linfocitos cutáneos CLA. Esta especialización del sistema inmune a través del fenómeno de "homing" nos permite estudiar los linfocitos en sangre periférica con este antígeno y si se incrementa en las afectaciones de la piel por medicamentos como se observa en la Figura 5, extraída del trabajo de González FJ, et al.²⁹.

Método

Desde 1996, además de los marcadores solubles, se viene realizando en los sujetos que acuden a Urgencias con reacciones por medicamentos la extracción de sangre heparinizada para el estudio de la expresión de marcadores de activación de los linfocitos T, en las mismas muestras, al llegar, a las 2 h, 24 h y al mes, en situación basal. Se procesan de

inmediato y sobre la subpoblación de CD4 se realizan los marcadores específicos CD69, CD25, HLA-DR, CD45RO, que expresan activación inmediata, tardía y de memoria de los linfocitos, respectivamente. También el CLA, que nos indica la expresión del "homing" cutáneo de linfocitos T.

Resultados

En la Tabla VI se pueden ver las características de un grupo de pacientes con reacciones a betalactámicos.

En la Figura 6 se puede observar en el grupo completo de reacciones inmediatas a betalactámicos, como el CD69 está elevado a las 2 h respecto al basal del mes, el CD25 se eleva más a las 24 horas y el CLA ya se eleva a las 2 horas y se mantiene elevado a las 24 h, mientras que tanto el DR como el CD45Ro apenas varían.

Cuando estudiamos estos marcadores por el tipo de reacción, encontramos que en la anafilaxia a las 2 horas se eleva el CD69, mientras el CLA ya está elevado al llegar y se mantiene a las 24 h (Figura 7). En las urticarias se observa que el CLA está más elevado que el resto de marcadores celulares (Figura 8). En las reacciones tardías, se eleva el CD69 y no tanto el CLA, aunque estas reacciones sean cutáneas en su mayoría (Figura 9).

En la Figura 10 se observa que la TRY, como marcador soluble, está muy elevada. Aumenta hasta 10 veces sobre el valor basal en el grupo de anafilaxias, más de 2 veces en las urticarias y menos de 2 veces en las reacciones tardías.

Si juntamos ambos marcadores celulares y solubles, podría quedar como se indica en la Tabla VII.

Tabla VI. Reacciones por betalactámico

Edad-Sexo	Reacción	Medicamento	P.C.	RAST
72-M	Anafilaxia	Amoxicilina	+	+
22-H	Reacción No Inm.	Amoxicilina	-	-
48-H	Urticaria	Amoxicilina	+	+
26-M	Exantema No Inm.	Amoxicilina	-	-
44-M	Reacción No Inm.	Amoxicilina	+	-
45-M	Ang.No Inmediato	Amoxicilina	-	-
28-M	Urticaria	Cefotaxima	+	-
15-M	Urt. No Inmediata	Cloxacilina	-	-
26-M	Urticaria	Amoxicilina	-	-
79-H	Shock Anafiláctico	Amoxicilina	+	+
40-M	Anafilaxia	Cefaclor		+
34-M	Shock Anafiláctico	Amoxicilina	+	+
24-M	Urticaria	Amoxicilina	-	-

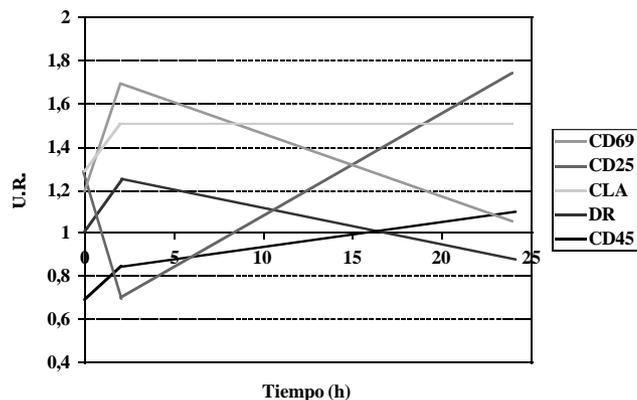


Fig. 6. Marcadores linfocitarios. Betalactámicos.

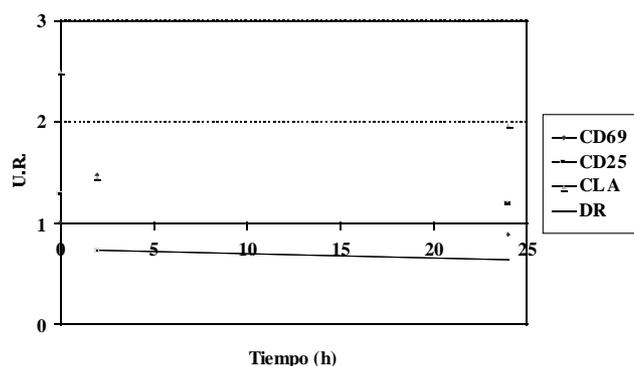


Fig. 7. Marcadores linfocitarios. Anafilaxia.

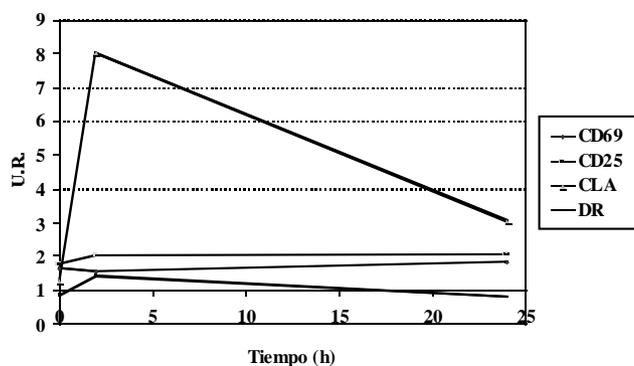


Fig. 8. Marcadores linfocitarios. Urticaria.

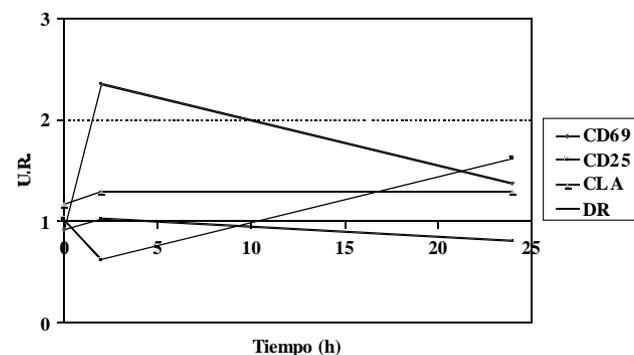


Fig. 9. Marcadores linfocitarios. Reacción no inmediata.

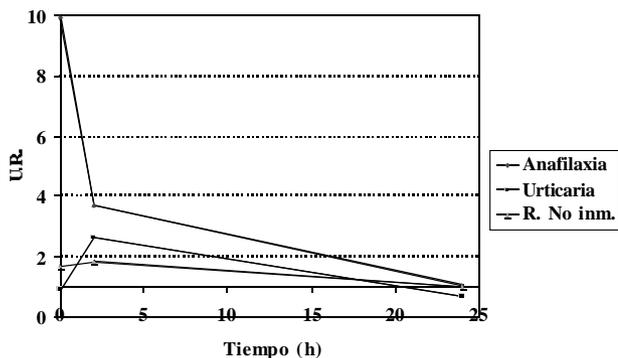


Fig. 10. Tryptasa. Penicilinas por tipo de reacción.

Tabla VII. Conclusiones

Reacción	Marcador soluble	Marcador celular
Anafilaxia	TRY > 8-10x basal	↑↑ CD69 > ↑ CLA
Urticaria	TRY > 2 x basal	↑↑ CLA > ↑ CD 69
No Inmediata	TRY < 2 x basal	↑CD69 = ↑ CLA

Conclusiones

El estudio de los marcadores solubles de actividad inflamatoria alérgica y de marcadores de activación de membrana de los Linfocitos T, podría ayudarnos a comprender mejor el tipo de reacción, las células que intervienen y su actividad en las reacciones inmediatas y no inmediatas producidas por medicamentos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Venge P. Soluble markers of allergic inflammation. *Allergy* 1994; 49:1-8.
- Andersson M, Andersson P, Venge P, Pipkorn U. Eosinophils and eosinophil cationic protein in nasal lavages in allergen-induced hyperresponsiveness: effects of topical glucocorticosteroid treatment. *Allergy* 1989; 44:342-348.
- Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, et al. Indirect evidence of bronchial inflammation assessed by titration of inflammatory mediators in BAL fluid of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 649-660.
- Hällgren R, Bjelle A, Venge P. Eosinophil cationic protein in inflammatory synovial effusions as evidence of eosinophil involvement. *Ann Rheum Dis* 1984; 43: 556-562.
- Griffin E, Håkansson L, Formgren H, Jörgensen K, Peterson C, Venge P. Blood eosinophil number and activity in relation to lung function in asthmatic patients with eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 548-557.

6. Venge P, Dahl R. Are blood eosinophil number and activity important for the development of the late asthmatic reaction after allergen challenge? *Eur J Respir Dis* 1989; 2 (Suppl. 6): 430s-434s.
7. Hedlin G, Ahlstedt S, Enander I, Håkansson L, Venge P. Eosinophil cationic protein (ECP), eosinophil chemotactic activity (ECA), neutrophil chemotactic activity (NCA) and tryptase in serum before and during bronchial challenge in cat-allergic children with asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 1992; 3: 144-149.
8. Kapp A, Czech W, Krutmann J, Schöpf E. Eosinophil cationic protein is sera of patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 1991; 24: 555-558.
9. Colombel JF, Hällgren R, Venge P, Mesnard B, Rambaud JC. Neutrophil and eosinophil involvement of the small bowel affected by chronic alcoholism. *Gut* 1988; 29: 1656-1660.
10. Hällgren R, Bjelle A, Venge P. Eosinophil cationic protein in inflammatory synovial effusions as evidence of eosinophil involvement. *Ann Rheum Dis* 1984; 43: 556-562.
11. Hällgren R, Borg T, Venge P, Modig J. Signs of neutrophil and eosinophil activation in adults respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1984; 12: 14-18.
12. Banks RE, Evans SW, Taylor KF, Bird HA, Whicher JT. Measurement of plasma concentrations of polymorphonuclear elastase- α 1-proteinase inhibitor (elastase- α 1-antitrypsin) in patients with rheumatoid arthritis: interference by rheumatoid factor. *Ann Rheum Dis* 1990; 49: 18-21.
13. Ishizaka T, Conrad D, Schulman E, Sterk A, Ishizaka K. Biochemical analysis of initial triggering events of IgE-mediated histamine release from human lung mast cells. *J Immunol* 1983; 130: 2357-2362.
14. Busse W, Swenson C. The relationship between plasma histamine concentration and bronchial obstruction to antigen challenge in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84: 658-1666.
15. Schwartz LB, Metcalfe DD, Miller JS, Earl H, Sullivan T. Tryptase levels as an indicator of mast-cell activation in systemic anaphylaxis and mastocytosis. *N Engl J Med* 1987; 316: 1622-1626.
16. Borish L, Rosenwasser L. Th1/Th2 lymphocytes: Doubts some more. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 161-164.
17. Montefort S, Rochge WR, Howarth PH, et al. Intercellular adhesion molecule-I (ICAM-I) and endothelial leucocyte adhesion molecule-I (ELAM-I) expression in the normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J* 1992; 5: 815-823.
18. Lamas AM, Mulroney CM, Schleimer RP. Studies on the adhesive interactions between purified human eosinophils and cultured vascular endothelial cells. *J Immunol* 1988; 140: 1500-1505.
19. Sabbah A, Sainte-Laudy J. Flow cytometry applied to the analysis of lymphocyte and basophil activation. *ACI International* 1996; 8: 116.
20. Amos HE. The problems of adverse drug reactions; in: *Allergic drug reactions*. London, Arnold, 1976; pp 1-8.
21. Phol LR, Satoh H, Christ DD, Kenna JG. The immunologic and metabolic basis of drug hypersensitivities. *Annu Rev Pharmacol* 1988; 28: 367-387.
22. González FJ, Blanca M. T lymphocytes subpopulation and markers in allergies to betalactams. *ACI International* 1997; 9: 22-23.
23. Fernández J, Blanca M, Moreno F, García J, Segurado E, del Cano A, Aguilar F. Role of tryptase, Eosinophil Cationic Protein and Histamine in immediate allergic reactions to drugs. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107: 160-162.
24. Enrique E, García-Ortega P, Sotorra O, Gaig P, Richart C. Usefulness of UniCAP tryptase fluoroimmunoassay in the diagnosis of anaphylaxis. *Allergy* 1994, 54: 602-606.
25. González FJ, Leyva L, Posadas S, Luque I, Blanca M, Santamaría L, Juárez C. Participation of T lymphocytes in cutaneous allergic reactions to drugs. *Clin Experimental Allergy* 1998; 28(Suppl 4): 3-6.
26. Hert M, Merk HF. Lymphocyte activation in cutaneous drug reaction. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 95S-98S.
27. Blanca M. Allergic reaction to penicillins. A changing world? *Allergy* 1995; 50: 777-782.
28. Blanca M, Canto G, López C, Romano A, Fernández J, García JC, Juste S, Martí E, Martínez I. The connection between basic research and clinical practice. *Clin Experimental Allergy* 1998; 28(Suppl 4): 87-91.
29. González FJ, Carvajal MJ, Juárez C, Blanca M, Santamaría LF. Expression of cutaneous lymphocyte associated antigen in circulating T cells in drug allergies reactions. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113: 345-347.