

URTICARIA CRONICA

EVOLUCION CLINICA, PRUEBA DEL SUERO AUTOLOGO, RECUENTO Y ACTIVACION DE BASOFILOS

NORA GALASSI¹, NORMA RIERA¹, GRACIELA REY², MARIA MARTA E. BRACCO¹, ALEJANDRO MALBRAN³¹ Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina;² Unidad de Alergia e Inmunología Clínica; ³ Hospital Británico, Buenos Aires

Resumen Recientes estudios sugieren que algunos pacientes con urticaria crónica tienen autoanticuerpos dirigidos contra la IgE o a la cadena alfa de su receptor de alta afinidad FcεR1a. La detección de éstos se realiza *in vivo* mediante la prueba del suero autólogo (PSA) o *in vitro* mediante una variedad de técnicas. Describimos aquí nuestra experiencia con 37 pacientes, 28 mujeres y 9 varones con una relación femenino/masculino de 3.1 y edad promedio de 36.5 años (16-78). La PSA fue positiva en 25 (68%) y negativa en 12 (32%). El suero indujo una pápula significativamente más grande que el plasma ($122 \pm 78 \text{ mm}^2$ vs $57 \pm 66 \text{ mm}^2$, $p < 0.05$). La persistencia de la urticaria fue de 437 días por análisis de Kaplan y Meier, sin diferencias entre pacientes con PSA(+) y PSA(-) (437 vs 369, $p = 0.18$). La concentración de IgE ($157 \pm 173 \text{ UI/mL}$) sigue la misma distribución que la de la población normal no seleccionada. El número de basófilos se encontró significativamente disminuido en el grupo de pacientes comparado con los controles normales (17 ± 12 vs $43 \pm 27 \text{ cél/mL}$, $p < 0.008$). Los sueros de 2/7 pacientes (28.6%) con PSA(+) y muy bajo recuento de basófilos indujeron la expresión de CD63. La especificidad del estímulo sobre el complejo FcεR1a-IgE se demostró utilizando células de un donante con basófilos no liberadores. Confirmamos la existencia de un grupo de pacientes con autoanticuerpos dirigidos al complejo FcεR1a-IgE, pero sugerimos que su investigación rutinaria no predice la evolución clínica de los mismos.

Palabras clave: urticaria crónica, autoanticuerpos, evolución

Abstract *Chronic urticaria. Follow up, autologous serum skin test, basophil count and activation.* Recent advances on the pathogenesis of chronic urticaria have defined a group of patients with autoantibodies directed to the IgE or to the alpha chain of the Fc high affinity receptor of IgE, FcεR1a. These antibodies are detected *in vivo* through the autologous serum test (AST) and *in vitro* with a variety of techniques. We here describe 37 patients with chronic urticaria, 28 female and 9 male, with a f/m ratio of 3.1. Mean age at onset was 36.5 years (range 16-78). AST was positive in 25 (68%) of 37 patients. Serum induced a wheal significantly larger than plasma ($122 \pm 78 \text{ mm}^2$ vs $57 \pm 66 \text{ mm}^2$, $p < 0.05$). Median persistence of the chronic urticaria, estimated by Kaplan-Meier analysis, was 437 days, with no difference between AST(+) and AST(-) patients (437 vs. 369, $p = 0.18$). Mean IgE concentration was $157 \pm 173 \text{ IU/mL}$, as expected in an unselected population. Basophil count was lower in patients compared with controls ($17 \pm 12 \text{ cel/mL}$ vs. $43 \pm 27 \text{ cel/mL}$, $p < 0.008$). Only sera from 2/7 (28.6%) patients AST (+) and very low basophil count consistently induced expression of CD63. This effect was abrogated in non-releasing basophils, confirming the presence of antibodies directed to the FcεR1a-IgE. We conclude that functional antibodies are present in only a minority of patients and that their identification does not predict the outcome.

Key words: chronic urticaria, autoantibodies, follow up

La urticaria y el angioedema son entidades clínicas encontradas frecuentemente en la práctica médica. Se estima que el 15 al 25% de la población tendrá urticaria en algún momento de su vida¹ y que su prevalencia es del 0.11%². Se presenta aislada en el 45% de los casos, acompañada de angioedema en el 45% y en el 10 o 15% de los pacientes el angioedema es la única manifestación del proceso³.

La urticaria se clasifica como aguda si dura menos de seis semanas y crónica si dura más de ese tiempo. La urticaria crónica (UC) es, en el 80% o más de los casos, idiopática⁴. Investigaciones realizadas en los últimos años, han permitido comprender mejor la patogenia de las urticarias idiopáticas, identificando autoanticuerpos capaces de desarrollar lesiones *in vivo*. En 1986, Grattan y col realizaron la denominada prueba del suero autólogo (PSA), en la que el suero autólogo inyectado en la cara volar del antebrazo induce la formación de una pápula urticariana en el sitio de inyección, sugiriendo la presencia de sustancias liberadoras de histamina en el suero de algunos enfermos⁵. Histológicamente, la lesión parece simular una respuesta mediada por IgE⁶. La naturaleza-

Recibido: 28-VIII-2002

Aceptado: 30-X-2002

Dirección Postal: Dr Alejandro Malbrán, Uriburu 1267, 1114 Buenos Aires, Argentina.

e-mail: amalbran@unilerta.com.ar

za química de los factores responsables de la PSA definieron la UC como una enfermedad autoinmune mediada por autoanticuerpos de tipo IgG, dirigidos en algunos casos hacia la IgE asociada a la membrana del basófilo⁷, y en otros hacia la cadena alfa del receptor de alta afinidad para el fragmento Fc de la IgE, el Fc ϵ R1a⁸. Estudios *in vitro* han demostrado la capacidad de la IgG purificada de los pacientes para inducir liberación de histamina de basófilos normales⁹, así como el aumento de la expresión de la molécula de membrana CD63 y la producción de leucotrienos¹⁰. Sobre la base de estos estudios se acuñó el nombre de UC autoinmune para aquellos pacientes con PSA positiva.

La detección de anticuerpos anti-Fc ϵ R1a por ELISA en patologías no urticarianas y la falta de actividad funcional de los autoanticuerpos en algunos pacientes con PSA positiva¹¹, han estimulado nuevos estudios sobre la relación existente entre la urticaria, la PSA y la funcionalidad de los autoanticuerpos *in vitro*. El objetivo del presente trabajo es describir nuestros hallazgos en 37 pacientes con UC, determinando la presencia de basofilo-penia y la capacidad del suero de inducir activación de basófilos normales, a fin de correlacionarlos con la PSA y con la evolución clínica.

Materiales y métodos

Pacientes

Iniciamos el reclutamiento de pacientes en 1998. Definimos como pacientes con UC a todos aquellos individuos afectados con urticaria, con o sin angioedema, con una frecuencia de por lo menos cinco veces por semana y por lo menos con seis semanas de evolución. Para el diagnóstico de UC idiopática, se puso especial énfasis en la ausencia de causas físicas de urticaria y en la ingesta crónica de drogas. En el momento del diagnóstico se registraron la edad, el sexo y la fecha aproximada de inicio de los síntomas. Asimismo, aclaramos a los pacientes que serían contactados periódicamente para informarnos sobre su evolución. Consideramos libres de urticaria a todos aquellos pacientes que no presentaron síntomas por un mínimo de un mes.

Prueba del suero autólogo (PSA)

Antes de realizar la PSA los pacientes dieron su consentimiento informado. Se suspendió toda medicación antihistamínica durante las 48 h previas al estudio. Si el paciente estaba recibiendo astemizol, se reemplazó éste por una droga de vida media corta por un término de dos semanas antes de la suspensión del mismo, a fin de controlar los síntomas durante el tiempo de lavado de la droga. El día de la prueba se realizó una extracción de sangre que se distribuyó en dos tubos, uno sin anticoagulante y otro con heparina. En condiciones de esterilidad se realizó la separación del suero y del plasma y se aplicó al paciente en la cara volar de cualquiera de los antebrazos una inyección intradérmica de 0.10 ml de suero, plasma y solución fisiológica, en tres sitios alineados. La reacción fue evaluada a los 30 y a los 120 minutos, por dos observadores, poniendo especial énfasis en la presencia de prurito, eritema y el tama-

ño de la pápula. Los pacientes fueron clasificados como positivos o negativos. En 17 /25 pacientes se registró el tamaño de la pápula.

Evolución

Para determinar la persistencia de la urticaria se calculó el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas, de acuerdo al relato de los pacientes, hasta el último contacto o hasta la fecha estimada de remisión. Para ello los pacientes fueron entrevistados en el consultorio o telefónicamente¹² cada cuatro meses.

Citometría de flujo

Empleamos un equipo *FACScan* de Becton Dickinson (BD). Las muestras se adquirieron y analizaron con el programa *CellQuest*. En todos los estudios, sobre el gráfico de tamaño (FSC) vs complejidad celular (SSC), delimitamos la región R1, que incluye linfocitos y basófilos, de la cual se adquirieron por lo menos 5000 eventos.

a) Recuento de basófilos:

Se realizó a partir de sangre entera con la técnica de marcación y lisis¹³. Los basófilos de R1 fueron detectados por los marcadores clásicos de membrana anti-CD45FITC (BD) / anti-CD14PE (BD) como células con menor intensidad de fluorescencia media (IFM) para anti-CD45 respecto de los linfocitos y al igual que éstos, negativos para CD14. Se individualizaron también con la marcación diferencial anti-IgE biotina-StreptavidinaPE (*Vector*) / anti-CD45TC (*Caltag*). El porcentaje de células IgE (+) fue expresado respecto del total de leucocitos en un gráfico de puntos SSC vs anti-IgE. En algunos casos calculamos el número absoluto de basófilos.

b) Estimulación de basófilos:

La activación de los basófilos fue detectada mediante la cuantificación del aumento de la expresión de CD63¹⁴ de basófilos normales preincubados con interleuquina 3 (IL-3)^{15,16}. Los leucocitos de dadores normales sedimentados con Dextrán 6% fueron resuspendidos en PBS con Ca⁺⁺ (2 mM) y Mg⁺⁺ (2 mM) e IL-3 a una concentración final de 10 ng/mL e incubados 15 minutos a 37 °C. Luego se agregaron los sueros inactivados (56 °C, 30 minutos) de los pacientes, en una dilución final al medio, y se continuó la incubación 45 minutos. Para el estudio del papel del complemento adicionamos igual volumen de suero fresco normal. Como controles negativos utilizamos células con PBS o con sueros normales y como control positivo, células activadas con 1mM de formil methyl leucil fenilalanina (fMLP). Después de un lavado las células fueron marcadas 30 minutos con anti-IgE biotina y nuevamente lavadas. Luego agregamos anti-CD63FITC (*Caltag*), StreptavidinaPE y anti-CD45TC, se incubaron 30 minutos, se lavaron y se resuspendieron en líquido de lectura (*Isoton II- Coulter*). Cuantificamos la expresión de CD63 en células IgE(+)/CD45(+). El límite negativo fue la expresión de CD63 en células sin activar. Los resultados se expresaron como:

Índice de Activación (IA) = (% de células CD63+ x IFM de la población CD63+).

Para evaluar múltiples experimentos, realizados con células de distintos dadores normales, expresamos los IA como porcentaje de la activación obtenidos con el fMLP para cada dador, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Activación} = \text{IA de la muestra} \times 100 / \text{IA del fMLP}$$

c) Detección de dadores con basófilos respondedores (R) y no respondedores (NR)

Antes de realizar un estudio de activación se requiere determinar si los basófilos del dador normal son R o NR¹⁷. Los leucocitos sedimentados con Dextrán 6% fueron resuspendidos en PBS con Ca⁺⁺ (2 mM) y Mg⁺⁺ (2 mM) e IL-3 a una concentración final de 10 ng/mL e incubados 15 minutos a 37 °C. Luego agregamos 50 mg/mL de anti-IgE y se incubaron 45 minutos adicionales. Se lavaron y se marcaron como se indicó en b).

Determinación de IgE sérica:

A partir de los sueros, conservados a -20 °C, evaluamos la concentración de IgE, en forma simultánea, en 25 de los 37 pacientes mediante electroquimioluminiscencia, utilizando un equipo Elecsys[®] 1010/2010, Roche Diagnostics, de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Estadística

Para los cálculos estadísticos de los estudios citométricos empleamos la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Utilizamos el test de Student para los cálculos paramétricos. Los estudios de sobrevivencia se evaluaron por Kaplan-Meier. Consideramos como valor significativo $p < 0.05$.

Resultados

Datos demográficos

Consultaron 28 mujeres y 9 varones con una relación femenino/masculino de 3.1 a 1. La edad promedio fue de 36.5 años y el rango de 16 a 78 años.

PSA

La PSA fue positiva en 25 (68%) de nuestros pacientes y negativa en 12 (32%). También fue negativa en tres pacientes controles, uno con dermatografismo, otro con prurigo nodular crónico y un tercero con síndrome de Schnitzle, que es una erupción urticariana con fiebre, dolor articular, paraproteinemia monoclonal de isotipo IgM. El suero indujo una pápula significativamente más grande que el plasma ($122 \pm 78 \text{ mm}^2$ vs. $57 \pm 66 \text{ mm}^2$, $p < 0.05$, $n = 17$) y ambos fueron significativamente más grandes que el control de salina ($12 \pm 11 \text{ mm}^2$, $p < 0.05$), en los pacientes considerados positivos. El pico máximo de expresión se registró a los 30 minutos y a las dos horas la lesión había involucionado.

Evolución

Determinamos la evolución en 33 de los 37 pacientes ingresados al estudio porque se perdió el contacto con 4 pacientes de los cuales 3 tenían PSA positiva. La mediana de la persistencia de la UC, calculada por el método de Kaplan-Meier, fue de 437 días. No detectamos una diferencia significativa en la duración de la UC com-

parando pacientes con PSA positiva y negativa (437 vs. 369, $p = 0.18$) como se muestra en la Figura 1.

En el momento de nuestra última evaluación habían remitido 29/33 (88%) pacientes, de los cuales 20 (67%) tenían PSA(+). De los 4 sujetos que estaban con UC activa 3 tenían PSA(+).

Recuento absoluto y relativo de basófilos

La Figura 2 muestra los porcentajes de basófilos obtenidos en 17 pacientes y 18 controles normales. El límite inferior normal corresponde al porcentual más bajo del rango normal. Los valores fueron significativamente diferentes entre ambos grupos: pacientes (media \pm DS) = $0.27 \pm 0.24\%$ y controles = $0.52 \pm 0.26\%$, $p < 0.003$. En 9 de 17 pacientes el porcentaje de basófilos estuvo por debajo del límite inferior normal. Uno de los pacientes

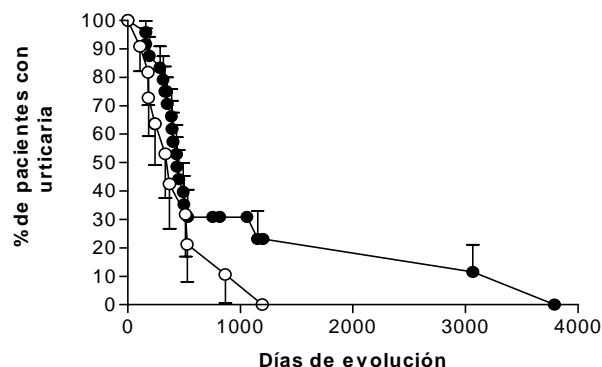


Fig. 1.- Persistencia de la urticaria crónica según los resultados de la prueba de sero autólogo (PSA). Círculos abiertos: porcentaje de pacientes con PSA negativa. Círculos llenos: porcentaje de pacientes con PSA positiva.

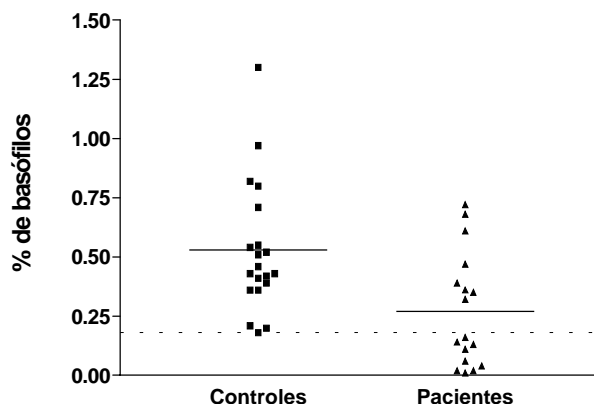


Fig. 2.- Porcentaje de basófilos circulantes en pacientes con urticaria crónica y en controles normales. Las líneas negras horizontales indican el valor medio de cada grupo y la línea punteada el valor inferior normal.

tenía PSA(-) y 8 (89%) PSA(+). Los cinco pacientes con porcentaje de basófilos inferior a 0.10% tuvieron PSA(+), sugiriendo una asociación estadística con la basofilo-penia. El número absoluto de basófilos circulantes mos-tró también una diferencia estadísticamente significati-va entre el grupo de pacientes (17 ± 12 cél/ μ L) y el de los normales (43 ± 27 cél/ μ L), $p < 0.008$.

Expresión de CD63

Fue estudiada en 28 pacientes. En la Figura 3 se ilustra la reproducibilidad de la reacción activando las células de un mismo dador normal (en tres experimentos) con sueros de 8/28 pacientes: P1 y P2 con PSA(-), P3, P4 y P5 con PSA(+), todos ellos con recuento normal de basófilos, P6, P7 y P8 con PSA(+) y recuento bajo de basófilos. Como controles se emplearon: sueros norma-les, N1 y N2.; suero de un paciente con dermatografismo (C1) y de un paciente con síndrome de Schnitzle (C2) y fMLP como control positivo. Una fuerte estimulación, reflejada en un alto IA se observó sólo con los sueros P6 y P7.

La Figura 4 compara la respuesta de los basófilos R y NR al anti-IgE que estimula a la célula a través del complejo Fc ϵ R1a-IgE sin modificar la respuesta al fMLP. Como se observa, el dador NR es incapaz de respon-der al estímulo dependiente del Fc ϵ R1a. Los sueros P6 y P7 no indujeron la expresión de CD63 en el dador NR.

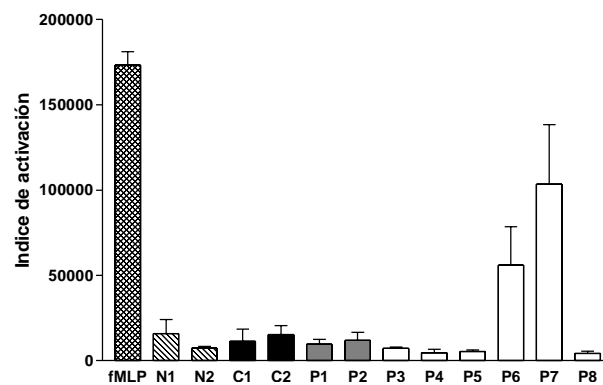


Fig. 3.- Reproducibilidad de la expresión de CD63. Las barras indican el valor medio de los Índices de Activación* de los basófilos en tres experimentos realizados con células de un mismo dador normal respondedor. Basófilos estimulados: con fMLP, con sueros de dos dadores normales N1 y N2, con sueros de pacientes controles C1 con dermatografismo y C2 con síndrome de Schnitzle y sueros de pacientes con urticaria crónica, P1 y P2 con prueba del suero autólogo (PSA) negativa, P3-P8 con PSA positiva. Los pacientes P3-P5 tenían recuento normal de basófilos y los pacientes P6-P8 con bajo recuento de basófilos.

* Índice de Activación = (% de células CD63+ x IFM de la población CD63+)
IFM= Intensidad de fluorescencia media.

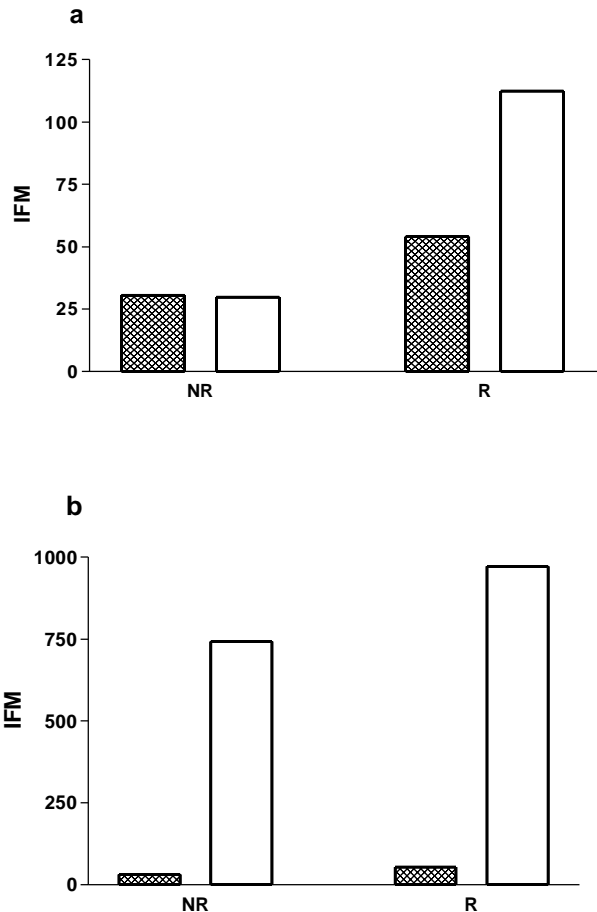


Fig. 4.- Expresión de CD63 en basófilos de un dador no respondedor (NR) y de un dador respondedor (R). Barras cuadrículadas controles sin estimular. Barras blancas: estímulados con 50 µg/mL de anti-IgE. en (a) y con 1 mM de fMLP en (b). IFM= Intensidad de fluorescencia media.

Cada uno de los 20/28 pacientes restantes (PSA+ o PSA-) (datos no ilustrados) se estudiaron con tres dadores R. Ninguno aumentó la expresión de CD63.

El agregado de complemento a la reacción indujo la activación de basófilos de un dador R sólo en 2, entre ellos el P8, de 6 sueros de pacientes y en 1/2 sueros normales. No se modificó la respuesta de P6 y P7 ni para el fMLP.

Concentración de IgE

La concentración media de IgE en 25 de los 33 pacien-tes fue de 157 ± 173 UI/mL. Nueve (36%) de los 25 pacientes tuvieron una IgE por encima del máximo valor normal, que caracteriza a las poblaciones atópicas¹⁸. Esta proporción es igual a la esperada en poblaciones no se-leccionadas y confirma la falta de utilidad clínica de la determinación de la IgE en pacientes con UC, como ele-mento diagnóstico.

Discusión

La etiología de la UC ha comenzado a dilucidarse en los últimos años. En 1962, Rorsman¹⁹ describió la reducción de basófilos circulantes en pacientes con UC y en el año 1974²⁰ se describió un factor sérico que podría causar la desensibilización de los mastocitos por vías dependientes de la IgE. En 1986 Grattan y col.⁵ demostraron la presencia de ese factor en algunos, pero no en todos los pacientes con UC, observando que la inyección intradérmica de suero autólogo producía una pápula en la piel, que recordaba a la lesión urticariana. Ese factor fue luego identificado como una IgG dirigida al FcεR1a de alta afinidad⁸ o bien dirigido hacia la molécula de IgE⁷. Otros factores activadores fueron también descritos⁹. La presencia o no de estos autoanticuerpos no es en sí misma diagnóstica de UC autoinmune, dado que también se los ha encontrado en patologías no urticarianas¹¹. Algunos autores han sugerido que los autoanticuerpos presentes en pacientes con UC tienen la capacidad de activar basófilos normales, mientras que el suero de pacientes con otras patologías, no²¹. En este trabajo, hemos estudiado la relación existente entre UC, la PSA, la presencia de basofilia y la capacidad del suero de los pacientes para activar basófilos. Nosotros hemos confirmado que el 70% de los pacientes con UC tienen una PSA(+). Al igual que en otras series internacionales, encontramos una preponderancia de mujeres jóvenes con UC, quizás reflejando la mayor susceptibilidad de este grupo etario para el desarrollo de enfermedades autoinmunes²². También hemos confirmado que los pacientes con UC tienen un número de basófilos circulantes significativamente inferior al de la población normal. Encontramos buena correlación entre el nivel bajo de basófilos y la PSA, pero no ha servido para predecir la evolución de la urticaria. Por último, nuestros hallazgos confirman que existe un subgrupo de pacientes con capacidad de inducir activación de basófilos *in vitro*, en los cuales hay plena coincidencia entre todas las pruebas.

Los resultados de los estudios de activación fueron reproducibles en experimentos realizados con células del mismo y de distintos donadores. De los sueros utilizados, sólo dos fueron activadores y correspondían a pacientes con PSA(+) y recuento de basófilos inferior a 0.10%. Los tres restantes sueros de pacientes con PSA (+) y con recuento de basófilos inferior a 0.10% (Figura 2) entre ellos el P8, no indujeron activación. La capacidad de inducir activación sólo fue demostrable utilizando basófilos liberadores, lo cual confirma que el estímulo actúa a través del complejo FcεR1a-IgE. Dado que según algunos autores el complemento es necesario para una óptima estimulación²³, repetimos el ensayo con el agregado de suero normal fresco como fuente de complemento; observamos que si bien éste indujo que algu-

nos sueros como el P8 fueran activadores, esta capacidad también se encontró con algunos sueros de normales, dificultando con estos datos la interpretación del papel del complemento en la inducción de CD63.

La distribución de la concentración de la IgE no difirió de la esperada en poblaciones no seleccionadas y no fue de utilidad diagnóstica. Confirmamos que el plasma heparinizado produce menos lesión que el suero homólogo²⁴, aunque no hemos ahondado aún en el mecanismo de acción.

La PSA, aunque orientadora, no es en sí misma diagnóstica. Nuestros resultados preliminares sugieren una cierta correlación, no significativa estadísticamente, con el número de basófilos, cuando los valores de éstos son inferiores a 0.10%. A su vez, basófilos bajos más suero autólogo positivo parece predecir la presencia de funcionalidad *in vitro* del anticuerpo (p=0.10).

Como surge de nuestros estudios estadísticos, la UC es una enfermedad crónica con un pronóstico de duración media para cada nuevo paciente de 437 días. Un 25% de los pacientes con UC seguirán sintomáticos 5 años después de comenzada la enfermedad. En nuestro grupo de estudio, el 89% remitió espontáneamente. Por ello, la frustración y angustia que estos pacientes transmiten en la consulta podría reducirse advirtiéndolos de la característica benigna, pero muy prolongada, de la enfermedad.

Agradecimientos: Los autores agradecen la colaboración técnica de la Srta. Marta Felippo. El presente trabajo ha sido financiado con un subsidio de investigación generosamente otorgado por la Fundación Alberto J Roemmers y por el apoyo de la Fundación de la Hemofilia.

Bibliografía

1. Champion RH, Roberts SOB, Carpenter RG, Roger JH. Urticaria and angioedema. A review of 554 patients. *Br J Dermatol* 1969; 81: 588-97.
2. Hellgren L. The prevalence of urticaria in the total population. *Acta Allergol* 1972; 27: 236-40.
3. Cooper KD. Urticaria and Angioedema. *J Am Acad Dermatol* 1991; 25: 166-76.
4. Champion RH. A practical approach to urticarial syndromes. A dermatologist's view. *Clin Exp Allergy* 1991; 20: 221-4.
5. Grattan CEH, Wallington TB, Warin RP, Kennedy CTC, Bradfield JW. A serological mediator in chronic idiopathic urticaria. A clinical immunological and histological evaluation. *Br J Dermatol* 1986; 114: 583-90.
6. Grattan CEH, Boon AP, Winkelman RK. The pathology of autologous serum skin test response in chronic urticaria resembles IgE-mediated late phase reactions. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990; 93: 198-204.
7. Grattan CEH, Francis DM, Hide M, Greaves MW. Detection of circulating histamine releasing autoantibodies with functional properties of an anti-IgE in chronic urticaria. *Clin Exp Allergy* 1992; 21: 695-704.

8. Hide M, Francis DM, Grattan CEH, Hakimi J, Kochan JP, Greaves MW. Autoantibodies against the high affinity IgE receptor as a cause of histamine release in chronic urticaria. *N Engl J Med* 1993; 328: 1599-604.
9. Fiebiger E, Maurer D, Holub H, et al. Serum IgG autoantibodies against the FcεR1a: A selective marker and pathogenetic factor for a distinct subset of chronic urticaria patients? *J Clin Invest* 1995; 96: 2606-12.
10. Wedi B, Novacovic V, Koerner M y A Kapp. Chronic urticaria serum induces histamine release, leukotriene production, and basophil CD63 surface expression-Inhibitory effects of anti-inflammatory drugs. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 552-60.
11. Fiebiger E, Hammerschmid F, Stingl G, Maurer D. Anti-FcεR1a autoantibodies in autoimmune-mediated disorders. *J Clin Invest* 1998; 101: 243-51.
12. Sehgal VN, Rege VL. An interrogative study of 158 urticaria patients. *Ann Allergy* 1991; 31: 279-154.
13. Galassi N, Riera N, Saracco M, Aixalá M, de Bracco MM. Citometría de Flujo: valores absolutos y relativos de células CD3CD4 obtenidos con dos técnicas. *Acta Bioquim Clin Latinoam* 1999; 33: 331-7.
14. Knol EF, Mul FP, Jansen H, Calafat J, Roos D. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 328-38.
15. Hirai K, Morita Y, Misaki Y, et al. Modulation of human basophil histamine release by hematopoietic growth factors. *J Immunol* 1988; 141: 3958-64.
16. Bochner B, McKelvey AA, Sterbinsky SA, et al. IL-3 augments adhesiveness for endothelium and CD11b expression in human basophils but not neutrophils. *J Immunol* 1990; 145: 1832-7.
17. Kepley CL, Youssef L, Andrews RP, Wilson BS, Oliver JM. Syk deficiency in nonreleaser basophils. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 279-84.
18. Raymond Zeiss C, Pruzansky JJ. Immunology of IgE mediated and other hypersensitivity states. In: Roy Patterson. JB Lippincott Company (eds). *Allergic Diseases: diagnosis and management*, Chicago, 1993, p 38-45.
19. Rorsman H. Basophilic leucopenia in different forms of urticaria. *Acta Allergol* 1962; 17: 168-84.
20. Greaves MW, Plummer VM, McLaughlan P, Stanworth P. Serum and cell bound IgE in chronic urticaria. *Clin Allergy* 1974; 4: 265-71.
21. Gruber BL, Baeza ML, Marchese MJ, Agnello V, Kaplan AP. Prevalence and functional role of anti-IgE autoantibodies in urticarial syndromes. *J Invest Dermatol* 1988; 90: 213-7.
22. Ferrer M, Nakazawa K, Kaplan AP. Complement dependence of histamine releases in chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 169-72.
23. Tong LJ, Balakrishnam G, Kochan JP, Kinet JP, Kaplan AP. Assessment of autoimmunity in patients with chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 461-5.
24. Fagiolo U, Cancian M, Bertollo L, Peserico A, Amadori A. Inhibitory effect of heparin on skin reactivity to autologous serum in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 1143-7.

Can anybody remember when the times were not hard and money not scarce?

¿Recuerda alguien tiempos que no fueron difíciles, y en el que el dinero no andaba escaso?

Ralph W. Emerson (1803-1882)
Works and Days