

UPDATE en aLERGIA

Asma ocupacional causado por *Papaver somniferum*

Referencia

Moneo I, Alday E, Ramos C, Curiel G. Occupational asthma caused by *Papaver somniferum*. *Allergol et Immunopathol* 1993;21(4):145-148.

Palabras clave

Papaver somniferum. Asma ocupacional. Liberación de histamina IgE específica.

Objetivo

Demostrar que *Papaver somniferum*, planta de donde se obtienen morfina y codeína, es capaz de producir asma ocupacional por un mecanismo IgE mediado en trabajadores de una industria farmacéutica. Esta acción es independiente de la capacidad que estos fármacos tienen de liberar histamina por degranulación directa de mastocitos.

Material y métodos

Se estudiaron 28 trabajadores empleados en las fábricas seleccionadas para el estudio, a los que se les realizó extracción de sangre.

Las cápsulas prensadas de *Papaver somniferum* fueron extraídas en PBS al 10% p/v, durante la noche, en cámara fría. Posteriormente, el extracto fue cen-



Papaver somniferum.

trifugado a 1.500 g durante 10 minutos y filtrado a través de una membrana de 22 µm.

Las pruebas cutáneas se realizaron mediante método estándar, empleando como control positivo histamina ácido fosfato (1:1.000 p/v).

Las pruebas de provocación bronquial específica se llevaron a cabo siguiendo la descripción de Alday y cols^{1,2}, considerando positiva una caída del FEV₁ superior al 20%. Dos de los pacientes sintomáticos se negaron a que se les realizara la provocación bronquial.

Se emplearon 10 individuos atópicos no expuestos como control en la realización de las pruebas cutáneas y provocación bronquial específica.

El ensayo de liberación de histamina se realizó mediante método Siraganian³. Se elaboraron 4 diluciones del extracto antigénico para ser probadas posteriormente sobre cada muestra de sangre y obtener así una curva dosis-respuesta.

Director

Javier Subiza (Alergólogo). Centro de Asma y Alergia Subiza. Madrid

Comité Editorial: Javier Subiza, José Luis Subiza, Concha Barjau, Angélica Feliu, Pilar González, Martha Cabrera

© De los textos: los autores, 2008

Coordinación editorial:  Jarpyo Editores C/ Antonio López Aguado, 4. 28029 Madrid. e-mail: editorial@jarpyo.es. www.jarpyo.es

Update en Alergia está patrocinado por Laboratorios Almirall, S.A.

Depósito Legal:

SVR: 8/07-R-CM

ISSN: 1887-3154

Los datos personales necesarios para poderle entregar este material promocional están recogidos en un fichero cuyo responsable es Laboratorios Almirall, S.A., que los utilizará para la gestión comercial únicamente interna. Usted puede ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición, simplemente escribiendo a: Laboratorios Almirall, S.A., Ronda General Mitre, 151. 08022-Barcelona. Fecha elaboración material: enero 2008.

Reservados todos los derechos de edición. Se prohíbe la reproducción total o parcial de los artículos, material fotográfico, dibujos o cuadros contenidos en el presente libro, ya sea por medio mecánico, de fotocopia o sistema de grabación, sin la autorización por escrito de los titulares del Copyright.

Se empleó anti-IgE para medir la capacidad de liberación de mediadores no dependiente de IgE por los basófilos.

La IgE total fue medida por IgE-EIA (Pharmacía), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Posteriormente se llevó a cabo la detección de IgG e IgE específicas por método ELISA indirecto, siendo considerado positivo cualquier resultado por encima de 0,2 OD de la media (obtenida de 10 controles no relacionados).

Finalmente se realizó SDS-PAGE mediante método discontinuo (Laemmli)⁴ y detección de IgE específica por Immunoblotting.

Resultados

Seis pacientes de los 28 trabajadores estudiados presentaban síntomas de asma ocupacional en su lugar de trabajo. Estos 6 pacientes presentaban prueba cutánea positiva a *Papaver somniferum*. La prueba de provocación bronquial específica con extracto de *Papaver somniferum* se realizó en 4 de los 6 pacientes sintomáticos, obteniéndose resultado positivo en todos ellos.

Los niveles de IgE total fueron > 200 kU/l en 5 de los 6 pacientes sintomáticos, al contrario de lo obtenido en los individuos expuestos asintomáticos, donde sólo 4 de los 22 alcanzaron estos valores. Es más, los niveles de IgE total > 400 kU/l sólo se objetivaron en los pacientes sintomáticos. Este hecho sugirió que un nivel de IgE total elevado es factor de riesgo para padecer esta enfermedad.

La IgG específica no fue detectada por ELISA indirecto en el suero de pacientes expuestos, ni sintomáticos ni asintomáticos.

Mediante SDS-PAGE se detectó una proteína de 67 kDa de PM, compuesta por dos cadenas y sensible a 2-mercaptoetanol. Esta banda mostró la máxima capacidad para fijar IgE. La reducción con 2-mercaptoetanol condujo a una pérdida completa de la propiedad de fijar IgE. Sólo una débil banda se obtuvo por immunoblotting, sugiriendo que el procedimiento casi destruyó completamente los epítomos de unión a IgE.

COMENTARIO

Múltiples fármacos como morfina, codeína y papaverina se obtienen de *Papaver somniferum*. Los alcaloides se separan de los materiales sobrantes utili-

zando disolventes orgánicos para, posteriormente, transformarse en principios farmacéuticos mediante reacciones químicas.

Alday y cols^{1,2} describieron previamente la presencia de asma bronquial en trabajadores empleados en compañías farmacéuticas, encargados de la producción de morfina y codeína. La presencia entonces de pruebas cutáneas positivas al extracto de *Papaver somniferum* y los niveles elevados de IgE total en los pacientes, junto con el hecho de que sus síntomas mejoraban durante los fines de semana y en vacaciones, sugirió una hipersensibilidad inmediata tipo I.

Sin embargo, es conocido que, tanto la morfina como la codeína, son compuestos con capacidad para degranular mastocitos de forma inespecífica, por un mecanismo independiente de IgE⁵. Estos hechos suceden en un número limitado de sujetos, por lo que parece probable la existencia de un factor personal de predisposición o idiosincrasia farmacológica. Gonzalo y cols⁶ demostraron la existencia de una relación causal entre la inhalación de morfina y la aparición de asma diferido, mediante provocación bronquial específica, no pudiendo demostrar la existencia de un mecanismo mediado por IgE y siendo la degranulación inespecífica de mastocitos y basófilos los principales responsables.

En este artículo se reporta la presencia de asma ocupacional en los trabajadores de una compañía farmacéutica en la que se producen morfina y codeína. La presencia de un mecanismo IgE mediado se demuestra mediante prueba cutánea y provocación bronquial específica, así como por métodos *in vitro*. Los alérgenos involucrados parecen ser macromoléculas como se demuestra por immunoblotting. Todos estos hechos sugieren que la enfermedad no es debida a un mecanismo farmacológico.

La morfina y la codeína, como hemos mencionado previamente, son drogas en las que son conocidas sus propiedades de liberación de histamina, siendo incluso responsables de algún caso de eosinofilia inducida por drogas¹. De este modo, la presencia de asma bronquial en trabajadores relacionados con estos productos puede ser atribuida a un efecto farmacológico. Sin embargo, los trabajadores estudiados en este artículo demostraron que los síntomas respiratorios fueron máximos en los expuestos al material sin procesar, disminuyendo a lo largo del proceso de extracción. Ningún trabajador presentó problemas con el manejo del producto final. La producción industrial de estos fármacos implica la extracción de los alcaloides de la forma vegetal mediante disolventes orgánicos. Durante esta extracción, a veces utilizando colorantes, se coex-

traen polifenoles. Algunos polifenoles de origen vegetal se ha descrito que poseen toxicidad pulmonar y propiedades liberadoras de serotonina^{7,8}. Sin embargo, ningún otro signo o síntoma aparte del asma se descubrió en los trabajadores.

Un gran número de los trabajadores expuestos (32%) no respondió a anti-IgE en el test de liberación de histamina. En la experiencia de los autores, en torno al 15% de los individuos normales son no respondedores a anti-IgE (son liberadores)⁹. Este alto porcentaje de no respondedores a anti-IgE podría quizás reflejar algún efecto farmacológico de estos polifenoles o alguna influencia de la exposición a opioides. En cualquier caso, el ensayo de liberación de histamina fue una herramienta muy útil en el diagnóstico de la población sensibilizada.

La IgE específica pudo ser detectada en los 6 trabajadores sintomáticos de los 28 estudiados. Este hecho se traduce porque la prevalencia de enfermedad pulmonar incapacitante entre los trabajadores expuestos al alérgeno de *Papaver somniferum* es en torno al 20%.

La compañía farmacéutica procesa *Papaver somniferum* una vez que las semillas han sido retiradas por otro fabricante, quien extrae aceite para procesos industriales. Un mecanismo IgE mediado ha sido descrito en alergia a la semilla de *Papaver somniferum*¹⁰ y, actualmente, no se puede excluir la posibilidad de que el antígeno estuviese contaminado por proteínas de la semilla, como demostró Aerialian y cols en la hipersensibilidad al psyllium¹¹. De esta manera, se piensa que nuevos pacientes serán diagnosticados entre los trabajadores empleados en la extracción del aceite y en el procesamiento del material virgen.

Jensen y cols¹² detectaron IgE unida a compuestos proteicos y azúcares de las semillas de *Papaver somniferum* y demostraron la existencia de reactividad cruzada entre semillas de *Papaver somniferum* y alimentos vegetales así como también entre semillas de *Papaver somniferum* y alérgenos del polen (Bet v 1 y profilinas).

Referencias bibliográficas

- Alday E, Lucena R, Barrio MV. Asma profesional en la industria farmacéutica (hoja de adormidera). *Salud y Trabajo* 1985; 48:36-40.
- Alday E, Moneo I, Lucena R, Zamorano ML, Montilla A, Cabezas MM, López MJ. Sensibilización profesional en la industria de preparación de alcaloides. *Salud y Trabajo* 1991;84:4-8.
- Siraganian RP. An automated continuous flow system for the extraction and fluorometric analysis of histamine. *Anal Biochem* 1974;57:383-394.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
- Ottessen EA. The eosinophil, eosinophilia and eosinophil retarded disorders. En: Middleton E, Reed CE, Ellis EF. eds. *Allergy: principles & practice*. Mosby. St. Louis 1978: 616
- Gonzalo Requés F, Pelta Fernández R, Senent Sánchez C, Colás Sanz C. Asma tardío inducido por opiáceos inhalados. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin* 1987;2;437-440.
- Johnson CM, Hanson MN, Rohrbach MS. Toxicity to endothelial cells mediated by cotton bract tannin. Potential contribution to the pathogenesis of byssinosis. *Am J Pathol* 1983;11:56-61.
- Cloutier MM, Rohrbach MS. Effects of endotoxin and tannin isolated from cotton bracts on the airway epithelium. *Am Rev Respir Dis* 1986;134:1158-1162.
- Moneo I, Puente S, Sánchez Agudo L, Curiel G, Cabal A, Baquero M, González-Muñoz M. Estudio de la liberación de histamina en sujetos normales atópicos y parasitados. *Inmunología* 1993 (en prensa).
- Braun W, Kovary PM. Poppy Seed Allergy. *Z. Hautkr* 1988; 63:344.
- Aerialian LG, Vyszynski-Moher D, Lawrence AT, Schrotel KR, Ritz HL. Antigenic and allergenic analysis of psyllium seed components. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:866-876.
- Jensen-Jarolim E, Gerstmayer G, Kraft D, Scheiner O, Ebner H, Ebner C. Serological characterization of allergens in poppy seeds. *Clin Exp Allergy* 1999;29:1075-1079.
- Moneo I, Bootello A, Hinojosa M, Alcover R. Nuevos avances en la determinación de histamina automatizada. *Alergol et immunopathol* 1980;suppl VII:311-315.
- Moneo I, Cuevas M, Ureña V, Alcocer R, Bootello A. A reverse enzyme immunoassay for the determination of *Dermatophagoides pteronyssinus* IgE antibodies. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1983;71:285-287.
- Carrillo T, Cuevas M, Muñoz T, Hinojosa M, Moneo I. Contact urticaria and rhinitis from latex surgical gloves. *Contact Dermatitis* 1986;15:69-72.
- Doster AR, Farrel RL, Wilson BJ. An ultrastructural study of bronchiolar lesions in rats induced by 4-lpomeanol, a product from mold-damaged sweet potatoes. *Am J Pathol* 1983;11:56-61
- Rohrbach M, Rolstad RA, Russell JA. Protection by plasma protein against condensed tannin-mediated platelet activation. *Biochem Med* 1985;34:189-194
- Subiza J, Subiza JL, Escribano P, et al. Occupational asthma caused by Brazil ginseng dust. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88(5):731-736.

Caso clínico

Asma ocupacional producido por *Papaver somniferum*

Dra. Angélica Feliu, Dra. M. J. Narganes, Dra. Pilar González, Dra. Carmen Prado*, Dra. Fernanda Bravo**
Dr. Javier Subiza

Centro de Asma y Alergia Subiza

*Laboratorios Inmunotek

** Asepeyo

Paciente varón de 33 años que, desde hace 5 meses, a los pocos minutos del inicio de su jornada laboral, comienza a presentar edema labial y palpebral bilateral asociado a lesiones eritemato-edematosas pruriginosas en zonas expuestas (miembros superiores). Cuatro horas después, presenta importante obstrucción nasal y disnea moderada. Los síntomas pueden tardar en remitir entre 15 y 30 días y se han repetido en tres ocasiones en los últimos 5 meses. Éstas han sido las tres ocasiones en que el paciente se ha incorporado nuevamente a su puesto de trabajo tras encontrarse de baja.

Desde hace 4 años, trabaja en una empresa farmacéutica en la que se elaboran alcaloides (morfina, codeína y tebaína). Para su producción, tiene que manipular polvo de adormidera, también conocido como CPA (concentrado de paja de adormidera). Éste es un granulado obtenido a partir del prensado de las cápsulas de *Papaver somniferum* (Fig. 1), a las que se les han extraído previamente las semillas. Es un polvo fácilmente inhalable aunque, durante su manipulación, los trabajadores emplean mascarillas de papel.

En la fábrica trabajan 47 personas sin que se conozcan más casos de afectación respiratoria.

La exploración física del paciente fue normal, incluyendo rinoscopia más fibroscopia nasal.

Inicialmente se le realizó una espirometría, encontrándose dentro de la normalidad y prueba de FE_{NO} (fracción espiratoria de óxido nítrico), con resultado de 68 ppb (inflamación muy alta). Metacolina positiva con PC₂₀ de 0,13 mg/ml acumulados (hiperreactividad bronquial dentro del rango asmático). Se le administró un espirómetro portátil (AM1 Jaeger®) para evaluar series de *peak-flow* durante periodos de trabajo y de baja, realizando 3 espiraciones cada vez, dos veces al día. Se observaron variaciones del PEF superiores al 40%, compatibles con asma bronquial y



Figura 1. *Papaver somniferum*.

patrón de agudización en el trabajo y recuperación espontánea durante los periodos de baja (Fig. 2).

El hemograma, bioquímica, VSG, RxTx y Rx de senos paranasales fueron normales en todos los casos.

El estudio alergológico se llevó a cabo mediante la realización de pruebas cutáneas con aeroalergenos habituales, obteniendo resultado positivo para *Dactylis glomerata*, *Platanus hispanica* y *Cupressus arizonica*. El resto de inhalantes (ácaros del polvo doméstico, epitelios, hongos y resto de pólenes) fueron negativos. El paciente no presentaba síntomas en relación con los pólenes anteriormente referidos.

Se realizó extracto de CPA a partir del polvo de adormidera manejado por el paciente en su lugar de trabajo y supuestamente responsable de la sintomatología.

Con el extracto dializado y sin dializar se realizaron pruebas cutáneas (en nuestro paciente) en *prick* con lectura inmediata, obteniéndose una prueba positiva con extracto de CPA no dializada al 10% y negativa

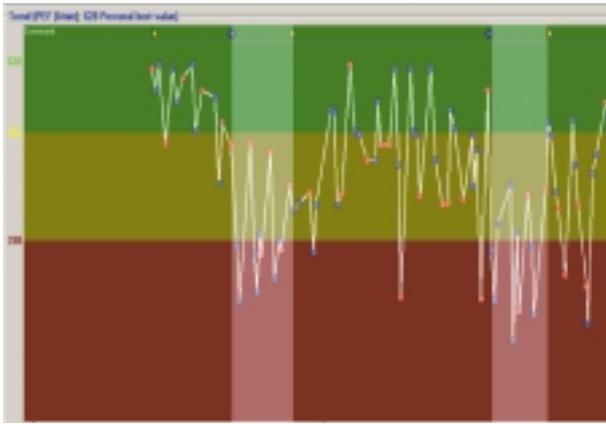


Figura 2. Monitorización del PEF dentro y fuera del trabajo 2 veces al día [al levantarse y al acostarse] durante periodos de trabajo (área sombreada) y periodos de baja [área no sombreada]. Obsérvense las variaciones superiores al 40%, compatibles con asma bronquial y patrón de agudización en el trabajo y recuperación espontánea durante los periodos de baja.

con el mismo extracto dializado al 10%. Se realizó *prick* con extracto de CPA no dializado al 10% en 5 controles no expuestos, observándose prueba positiva en todos ellos, lo que apuntó a un mecanismo inespecífico, probablemente producido por el efecto farmacológico histaminoliberador de los alcaloides e invalidó el resultado de las pruebas cutáneas.

Seguidamente, se realizó provocación bronquial específica con extracto de CPA no dializada (1:10 p/v) que fue positiva, obteniéndose una caída del FEV₁ del 57% a las 4 horas sin que ésta se hubiera precedido de una respuesta inmediata. Sin embargo, estos resultados no se objetivaron en nuestro paciente en el periodo del post-salino, lo que confirma la especificidad del resultado (Fig. 3).

La misma prueba pero con extracto de CPA dializado (libre de sustancias con PM < 8 kDa) fue negativa.

Provocación bronquial con extracto de CPA

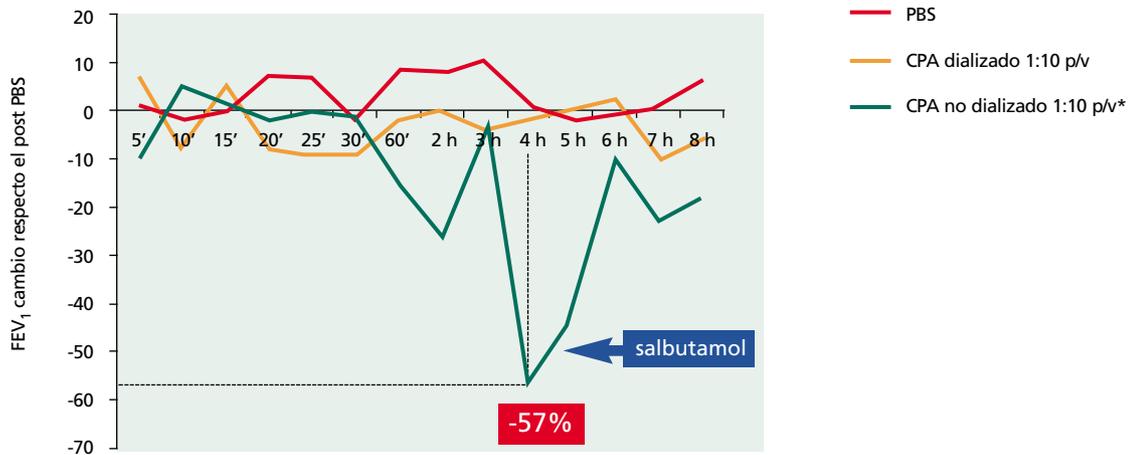


Figura 3. Se realizó la provocación inhalativa con una aerosol devilbiss 649 según técnica previamente publicada¹⁸. Primero se realizó un día control, mediante la provocación con PBS y monitorización del FEV₁ durante las 8 horas siguientes, sin observar, como pueden ver, variaciones superiores al 10%.

Al día siguiente se realizó una provocación con el extracto de CPA comenzando por una dilución de 1:1.000.000 p/v e incrementando las concentraciones en 10 veces cada 10 minutos siempre que no hubiera una respuesta inmediata (es decir, una caída \geq 20%).

En la figura pueden ver la respuesta a la concentración de 1:10 p/v, observándose una significativa respuesta tardía [caída del FEV₁ del 57% que fue tratada con salbutamol inhalado] sin que ésta se hubiera precedido de una respuesta inmediata. Por el contrario, estos cambios no fueron observados en el periodo del post-salino lo que confirma la especificidad del resultado.

El mismo test pero con extracto de CPA sí dializado (libre de sustancias con PM < 8 kDa) fue negativo.

La provocación con extracto de CPA no dializado realizada en un asmático no expuesto a adormidera y con un PC₂₀ de metacolina de 0,40 mg/ml fue completamente negativa, lo que apoya la especificidad de la reacción obtenida en el trabajador.

La provocación bronquial con extracto de CPA no dializado en un asmático no expuesto a adormidera y con una $PC_{20}FEV_1$ de metacolina de 0,40 mg/ml fue completamente negativa, lo que apoya la especificidad de la reacción obtenida en el trabajador.

Se realizó una medición seriada de la fracción espiratoria de óxido nítrico [FE_{NO}], objetivándose gran inflamación bronquial con FE_{NO} de 202 ppb (incremento del 206% sobre la determinación inicial 68 ppb) siete días después de la provocación bronquial con CPA no dializado. Los valores siguieron por encima de los basales hasta un mes más tarde. Por el contrario, la FE_{NO} en el paciente control no se alteró tras la provocación con CPA no dializado (Fig. 4).

Se realizó también seguimiento del PEF con espirómetro portátil desde cinco días antes y hasta 43 días después de la provocación con CPA dializada, observándose un incremento en la variabilidad del PEF, que se resolvió tras tratamiento con betametasona intramuscular (Fig. 5).

En orden a detectar IgE sérica contra el extracto de CPA, realizamos un ELISA directo con el suero del paciente, siendo el resultado negativo. Ante la posibilidad de que pudiera tratarse de un hapteno, se realizó el mismo estudio pero utilizando CPA ligado a HSA (albúmina sérica humana), siendo el resultado igualmente negativo.

Conclusión

Se trata de un paciente, trabajador en una empresa farmacéutica durante 4 años que, desde hace 5 meses, presenta síntomas compatibles con asma, urticaria y angioedema tras la exposición al CPA.

Se demuestra mediante monitorización del PEF que el asma se produce en su puesto de trabajo.

Mediante provocación inhalativa con CPA, se observa a las cuatro horas broncoespasmo importante, hallazgo que, por el contrario, no presentó el control asmático, lo que apunta más a una susceptibilidad específica al CPA, que a un efecto inespecífico (degranulación) de sus alcaloides. Esta con-

Determinaciones de FE_{NO} antes y después de la provocación con extracto de CPA no dializado

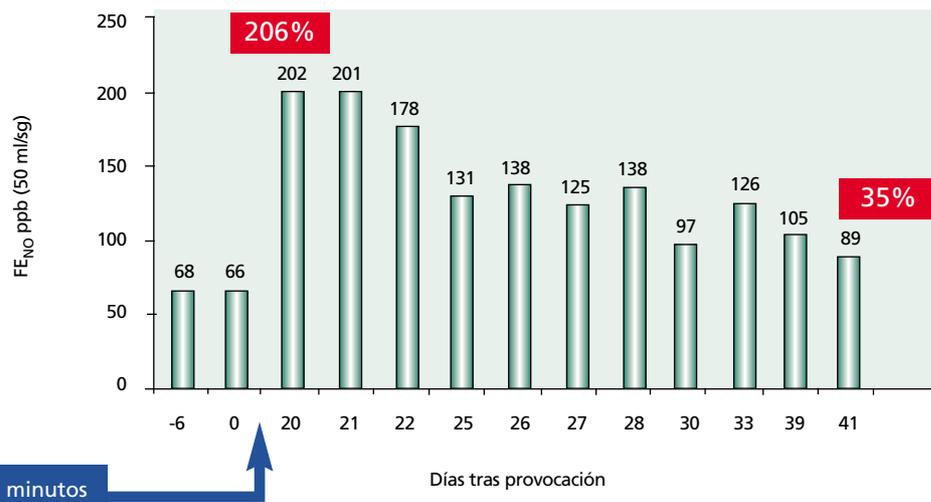


Figura 4. Para determinar si la respuesta bronquial observada en la figura 3 iba acompañada de un incremento de la respuesta inflamatoria de las vías aéreas, se monitorizó la fracción espiratoria del óxido nítrico mediante determinaciones seriadas con un NIOX.

El FE_{NO} antes de la provocación fue de 66 ppb, es decir, alto para un adulto, (el rango de normalidad está en 10-20 ppb).

A los 20 días el FE_{NO} había subido un 206%, luego fue descendiendo paulatinamente pero estando 40 días después de la provocación un 35% más alto que el basal.

Parece interesante que tan sólo 2 minutos de exposición al extracto de CPA produjera una respuesta inflamatoria de más de 1 mes de duración.

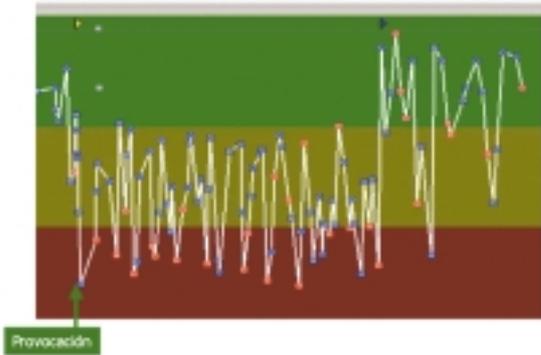


Figura 5. Las determinaciones de PEF realizadas diariamente (mañana y noche) por el paciente en su domicilio durante la semana antes de la provocación parecían indicar que su asma se encontraba bajo control.

Sin embargo observen cómo cambian radicalmente las determinaciones del PEF a partir de la provocación (ícono amarillo). Efectivamente, puede observarse un claro incremento de la labilidad bronquial a partir del día de la provocación con el extracto de CPA no dializado y que se mantiene durante unas 4 semanas. Durante este periodo el paciente refirió además una recidiva de sus síntomas de asma, razón por lo que fue tratado con betametosa IM (ícono azul).

En otras palabras, los datos parecen apuntar que esos 2 minutos de inhalación de extracto de CPA fueron capaces no solamente de inflamar las vías aéreas (Fig. 4), sino de agudizar el asma hasta varios semanas después de la provocación.

clusión se ve apoyada por el incremento del FENO tras la provocación, que persistió hasta un mes después. No obstante, mediante estudios *in vitro* no pudimos concluir que se tratara de un mecanismo IgE mediado; este hecho, junto con el hallazgo de

que el agente desencadenante de esta sintomatología fuera una sustancia(s) de bajo peso molecular (< 8 kDa), apunta a una posible idiosincrasia farmacológica a los alcaloides que queda por investigar en futuros estudios.