

# Utilidad de un extracto de semillas de *Papaver somniferum* en la prevención y confirmación de hipersensibilidad provocada por opiáceos y compuestos estructuralmente relacionados.

Miriam Castillo<sup>1,2</sup>, David Rodríguez Gil<sup>2</sup>, Fernando Pineda de la Losa<sup>2</sup>

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2 Laboratorios Diater, Leganés, Madrid, España.

## Resumen

La anafilaxia durante la anestesia causa la muerte en el 3-9% de los pacientes que la padecen. Los analgésicos son la segunda causa más común de anafilaxia mortal por fármacos. La prevalencia de anafilaxia por opiodes en intervenciones quirúrgicas está subestimada como consecuencia de la dificultad de recopilar estas graves reacciones, al ser muchos los fármacos administrados durante la intervención. La detección de anticuerpos específicos a opiodes sería muy útil para prevenir reacciones fatales durante la anestesia, en tratamientos del dolor y personas con riesgo por abuso de opiodes (heroínómanos). En recientes trabajos se ha podido constatar que estos pacientes eran capaces de generar anticuerpos IgE a la semilla de opio. Por tanto, es muy importante estudiar el valor clínico de la determinación de anticuerpos específicos a morfina, codeína, rocuronio y proteínas hidrosolubles y liposolubles de la semilla de opio (*Papaver somniferum*) en el diagnóstico y la confirmación de alergia a opiodes. Cualquier método de prevención de eventos adversos por fármacos tan utilizados como los opiáceos constituiría una ventaja muy importante en la prevención de reacciones adversas frente a dichos fármacos y tendría una gran repercusión sanitaria y social. En definitiva, los opiodes pueden provocar cuadros alérgicos graves y sería posible prevenir la sensibilidad a opiáceos (morfina, heroína, analgésicos opiodes, codeína) y las anafilaxias intraoperatorias por métodos de rutina alergológica.

**Palabras clave:** *Papaver somniferum*; semillas; opiodes; anafilaxia; anestesia.

**Cita:** Miriam Castillo, David Rodríguez, Fernando Pineda (2014) Utilidad de un extracto de semilla de *Papaver somniferum* en la prevención y confirmación de hipersensibilidad provocada por opiáceos y compuestos estructuralmente relacionados. *Dianas* 3(1): e20140902. ISSN 1886-8746 journal.dianas. e20140902 URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

**Editores:** María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

**Recibido:** 16 de junio de 2014

**Copyright:** © 2014 Miriam Castillo Fernández et al.

Este es un artículo open-access distribuido bajo licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

\*E-mail: [miriam14.12@hotmail.com](mailto:miriam14.12@hotmail.com)



## Introducción

La anestesia es la ausencia total o parcial de la sensibilidad. Puede producirse por un traumatismo o de manera artificial e inducida. El término, por lo general, se utiliza para referirse a la acción médica que consiste en bloquear la sensibilidad táctil y dolorosa de un paciente mediante el suministro de sustancias con propiedades anestésicas.

Los anestésicos generales incluyen hipnóticos, analgésicos potentes, relajantes musculares y otras sustancias como anticolinérgicos, benzodiacepinas y anticolinesterásicos que revierten el efecto de los relajantes musculares. Entre dichos analgésicos se encuentran los opiáceos naturales (morfina) o sintéticos (fentanilo, meperidina, alfentanilo y remifentanilo), y compuestos relacionados con la morfina, por ejemplo, codeína, heroína, metadona y pholcodina. Entre los relajantes musculares se encuentran los denominados NMBAs (agentes bloqueantes neuromusculares) que tienen una estructura similar a la morfina.

La anafilaxia durante la anestesia es una condición clínica seria que puede llegar a ser fatal [1]. El término "anafilaxia" se ha utilizado para todo tipo de enfermedad aguda potencialmente mortal provocada por una sensibilidad anormal (hipersensibilidad) a alguno de los compuestos de la anestesia. Esto ha hecho que sea difícil de definirla [2]. El Comité de Nomenclatura EAACI propuso la siguiente definición: "La anafilaxia es una reacción de hipersensibilidad generalizada o sistémica grave potencialmente mortal".

## Hipersensibilidad provocada por opiáceos: *Papaver somniferum*

Los individuos que tienden a desarrollar reacciones de hipersensibilidad inmediata se denominan atópicos y se dice que sufren alergias. Los antígenos que desencadenan intensas reacciones de hipersensibilidad inmediata se llaman alérgenos. En este trabajo hablaremos de reacciones de hipersensibilidad de tipo I, anafiláctica y dependiente de IgE [3].

La IgE fue la última inmunoglobulina descubierta y su concentración sérica y vida media son las más bajas de todas las inmunoglobulinas, normalmente presente en el plasma en una concentración menor a 1 µg/mL. En situaciones patológicas graves, el nivel sérico puede aumentar por encima de 1.000 µg/mL.

Las reacciones alérgicas mediadas por la IgE o reacciones de hipersensibilidad tipo I constituyen reacciones inflamatorias de instauración inmediata, causada por la liberación masiva de mediadores inflamatorios por basófilos y mastocitos, como consecuencia de la unión de un antígeno a un anticuerpo IgE previamente fijado a la membrana de dichas células.

Las reacciones anafilactoides comprenden intolerancias al fármaco, son menos dependientes de la dosis y son consideradas pseudo-alérgicas. Los términos anafiláctico y anafilactoide, sin embargo, se han utilizado de manera incompatible en la literatura. Por lo tanto, el grupo de trabajo nomenclatura establecida por la Comisión Europea Academia de Alergia e Inmunología (EAACI) propusieron que las reacciones de tipo anafiláctico deben estar clasificadas en anafilaxia alérgica y anafilaxia no alérgica. A su vez, las anafilaxias alérgicas se subdividen en las reacciones mediadas por IgE y las no mediadas por IgE [4].

Las reacciones anafilácticas durante la anestesia involucran principalmente a los opiáceos y NMBAs, siendo la causa más frecuente de las mismas (50-70%) [1]. Es por esto, que cualquier método de prevención de eventos adversos por fármacos tan utilizados como los opiáceos constituiría una ventaja muy importante en la prevención de reacciones adversas frente a dichos fármacos y tendría una gran repercusión sanitaria y social.

Las pruebas cutáneas (“prick test” e intradermorreacción), son pruebas *in vivo* que constituyen uno de los métodos diagnósticos empelados para confirmar las sospechas clínicas de reacciones alérgicas a NMBAs. Sin embargo, dichas pruebas no han mostrado utilidad diagnóstica cuando se emplean como reactivos a los opiáceos (morfina, meperidina o petidina) [5].

Los métodos *in vitro*, basados principalmente en la cuantificación de inmunoglobulina E (IgE) específica en suero frente a NMBAs, constituyen otra de las alternativas diagnósticas habitualmente empleadas para evaluar la alergia o hipersensibilidad a NMBAs. Estas pruebas *in vitro* han puesto de manifiesto la presencia de IgE específica en suero frente a alcuronium, d-tubocurarine, pancuronium y análogos, vecuronium, succinilcolina, decamethoniym y galamina en pacientes alérgicos a estos NMBAs, sin embargo su utilidad clínica no está clara [6].

Aunque se han descrito diversos métodos para diagnosticar si un sujeto padece alergia o hipersensibilidad a opiáceos y NMBAs utilizados en anestesia, sigue existiendo la necesidad de desarrollar métodos alternativos que permitan diagnosticar, de una manera objetiva, segura para los pacientes, sencilla y de bajo coste, si un sujeto padece alergia o hipersensibilidad a opiáceos y/o compuestos estructuralmente relacionados utilizados en anestesia.

En un estudio reciente con pacientes sometidos a anestesia general se ha encontrado que los extractos de las semillas de *Papaver somniferum* proporcionaron un mayor rendimiento diagnóstico [7,8]. El opio es una de las plantas cultivadas más importantes para la industria farmacéutica, ya que es la única fuente de alcaloides como la morfina, la codeína y la tebaína, que son ampliamente utilizados en la medicina como analgésicos, anestésicos, antitusígenos y antiespasmódicos.

Partimos de la hipótesis de que las fracciones hidrosoluble y liposoluble de los extractos de las semillas de *Papaver somniferum* podrían tener un mejor rendimiento en el diagnóstico de la sensibilidad a los opioides, debido a que las semillas contienen la totalidad del proteoma de la futura planta.

El objetivo de este trabajo es evaluar la rentabilidad de las pruebas diagnósticas (prick, IgE específica) en pacientes con reacciones de hipersensibilidad inmediata durante la anestesia o después tratamiento con analgésicos como los opiáceos y compuestos estructuralmente relacionados y en heroínómanos con síntomas de alergia (asma, anafilaxis).

## Materiales y métodos

### Pacientes

A partir de los registros de los 23.873 pacientes atendidos en los últimos 23 años por la Unidad de Alergia del Hospital Universitario Río Hortega se seleccionaron: 80 pacientes con anafilaxia durante cirugía o reacciones severas a los opioides o compuestos estructuralmente relacionados (asma, urticaria, anafilaxis,

## Hipersensibilidad provocada por opiáceos: *Papaver somniferum*

angioedema, vómitos, angina de pecho, y la erupción cutánea). Los agentes sospechosos involucrados incluían tramadol, rocuronio, fentanilo, propofol, morfina, codeína, Algidol, y atracurio.

Además, 42 consumidores habituales de heroína fueron reclutados de las Cortes de Castilla - Asociación de León para la Ayuda de la Drogadicción (ACLAD); 25 pacientes alérgicos al tabaco (definido como CAP prueba cutánea (IgE) > 0,35 UI/mL y provocación bronquial positiva); 16 pacientes con anafilaxia debida a la codeína (diagnosticada según criterios clínicos); y 10 pacientes con anafilaxia durante la cirugía debido a la penicilina (definida como la prueba cutánea positiva).

Como grupo control se incluyeron 200 sujetos no atópicos, no fumadores, que fueron seleccionados al azar (Unidad de Donación de Sangre, SACYL), que no eran usuarios de drogas ilícitas y que nunca habían sido consultados en un servicio de alergia.

Todos los pacientes y controles dieron su consentimiento informado por escrito para participar en el estudio. Además, para las técnicas *in vitro*, se recogieron los excedentes de sangre de 20 muestras de sangre de cordón umbilical de los recién nacidos prematuros. El protocolo fue aprobado por el HURH Comité de Ética para la Investigación Clínica.

### Prueba cutánea y estandarización biológica

Se realizaron pruebas cutáneas de punción convencionales (prick test) de acuerdo al protocolo del Grupo Europeo para el diagnóstico de hipersensibilidad a fármacos [9].

Cada uno de los pacientes seleccionados fue testado frente a una prueba cutánea para determinar la reactividad biológica del extracto. La reactividad biológica del extracto vendrá determinada por la aplicación de los criterios de inclusión en relación con las pápulas obtenidas con las diferentes concentraciones del extracto alergénico empleado. El cálculo del valor HEP (histamina equivalente) del extracto alergénico se realizó sobre la base del cálculo estadístico del logaritmo de la concentración del extracto versus el logaritmo del área de la pápula de la histamina. Tras el cálculo de la media de las pápulas obtenidas con los HEP de todos los pacientes, se obtuvo el valor HEP para el extracto alergénico de las fracciones hidrosoluble y liposoluble de *Papaver somniferum*.

### IgE específica

Los niveles de IgE específica frente a *Papaver somniferum* fueron medidos mediante el sistema ImmunoCAP (Phadia, Uppsala, Suecia) siguiendo las instrucciones del fabricante, previa biotilación y acoplamiento de los extractos a los discos de streptavidina suministrados por el mismo. Niveles en suero superiores a 0,35 kU/L se consideraron positivos. La capacidad fijadora de la IgE específica para las proteínas de los extractos de *Papaver somniferum* se determinaron mediante Inmunoblotting y Dot-blot.

### Extracto de semillas de *Papaver somniferum* [10]

Las semillas de amapola fueron adquiridas a un proveedor autorizado. Dichas semillas estaban clasificadas, certificadas y estandarizadas con respecto a la pureza (más del 99%). Se pesaron 300 mg, se suspendieron en tampón fosfato salino (PBS) [NaCl 1,37 mM, 14,7 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 78,1 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 26,8 mM de KCl] pH 7,4, y a continuación se trituraron hasta obtener una suspensión homogénea. Es importante mantener el pH entre 6 y 8.

El homogeneizado se agitó magnéticamente durante 30 min a 5±3°C. La muestra se centrifugó a 10.000 g. La fracción liposoluble se separó de la hidrosoluble y se trataron de forma independiente. Concretamente, la fracción liposoluble sería la capa superior de grasa que queda en el tubo de centrifuga y la hidrosoluble, el sobrenadante.

El sobrenadante obtenido (la fracción hidrosoluble) se filtró por un tamaño de poro de 2.0 µm (Millipore AP2009000) en campana de flujo laminar. Posteriormente se concentró por ultrafiltración tangencial en sistema microCogent de Millipore con un cassette Biomax de 3.500 daltons hasta la mitad del volumen del sobrenadante obtenido. Tras la concentración la muestra se sometió a diálisis frente a agua WFI (agua para inyectables) por ultrafiltración tangencial en el mismo aparato mencionado anteriormente.

Para la fracción liposoluble se recogió la capa superior de grasa de cada dos tubos de centrifuga y se resuspendió en uno nuevo que contenía tampón PBS pH 7.4. Tras homogenizarlo, se centrifugó el extracto a 10.000 g durante 10 minutos. Este proceso se repitió dos veces más. Tras el tercer centrifugado se recogió la capa superior de grasa y se resuspendió en PBS Tween 0,5% [NaCl 1,37 mM, 14,7 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 78,1 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 26,8 mM de KCl, 0,5% Tween 20] hasta tener una suspensión homogénea. Se filtró por filtros con un tamaño de poro de 2.0 µm (Millipore AP2009000) en campana de flujo laminar. A continuación se realizó una diálisis por ultrafiltración tangencial en el mismo sistema que la fracción hidrosoluble.

Tras realizar todo el proceso mencionado anteriormente se procede a la dosificación de las muestras en viales Pyrex de vidrio para su posterior liofilización. La liofilización o deshidrocongelación consiste en eliminar el agua desde el estado sólido al gaseoso del ambiente sin pasar por el estado líquido. Para acelerar el proceso se utilizan ciclos de congelación-sublimación con los que se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el producto original, pero preservando la estructura molecular de la sustancia liofilizada. De esta forma tenemos las muestras preparadas para ser almacenadas o analizadas.

La cantidad de proteína obtenida para cada fracción alérgica se midió según método propuesto por Bradford [11].

### Producción de anticuerpos

Para la producción de sueros hiperinmunes frente a las fracciones hidrosoluble y liposoluble de *Papaver somniferum* se inmunizaron dos conejos albinos neozelandeses de aproximadamente 2,5 Kg de peso inicial. Se administraron dosis de 200 µg de proteínas y las inmunizaciones se llevaron a cabo durante 7-8 semanas tras las cuales se procedió a la sangría final del animal, previa titulación del suero.

### SDS-PAGE

Las fracciones hidrosoluble y liposoluble se analizaron por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) de acuerdo al método propuesto por Laemmli y cols. [12].

En resumen, las proteínas de las anteriores fracciones se separaron en geles de poliacrilamida al 15%, a 200V y 45 minutos. Las muestras se cargaron a 1 mg/mL de proteína. Las bandas de las proteínas se tiñeron con Azul Coomassie. Las imágenes se trataron posteriormente con el programa ImageLab.

### Inmunoblotting

La analítica mediante western blot se realizó para ambas fracciones de las semillas de *Papaver somniferum* según el método de Towbin y cols. [13]. En resumen, tras la separación de las proteínas de ambas fracciones mediante SDS PAGE se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno - PVDF - (Trans-Blot Turbo, BioRad, USA). A continuación, se bloqueó la membrana durante 1 hora con PBS Tween 0,5% y se incubó durante toda la noche con el suero (diluido 1/5 para la fracción hidrosoluble y a un 1/20 para la fracción liposoluble en PBS Tween 0,5%). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron, anticuerpo de ratón anti-IgE humano (Southern Biotech) y anticuerpo de conejo anti-IgE humano (Sigma-Aldrich), ambos conjugados con peroxidasa. La unión antígeno-anticuerpo se reveló utilizando el reactivo quimioluminiscente, Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer).

La analítica mediante DOT-blot se realizó con las fracciones hidrosoluble y liposoluble de las semillas de *Papaver somniferum*, según el método de Towbin y cols. [13] con las modificaciones introducidas por el fabricante (IgE DOT-blot, Bio-Rad, USA) y los sueros de los pacientes con anafilaxia durante la anestesia. Las imágenes se trataron posteriormente con el programa ImageLab.

### ELISA inhibición

La analítica mediante ELISA inhibición se realizó según el método propuesto por Ceska y Lundqvist [14] con modificaciones. Brevemente, los pocillos de las placas de microtitulación de 96 pocillos se tapizaron (toda la noche, 4°C) con el extracto alérgico diluido en tampón bicarbonato, pH 9,8, 250µM. Se bloqueó la placa con 1% BSA en PBS Tween 0,05% durante 1 hora. Durante esa misma hora se incubaron las diferentes concentraciones de las muestras de la fase inhibidora con el suero diluido 1/4 para la fracción hidrosoluble y 1/20 para la fracción liposoluble.

Las muestras se cargaron por triplicado y se incubaron durante 2 horas. A continuación, por cada pocillo se añadieron 50 µL de anticuerpo monoclonal anti-IgE humano (Operon, Zaragoza, España) a una dilución 1:1000 durante 30 minutos. 50 µL de anticuerpo anti- IgG biotinilado (Sigma- Aldrich) a una dilución 1:500 durante 30 minutos y a continuación 50 µL de streptavidina-peroxidasa (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:250 durante 30 minutos. Todo el proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente. La reacción se visualizó a 450 nm tras la adición de 50 µL de ABTS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:1000). La placa se lavó con PBS Tween 0,05% después de cada paso.

Esta técnica sirve (entre otras) para comprobar que los extractos obtenidos son de calidad, es decir, que se han producido siguiendo buenas prácticas de fabricación y que dichos extractos están controlados por un sistema de calidad que garantiza la consistencia entre los lotes producidos.

## 2D-electroforesis, 2D-Inmunoblotting y secuenciación

La identificación de las proteínas que forman parte de la fracción liposoluble se realizó escogiendo el punto más cercano a lo referenciado en términos de peso molecular y punto isoelectrico tras la realización de una 2D electroforesis e IgE-2D-Inmunoblotting. El punto reconocido por el suero de los pacientes se sometió al análisis de su secuencia mediante huella peptídica (MALDI-TOF-MS) y análisis MS/MS (Centro de proteómica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, España).

La digestión con tripsina se llevó a cabo mediante el método de Schevchenko [15]. La huella peptídica se obtuvo mediante MALDI-TOF-MS [16] y la secuenciación de novo por MS/MS de acuerdo al método de Gautam y cols. [17].

## Resultados

### Prueba cutánea y estandarización biológica

Cada uno de los pacientes seleccionados fue testado frente a una prueba cutánea para determinar la reactividad biológica del extracto.

**Fracción hidrosoluble:** 21 pacientes fueron incluidos de los 26 seleccionados debido a la aplicación de los criterios de inclusión en relación con las pápulas obtenidas con las diferentes concentraciones del extracto alérgico empleado. Los límites de confianza para el 95% de la población se determinaron entre los valores de HEP de los pacientes 6 y 16. En resumen el valor HEP obtenido entre los 21 pacientes seleccionados se correspondía con un valor de 0.94 mg/mL de la fracción hidrosoluble del extracto de *Papaver somniferum*.

**Fracción liposoluble:** 20 pacientes fueron incluidos de los 26 seleccionados según los criterios descritos. Los límites de confianza para el 95% de la población se determinaron entre los valores de HEP de los pacientes 6 y 15. El valor HEP obtenido se correspondía con un valor de 0.04 mg/mL de la fracción liposoluble del extracto de *Papaver somniferum*.

### SDS PAGE y blotting

Los perfiles electroforéticos de los extractos de *Papaver somniferum* se muestran en la Figura 1. En ellos podemos destacar la presencia de los alérgenos descritos Pap s 34 KD y Pap s 17 KD, en la fracción hidrosoluble (Figura 1A) y los alérgenos caracterizados mediante secuenciación de novo, caleosina (34 KDa), oleosina (16 KDa) y arginine-ornitina acetiltransferasa –ArgJ- (15 KDa), en la fracción liposoluble (Figura 1B).

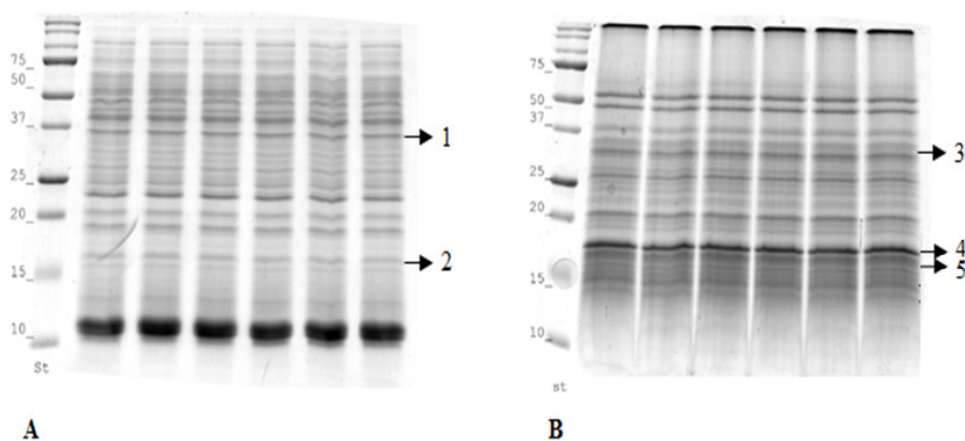


Figura 1.- Geles teñidos con Coomassie. A; Fracción hidrosoluble. Las bandas indicadas son (1) Pap s 34 KD y (2) Pap s 17 KD. B; Fracción liposoluble. Las bandas indicadas son (3) caleosina, (4) oleosina y (5) ArgJ. Los marcadores moleculares están indicados.

Los sueros hiperinmunes que se produjeron a partir de conejos mostraron capacidad fijadora frente a alérgenos de las fracciones hidrosoluble y liposoluble de los extractos de *Papaver somniferum* (Figura 2). Así mismo, se realizaron Inmunoblot con sueros de los pacientes que se seleccionaron al inicio del estudio y que presentaban reactividad biológica al extracto de *Papaver somniferum* (Figura 3).

## Hipersensibilidad provocada por opiáceos: *Papaver somniferum*

Los sueros de los pacientes con anafilaxia o reacciones severas a los opiáceos y compuestos estructuralmente relacionados, reconocieron mediante Dot blot las fracciones hidrosoluble y liposoluble, tal y como se muestra en la Figura 4.

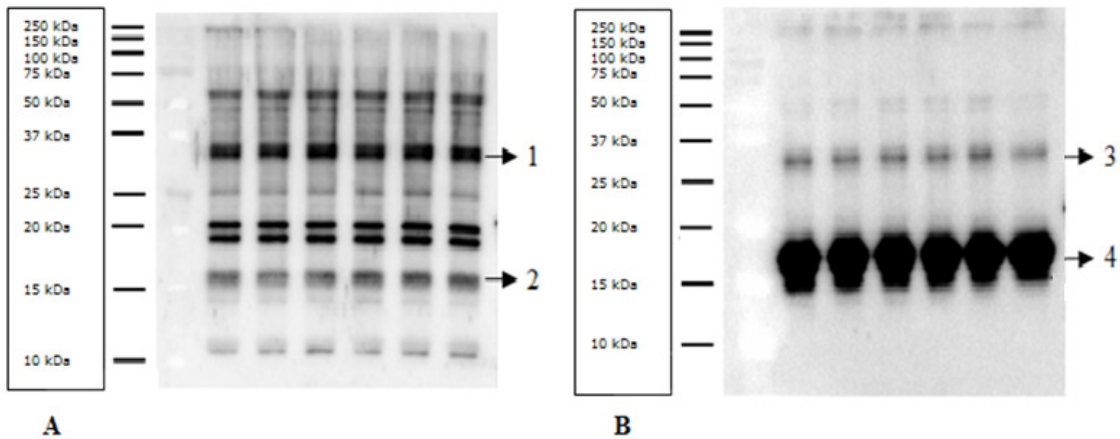


Figura 2.- Inmunoblot con suero de conejo para ambas fracciones de *Papaver somniferum*. A; Fracción hidrosoluble. Las bandas indicadas son (1) Pap s 34 KD y (2) Pap s 17 KD. B; Fracción liposoluble. Las bandas indicadas son (3) caleosina y (4) oleosina/ArgJ que resulta imposible poder distinguirlas individualmente. Los tamaños del marcador molecular están indicados y se corresponden con el primer carril.

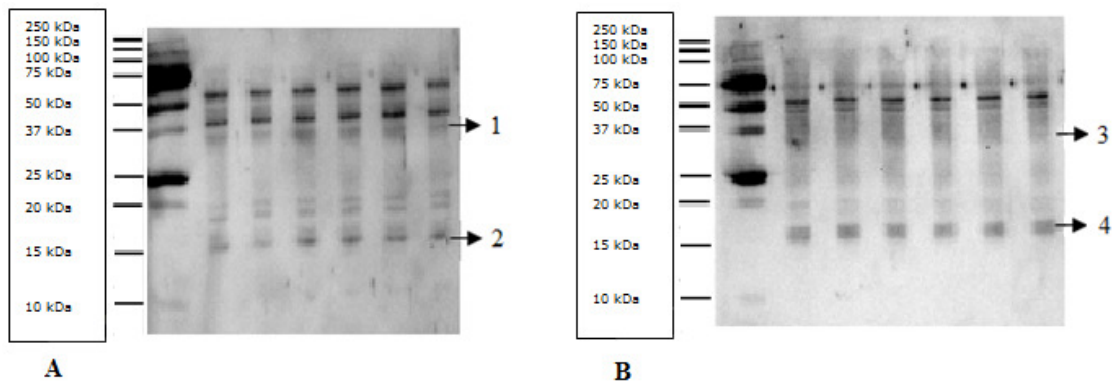


Figura 3.- Inmunoblot con suero de pacientes para ambas fracciones de *Papaver somniferum*. A; Fracción hidrosoluble. Las bandas indicadas son (1) Pap s 34 KD y (2) Pap s 17 KD. B; Fracción liposoluble. Las bandas indicadas son (3) caleosina y (4) oleosina/ArgJ que resulta imposible poder distinguirlas individualmente. Los tamaños del marcador molecular están indicados y se corresponden con el primer carril.

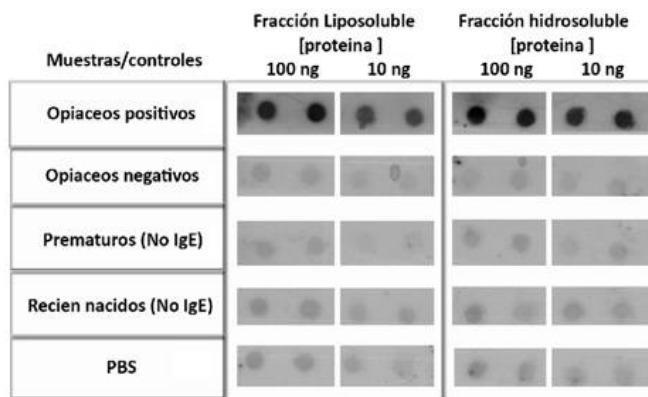


Figura 4.- Respuestas positivas de pacientes a los opiáceos, negativa a los mismos y recién nacidos prematuros frente a proteínas de las fracciones hidrosoluble y liposoluble.

### Elisa inhibición

Se calculó la recta logarítmica de inhibición así como el valor de Ag50 (concentración de extracto con el que se produce el 50% de inhibición). El valor Ag50 para el extracto de la fracción hidrosoluble de

## Hipersensibilidad provocada por opiáceos: *Papaver somniferum*

*Papaver somniferum* se estableció en 2,608 µg/mL tal y como se observa en la Figura 5A. El valor Ag50 para la fracción liposoluble se estableció en 163,87 µg/mL (Figura 5B).

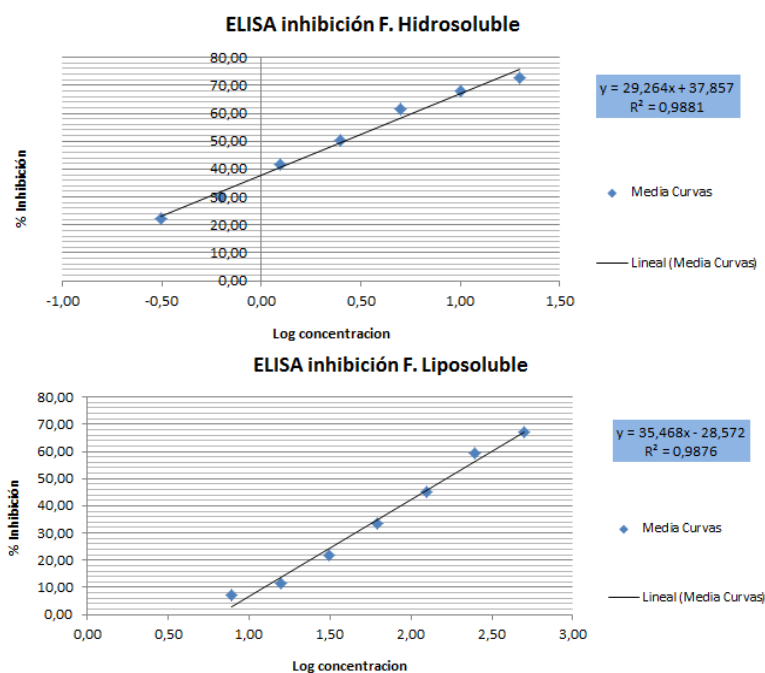


Figura 5.- Elisa inhibición. A; Fracción hidrosoluble con un valor de Ag50 de 2,608 µg/mL. B; Fracción liposoluble con un valor de Ag50 de 163,87 µg/mL.

## Discusión

El objetivo de este trabajo fue estudiar la rentabilidad de la pruebas de hipersensibilidad (prick, IgE específica) en pacientes con reacciones de hipersensibilidad durante la anestesia o después tratamiento con analgésicos como los opiáceos y en heroinómanos con síntomas de alergia (asma, anafilaxis). Aunque las fracciones acuosas de los extractos se utilizan en pruebas comercializadas, tenemos la hipótesis de que la fracción lipídica de las semillas de *Papaver somniferum* podrían ser más sensibles. Además, en un estudio previo se encontró que las fracciones lipídicas de las semillas son claramente alergénicas [18,19].

Los opioides y compuestos estructuralmente relacionados pueden provocar cuadros alérgicos graves. Los pacientes drogodependientes son un grupo de elevado riesgo en intervenciones quirúrgicas y también pacientes que se han sensibilizado tras precisar analgesia con fármacos con estructura morfínica. Es posible prevenir la sensibilidad a opiáceos y compuestos estructuralmente relacionados (morfina, heroína, analgésicos opioides, codeína) y las anafilaxias intraoperatorias por métodos de rutina alergológica sensibles y específicos, siendo la prueba más rentable la determinación de IgE específica a fracción liposoluble de semilla de opio.

Realizar un diagnóstico etiológico alergológico de un paciente anestesiado resulta muy difícil ya que las reacciones cutáneas están ocultas bajo las sábanas quirúrgicas, el paciente no se puede quejar de picor o disnea al estar anestesiado, y, además, son múltiples los fármacos que se utilizan. Asimismo, cualquier método de prevención de eventos adversos por fármacos tan utilizados como los opiáceos constituiría una ventaja muy importante en la prevención de reacciones adversas frente a dichos fármacos y tendría una gran repercusión sanitaria y social.

Las pruebas cutáneas son pruebas *in vivo* que constituyen uno de los métodos diagnósticos empleados para confirmar las sospechas clínicas de reacciones alérgicas a NMBAs. Sin embargo, las pruebas cutáneas mediante “prick test” no ha mostrado utilidad diagnóstica cuando se emplean como reactivos opiáceos, tales como morfina, meperidina o petidina y papaveretum (una mezcla de clorhidratos de alcaloides del opio).

En conclusión, en nuestro trabajo, la prueba cutánea por prick a la fracción lipídica de la semilla de opio fue sensible y específica, así como la determinación de IgE específica a semilla entera. Ambas técnicas, prueba cutánea y determinación de IgE, serían métodos fáciles, de bajo coste, útiles y sencillos en la prevención de anafilaxias intraoperatorias e hipersensibilidad a analgésicos derivados del opio.



## Agradecimientos

Agradecer a los laboratorios Diater y en concreto al departamento de I+D+i la dedicación y paciencia que han tenido para enseñarme todos los conocimientos que he adquirido y por haberme acogido como una más en estos tres meses en la empresa.

## Referencias

1. Moneret-Vautrin, D. A. and M. Mertes. 2010. Anaphylaxis to general anesthesia. *Chem Immunol Allergy*. 95:180-9.
2. Harper, N. J., et al., Working Party of the Association of Anaesthetists of Great Britain and Ireland. 2009. Suspected anaphylactic reactions associated with anaesthesia. *Anaesthesia*. 64(2):199-211.
3. Gell, P. G. H and R. R. A. Coombs. 1963. Eds. *Clinical Aspects of Immunology*. 1st ed. Oxford, England: Blackwell.
4. Johansson, S. G, T. Bieber, R. Dahl, P. S. Friedmann, B. Q. Lanier, R. F. Lockey. 2004. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization. *J Allergy Clin Immunol*. 113:832–836.
5. Nasser, S. M. and P. W. Ewan. 2001. Opiate-sensitivity: clinical characteristics and the role of skin prick testing. *Clin Exp Allergy*. 31(7):1014-20.
6. Baldo, B. A., D. G. Harle, M. M. Fisher. 1985. In vitro diagnosis and studies on the mechanism(s) of anaphylactoid reactions to muscle relaxant drugs. *Ann Fr Anesth Reanim*. 4(2):139-45.
7. Armentia, A., P. Ruiz-Muñoz, J. M. Quesada, I. Postigo, M. Herrero, F. J. Martín-Gil, M. Gonzalez-Sagrado, B. Martín, J. Castrodeza. 2011. Clinical value of morphine, pholcodine and poppy seed IgE assays in drug-abusers and allergic people. *Allergol Immunopathol*. [Epub ahead of print].
8. Armentia, A., F. Pineda, R. Palacios, F. J. Martín-Gil, A. S. Miguel, J. J. Arenal, J. Tejedor, B. M. Tef. 2014. Utility of opium seed extract tests in preventing hypersensitivity reactions during surgery. *Allergol Immunopathol*. 42(1):56-63.
9. Brockow, K., A. Romano, M. Blanca, J. Ring, W. Pichler, P. Demoly. 2002. General considerations for skin test procedures in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy*. 57(1):45-51.
10. Palacios, R., D. Aldana, F. Pineda, A. Armentia, B. Martín, C. De Lecea, Y. Puente. 2014. Método de diagnóstico de alergia o hipersensibilidad a opiáceos y compuestos estructuralmente relacionados. "Patente nacional-internacional-solicitada". ES 2 394 322 B1.
11. Bradford, M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72: 248–254.
12. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-5.
13. Towbin, H., T. Staehelin, J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 76(9):4350-4.
14. Ceska, M., U. Lundqvist. 1972. A new and simple radioimmunoassay method for the determination of IgE. *Immunochemistry*, 9:102–105.
15. Schevchenko, A., H. Tomas, O. Vorm, J. Havlis, J. V. Olsen, M. Mann. 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*. 1: 2856-60.
16. Suckau, D., A. Resemann, M. Schuerenberg, P. Hufagel, J. Franzen, A. Holle. 2003. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem*. 376: 952-65.
17. Gauman, P., C. S. Sundar, T. Madam, W. N. Gade, A. Shah, R. Sirdeshmukh, P. U. Sarma. 2007. Identification of novel allergens of *A. fumigatus* using immunoproteomics approach. *Clin Exp Allergy*. 37:1239-49.
18. Pineda, F., R. Palacios, R. Villeka, M. Pascal, J. Bartra. 2011. Anaphylactic reactions caused by oil body fraction lipoproteins. *Allergy*. 66:701-2.
19. Dueñas-Laita, A., F. Pineda, A. Armentia. 2009. Hypersensitivity to generic drugs with soybean oil. *N Engl J Med*. 361:1317-8.