

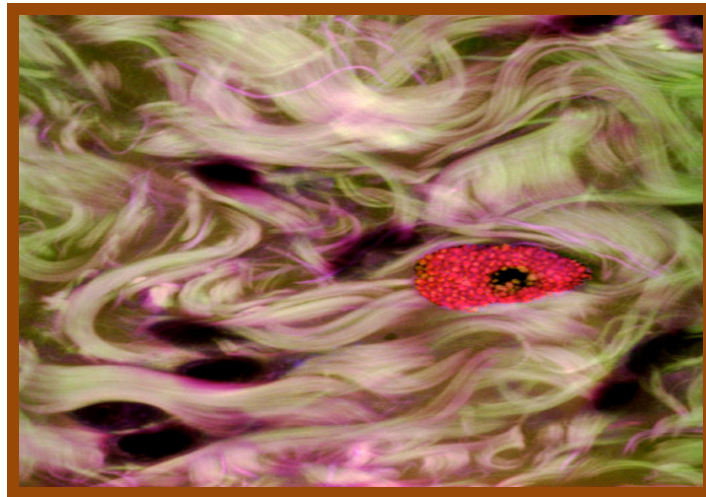


**Universitat Autònoma de Barcelona**  
Facultat de Medicina  
Departament de Medicina

---

**Mediadores mastocitarios durante la anafilaxia:**  
Utilidad y limitaciones de la triptasa como marcador  
diagnóstico actual e implicación del sistema de contacto y de  
la coagulación en la anafilaxia

---



---

**Anna Sala Cunill**  
Tesis Doctoral  
2012

**Directores de la Tesis:**  
**Dra. Victòria Cardona Dahl**  
**Prof. Josep Àngel Bosch Gil**



**Victoria Cardona Dahl**, Responsable de la Sección de Alergia del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitari Vall d'Hebron

y

**Josep Àngel Bosch Gil**, Coordinador médico del Área General del Hospital Universitari Vall d'Hebron y Catedrático de la Facultad de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona

Certifican que la tesis doctoral titulada

**“Mediadores mastocitarios durante la anafilaxia:  
Utilidad y limitaciones de la triptasa como marcador diagnóstico actual e implicación del sistema de contacto y de la coagulación en la anafilaxia “**

que presenta la licenciada **Anna Sala Cunill**, ha sido realizada bajo su dirección en la Sección de Alergia del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitari Vall d'Hebron, la consideran finalizada y reúne las condiciones necesarias para ser defendida ante el tribunal que corresponda para obtener el grado de Doctor en Medicina.

Dra. Victòria Cardona Dahl

Prof. Josep Àngel Bosch Gil

Bellaterra, 15 de octubre de 2012



***“Para hacer escuchar lo que decimos, es necesario ponerse en el lugar de aquellos a quienes uno se dirige”***

Jean Jacques Rousseau



## AGRADECIMIENTOS

Han pasado unos 4 años desde que empecé el trabajo que culmina con mi Tesis Doctoral. Durante este tiempo han sido muchas las personas que han formado parte de mi día a día, apoyándome, creyendo en mi y dándome buenos consejos, cariño y fuerza. A todos y a cada uno de ellos, mi más sincero agradecimiento.

A la Dra. Vicky Cardona, mi directora de tesis, jefa y amiga, a quien admiro, ya que ha sabido ganarse un sitio en la Alergología a nivel mundial y gracias a la cual he aprendido a avanzar en el conocimiento de la alergia. Además, darle las gracias por haber hecho posible mi estancia en el Karolinska Institutet, muy importante para mi formación como investigadora, y por haber apoyado y creído en mi tanto a nivel profesional como a nivel personal. Su apoyo, en todos los sentidos, ha sido básico para mí.

Al Dr. Álvaro Cadahía, mi primer jefe de Alergología, por su apoyo y porque desde residente creyó en mí.

A Mar Guilarte, mi compañera de trabajo y amiga, quien me ha enseñado mucho y me ha introducido en dos campos que actualmente me apasionan, la anafilaxia y el angioedema. Esta tesis nace de ella y de la pregunta que mientras era residente me hizo: *“¿Por qué no escribes un protocolo y hablas con los de urgencias para conseguir suero de pacientes con anafilaxia y estudiamos la utilidad de la triptasa y otros marcadores?”*. A partir de entonces, se despertaría mi interés en profundizar mis conocimientos sobre la fisiopatología de la anafilaxia.

Pero la profundización en la investigación, desde la parte más básica y desde otro punto de vista menos clínico, me llegó durante mi intensa estancia en el Karolinska Institutet. Primero agradecer al Prof. Thomas Renné, quien me acogió en su laboratorio como una más y me enseñó el complicado mundo del sistema de contacto y de la coagulación, y quien aunque al principio fue muy duro, dudando del proyecto y de que alguien tan clínico pudiera realizar este trabajo, finalmente, después de muchas horas de trabajo y de mucho sacrificio, y de demostrarle mi interés por la investigación día tras día, empezó a creer en mi y en mi proyecto. Agradecerle también, que finalmente me haya apoyado a nivel profesional, creyendo en mi como investigadora y ofreciéndome oportunidades laborales y seguir colaborando con su laboratorio... Al resto de compañeras mías del Karolinska, Jenny, Katrin, Stephanie y Felicitas, a las que agradezco enormemente su apoyo, y su generosidad al enseñarme tanto sobre química y sobre técnicas de laboratorio que desconocía y sobretodo por hacer que mi estancia en Suecia fuera menos dura, acompañándome los fines de semana que tuve que trabajar en el laboratorio y en los momentos duros y desesperantes cuando un ensayo había salido mal y porque además, me enseñaron a disfrutar de una cultura y de una ciudad tan especial como es Stockholm. Y al resto de compañeros del Karolinska, sin todos ellos mi segunda parte de la tesis no hubiera sido posible.

En mi “segunda casa” de todos éstos años, el Hospital Vall d’Hebron, he tenido unos maestros excepcionales. A parte de los enumerados anteriormente, agradecer a la Dra. Olga Luengo, una de mis referentes y amiga, su apoyo constante en este trayecto de mi vida y también al Dr. Moisés Labrador, un gran amigo que empezó siendo mi “R grande”, con el que hemos compartido muchos momentos durante la residencia y quien me ha ayudado y apoyado y me ha introducido en el campo de la inmunología e investigación en el laboratorio. A mis residentes pequeñas y amigas Teresa, Olga, Adriana, Sonia, Lorena, Alba, Silvia, Marta, Belén y Núria, con quienes he compartido grandes momentos y confianzas, y quienes me han apoyado mucho, sobretodo en el último año lleno de incertidumbres a nivel laboral, pero que aún así, siempre han creído en mi y me han empujado hacía delante. A Eli, que aunque ha llegado más tarde, ha sabido ganarse un sitio entre nosotros. A la Dra. María Vicario, por sus consejos durante la realización de la Tesis. Al resto de compañeros que he coincidido durante mi residencia y carrera laboral, gracias por estar ahí.

A Chenchu, Alberto y Emília, sin los que no sería posible realizar ningún estudio en el Servicio, les agradezco su colaboración y su apoyo desinteresado.

A Cinta, porque sin su colaboración y apoyo el proyecto de las triptasas no hubiera sido posible.

A todo el servicio de Alergia del Infantil del Hospital Vall d’Hebron y en especial Rosa, Carme y Paula, quienes durante mi primer contacto con la alergia, me hicieron sentir como en casa y me apoyaron en unos momentos de desconcierto.

A todos mis compañeros de la guardia de “*Los Flanders*”, con quienes he compartido tanto. Y a todos los médicos que han pasado por urgencias de Medicina Interna del Hospital Vall d’Hebron, por haber colaborado en mi Tesis.

Al servicio de Medicina Interna y en especial al Prof. Miquel Vilardell, a quien admiro, por su apoyo en todo momento y quien me ha ayudado a poder formarme como médico y como investigadora, dándome la oportunidad de solicitar la beca Río Hortega que posteriormente recibí. Al Prof. Albert Selva, quien durante mi primer año de residencia en Medicina Interna, me enseñó a escuchar y a tratar a los pacientes y quien desde entonces ha sido un referente como médico para mí, por sus conocimientos, su humildad y su trato con los pacientes. Y finalmente al Prof. Josep Bosch por su apoyo en todo momento tanto en la Tesis como en la parte laboral.

A mis compañeros de Traumatología del Hospital General de Vic y en especial Llorenç Guillaumet, mi primer jefe y ahora amigo, quienes durante mis meses de estudio para el exámen MIR, me ensañaron mucho, pero sobretodo darle las gracias, por todos los consejos a nivel personal que me dieron, por la responsabilidad que me ofrecieron y por creer desde el principio en mis posibilidades, seguir apoyándome en todo momento y por las horas de amistad compartidas.

A todos mis amigos, por estar ahí y haber entendido que hay veces que en la vida se tienen que sacrificar ciertos momentos para conseguir algo, ya que todo requiere un esfuerzo.



A mis padres, a quienes les agradezco todo. Gracias por hacer posible que me formara como médico y sobretodo como persona. Y gracias por estar siempre ahí, por quererme, por vuestra comprensión y paciencia, por vuestra generosidad y sobretodo por el apoyo incondicional día tras día, hasta la culminación de la Tesis Doctoral.

A mi hermana, quien siempre ha estado a mi lado y me ha aconsejado, y quien ha sido un referente para mi. Y también a Lluís, y a mis ahijados, los mellizos Martí y Genís, quienes ayudé y vi nacer hace 8 años, en el mismo momento que también nacía mi carrera como Alergóloga y quienes han crecido conmigo durante este largo período (primero la residencia y después la tesis) y me han dado energía para conseguirlo.

A la familia de Adrià, por su gran apoyo y paciencia en todo momento y por entendernos.

Y por último, agradecer a mi alma gemela, Adrià, mi compañero de este largo trayecto, por haberme apoyado tanto durante estos años, y hacer más fácil mi estancia en Suecia, que aunque nos separaba una gran distancia, le sentí siempre a mi lado. Gracias por creer en mi y en mis posibilidades y por entenderme tan bien siempre. Pero sobretodo, agradecer la suerte que tenemos de poder compartir aficiones, inquietudes, un trabajo que desde fuera cuesta tanto de entender y un día a día juntos que nos permite crecer en todos los niveles.

## **MÁS AGRADECIMIENTOS**

Los trabajos que componen esta tesis han sido llevados a cabo gracias a la ayuda del Ministerio de Ciencia e Innovación de España, Instituto Carlos III (CM09/00212) quien hizo posible mi estancia en el Karolinska Institutet (Stockholm, Suecia), de la Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica y del Fondo de Investigación Sanitaria de España (PI10/01871).

## PRESENTACIÓN

La Tesis Doctoral que aquí se presenta ha sido realizada en el grupo de investigación de anafilaxia de la Sección de Alergia del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitari Vall d'Hebron, adscrito a la Facultad de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, bajo la dirección de la Dra. Victòria Cardona Dahl y del Prof. Josep Àngel Bosch Gil.

El objetivo de esta Tesis Doctoral es investigar los mediadores mastocitarios implicados en la fisiopatología de la anafilaxia, reacción de instauración rápida y potencialmente mortal. Se presenta como un compendio de dos trabajos. El primero, ya publicado en una revista indexada, investiga la utilidad y las limitaciones de la triptasa, el marcador diagnóstico disponible en la actualidad. El segundo, estudia otros posibles mediadores implicados en la fisiopatología de la anafilaxia, y evalúa el papel del sistema de contacto y de la coagulación durante la anafilaxia, encontrando novedosos resultados que están pendientes de publicación. Una parte de este segundo estudio, en la que se analiza el sistema de contacto y de la coagulación, ha sido desarrollada por la Doctoranda en el Departamento de Medicina y Cirugía Molecular del Karolinska Institutet, en Stockholm, Suecia, liderado por el Profesor Thomas Renné, hematólogo y químico de gran prestigio a nivel mundial por sus conocimientos sobre el sistema de contacto.

La Tesis Doctoral consta de los siguientes apartados: *Introducción, Justificación e Hipótesis, Objetivos, Resultados, Discusión, Conclusiones, Bibliografía y Anexos*. En la *Introducción* se tratan los aspectos más relevantes sobre la anafilaxia, definiéndola y describiendo la fisiopatología, el diagnóstico, la clasificación, la etiología y el tratamiento. También se describe el sistema de contacto y la coagulación, incluyendo la

fisiopatología y los componentes implicados en ellos, ya que son dos de los aspectos evaluados en el segundo trabajo, comentando la bibliografía más actual publicada al respecto hasta el momento de realizar la Tesis Doctoral. Tanto en el apartado de los *Objetivos*, de los *Métodos*, de los *Resultados* como de la *Discusión* se ha dividido el contenido en dos partes, cada una de ellas representa un trabajo, para facilitar la comprensión y la lectura, porque aunque los dos estudios siguen una misma línea (investigar los mediadores mastocitarios durante la anafilaxia) cierta metodología y los temas a evaluar y discutir son distintos. En la *Discusión* se comentan los resultados obtenidos desde una óptica integradora analizándola con los conocimientos que tenemos hoy en día, y aunque el segundo trabajo todavía está en revisión de una revista científica, debido a que los hallazgos de éste son importantes y novedosos se ha procedido a la presentación de la Tesis previa a su publicación. Y finalmente, las *Conclusiones* recapitulan los aspectos y las aportaciones más relevantes de la Tesis Doctoral. En el apartado de *Bibliografía* se detallan las referencias bibliográficas citadas en la Tesis Doctoral.

## **PRODUCCIÓN CIENTÍFICA:**

Los resultados obtenidos durante el proceso de investigación que ha llevado a la elaboración de esta tesis doctoral han sido publicados previamente en revistas científicas indexadas y presentados en congresos científicos de ámbito internacional:

### **PUBLICACIONES INTERNACIONALES DE LA TESIS**

#### **Artículos Originales**

**1.- “Usefulness and limitations of sequential serum tryptase for the diagnosis of anaphylaxis in 102 patients”**

**Sala-Cunill A**, Cardona V, Labrador-Horrilo M, Luengo O, Estes O, Garriga T, Vicario M, Guilarte M. *International Archives of Allergy and Immunology* 2013;160:192-199 (DOI:10.1159/000339749). IF 2.54. **Editor’s Choice**, artículo seleccionado para acceso abierto.

**2.- Activation of the plasma contact-system in patients with Anaphylaxis (pendiente de publicación)**

**Anna Sala-Cunill**, Mar Guilarte, Victoria Cardona, Jenny Björkqvist, Katrin Nickel, Moises Labrador-Horrillo, Olga Luengo, Thomas Renné

### **OTROS RESULTADOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**1.- Anaphylaxis: usefulness of tryptase in patients attending an emergency department.**

**Sala Cunill A**, Guilarte M, Labrador M, Luengo O, Estes O, Garriga T, Cardona V.

29<sup>th</sup> Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. London. June 2010. *Allergy* 2010; Suppl.

**Presentado como comunicación oral en el Congreso Europeo de la EACCI en Londres 2010 y premiado por el jurado como mejor comunicación oral.**

**2.- Activation of the Plasma Contact-System in Patients with Anaphylaxis**

**Anna Sala-Cunill**, Mar Guilarte, Victòria Cardona, Jenny Björkqvist, Moises Labrador, Katrin Nickel, Olga Luengo and Thomas Renné

**Aceptado como comunicación oral para el “2013 Annual Meeting of AAAAI” San Antonio, Texas (Abstract Number: 456846)**



# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b> .....	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Anafilaxia</b> .....	<b>23</b>
3.1.1	<i>Definición</i> .....	23
3.1.2	<i>Epidemiología</i> .....	23
3.1.3	<i>Causas de anafilaxia</i> .....	24
3.1.4	<i>Fisiopatología</i> .....	25
3.1.5	<i>Diagnóstico</i> .....	28
3.1.6	<i>Diagnóstico diferencial</i> .....	39
3.1.7	<i>Tratamiento de la anafilaxia</i> .....	40
<b>3.2</b>	<b>Sistema de contacto</b> .....	<b>48</b>
3.2.1	<i>Definición</i> .....	48
3.2.2	<i>Componentes del sistema de contacto</i> .....	48
3.2.3	<i>Fisiología</i> .....	58
<b>3.3</b>	<b>Hemostasia</b> .....	<b>61</b>
3.3.1	<i>Definición</i> .....	61
3.3.2	<i>Sistema de la coagulación</i> .....	62
3.3.3	<i>Sistema fibrinolítico</i> .....	65
3.3.4	<i>Componentes del sistema de la coagulación</i> .....	65
3.3.5	<i>Pruebas de laboratorio para estudiar la hemostasia</i> .....	66
<b>3.4</b>	<b>Relación entre los mediadores mastocitarios y la activación del sistema de contacto</b> .....	<b>69</b>
3.4.1	<i>La heparina mastocitaria activa el sistema de contacto</i> .....	70
3.4.2	<i>La estimulación de los mastocitos a través de un alérgeno induce edema mediado por bradícina en un modelo murino</i> .....	73
<b>4</b>	<b>JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO</b> .....	<b>75</b>
<b>4.1</b>	<b>HIPÓTESIS DEL PRIMER TRABAJO</b> .....	<b>76</b>
<b>4.2</b>	<b>HIPÓTESIS DEL SEGUNDO TRABAJO</b> .....	<b>76</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>77</b>
<b>5.1</b>	<b>PRINCIPAL</b> .....	<b>77</b>
<b>5.2</b>	<b>ESPECÍFICOS</b> .....	<b>77</b>
5.2.1	<i>Primer trabajo</i> .....	77
5.2.2	<i>Segundo trabajo</i> .....	77
<b>6</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>79</b>
<b>6.1</b>	<b>Diseño del estudio y selección de pacientes</b> .....	<b>79</b>
6.1.1	<i>Primer trabajo</i> .....	79
6.1.2	<i>Segundo trabajo</i> .....	79
<b>6.2</b>	<b>Aspectos éticos. Consentimiento informado</b> .....	<b>80</b>
<b>6.3</b>	<b>Clasificación de la gravedad de la anafilaxia</b> .....	<b>80</b>
<b>6.4</b>	<b>Tratamiento recibido en el Departamento de urgencias</b> .....	<b>81</b>
<b>6.5</b>	<b>Etiología</b> .....	<b>81</b>
<b>6.6</b>	<b>Factores de riesgo para anafilaxia grave</b> .....	<b>82</b>
<b>6.7</b>	<b>Pruebas cutáneas (prick test)</b> .....	<b>82</b>
<b>6.8</b>	<b>Prueba del cubito de hielo</b> .....	<b>83</b>
<b>6.9</b>	<b>Extracción de sangre y obtención de suero</b> .....	<b>84</b>
<b>6.10</b>	<b>IgE específica</b> .....	<b>84</b>

6.11	Determinación de triptasa sérica .....	84
6.12	Extracción de sangre y obtención de plasma .....	85
6.13	Validez interna del plasma para el estudio del sistema de contacto.....	85
6.14	SDS-PAGE e Inmunodetección de HK, PK y FXII .....	86
6.14.1	<i>Escisión del HK como biomarcador de activación del sistema de contacto y creación de una curva estándar de cuantificación del porcentaje de escisión del HK.....</i>	<i>88</i>
6.15	Cuantificación del TTPa .....	89
6.16	Cuantificación del anti-Xa .....	90
6.17	Análisis estadístico.....	90
6.17.1	<i>Primera parte.....</i>	<i>90</i>
6.17.2	<i>Segunda parte.....</i>	<i>91</i>
<b>7</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>93</b>
<b>7.1</b>	<b>Primer trabajo.....</b>	<b>93</b>
7.1.1	<i>Algoritmo del estudio y características de los pacientes.....</i>	<i>93</i>
7.1.2	<i>Grados de gravedad de la anafilaxia y etiología .....</i>	<i>95</i>
7.1.3	<i>Factores de riesgo de gravedad.....</i>	<i>96</i>
7.1.4	<i>Concentración de triptasa sérica en los distintos intervalos de tiempos.....</i>	<i>97</i>
7.1.5	<i>Concentración de triptasa sérica según los grados de gravedad de la anafilaxia .....</i>	<i>100</i>
7.1.6	<i>Concentración de triptasa sérica según la etiología de la anafilaxia .....</i>	<i>101</i>
7.1.7	<i>Tratamiento recibido en urgencias.....</i>	<i>102</i>
<b>7.2</b>	<b>Segundo trabajo .....</b>	<b>104</b>
7.2.1	<i>Características de los pacientes.....</i>	<i>104</i>
7.2.2	<i>Escisión del HK como biomarcador de activación del sistema de contacto .....</i>	<i>105</i>
7.2.3	<i>Validez interna del plasma para el estudio del sistema de contacto.....</i>	<i>107</i>
7.2.4	<i>Análisis de la activación del sistema de contacto en pacientes y controles.....</i>	<i>108</i>
7.2.5	<i>Inmunodetección del FXII, PK y HK.....</i>	<i>111</i>
7.2.6	<i>Grados de gravedad de la anafilaxia y correlación con el sistema de contacto .....</i>	<i>112</i>
7.2.7	<i>Concentración de triptasa sérica en los pacientes con anafilaxia y correlación con la activación del sistema de contacto.....</i>	<i>113</i>
7.2.8	<i>Evaluación del sistema de la coagulación en pacientes con anafilaxia .....</i>	<i>114</i>
7.2.9	<i>La heparina inicia la activación del sistema de contacto en pacientes con anafilaxia.....</i>	<i>115</i>
<b>8</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>119</b>
<b>8.1</b>	<b>Primer trabajo.....</b>	<b>119</b>
8.1.1	<i>Triptasa como marcador diagnóstico en la anafilaxia .....</i>	<i>120</i>
8.1.2	<i>Etiología de la anafilaxia según los niveles de triptasa .....</i>	<i>120</i>
8.1.3	<i>Gravedad de la anafilaxia según los niveles de triptasa .....</i>	<i>121</i>
8.1.4	<i>Factores de riesgo de la anafilaxia.....</i>	<i>124</i>
8.1.5	<i>Tratamiento de la anafilaxia .....</i>	<i>125</i>
8.1.6	<i>Limitaciones del estudio.....</i>	<i>127</i>
<b>8.2</b>	<b>Segundo trabajo .....</b>	<b>129</b>
8.2.1	<i>Escisión del HK como biomarcador de activación del sistema de contacto .....</i>	<i>129</i>
8.2.2	<i>El sistema de contacto durante la anafilaxia .....</i>	<i>130</i>
8.2.3	<i>Gravedad de la anafilaxia y activación del sistema de contacto.....</i>	<i>131</i>
8.2.4	<i>La triptasa y el sistema de contacto .....</i>	<i>136</i>
8.2.5	<i>El sistema de la coagulación durante la anafilaxia .....</i>	<i>137</i>
8.2.6	<i>Limitaciones del estudio.....</i>	<i>141</i>
<b>9</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>143</b>
<b>10</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>145</b>
<b>11</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>155</b>



## 1 ABREVIATURAS

<b>AF:</b>	Anafilaxia
<b>BK:</b>	Bradicinina
<b>CCR:</b>	Receptor de tipo C de las quimiocinas
<b>CPA:</b>	Células presentadoras de antígeno
<b>DNP-HSA:</b>	Dinitrofenil- albúmina sérica humana
<b>ECA:</b>	Enzima convertidor de angiotensina
<b>ECG:</b>	Electrocardiograma
<b>ELISA:</b>	Enzima inmuno ensayo en fase sólida
<b>FC:</b>	Frecuencia cardíaca
<b>FcεRI:</b>	Receptor de alta afinidad de la IgE
<b>FXII:</b>	Factor XII
<b>FXI:</b>	Factor XI
<b>HK:</b>	Cininógeno de alto peso molecular
<b>Ig:</b>	Inmunoglobulina
<b>IL:</b>	Interleucina
<b>IM:</b>	Intramuscular
<b>INF:</b>	Interferón
<b>IV:</b>	Intravenoso
<b>KDa:</b>	Kilodalton
<b>LK:</b>	Cininógeno de bajo peso molecular
<b>LT:</b>	Leucotrieno
<b>MCT:</b>	Mastocitos que contienen triptasa
<b>MCTC:</b>	Mastocitos que contienen triptasa y quimasa
<b>NEP:</b>	Endopeptidasa neutra
<b>OSCS:</b>	Condroitín sulfato sobre sulfatado
<b>PAF:</b>	Factor activador de plaquetas
<b>PAI:</b>	Inhibidor del activador del plasminógeno
<b>PEF:</b>	Pico flujo espiratorio
<b>PG:</b>	Prostaglandinas
<b>PK:</b>	Calicreína plasmática

<b>PPK:</b>	Precalicroína plasmática
<b>PTK:</b>	Precalicroína tisular
<b>PAGE:</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida
<b>SDS:</b>	Dodecil sulfato disódico
<b>RANTES:</b>	Regulador de la activación de células T normales expresado y secretado
<b>RBK2:</b>	Receptor 2 de la bradicinina
<b>SpO<sub>2</sub> :</b>	Saturación plasmática de oxígeno
<b>TA:</b>	Tensión arterial
<b>TGF:</b>	Factor de transformación de crecimiento
<b>TK:</b>	Calicroína tisular
<b>TNF:</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>TP:</b>	Tiempo de protrombina
<b>TT:</b>	Tiempo de trombina
<b>TTpa:</b>	Tiempo de tromboplastina parcial activada
<b>WT:</b>	Tipo salvaje

## 2 ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Causas de anafilaxia en España.....	24
<b>Figura 1:</b> Fases de la reacción alérgica mediada por IgE.....	26
<b>Tabla 2:</b> Criterios clínicos para el diagnóstico de anafilaxia .....	29
<b>Tabla 3:</b> Grados de gravedad de las reacciones sistémicas de hipersensibilidad.....	31
<b>Figura 2:</b> Metabolismo de la histamina y triptasa.....	42
<b>Tabla 4:</b> Diagnóstico diferencial de anafilaxia .....	39
<b>Tabla 5:</b> Efectos terapéuticos de la adrenalina.....	42
<b>Tabla 6:</b> Efectos adversos de la adrenalina.....	42
<b>Figura 3:</b> Concentraciones plasmáticas de adrenalina en función de la vía de administración y del lugar.....	43
<b>Figura 4:</b> Estructura del FXII.....	49
<b>Figura 5:</b> Estructura de la precalicreína.....	51
<b>Figura 6:</b> Estructura de los dominios del cininógeno.....	53
<b>Figura 7:</b> Estructura del cininógeno de alto peso molecular.....	54
<b>Figura 8:</b> Esquema superficial de la formación de las cininas, unión a sus receptores y degradación, tanto en plasma como en tejido.....	55
<b>Figura 9:</b> Metabolismo de la bradisinina.....	57
<b>Figura 10:</b> Efectos de la bradisinina en diferentes estados fisiopatológicos.....	58
<b>Figura 11:</b> Activación del sistema de contacto.....	59
<b>Tabla 7:</b> Activadores del sistema de contacto.....	60
<b>Figura 12:</b> Esquema de las dos vías de la coagulación.....	63
<b>Figura 13:</b> Revisión del modelo de formación de trombo.....	64
<b>Tabla 8:</b> Factores de la coagulación.....	66

<b>Figura 14:</b> La heparina de los mastocitos inicia la formación de la BK mediante la activación del sistema de contacto.....	71
<b>Figura 15:</b> La heparina de los mastocitos inicia la formación de BK mediante la activación del sistema de contacto.....	71
<b>Figura 16:</b> La heparina derivada de los mastocitos induce la formación de BK dependiendo de su carga negativa.....	72
<b>Figura 17:</b> La heparina aumenta la permeabilidad vascular de la microvascularidad cutánea.....	73
<b>Figura 18:</b> La BK contribuye al edema en un modelo murino de anafilaxia.....	74
<b>Tabla 9:</b> Grados de gravedad de la anafilaxia.....	81
<b>Figura 19:</b> Algoritmo del primer estudio.....	93
<b>Tabla 10:</b> Características demográficas y clínicas de pacientes del primer trabajo.....	94
<b>Tabla 11:</b> Etiología de la anafilaxia de acuerdo con los grado de gravedad.....	96
<b>Tabla 12:</b> Factores de riesgo de pacientes asociados a anafilaxia grave.....	97
<b>Tabla 13:</b> Concentración de triptasa sérica en diferentes tiempos y porcentaje de pacientes con triptasa elevada.....	98
<b>Figura 20:</b> Concentración sérica de triptasa en distintas mediciones temporales.....	99
<b>Figura 21:</b> Concentración de triptasa sérica durante la anafilaxia en función de los grados de gravedad de la anafilaxia.....	100
<b>Figura 22:</b> Concentración de triptasa en los diferentes tiempos de medición dependiendo de la causa.....	102
<b>Figura 23:</b> Vías de administración de la adrenalina.....	103
<b>Tabla 14:</b> Características demográficas y clínicas de pacientes del segundo trabajo..	104
<b>Figura 24:</b> Inmunodetección de los distintos porcentajes de escisión del HK y sus productos de la proteólisis.....	106
<b>Figura 25:</b> Inmunodetección de la molécula del HK en las distintas formas de almacenaje del plasma.....	108
<b>Figura 26:</b> Escisión del HK en pacientes durante distintos tiempos de la anafilaxia y en condiciones basales y en controles.....	109

<b>Figura 27:</b> Porcentaje de escisión del Hk en pacientes durante la anafilaxia y en condiciones basales.....	110
<b>Figura 28:</b> Porcentaje de escisión del Hk en pacientes durante la anafilaxia, en condiciones basales y en controles.....	111
<b>Figura 29:</b> Inmunodetección del FXII y del PK, comparando con la inmunodetección del HK en los pacientes durante la anafilaxia y en condiciones basales.....	112
<b>Figura 30:</b> Porcentaje de escisión del HK en función de la gravedad de la anafilaxia.....	113
<b>Figura 31:</b> Correlación de la triptasa sérica en los pacientes durante la anafilaxia con el porcentaje de escisión del HK.....	114
<b>Tabla 15:</b> Datos de laboratorio de los pacientes durante la anafilaxia y en condiciones basales.....	115
<b>Figura 32:</b> Niveles de anti-Xa en los pacientes durante la anafilaxia y en condiciones basales y en los controles.....	116



## **3 INTRODUCCIÓN**

### **3.1 Anafilaxia**

#### **3.1.1 Definición**

No existe una definición de anafilaxia universalmente admitida, lo que conduce con frecuencia a una confusión en el diagnóstico y en el tratamiento [1]. La European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EACCI) define la anafilaxia como una reacción de hipersensibilidad generalizada o sistémica, grave y que amenaza la vida [2]. La guía española de actuación en Anafilaxia: GALAXIA considera que la anafilaxia es una reacción alérgica grave de instauración rápida y potencialmente mortal [3], de acuerdo con la definición propuesta en la segunda reunión de la NIAID/FAAN [1].

Desde un punto de vista clínico, se trata de un síndrome complejo, con aparición de síntomas y signos sugestivos de liberación generalizada de mediadores de mastocitos y de basófilos tanto a nivel cutáneo (eritema, prurito generalizado, urticaria y/o angioedema) cómo en otros órganos (gastrointestinal, respiratorio o cardiovascular)[4], que se puede desencadenar tanto por mecanismos inmunológicos como no inmunológicos [5].

#### **3.1.2 Epidemiología**

La prevalencia de la anafilaxia está entre 0,05 y 2% aunque parece que está aumentando, especialmente en gente joven [6], [7], [8] . De todas formas, parece claro que sigue siendo una patología infradiagnosticada por parte de los médicos y

poco reconocida por parte de los pacientes, ocasionando, en muchos casos, un tratamiento inadecuado [6].

Existen pocos datos sobre la incidencia de anafilaxia en la población general, y los que hay son difícilmente comparables debido a la amplia variabilidad en los criterios de inclusión, en la población diana y por la falta de una definición universalmente aceptada. La mayoría de los artículos indican una incidencia entre el 3,2 y 30 por 100.000 personas-año, con una mortalidad entre 0,05 y 2% del total de las reacciones [1], [4]. En EEUU se describen unos 100.000 episodios al año y al menos un 1% son mortales [9].

### 3.1.3 Causas de anafilaxia

Las causas más frecuentes de anafilaxia a nivel global son los fármacos, seguido por los alimentos y las picaduras de himenópteros en la mayoría de series publicadas [1], [10]. La frecuencia de cada uno de ellos varía en función de la edad, así los alimentos son la causa más frecuente en la infancia y los fármacos son los más frecuentes en adultos [3]. En la tabla 1 se recogen los agentes etiológicos descritos en series españolas y resumidos en la Guía Española de actuación en Anafilaxia: GALAXIA [11].

**Tabla 1. Causas de anafilaxia en España. Adaptado de [11],[12], [13], [14].**

<b>Etiología</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Medicamentos y medios diagnósticos	46.7-62
Alimentos	22.6-24.1
Picaduras de insectos	8.6-13.9
Factores físicos	3.4-4
Otros (incluye látex)	7.26
Idiopática	3.4-5



Los alimentos más frecuentes implicados en los niños son: huevo, leche, frutos secos, pescado y marisco y en los adultos son: frutas, frutos secos, marisco y pescado [12], [13].

Los fármacos más frecuentemente implicados en reacciones anafilácticas son: antibióticos betalactámicos, antiinflamatorios no esteroideos, otros agentes antiinfecciosos no betalactámicos y medios de contraste radiológicos [12]. El látex constituye una causa importante en el medio hospitalario.

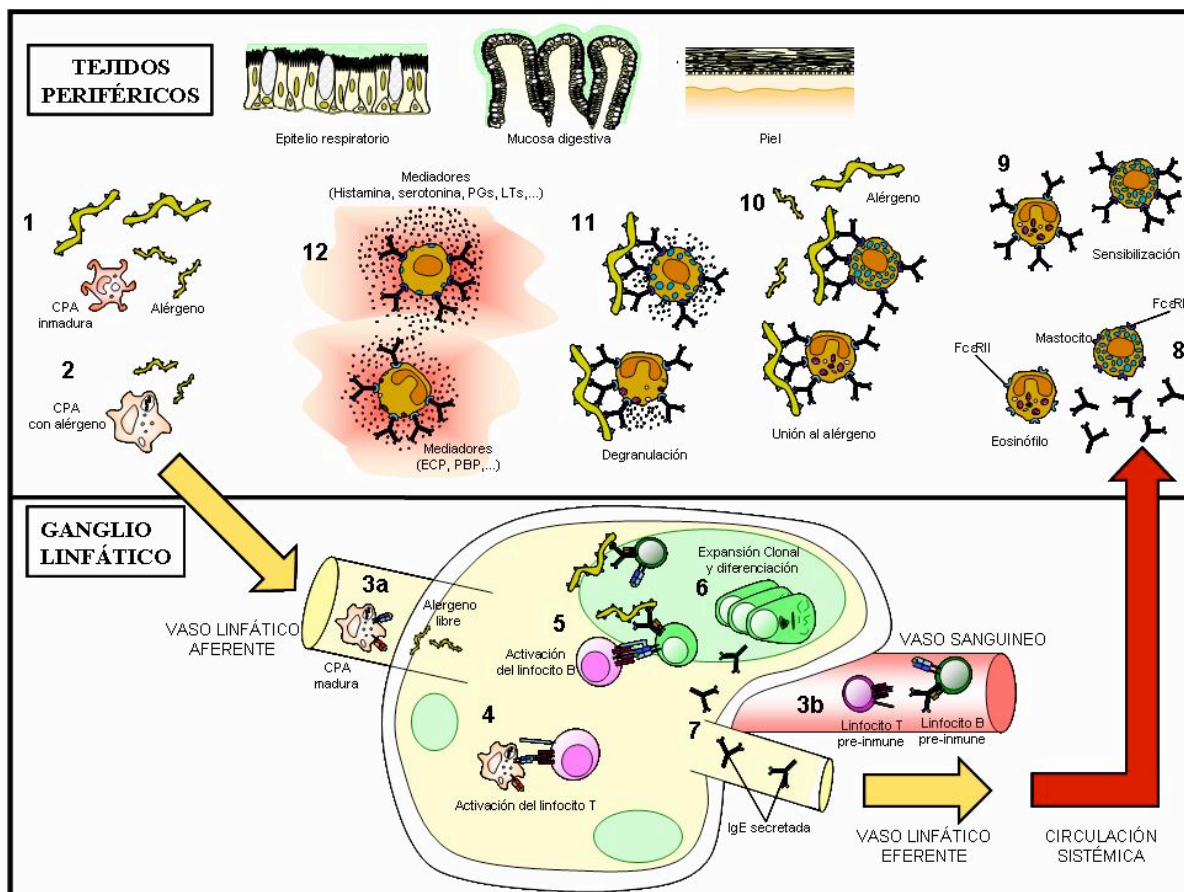
### **3.1.4 Fisiopatología**

La anafilaxia se produce por una liberación de mediadores mastocitarios y de basófilos. Esta liberación puede producirse por tres mecanismos distintos:

#### **3.1.4.1 Reacción de hipersensibilidad mediada por IgE**

En la mayoría de pacientes con anafilaxia, la IgE ejerce una función primordial en su patogénesis. El tipo de reacción de hipersensibilidad, en la que la IgE está implicada, es la reacción de hipersensibilidad inmediata tipo I de la clasificación de Gell y Coombs realizada en 1963 [15]. De forma esquemática se representa éste tipo de reacción en la Figura 1. Primero hay una fase de sensibilización y posteriormente, en una re-exposición al alérgeno, éste se une a la IgE fijada al receptor de alta afinidad de la IgE (FcεRI) de la superficie celular del mastocito y de los basófilos. El entrecruzamiento entre complejos IgE/ FcεRI producirá una activación celular y una liberación de los mediadores mastocitarios. La IgE, además, también contribuye a intensificar, a partir de mecanismos más allá de la sensibilización, la activación y la liberación de

mediadores mastocitarios, por ejemplo, al potenciar la expresión del FcεRI en los mastocitos y basófilos [16],[17], [18].



**Figura 1 Fases de la reacción alérgica mediada por IgE. FASE DE SENSIBILIZACIÓN.** 1/ Entrada de alérgenos en los tejidos periféricos y captación por las células presentadoras de antígeno (CPA) inmaduras; 2/ CPA madura con antígeno procesado; 3a/ Llegada del antígeno, libre y procesado por CPA, al ganglio linfático; 3b/ Llegada de linfocitos B y T pre-inmunes al ganglio linfático; 4/ Presentación del antígeno procesado al linfocito T. Activación del linfocito T; 5/ Presentación del antígeno libre al linfocito B. Activación del linfocito B por el linfocito T activado; 6/ Expansión clonal de los linfocitos B y diferenciación a células plasmáticas productoras de IgE específica; 7/ Transporte de IgE específica a los tejidos periféricos; 8/ Unión de la IgE a los receptores de alta y baja afinidad de las células efectoras; 9/ Sensibilización de las células efectoras, mastocitos y eosinófilos. **FASE EFECTORA.** 10/ Segundo contacto con el alérgeno tras fase de sensibilización; 11/ Polarización de IgE positiva al alérgeno e inicio de la desgranulación de los mastocitos; 12/ Liberación de mediadores inflamatorios. Fase de expresión clínica. (Reproducido con permiso del Dr. M. Labrador ) [19].

### 3.1.4.2 Reacción inmunológica no IgE

En humanos, la anafilaxia por otros mecanismos inmunológicos que no implican la IgE es mucho menos frecuente y está menos estudiada. Entre estos mecanismos se incluyen complejos de antígeno-IgG, activación del

complemento y del sistema de coagulación, y posiblemente otros mecanismos como son la citotoxicidad, la activación de células T, liberación de neuropéptidos (sustancia P), o autoinmunidad [16],[20],[21],[22],[18]. Hay pruebas indirectas de que después de la administración de un antígeno a dosis altas se puede desencadenar una anafilaxia, como son la generación de complejos IgG-antígeno y la liberación del factor de activación de plaquetas. Por ejemplo, en pacientes que recibían tratamiento con infliximab se describió una respuesta IgG específica contra la inmunoglobulina murina [23],[24],[25]. Otro ejemplo, bien documentado, sobre la implicación del sistema del complemento y la coagulación en la anafilaxia, es la anafilaxia desencadenada por la heparina contaminada con condroitín sulfato sobre sulfatado (OSCS, acrónimo del inglés “Over Sulphate Chondroitin-Sulphate”), la cual se produce por una activación del complemento, por el exceso de cargas negativas que contiene el OSCS, conduciendo a la generación de bradicinina, así como de anafilotoxinas C3a y C5a, y también a la activación del sistema de la coagulación a través del factor XII [20], [26].

### **3.1.4.3 Reacciones no inmunológicas**

Hay factores que pueden activar el mastocito, sin precisar un mecanismo inmunológico, como son el ejercicio físico, el aire frío, la exposición al agua, al alcohol, el veneno de insectos, los contrastes radiológicos, y medicaciones como opioides y vancomicina. Este mecanismo todavía no está bien dilucidado [16], [18], [27]. En un mismo paciente, durante un episodio de anafilaxia, puede estar implicado más de un mecanismo distinto.

### **3.1.5 Diagnóstico**

#### **3.1.5.1 Diagnóstico clínico**

##### ***3.1.5.1.1 Sospecha clínica.***

El diagnóstico de anafilaxia es, fundamentalmente, clínico, hecho que hace imprescindible el rápido reconocimiento de los signos y síntomas de la anafilaxia para poder evitar un desenlace mortal y para poder identificar el agente causal y, así, evitar nuevos episodios. Otro problema añadido, es la diferencia de criterios entre autores sobre los síntomas que tiene que presentar un paciente para poder realizar el diagnóstico de anafilaxia. Hay autores que describen como anafilaxia cualquier reacción sistémica, aunque sólo sea con afectación cutánea, y otros sólo consideran anafilaxia cuando hay hipotensión asociada [28].

Actualmente, se acepta que se debe sospechar una anafilaxia cuando aparece de manera aguda (en minutos o pocas horas) un síndrome rápidamente progresivo que afecta a la piel y/o mucosas y que se acompaña de compromiso respiratorio y/o circulatorio (**Tabla 2**, criterio 1) [1]. Como la mayoría de las anafilaxias cursan con síntomas cutáneos (>80%) [29], con este criterio al menos un 80% de las anafilaxias son identificadas. Sin embargo, existen presentaciones menos típicas que no quedarían incluidas, como es el caso de las que cursan sin afectación en la piel (hasta un 20%), o de las que presentan exclusivamente hipotensión [30]. También es importante tener en cuenta que la concurrencia de una exposición a un

alérgeno potencial o conocido para el paciente apoya el diagnóstico. Por todo esto se han establecido dos criterios más de sospecha de anafilaxia representados en la **Tabla 2** [1].

**Tabla 2. Criterios clínicos para el diagnóstico de anafilaxia. Adaptado de [1].**

**La anafilaxia es muy probable cuando se cumple uno de los tres criterios siguientes:**

1. Inicio agudo (minutos o horas) de un síndrome que afecta a la piel y/o mucosas (ej. Urticaria generalizada, prurito, eritema, “flushing”, edema de labios, úvula o lengua) junto con a menos uno de los siguientes :
  - a. Compromiso respiratorio (ej. Disnea, sibilancias, estridor, disminución del PEF, hipoxemia)
  - b. Disminución de la TA o síntomas asociados de disfunción orgánica (ej. Hipotonía, síncope, incontinencia)
  
2. Aparición rápida de dos o más tras la exposición a un alérgeno potencial:
  - a. Afectación de piel y/o mucosas
  - b. Compromiso respiratorio
  - c. Disminución de la TA o síntomas asociados
  - d. Síntomas gastrointestinales persistentes
  
3. Disminución de la TA en minutos o algunas horas tras la exposición a un alérgeno conocido para ese paciente.
  - a. Lactantes y niños: TA baja o descenso superior al 30% de la TA sistólica\*
  - b. Adultos: TA sistólica inferior a 90mmHg o descenso superior al 30% sobre la basal

EF, pico flujo espiratorio; TA, tensión arterial. \*TA sistólica baja en la infancia: menor de 70 mmHg de 1 mes a 1 año, menor de [70mmHg + (2 x edad)] de uno a 10 años, y menor de 90mmHg de 11 a 17 años.

Cuando existe afectación cardiovascular con hipotensión se habla de shock anafiláctico.

Hay que recordar que la anafilaxia se puede presentar con manifestaciones inusuales como son las metrorragias [31], [32],

convulsiones o otras alteraciones neurológicas [33], y hemorragia suprarrenal [29].

La dificultad en el diagnóstico estriba en que no hay ningún signo o síntoma patognomónico; lo que sí que es típico es la rápida progresión en la gravedad o intensidad de los síntomas y esta característica es válida tanto para niños como adultos.

#### ***3.1.5.1.2 Evaluación de la gravedad***

La gravedad de la anafilaxia se relaciona con la rapidez en la progresión de los síntomas, con el tipo de antígeno y su vía de entrada, y con los órganos afectados. Sin embargo, existen factores relacionados con el propio paciente que también se han asociado a una mayor gravedad de la reacción y mayor mortalidad, como son la edad avanzada, la presencia de patología respiratoria (especialmente asma) o cardiovascular asociada, el tratamiento con IECA o betabloqueantes, o tener una mastocitosis [27], [34].

#### ***3.1.5.1.3 Clasificación de la gravedad***

Valorar la gravedad de la anafilaxia puede ser difícil, porque los síntomas iniciales pueden ser leves. Pero tardar en reconocer los signos y síntomas derivados de la anafilaxia, puede llevar a un desenlace fatal debido al grado de obstrucción máxima de la vía aérea o al colapso vascular.

Se han propuesto varias clasificaciones de gravedad de la anafilaxia, con la finalidad de unificar criterios, basándose en los órganos o aparatos afectados:

Una de las más utilizada es la clasificación de Mueller [35], que clasifica la anafilaxia en cuatro grados según su gravedad, correspondiendo a anafilaxia grave los grados III y IV. Otros autores, como Ring [28], añaden un quinto grado, en el que existe paro respiratorio, bradicardia extrema y/o hipotensión o parada cardíaca.

Sin embargo, la más actual es la clasificación de Brown SGA et al [30], que usa los términos *leve* para referirse a la reacción de hipersensibilidad que afecta puramente a nivel cutáneo-mucoso; *moderada* cuando los síntomas cutáneos están asociados a afectación de las vía respiratoria o del aparato gastrointestinal y *grave* cuando además de lo anterior, hay afectación cardiovascular o de otros órganos, tal y como se muestra en la Tabla 3. Recientemente, Stone et al [36] han demostrado que esta clasificación tiene una buena correlación con los niveles de triptasa sérica durante la anafilaxia.

**Tabla 3. Grados de gravedad de las reacciones sistémicas de hipersensibilidad. Adaptada de Brown SGA [30].**

Grado	Definido por
Leve (piel y tejido subcutáneo sólo)	Eritema generalizado, urticaria, o angioedema
Moderado (características sugestivas de involucrar el aparato respiratorio, cardiovascular, o gastrointestinal)	Náuseas, vómitos o dolor abdominal, disnea, estridor, sibilantes, mareo, (presíncope), diaforesis, o ocupación de gargantas
Grave (hipoxemia, hipotensión, o compromiso neurológico)	Cianosis o *SpO2 ≤92%, hipotensión (Presión Arterial sistólica < 90 mmHg en adultos), confusión, colapso, pérdida de conciencia o incontinencia

\*SpO2- Saturación de Oxígeno, medida por pulsioximetría.

Note que el grado leve no corresponde a un diagnóstico de anafilaxia, teniendo en cuenta los criterios del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas-FAAN[1]

### 3.1.5.2 Diagnóstico de laboratorio

Las pruebas de laboratorio disponibles actualmente para apoyar el diagnóstico clínico de anafilaxia son los niveles plasmáticos de histamina y de triptasa total. Incluso en las condiciones más óptimas, los niveles de histamina y triptasa pueden ser normales; esto no es infrecuente en la anafilaxia por alimentos, situación en la cual parece que la implicación de los basófilos es más importante que la de los mastocitos [1], [34].

Tras una activación anafiláctica del mastocito, sus mediadores son liberados por exocitosis en pocos minutos. La síntesis de metabolitos del ácido araquidónico, incluyendo prostagandinas (PG) y leucotrienos (LT) también se produce en pocos minutos, mientras la activación de la síntesis de citocinas inflamatorias y quimiocinas puede tardar horas [37].

Los mastocitos generan y liberan un grupo heterogéneo de mediadores implicados en el proceso anafiláctico que difieren en potencia y actividad biológica. La activación del mastocito da lugar a dos tipos de respuesta: una la secreción del contenido preformado de los gránulos por exocitosis, que se produce a los pocos minutos de la activación celular, y en segundo lugar la síntesis de nuevos mediadores [37].

Los mediadores del mastocito pueden ser divididos en tres grupos [37]:

- **Mediadores preformados contenidos en los gránulos:** aminas biógenas (histamina, serotonina (5-HT), proteasas neutras (triptasa, quimasa, carboxipeptidasa A), proteoglicanos (heparina, condroitín sulfato, ácido hialurónico), péptidos (hormona liberadora de corticotropina, sustancia P,



factor de crecimiento del endotelio vascular, urocortina, péptido vasoactivo intestinal), citocinas (TNF-alfa e IL-6).

- **Mediadores derivados de lípidos:** derivados del ácido araquidónico (prostaglandinas (PG) D2, leucotrieno (LT) B4, LTC4, LTD4, LTE4), factor activador de plaquetas.
- **Citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento:** citocinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-16, INF-gamma, TNF-alfa), quimiocinas (IL-8, RANTES, MIP-1alfa, MIP-1beta, MCP-1, MCP-3, MCP-4, I-309), factores de crecimiento.

Las características de los principales mediadores del proceso de anafilaxia son:

#### ***3.1.5.2.1 Histamina***

Es el mediador principal y el que más rápidamente se eleva en la anafilaxia. Sin embargo, una vez en el medio extracelular es rápidamente metabolizada (vida media 30 minutos) mediante la enzima histamina metil transferasa (Figura 2). Además para su medición es necesario procesar las muestras de manera inmediata a 4°C [38]. Ambos hechos limitan su uso como marcador de activación mastocitaria útil en la actividad clínica habitual.

#### ***3.1.5.2.2 Triptasa***

La triptasa es una proteasa neutra específica de los mastocitos. Cuando se libera, se secreta como un complejo proteoglicano activo de gran tamaño (200-250KDa) que limita su difusión más allá de los lugares de activación del mastocito. Así, los niveles circulantes de triptasa aumentan solo tras la

activación mastocitaria masiva, como ocurre en la anafilaxia o en la mastocitosis. Además, la triptasa puede propagar la señal de degranulación de mastocito a mastocito. La triptasa sérica alcanza su pico máximo a los 60-90 minutos del inicio de la anafilaxia y permanece elevada durante unas 5 horas (figura 2), disminuyendo de forma progresiva en las siguientes horas [37]. Se han descrito tres isoformas: triptasa alfa, beta y gamma. Las más estudiadas y que presentan interés para la anafilaxia son la alfa y la beta. La alfa-triptasa se secreta constitutivamente como forma inactiva en pequeñas cantidades, no está almacenada en los gránulos de secreción, y es la forma más frecuentemente presente en el suero de individuos normales (los valores varían de 1-10 ng/ml en controles sanos). Se eleva de forma significativa en pacientes afectos de mastocitosis. La beta-triptasa se almacena en los gránulos secretores y es la forma que se libera de forma masiva tras una activación anafiláctica. La ratio entre triptasa total y beta-triptasa puede ser útil para diferenciar anafilaxia de mastocitosis [38]. Los valores de triptasa varían en función de la gravedad y de la etiología de la anafilaxia, como en el caso de la anafilaxia inducida por alimentos donde no siempre se observa un aumento de la triptasa sérica [1]. Podría ser debido a la activación de los mastocitos de la mucosa intestinal, donde predominan los mastocitos que contienen triptasa (MCT) mientras que en otras localizaciones predominan mastocitos que contienen tanto triptasa como quimasa (MCTC) y que contienen concentraciones de triptasa muy superiores a los MCT. Además, en un estudio multicéntrico de 78 pacientes que acudieron a urgencias por anafilaxia, un número no despreciable de pacientes (36%) presentaban unos niveles de triptasa normales [36]. Se

recomienda realizar determinaciones seriadas de los valores de triptasa sérica para aumentar la sensibilidad de la prueba [38], [39]. Así, niveles normales de triptasa total sérica ante un episodio clínicamente compatible con una anafilaxia, no descartan el diagnóstico.

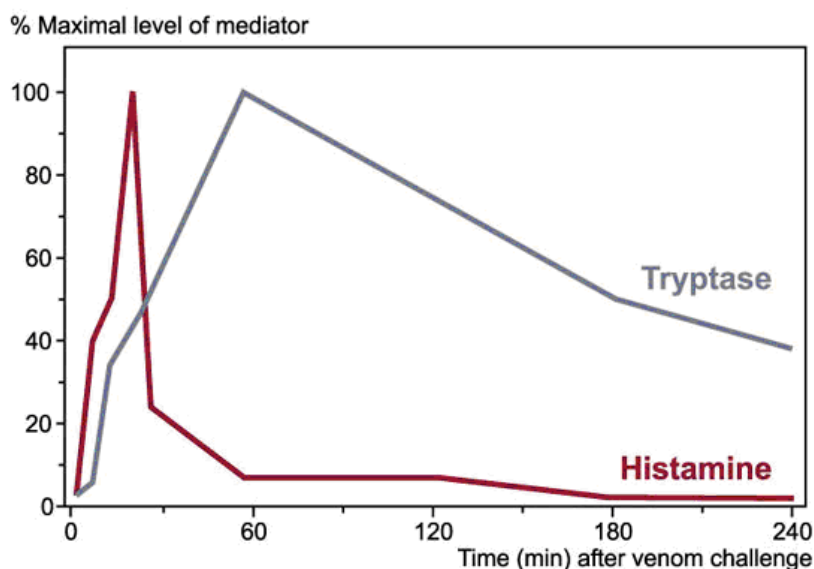


Figura 2. Metabolismo de la histamina y triptasa [37].

### 3.1.5.2.3 Quimasa

Al igual que la triptasa, la quimasa es otra proteasa que se encuentra unida a proteoglicanos y es almacenada en los mismos gránulos de secreción del mastocito. Se presenta únicamente en los MCTC, que se localizan preferentemente en la piel y en tejido submucoso del tracto respiratorio y gastrointestinal. Al igual que los otros mediadores preformados del mastocito, es liberada tras la activación mastocitaria, tanto de forma brusca en las reacciones anafilácticas como de tipo progresivo (“piecemeal”). La quimasa se libera en un complejo macromolecular junto con la carboxipeptidasa y los proteoglicanos de forma independiente a la triptasa

[37]. La quimasa actúa en el sistema renina-angiotensina, mediante la conversión de la angiotensina I a angiotensina II para compensar la pérdida de volumen intravascular secundario al aumento de la permeabilidad vascular. Además, también participa en la reparación de heridas y en la formación del tejido de granulación [40]. Existen pocas publicaciones en las que se estudie la relación entre quimasa y anafilaxia. En un estudio post-mortem de ocho individuos fallecidos por anafilaxia se encontró elevada [41], mientras que se mantuvo por debajo de los niveles de detección en 104 individuos fallecidos por otra causa.

#### **3.1.5.2.4 Carboxipeptidasa A3**

Las carboxipeptidasas son los enzimas más abundantes en los mastocitos, tanto en humanos como en roedores [40],[42]. Se encuentra en los gránulos secretores de los MCTC, co-localizándose con la quimasa. Existen datos que indican que los niveles séricos de carboxipeptidasa A3 están elevados en pacientes con diagnóstico clínico de anafilaxia, incluso en aquellos pacientes en los que no se detecta un aumento de la triptasa. Además, se mantienen elevados durante más tiempo que la triptasa [40].

#### **3.1.5.2.5 Beta-hexosaminidasa**

Se secreta de forma paralela a la histamina después de la activación del mastocito. Es otro mediador preformado en los gránulos del mastocito. Los mastocitos humanos son una de las fuentes más ricas en beta-hexosaminidasa [43]. No existen estudios de la liberación de esta enzima durante la anafilaxia en humanos.

### **3.1.5.2.6 Eicosanoides**

Los mastocitos humanos generan y secretan prostaglandinas (PG) y leucotrienos (LT), siendo una de las principales fuentes de PGD<sub>2</sub> y LTC<sub>4</sub>. En cambio, los basófilos no producen PGD<sub>2</sub>. Después de ser sintetizada por los mastocitos, la PGD<sub>2</sub> es excretada y se une a sus receptores presentes en la mayoría de los tejidos. Los mastocitos, cutáneos producen principalmente PGD<sub>2</sub>, mientras que los mastocitos de pulmón, corazón y tracto gastrointestinal secretan PGD<sub>2</sub> y LTC<sub>4</sub> [40], [44]. Se ha observado un aumento de PGD<sub>2</sub> y LTC<sub>4</sub> de forma paralela a la histamina y a la triptasa en lavados broncoalveolares de pacientes asmáticos [45]. El metabolito de la PGD<sub>2</sub>, 9alfa, 11 beta-PGF<sub>2</sub> es un marcador de activación mastocitaria por alérgenos en la provocación específica bronquial en pacientes con asma alérgica [46]. La PGD<sub>2</sub> produce broncoconstricción, vasodilatación periférica y vasoconstricción arterial pulmonar y coronaria, por lo que su liberación masiva por parte de los mastocitos tras la activación anafiláctica podría contribuir al desarrollo de los síntomas cardiovasculares y pulmonares presentes en la anafilaxia. Se han descrito niveles urinarios elevados del metabolito de PGD<sub>2</sub> tras un shock anafiláctico por salicilamida [47].

### **3.1.5.2.7 Factor activador de plaquetas (PAF)**

El factor activador de plaquetas es liberado por los mastocitos durante la anafilaxia. Sin embargo, existe sólo un estudio realizado en humanos [48], que evalúe su papel durante la anafilaxia. En dicho artículo, Vadas y

colaboradores, demostraron, que en 41 pacientes con anafilaxia, los niveles séricos del factor activador de plaquetas estaban aumentados y además se correlacionaban con la gravedad de la reacción, con diferencias significativas comparando con el grupo control o con los mismos pacientes en condiciones basales. Además, también encontraron que los niveles de la acetilhidrolasa del PAF (enzima que metaboliza el PAF) estaban inversamente correlacionados con los niveles de PAF y con el grado de anafilaxia, encontrando niveles muy bajos en anafilaxias fatales por cacahuete. Concluyen que estos niveles tan bajos de acetilhidrolasa del PAF en anafilaxias graves pueden ser los responsables de los altos niveles de PAF y de sus consecuencias. No obstante, éste grupo no comparó los niveles del PAF con los de la triptasa, ya que no midieron este último marcador.

### ***3.1.5.2.8 Citocinas y quimiocinas***

Los mastocitos liberan citocinas y quimiocinas que contribuyen a la reacción anafiláctica. Participan sobretodo en las reacciones bifásicas (reactivación de la reacción anafiláctica entre 2 y 72 horas después del episodio inicial de anafilaxia). La principal citocina implicada es el TNF-alfa que se encuentra preformada en los mastocitos y se libera en respuesta a estimulación vía IgE, IgG o toll-like receptor. Una vez liberada, activa los neutrófilos, incrementa la quimiotaxis de los monocitos y aumenta la producción de otras citocinas por parte de linfocitos T [43]. El número de quimiocinas y citocinas implicadas en la anafilaxia cada vez es más numeroso (RANTES, CCL-7, CCL-1, CCL-11, GM-CSF, M-CSF, IL1-beta, IL3, IL4, IL6, IL8, IL10, IL13, IL16, IL22). El último artículo sobre este tema,

publicado en octubre de 2009, por Stone y colaboradores [36], demostró un aumento de IL6 y IL10 durante la anafilaxia.

### 3.1.6 Diagnóstico diferencial

Generalmente el diagnóstico de anafilaxia es fácil de sospechar, especialmente si las manifestaciones cutáneas están presentes y si existe el antecedente inmediato de administración de un fármaco o exposición a un alérgeno. Sin embargo, cuando faltan las manifestaciones cutáneas, o se produce un colapso vascular aislado y no se puede obtener una historia, la anafilaxia se puede confundir con otras enfermedades que cursan con afectación cardiovascular o respiratoria. En la Tabla 4 se recoge el diagnóstico diferencial [29],[49] .

**Tabla 4. Adaptado de la Guía de Actuación en Anafilaxia [11]**

<b>Dignóstico diferencial de Anafilaxia</b>
<b>Urticaria/Angioedema:</b> urticaria idiopática, déficit C1 inhibidor, angioedema por IECA.
<b>Enfermedades que simulan edema de la vía respiratoria alta:</b> reacciones distónicas por metoclopramida, proclorperazina, antihistamínicos o reflujo esofágico agudo.
<b>Síndromes que cursan con eritema o “flushing”:</b> carcinoide, postmenopáusico, inducido por alcohol, carcinoma medular de tiroides, VIPomes, síndrome del hombre rojo.
<b>Síndromes neurológicos:</b> epilepsia, accidente cerebrovascular.
<b>Otras causas de shock:</b> séptico, cardiogénico, hemorrágico.
<b>Distrés respiratorio agudo:</b> asma, embolismo pulmonar agudo, crisis de pánico, globo histérico, laringoespasma, disfunción de cuerdas vocales.
<b>Miscelánea:</b> reacciones vasovagales, escombroidosis, síndrome del restaurante chino, sulfitos, enfermedad del suero, feocromocitoma, síndrome de hipermeabilidad capilar generalizado, hipotonía tras espasmo del sollozo, shock séptico del niño.

### **3.1.7 Tratamiento de la anafilaxia**

El éxito del tratamiento de una reacción anafiláctica depende de varios factores: el reconocimiento temprano de la anafilaxia, la preparación del personal que atiende al paciente y el tratamiento precoz y agresivo [1]. Los principios básicos de tratamiento son los mismos para todos los grupos de edad [50],[51].

#### **3.1.7.1 Requisitos mínimos de la atención a un paciente con sospecha de anafilaxia**

- Reconocimiento de su estado de gravedad.
- Solicitud temprana de ayuda.
- Tratamiento inicial basado en la aproximación ABCDE [51].
- Adrenalina cuando esté indicado.
- Estudio y seguimiento posterior por un alergólogo.

#### **3.1.7.2 Posición del paciente**

Los pacientes que han sufrido una anafilaxia se deben colocar en posición cómoda, tumbados, con las piernas elevadas para así aumentar el flujo sanguíneo. Deben evitarse cambios posturales, especialmente levantar al paciente o mantenerle en bipedestación, ya que puede empeorar el compromiso hemodinámico.

Esta posición no es aconsejable en caso de vómitos o dificultad respiratoria, donde los pacientes se deberán colocar en decúbito lateral. De la misma forma deberán colocarse los pacientes que estén inconscientes o las mujeres embarazadas para evitar compresión de la vena cava.

Se debe asegurar la permeabilidad de la vía respiratoria en todo momento.



### **3.1.7.3 Retirada del alérgeno**

Siempre que sea posible debe retirarse el alérgeno. Debe tenerse en cuenta:

- Suspender la administración de fármacos supuestamente responsables de la anafilaxia (Ej. Suspender la administración IV de un antibiótico o un analgésico).
- Retirar el aguijón tras picadura de abeja. En este caso prima la rapidez de la extracción sobre la forma de hacerlo [52].
- No intentar provocar el vómito en una anafilaxia producida por alimentos, pero si retirar restos alimentarios de la boca.
- Evitar productos de látex (guantes, sondas...) si se sospecha alergia al mismo.
- No retrasar el tratamiento definitivo si la evitación del alérgeno no es fácil.

### **3.1.7.4 Parada cardiorrespiratoria**

La anafilaxia es una causa infrecuente, pero potencialmente reversible, de parada cardiorrespiratoria. El tratamiento estará basado en un soporte vital básico y avanzado [53] .

Son signos y/o síntomas de alarma: la rápida progresión de los síntomas, el distrés respiratorio (sibilancias, ronquera, taquipnea, estridor, cianosis), los vómitos persistentes, la hipotensión, las arritmias, el síncope, el dolor torácico, la confusión, la somnolencia y el coma.

### 3.1.7.5 Fármacos y forma de administración

#### 3.1.7.5.1 Adrenalina

La adrenalina es el fármaco más eficaz para el tratamiento de la anafilaxia. Es capaz de prevenir o revertir el broncoespasmo y el colapso cardiovascular. Debe administrarse de forma precoz, ya que mejora la supervivencia [54], [55].

Presenta un inicio de acción rápida y una vida media corta con un estrecho margen terapéutico-tóxico. (Tabla 5 y 6).

**Tabla 5. Efectos terapéuticos de la adrenalina. Adaptado de [56].**

Frecuentes y transitorios (pueden aparecer con dosis terapéuticas)	Ansiedad, miedo, inquietud, mareos, cefalea, palpitaciones, palidez, temblor.
Raros (más frecuentes si sobredosis, uso concomitante otros fármacos, comorbilidad asociada)	Arritmias ventriculares, isquemia miocárdica, edema pulmonar, crisis de hipertensión, hemorragia intracraneal.

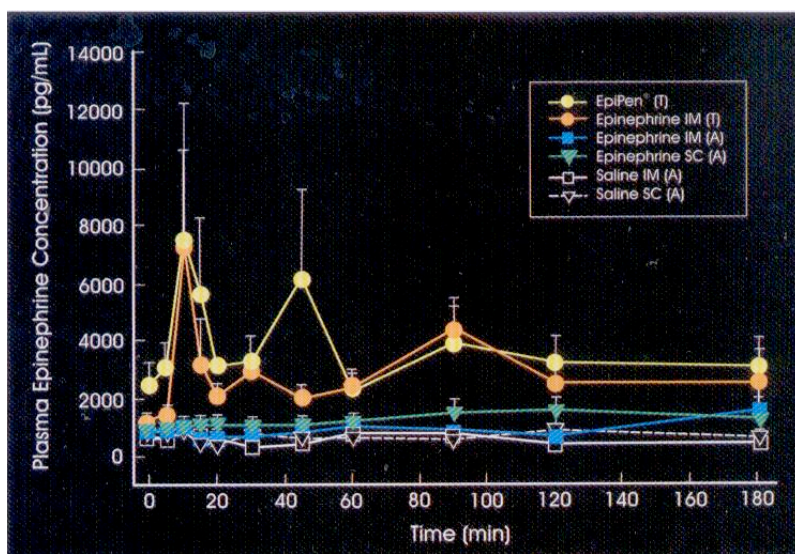
**Tabla 6. Efectos adversos de la adrenalina. Adaptado de [56].**

Agonista sobre receptores adrenérgicos	$\alpha 1$	Aumenta vasoconstricción y resistencia vascular periférica. Disminuye el edema mucoso.
Agonista sobre receptores adrenérgicos	$\beta 1$	Efecto inotropo y cronotropo positivo.
Agonistas sobre receptores adrenérgicos	$\beta 2$	Incrementa la broncodilatación. Disminuye liberación de mediadores de inflamación de mastocitos y basófilos.

La vía intramuscular (IM) es la vía de elección para administrar la adrenalina en el tratamiento inicial de la anafilaxia en cualquier situación. Se obtienen unas concentraciones plasmáticas más rápidas y

elevadas que por vía subcutánea (SC) [57]. Presenta un mayor margen de seguridad que la administración intravenosa (IV). Se debe monitorizar al paciente lo más precozmente posible (FC, TA, ECG, saturación de oxígeno). El mejor sitio de administración es la cara anterolateral del muslo (Figura 3).

La dosis recomendada para adultos (1mg=1ml de adrenalina en solución acuosa 1/1000) es de 0,3 a 0,5 mg en dosis única . Este tratamiento puede repetirse cada 5 a 15 minutos según la gravedad y tolerancia del paciente. En lactantes y niños, la dosis recomendada es 0.01 mg por kilogramo, máximo 0.3 mg, repitiéndose en 5 a 15 minutos en caso necesario.



**Figura 3. Concentraciones plasmáticas de adrenalina en función de la vía de administración y del lugar. Adaptado de [57].**

En amarillo, el autoinyector EpiPen intramuscular administrado en el muslo. En naranja la adrenalina intramuscular también administrada en el muslo. En azul, la adrenalina intramuscular en el brazo. En verde, la adrenalina subcutánea en brazo. En blanco, el suero salino intramuscular y subcutáneo en brazo.

No existen contraindicaciones absolutas en el uso de adrenalina y es el tratamiento de elección en situación de anafilaxia [56], [54].

Presentan mayor riesgo de efectos adversos los siguientes pacientes:

- Ancianos o pacientes con patologías asociadas (cardiopatía isquémica, arteriopatía periférica, HTA, hipertiroidismo, cirugía intracraneal reciente, aneurismo aórtico) [58].
- Pacientes en tratamiento con IMAO (bloquean el metabolismo de la adrenalina), antidepresivos tricíclicos (prolongan la vida media de la adrenalina), beta bloqueantes (respuesta parcial de la adrenalina), aminofilina, salbutamol IV u otros fármacos vasoconstrictores o arritmogénicos.
- Intoxicación por cocaína, anfetaminas.

En estos casos se debe monitorizar exhaustivamente al paciente y vigilar signos de toxicidad, utilizando la mínima dosis eficaz.

### **3.1.7.5.2 Broncodilatadores**

Los broncodilatadores beta-adrenérgicos deben utilizarse siempre que el paciente presente broncoespasmo durante una anafilaxia [59]. Además, están indicados en el tratamiento del broncoespasmo refractario a adrenalina.

### **3.1.7.5.3 Glucagón**

Los pacientes que reciban beta-bloqueantes pueden ser resistentes al tratamiento con adrenalina y desarrollar hipotensión refractaria y bradicardia prolongada. En estos casos el glucagón está indicado debido a que su acción, inotrópica y cronotrópica, no está mediada por los receptores

beta-adrenérgicos [60]. También se puede plantear su uso en pacientes cardiópatas.

#### **3.1.7.5.4 Atropina y fármacos vasopresores**

La atropina está indicada en caso de bradicardia prolongada. Se administra en dosis de 0,5-1 mg IV en bolo, pudiéndose repetir hasta dosis de 3 mg. En niños, la dosis es de 0.02 mg/Kg [61]. También estaría indicado el tratamiento adyuvante con dopamina, dobutamina, noradrenalina o vasopresina [62].

#### **3.1.7.5.5 Oxígeno**

Se debe usar de forma precoz, manteniendo una Saturación de O<sub>2</sub> > 95% Utilizar mascarillas tipo Venturi a alto flujo (FIO<sub>2</sub>50-100%, 10-15 l/min) para evitar el colapso de la vía respiratoria.

#### **3.1.7.5.6 Reposición de líquidos**

Todos los pacientes con reacción anafiláctica requieren la administración de fluidos de forma precoz [63]. Esto es debido al incremento de la permeabilidad vascular y a la gran extravasación de plasma al espacio intersticial.

#### **3.1.7.5.7 Antihistamínicos**

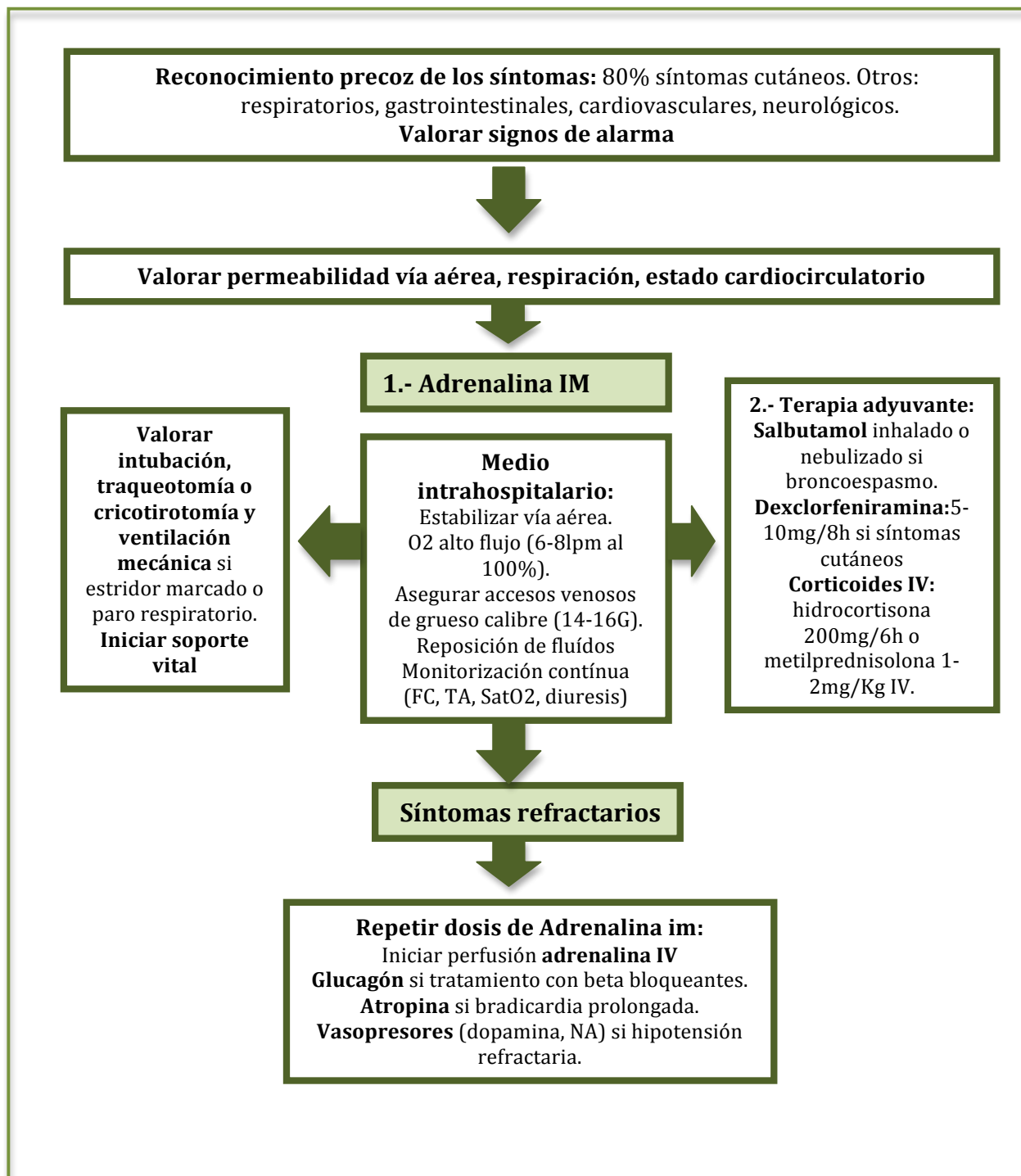
Los antihistamínicos constituyen la segunda línea de tratamiento de una reacción anafiláctica. Aunque son escasos los datos que demuestran su eficacia en la anafilaxia, son lógicas las razones. Los antihistamínicos pueden contribuir a tratar algunas acciones de la histamina en la reacción

anafiláctica [27], [64]. No son eficaces en aquellas reacciones debidas a otro tipo de mediadores, pero se trata de un grupo de fármacos de un buen perfil de seguridad. Su utilización aislada, es insuficiente como tratamiento aislado en una anafilaxia.

#### **3.1.7.5.8 Esteroides**

Los corticosteroides pueden ser útiles para prevenir o acortar reacciones prolongadas. En el caso de asma asociada, el tratamiento precoz con corticosteroides es beneficioso tanto en adultos como en niños [27], [65]. La utilización de glucocorticoides tiene una base empírica en el sentido de que pudieran prevenir la aparición de reacciones bifásicas, que podrían darse hasta en un 20% de los pacientes.

Algoritmo de actuación general en la anafilaxia. Adaptado de la "Guía de Actuación en Anafilaxia: GALAXIA" [11].



## **3.2 Sistema de contacto**

### **3.2.1 Definición**

El sistema de contacto es una cascada plasmática de proteasas, iniciada por el factor XII (FXII) de la coagulación que provoca una reacción proinflamatoria y procoagulante [66].

### **3.2.2 Componentes del sistema de contacto**

#### **3.2.2.1 Factor XII (FXII) o *Factor de Hageman*.**

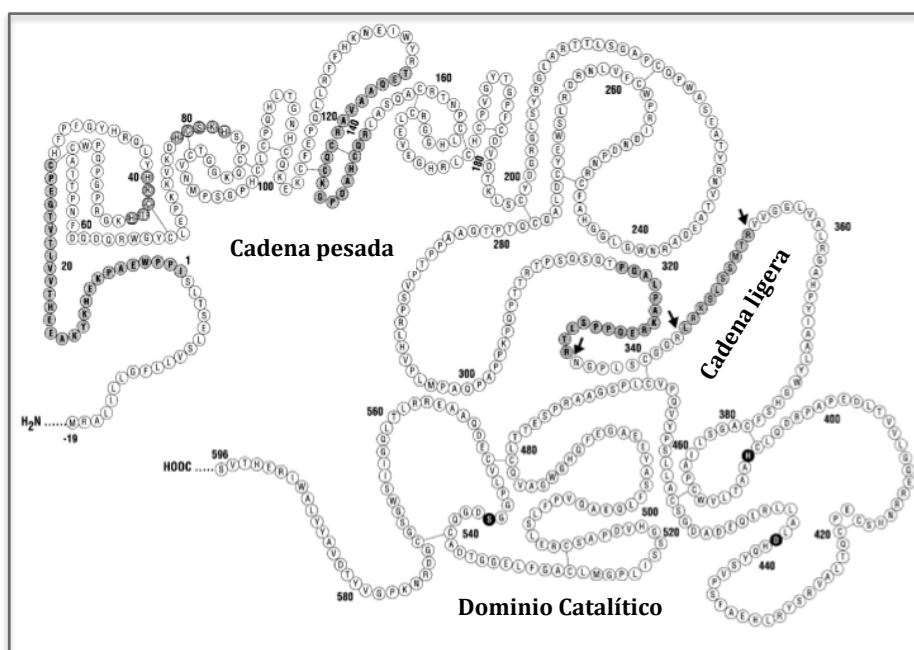
El FXII es producido por un único gen, en el hígado, situado en el cromosoma 5. Este gen tiene 12 kilobases (kb) y se compone de 13 intrones y de 14 exones. El FXII tiene múltiples dominios con una extensa región homóloga con el factor activador del plasminógeno tisular (tPA) y la fibronectina [67]. La concentración en plasma es de alrededor de 30 µg/ml (rango 15-47).

Después del contacto con superficies de carga negativa, el FXII es auto-activado. Hay evidencia de que la unión del FXII a la molécula de  $Zn^{2+}$  induce un cambio conformacional que hace que la proteína sea más susceptible a desarrollar una actividad enzimática cuando se asocia con superficies de carga negativa [68], [69], [70]. Finalmente, tanto la unión al  $Zn^{2+}$ , como la unión a superficies con carga negativa provocarán su autoactivación induciendo un cambio conformacional. Hay dos formas del FXII activado: el FXIIa, una proteína de 80 KDa que contiene dos cadenas



unidas por un puente disulfúrico y el FXII<sub>f</sub> (fragmentos del factor Hageman) de unos 28-30 KDa [71] (Figura 4). A su vez, otras proteasas plasmáticas, como la calicreína plasmática (PK) y la plasmina, activan el FXII, escindiéndolo en 2 cadenas, la pesada (de 353 residuos y con un peso de 50KDa) y la ligera (de 242 residuos con un peso de 30 KDa), que se unen mediante un puente disulfúrico. La cadena pesada es la que contiene dos regiones de unión a superficies artificiales [67].

El mayor inhibidor de las proteasas FXIIa y FXII<sub>f</sub> es el inhibidor del C1, que representa más del 90% de la inhibición en plasma y las inhibe de una forma irreversible. A su vez, el FXIIa también es inhibido (aunque en una proporción mucho menor) por la antitrombina III [72] y el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI) [73].



**Figura 4. Estructura del factor XII (adaptado de [67]).** La activación del factor XII (factorXIIa) resulta de la proteólisis en la región de la arginina 334, 343 y 353 (flechas). Los círculos grises representan el dominio de unión a superficies artificiales de la cadena pesada del Factor XII. Los círculos con líneas horizontales representan los dos dominios de unión al Zinc.

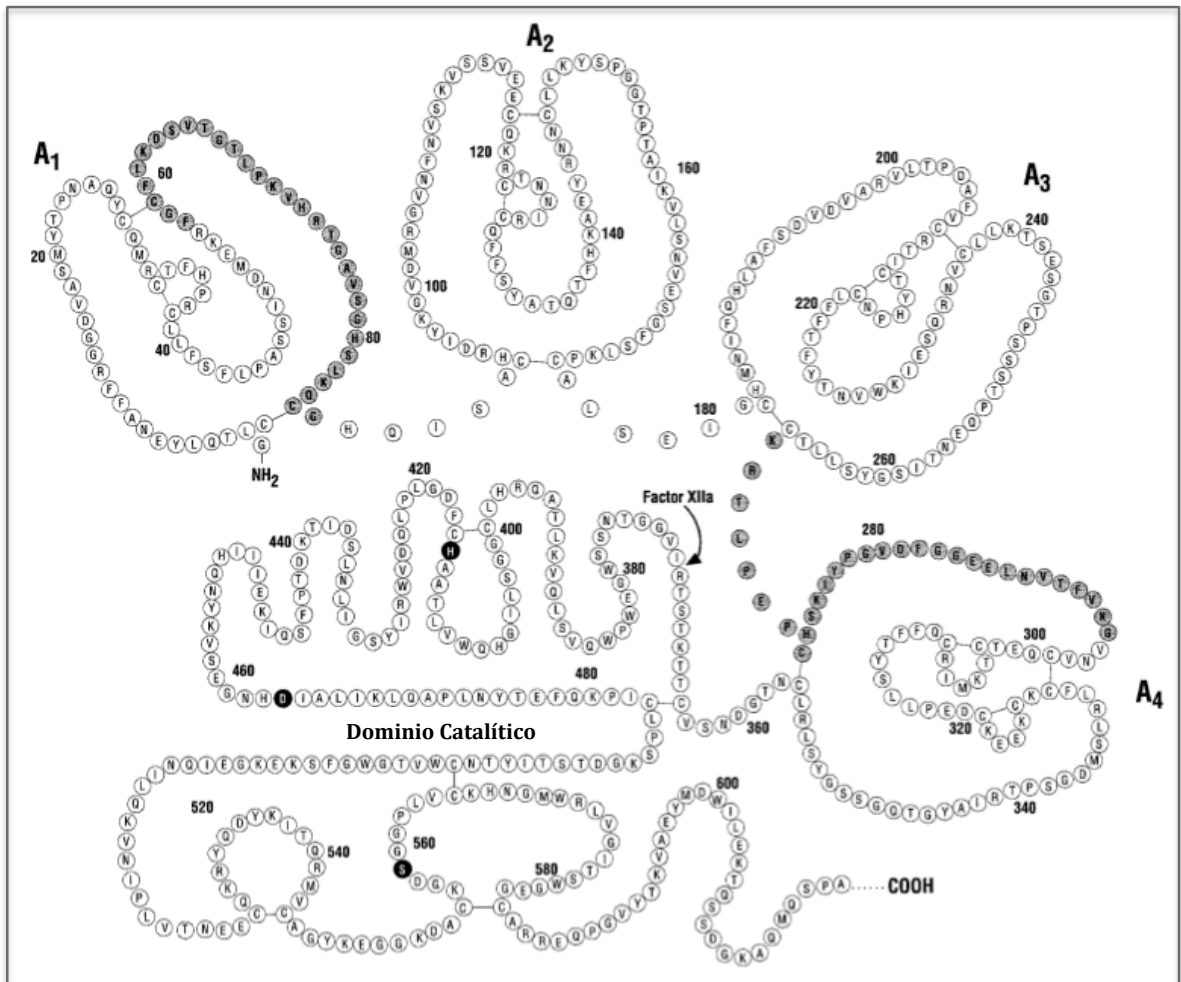
### 3.2.2.2 Precalicroeína plasmática o *Factor Fletcher* (PPK).

La PPK es producida por un único gen situado en el cromosoma 4. La estructura del gen de la PPK es similar al del FXI, con una homología del 58% en la secuencia de aminoácidos [74]. Está dividida en 2 partes: una cadena pesada de 371 aminoácidos y una de ligera de 248 aminoácidos, unidas por un puente disulfúrico (Figura 5). La PPK tiene cuatro grupos de 90 a 91 aminoácidos que se organizan en una estructura similar a una manzana y se denominan “dominios manzana” [75]. La misma estructura se ha descrito en el factor XI [76], sugiriendo una duplicación del gen ancestral tanto por la PPK como para el FXI.

En plasma, la PPK aparece como un doblete de 85 y 88 KDa, dependiendo de si la proteína está en condiciones de reducción. Su concentración es de alrededor de 35 a 50 µg/ml [75]. Parece que la síntesis es también hepática, de hecho en enfermedades hepáticas los niveles de PK disminuyen [77]. Cuando la PPK se activa a calicroeína plasmática (PK) por el FXIIa o el FXIIb, la proteína observada en un gel de electroforesis en condiciones de reducción con dodecil sulfato sódico (SDS) presenta dos subunidades: una cadena pesada de aproximadamente 52 KDa y 2 cadenas ligeras de 36 y 33 KDa. El lugar activo de la PK está en la cadena ligera (Figura 5). De hecho, si se incubaba con la propia PK se autodigiere en la parte de la cadena pesada en dos bandas de 33 y 22 KDa [78]. Éstas escisiones ocurren donde el tándem en la cadena pesada se va repitiendo y produce una proteína que cada vez escinde el cininógeno de

alto peso molecular (HK) más lentamente hasta fallar en la activación [75]. En ausencia de FXII, la PPK no se puede activar en una superficie artificial. Es por este motivo que a éste sistema se le denomina sistema de contacto.

Las proteasas que inhiben la activación de la PPK son: el inhibidor del C1, la alfa-2-macroglobulina [79] y la antitrombina III [80], aunque ésta última de una forma mucho más débil. El inhibidor de la proteína C también ha sido reconocido como un potente inhibidor de la PK [81].

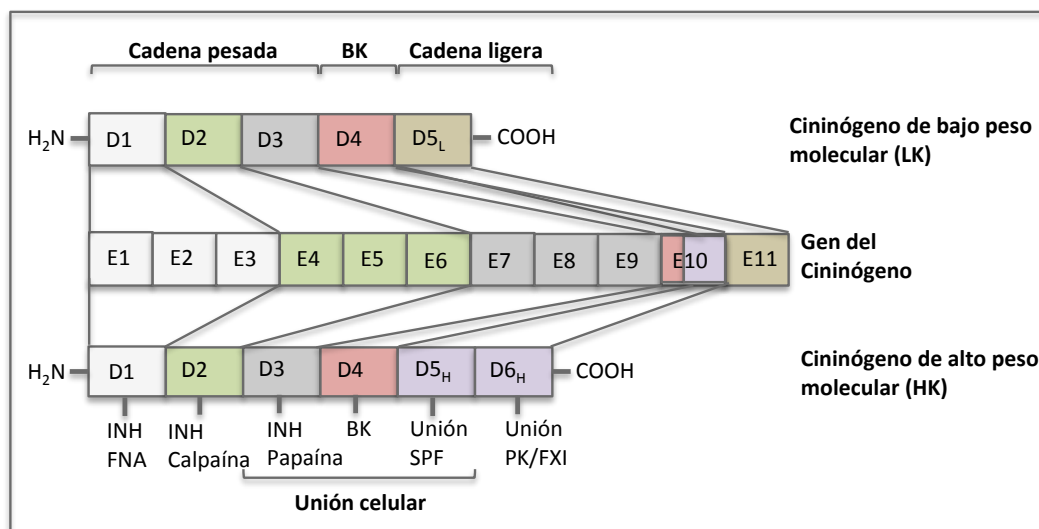


**Figura 5. Estructura de la precalicreína (adaptado de [82]).** Las letras A1, A2, A3, A4 representan los “dominios manzana” de la cadena pesada de la precalicreína. La flecha del Factor XIIa indica el aminoácido 371 (arginina) y representa el sitio de activación del FXIIa en la precalicreína. Los círculos negros (415, 464, 559) representan los dominios activos catalíticos. Los círculos grises representan las regiones implicadas en la unión del cininógeno de alto peso molecular.

Existe otra calicreína, la calicreína tisular (TK), que aunque tiene un nombre similar, no está relacionada ni estructuralmente ni por evolución [83]. La TK se activa a nivel tisular a partir de una proteasa, la precalicreína tisular (PTK), que provoca su proteólisis de una forma limitada. El enzima que activa la PTK todavía no se ha identificado [84]. El sustrato de la TK es el cininógeno de bajo peso molecular (LK) [83].

### **3.2.2.3 Cininógeno de alto peso molecular (HK) o *Factor Fitzgerald***

El HK es una proteína producida por un único gen en el cromosoma 3. Este gen es el mismo que codifica para el cininógeno de bajo peso molecular (LK). El gen consiste en 11 exones de 27 Kb que producen mRNA para HK y LK (Figura 6). El HK y el LK comparten la región de codificación de los nueve primeros exones y una parte del exón 10 que codifica para la bradicinina (BK). El resto del exón 10 codifica la secuencia entera de la cadena ligera del HK. Por otro lado, el exón 11 codifica la cadena ligera del LK [85]. El LK es una beta-globulina de unos 66 KDa con una concentración plasmática de 160 µg/ml y el HK es una alfa-globulina de unos 120 KDa con una concentración plasmática de 80 µg/ml [86]. Se sintetizan en el hígado. Las regiones de los cininógenos se dividen en varios dominios (Figura 6). Hay tres estructuras principales: la cadena pesada (D1-D3), la BK en HK (D4) y la Lys-BK en LK (D4) y la cadena ligera (D5<sub>L</sub> en el LK de 4 KDa y D5<sub>H</sub>-D6<sub>H</sub> en el HK de 56 KDa). Esta diferencia en los últimos dominios hace que el LK sea más corto (626 kilobases el HK versus 409 el LK).



**Figura 6. La estructura de los dominios del cininógeno (adaptado de [67]).** Los dos cininógenos son producidos por un único gen con 11 exones (E1-E11). Los exones E1-E3 codifican para el dominio 1 (D1) en los dos cininógenos (HK y LK). Parte del D1 inhibe el factor natriurético atrial (FNA). Los exones E4-E6 codifican para el dominio 2 (D2), que tiene una secuencia inhibitoria de la calpaína. Los exones E7-E9 codifican para el dominio 3 (D3), que tiene una secuencia inhibitoria de la papaína. El dominio 4 (D4) es codificado por una parte del exón E10. Éste dominio pertenece a la bradicinina (BK). La otra parte del exón E10 codifica por los dominios 5 y 6 (D5<sub>H</sub> y D6<sub>H</sub>) de la cadena ligera del cininógeno de alto peso molecular (HK). El dominio 5 (D5<sub>H</sub>) es una región de unión a superficies artificiales (SPF) y el dominio 6 (D6<sub>H</sub>) tiene la región de unión al factor XI (FXI) y a la calicreína plasmática (PK). Los dominios 3, 4, y 5 del HK también participan en la unión celular. El exón E11 codifica por el único dominio (D5<sub>L</sub>) de la cadena ligera del cininógeno de bajo peso molecular (LK).

La PK será la proteasa que escindirá el HK por la parte C-Terminal, por el sitio donde la Bk se une a la cadena ligera (Arg371-Ser372) [87], y generará 2 cadenas de HK, pero la BK seguirá unida a la cadena pesada del HK. Posteriormente, la PK producirá otra escisión en Lys362-Arg363, liberando la BK de la cadena pesada del HK [88].

La actividad procoagulante del HK depende de dos factores: 1) de la capacidad del HK para unirse a superficies aniónicas vía D5<sub>H</sub> y 2) de la capacidad del HK para unirse a la PPK y al FXI en el dominio 6 [89], [90].

La unión de la PPK al HK inicia una secuencia que conducirá a la activación de la PPK en la superficie de sustancias biológicas independiente de la activación del FXII (Figura 7).

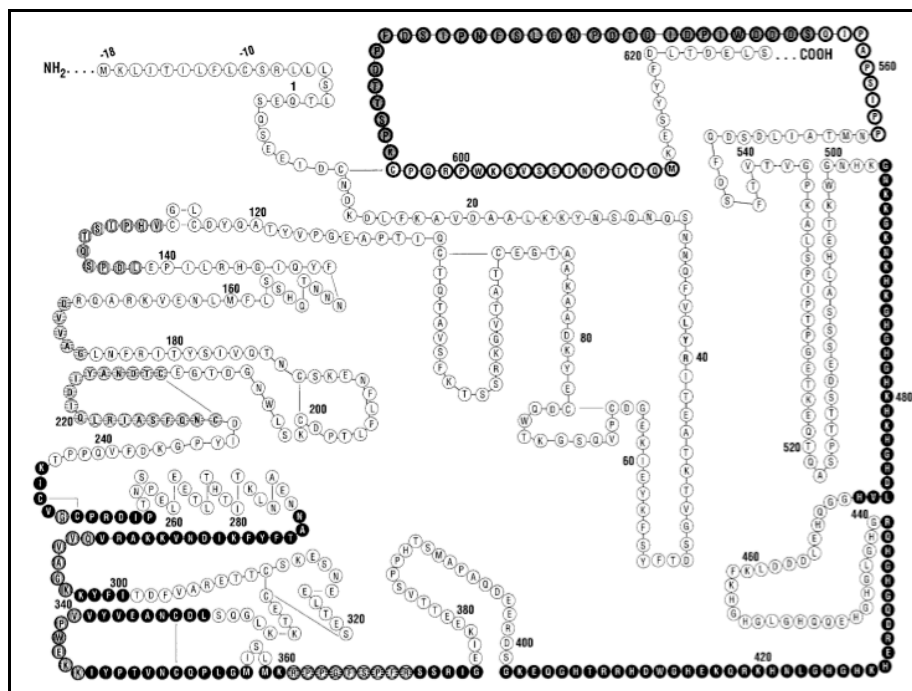


Figura 7. Estructura del cininógeno de alto peso molecular (HK). Adaptado de [67]. Los círculos con líneas delgadas verticales representan el dominio de la inhibición de la papaína. Los círculos con líneas delgadas horizontales representan el dominio de inhibición de la calpaína. Los círculos con líneas gruesas horizontales representan los nueve aminoácidos que forman la bradicinina (H363-R371). Los círculos negros representan los dominios de unión de las superficies celulares. El círculo remarcado negro y blanco en el interior representa el dominio de unión del factor XI (P556-M613). El círculo gris representa el dominio de unión de la PK (S565-K595). Del aminoácido A361-A370 a forman el dominio 4 del HK que corresponde a la bradicinina.

### 3.2.2.4 Cininas

Las cininas son hormonas peptídicas de vida media muy corta y que inducen varios efectos inflamatorios y fisiológicos. Constituyen una familia de péptidos vasoactivos que incluye la bradicinina (BK), la calidina (Lys-BK) y sus productos de degradación respectivamente.

La bradicinina es un nonapéptido (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) de bajo peso molecular (1060.21 Da:  $C_{50}H_{73}N_{15}O_{11}$ ), que se forma a partir de la escisión del HK mediante la PK y produciendo su liberación (Figura 7). Contrariamente, la generación del decapeptido de calidina (que contiene un

residuo más que la BK, una lisina en el extremo N-terminal) es constitutiva y se produce por la escisión del LK mediante la TK. *In vitro*, la calidina se puede convertir rápidamente en BK mediante la aminopeptidasa, que escinde el residuo de lisina en la parte N-terminal, tal y como se muestra en la figura 8. La calidina contribuye a mantener la homeostasis de la presión arterial, por eso en ratones deficientes de TK, tienen niveles altos de presión arterial sistólica [91].

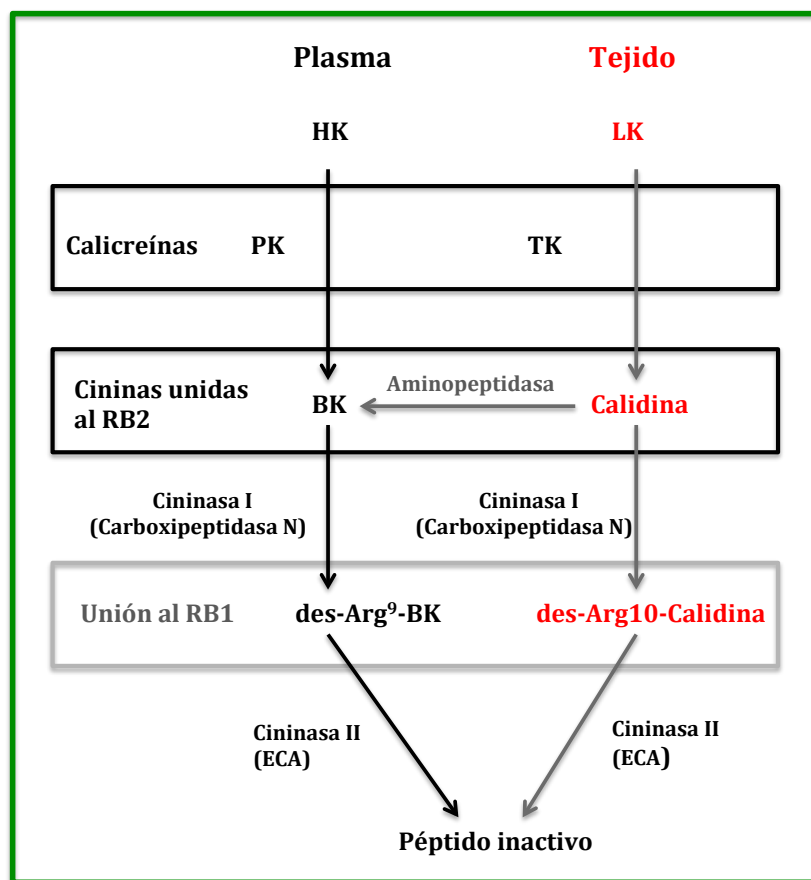


Figura 8. Esquema superficial de la formación de las cininas, unión a sus receptores y degradación, tanto en plasma como en tejido.

La BK y la calidina formada que se una al receptor 2 (RBK2), es la que ejercerá su función. Pero las cininas son rápidamente metabolizadas por las cininasas endógenas. Una de las cininasas más importantes es la cininasa I o

carboxipeptidasa N, que escinde el residuo de arginina de la parte C-Terminal, tanto de la BK como de la calidina. El péptido resultante es la des-Arg<sup>9</sup>-BK y la des-Arg<sup>10</sup>-calidina, respectivamente, que ya no se podrá unir al RBK2. De todas formas, estas dos moléculas se pueden unir al receptor 1 y también producir aumento de la permeabilidad vascular parecido al receptor 2 [92].

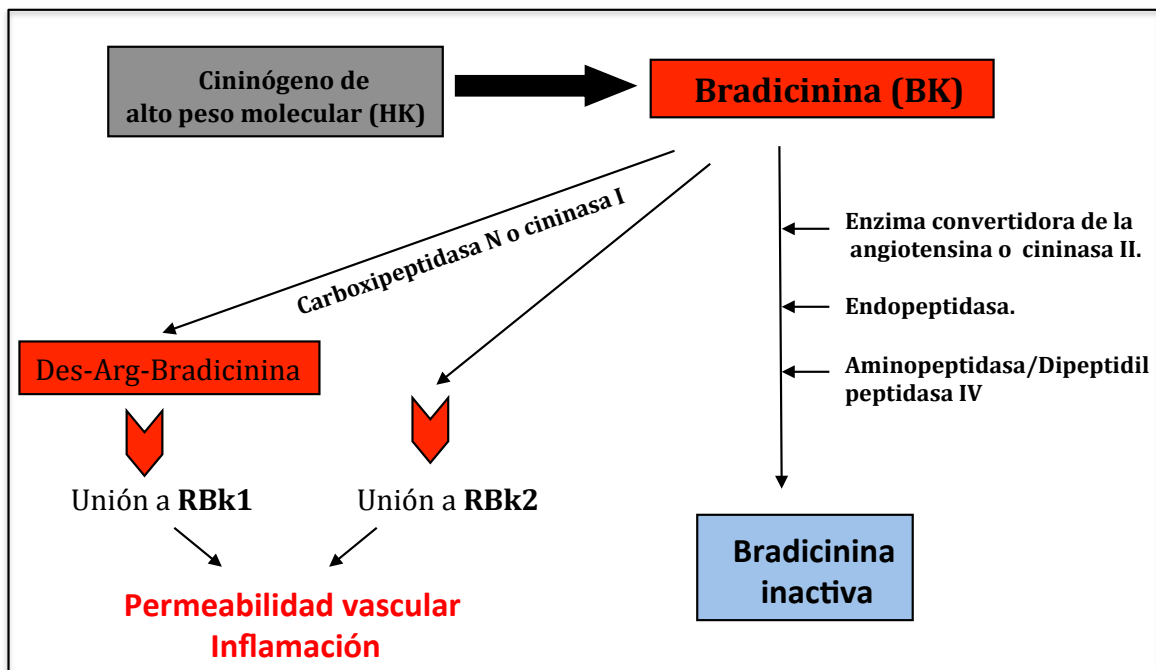
La BK y la calidina que no se une al receptor 2, es rápidamente metabolizada por metaloproteasas endógenas. De hecho, la BK tiene una vida media muy corta, de aproximadamente unos 15 segundos, y los niveles circulantes son extremadamente bajos [93], [94], [95]. De las proteasas encargadas de su degradación, la más importante es la cininasa II o enzima convertidor de angiotensina (ECA). Aunque otras enzimas, como la endopeptidasa neutral (NEP o neprilisina), dipeptidil peptidasa IV y la aminopeptidasa P también ayudan a su degradación. En la figura 9 se muestra el metabolismo de la bradicinina.

### **3.2.2.5 Receptores de las cininas**

La bradicinina, igual que la calidina, para ejercer su función deberá unirse a sus receptores. Existen actualmente 2 receptores de la bradicinina [96]. El receptor 1 (RBK1), que es inducible, y que se expresa en la superficie celular en condiciones de inflamación, cuando hay aumento de TGF-beta e IL-1, y su papel fisiopatológico no está del todo claro. Los principales agonistas de éste receptor son la des-Arg<sup>9</sup>-BK y la des-Arg<sup>10</sup>-Calidina[92]. El receptor 2 (RBK2), que es constitutivo, es el que más se conoce actualmente y es el causante de que cuando la BK y/o la calidina se unen a él produzca aumento de la permeabilidad vascular e inflamación (Figura 8). De hecho, existen fármacos



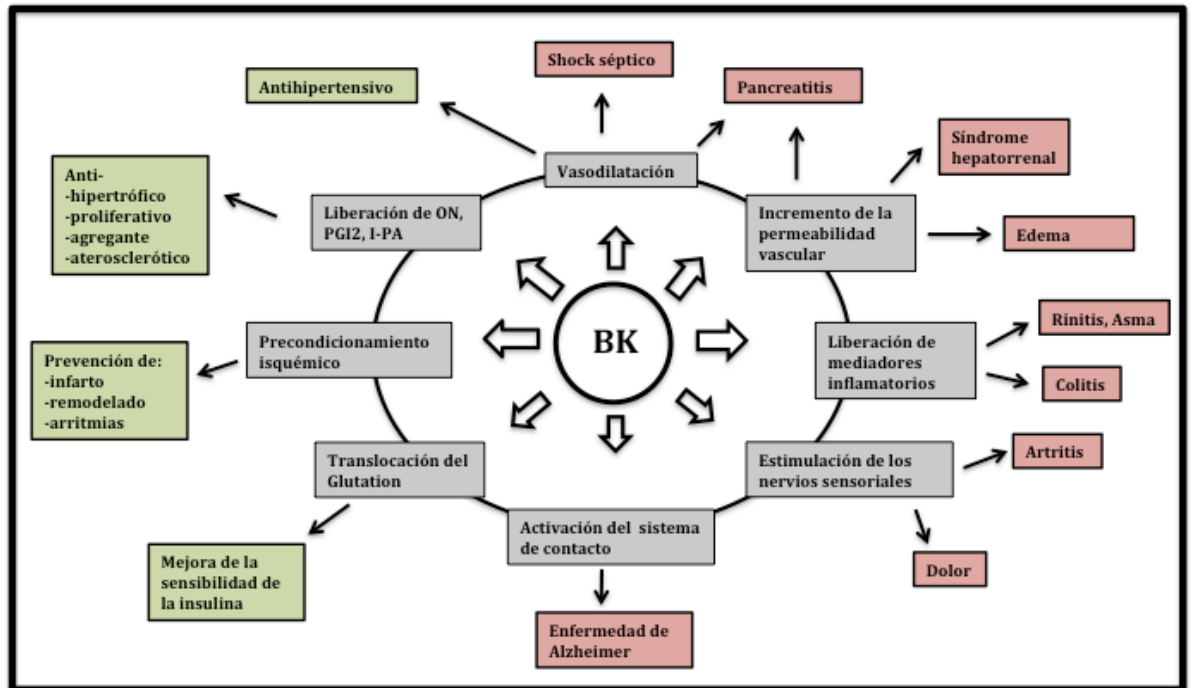
que inhiben el RBK2 y que han demostrado, en enfermedades como el angioedema hereditario (AEH) [97], que en brotes de angioedema inhibiendo el RBK2 se autolimita la permeabilidad vascular. El patrón de activación a través de la movilización de  $Ca^{2+}$  de los dos receptores es distinto, por lo que esto podría explicar sus distintos papeles fisiopatológicos [96].



**Figura 9. Metabolismo de la Bradiginina (BK).** La BK se degrada mediante el enzima convertidor de la angiotensina (ECA) o cininasa II, la endopeptidasa y la aminopeptidasa/dipeptidil peptidasa IV convirtiéndose en BK inactiva. A su vez la carboxipeptidasa N o cininasa I metaboliza la BK en Des-Arg-bradiginina que es también un metabolito activo y que ejercerá su función si se une al receptor 1 de la BK (RBK1), que es inducible. Por otra parte, la BK no metabolizada se unirá al receptor 2 (RBK2), constitutivo, y ejercerá su acción.

Cada vez son más las enfermedades descritas por un aumento de la BK y por consecuente por su unión a sus receptores [95].

Los efectos de la bradiginina, tanto fisiológicos como patológicos están resumidos en la figura 10.



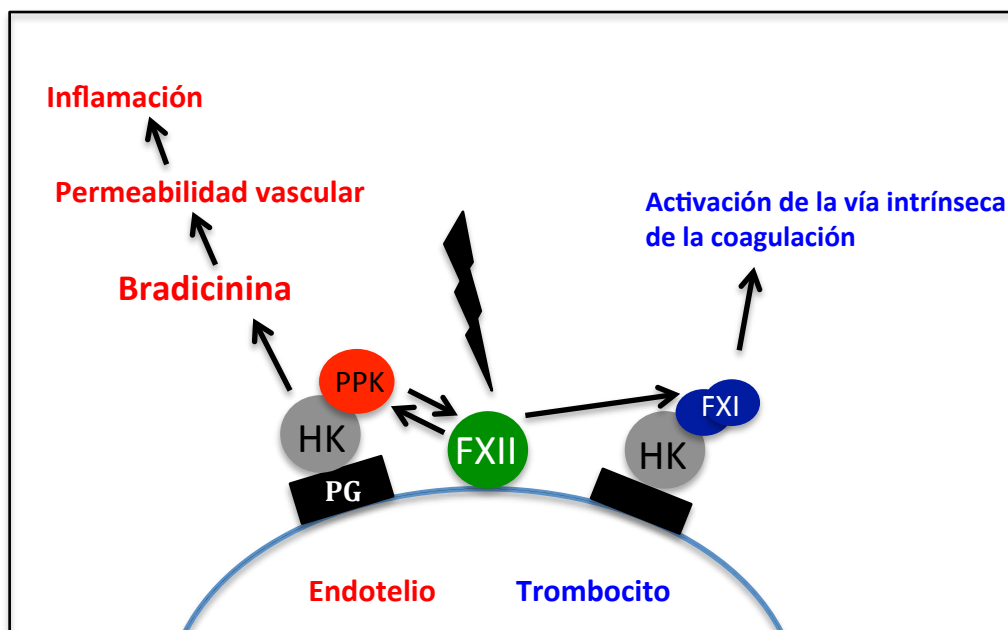
**Figura 10. Efectos de la bradicinina (BK) en diferentes estados fisiopatológicos. Adaptado de [95].** Los cuadros grises representan las acciones fisiológicas de la bradicinina, en rojo los estados fisiopatológicos que provocan sus acciones y en verde sus estados beneficiosos que también provocan sus acciones.

### 3.2.3 Fisiología

#### 3.2.3.1 Activación del sistema de contacto. ¿Cómo se forma la bradicinina?

La cascada de formación de la BK es iniciada por la activación del complejo del cininógeno de alto peso molecular (HK), la precalicreína y el FXII al unirse éste último a cargas negativas. Esto produce una autoactivación del FXII, que se convierte en FXII activado (FXIIa), quien convierte el proenzima precalicreína (PPK) en calicreína plasmática (PK); luego el HK es escindido por la calicreína plasmática y se libera bradicinina (Figura 11). Cabe destacar, que una modesta autoactivación del FXII puede

promover a una exponencial formación de calicreína [84], [98]. A su vez, el FXII también activa a su sustrato, el FXI, quien activará la vía intrínseca de la coagulación para formar, como objetivo final, fibrina.



**Figura 11.** La activación del factor XII (FXII) de la coagulación conduce a una activación del sistema de contacto. Moléculas con cargas negativas en la superficie como los polifosfatos derivados de las plaquetas (representados con una flecha negra), activan el FXII de las células endoteliales e inician una cascada proinflamatoria y procoagulante. El FXII activa su sustrato, el FXI, conduciendo a la formación de fibrina a través de la vía intrínseca de la coagulación. Alternativamente, el FXII inicia la formación de bradicinina (BK), a través de la activación de la calicreína plasmática que provocará la escisión del cininógeno de alto peso molecular (HK) de la superficie del endotelio de los proteoglicanos (PG) y por lo tanto se producirá la liberación de la bradicinina. Este nonapéptido, BK, es un mediador inflamatorio y aumentará la permeabilidad vascular. (Adaptada de [66]).

### 3.2.3.2 Activadores del sistema de contacto.

Por su carga negativa existen numerosos activadores fisiológicos y no fisiológicos del sistema de contacto. En la tabla 7 se enumeran los activadores más importantes [99], [100].

**Tabla 7. Activadores del sistema de contacto**

<b>Activadores no fisiológicos</b>	<b>Activadores fisiológicos</b>
Cristal	DNA/RNA
Caolín	Sulfátidos/Micelas
Sílice	Cristales de urea
Polietileno	Colágeno
Dextrán sulfato	Glicosaminoglicanos
Silicona	Ácidos grasos
Ácido elágico	Endotoxinas
	Protoporfirinas
	Hematina
	Lipopolisacáridos
	Proteínas fibrosas de la superficie bacteriana
	Condroitín sulfato
	Polifosfatos
	Heparina
	Proteínas desdobladas

## 3.3 Hemostasia

### 3.3.1 Definición

La hemostasia espontánea o natural puede ser definida como el conjunto de procesos biológicos que tienen como finalidad conseguir la fluidez de la sangre y la integridad de los vasos, evitando la pérdida sanguínea a través de posibles defectos vasculares. Para conseguir una correcta hemostasia vascular tienen que haber unas complejas interacciones entre la **pared vascular, las plaquetas y las proteínas plasmáticas** implicadas en la coagulación [101].

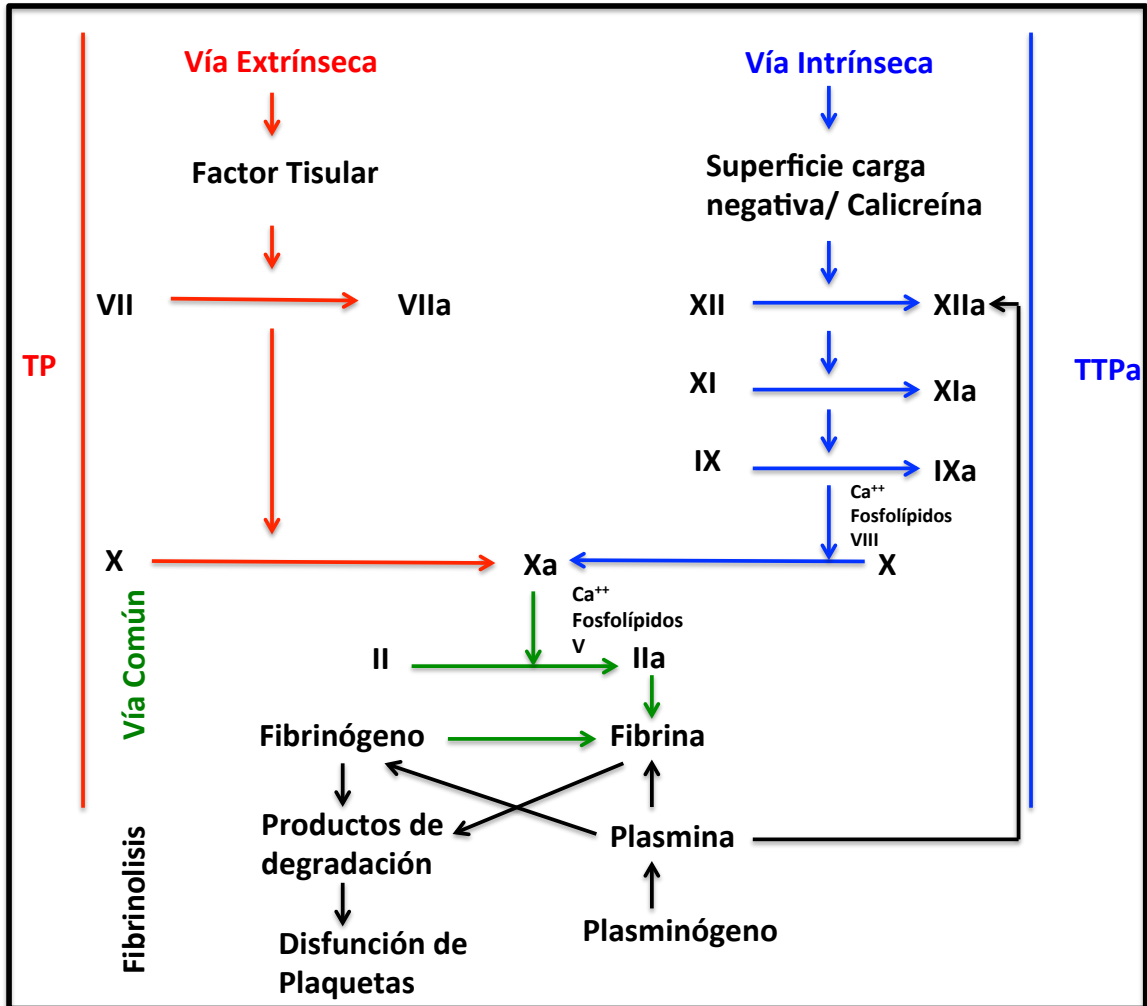
Ante una lesión vascular, la hemostasia se activa para poder detener la hemorragia. Este proceso está constituido por tres fases: **una fase vascular**, en la que hay una respuesta de vasoconstricción, y en la que a parte de disminuir la pérdida de sangre, inicia la **segunda fase, la fase plaquetaria o hemostasia primaria**, facilitando la adhesión de las plaquetas. En esta segunda fase se realiza la constitución del trombo o clavo plaquetario. Esta fase, es llevada a cabo por la acción del factor de von Willebrand (FvW), glucoproteína adhesiva, que será la responsable de favorecer la adhesividad de las plaquetas al endotelio gracias a la fijación a los receptores de la membrana plaquetaria de la glucoproteína Ib (GpIb) provocando un cambio conformacional de éstas y consecuentemente la liberación de factores para **la tercera fase, la de formación del coágulo o hemostasia secundaria**, e incluso se producirán una liberación de mediadores para aumentar la acción de la primera fase (serotonina como acción vasoconstrictora) [102]. En la tercera fase hay una activación del sistema de coagulación, que se explicará a

continuación. Una vez se ha producido el coágulo, se debe poner en marcha la cuarta fase, el proceso de fibrinólisis, que eliminará el coágulo.

Este sistema tiene mecanismos de seguridad: 1) cada componente es inactivo y se tiene que activar, 2) la mayoría de los componentes forman complejos con la superficie de las membranas que están localizados sólo en la región del vaso lesionado y, finalmente, 3) existen los inhibidores del proceso para evitar una activación de la coagulación y fibrinólisis más allá de la lesión [101].

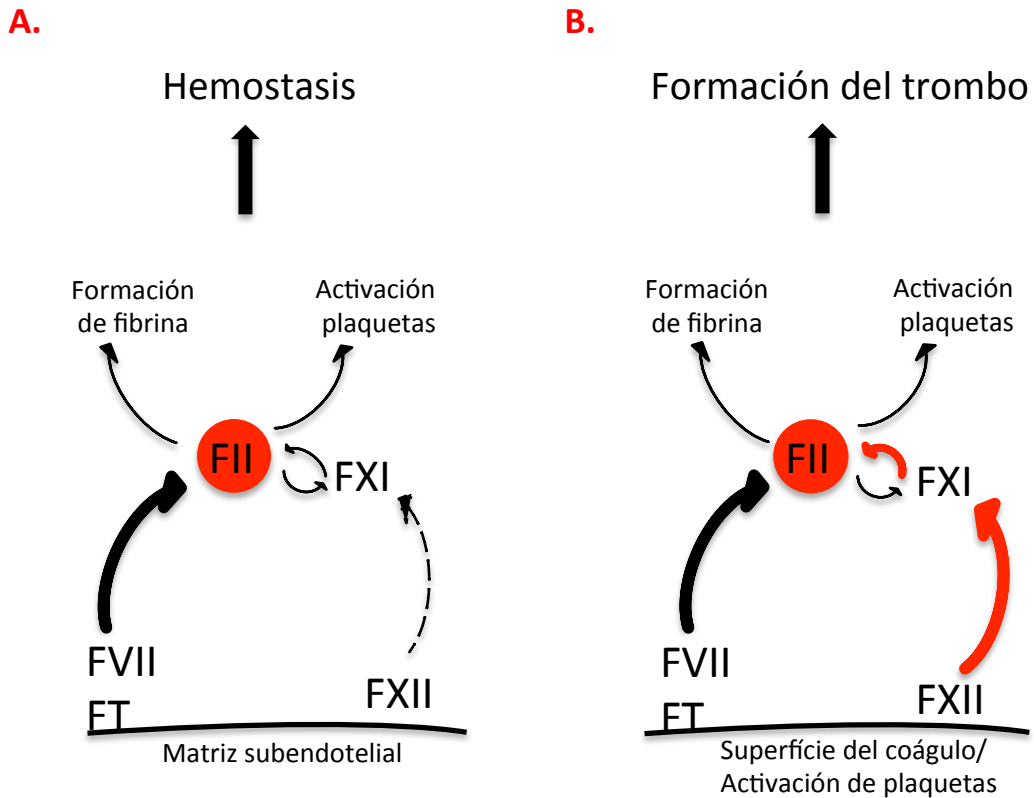
### 3.3.2 Sistema de la coagulación

La cascada de la coagulación comprende dos vías: **la vía extrínseca**, que ocurre cuando hay una lesión vascular. Después de una lesión vascular se produce el contacto de la sangre circulante con el subendotelio, lo que favorece la unión del factor tisular (FT o factor III) circulante con el FVII y su posterior activación. El complejo FT/FVIIa activa al factor X. En éste momento, en la activación del factor X a Xa, convergen las dos vías. Por otro lado, **la vía intrínseca**, se inicia cuando el FXII entra en contacto con la superficie del coágulo (con iones de calcio y fosfolípidos secretados por las plaquetas) y con superficies expuestas a cargas negativas y se activa y por ende, el FXII activa al PK y éste al HK (explicado en apartado anterior). A esta fase se la denomina fase de contacto. No obstante, la vía intrínseca requiere de otros factores de coagulación como VIII, IX, XI. La fase final de la vía intrínseca también resulta de la activación del factor X donde converge con la extrínseca [99], tal y como se muestra en la figura 12.



**Figura 12.** Un esquema de las dos vías de la coagulación. En rojo, la vía extrínseca y en azul la vía intrínseca. En verde la parte común de las dos. TP: tiempo de protrombina que sirve para medir la vía extrínseca y TTPa es el tiempo de tromboplastina parcial activada que sirve para medir la vía intrínseca.

Sin embargo, estas dos vías no operan de forma independiente, ya que el complejo FT/VIIa no sólo activa el factor X, sino también el factor IX. De allí que se dice que la vía extrínseca tiene una mayor importancia in vivo en el mantenimiento de la hemostasia (Figura 13) [103].



**Figura 13.** Una revisión del modelo de formación del trombo. (A) La formación de trombina (FII) en el lugar de la lesión es predominantemente llevada a cabo por el Factor tisular (FT) expuesto a la matriz subendotelial. El FT junto con el FVII inicia la formación del trombo. La contribución del factor XII (FXII) en la hemostasia es menor, (A). Una actividad adicional de formación de fibrina es necesaria para la formación del trombo. La activación del FXII en la superficie del coágulo en crecimiento contribuye a la generación del trombo y una activación adicional de las plaquetas, propagando el crecimiento del trombo (B) (figura adaptada de [103]).

De hecho, las dos vías convergen en la activación del factor X a Xa. El factor Xa hidroliza y activa la protrombina a trombina. La trombina puede por ende activar los factores XI, VIII, V por lo que ayuda a que proceda la cascada. Básicamente, el papel de la trombina es convertir el fibrinógeno a fibrina y activar el factor XIII a XIIIa. El factor XIIIa se une a polímeros de fibrina y así solidifica el coágulo (Figura 12)[104].



### 3.3.3 Sistema fibrinolítico

Una vez formado el coágulo, tiene lugar **la fibrinólisis**, que es el sistema encargado de la degradación de la fibrina, y es necesario para prevenir la coagulación de la sangre intravascular lejos de la zona lesionada y para disolver el coágulo una vez cumpla su función hemostática. En este sistema participa la plasmina, producida a partir de un precursor inactivo, el plasminógeno por la acción del activador tisular (t-PA) y activador tipo uroquinasa (u-PA) [105]. Los sistemas formadores y de degradación de fibrina están íntimamente relacionados: la activación del sistema formador de fibrina activa también el sistema fibrinolítico (Figura 11).

El sistema de la coagulación debe estar regulado para mantener la hemostasia, y evitar la generación de excesivas cantidades de trombina. Ello se lleva a cabo por la acción de sistemas anticoagulantes naturales, presentes en el endotelio vascular, en el que los más importantes son el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), la antitrombina y el sistema de la proteína C [106]. El TFPI impide la coagulación inicial, la antitrombina inhibe la trombina y otros factores de la coagulación como el FXa y FIXa. Por último, el sistema de proteína C, en colaboración con la proteína S, inhiben los factores V y VIII y disminuye la generación de trombina, además de poseer otras propiedades anticoagulantes y antiinflamatorias [106].

### 3.3.4 Componentes del sistema de la coagulación

Los factores de la coagulación, así como su nombre común y la vía de la coagulación en la que están implicados están resumidos en la tabla 8 .

**Tabla 8. Factores de la coagulación (Adaptado de [102]).**

<b>Factor</b>	<b>Nombre(s) Común (es)</b>	<b>Vía</b>
<b>I</b>	Fibrinógeno	Ambas
<b>II</b>	Protrombina	Ambas
<b>III</b>	Factor tisular	Extrínseca
<b>IV</b>	Calcio	Ambas
<b>V</b>	Proacelerina, factor lábil	Ambas
<b>VI</b>	Acelerina	Ambas
<b>VII</b>	Proconvertina, factor estable	Extrínseca
<b>VIII</b>	Factor antihemofílico A	Intrínseca
<b>IX</b>	Factor antihemofílico B, factor de Christmas	Intrínseca
<b>X</b>	Factor Stuart-Prower	Ambas
<b>XI</b>	Precursor de la tromboplastina plasmática, factor antihemofílico C	Intrínseca
<b>XII</b>	Factor Hageman	Intrínseca
<b>XIII</b>	Factor estabilizante de la fibrina, fibrinolisasa	Ambas

### 3.3.5 Pruebas de laboratorio para estudiar la hemostasia

#### 3.3.5.1 Tiempo de sangrado

Valora la hemostasia primaria, es decir, el vaso sanguíneo, las plaquetas y el factor von Willebrand; esta prueba desde su inicio nos orienta acerca de si existe algún defecto en los mecanismos que intervienen en la formación del tapón plaquetario. El método más recomendable es el Ivy que consiste en realizar una punción en el antebrazo con un bisturí a una profundidad de 1 mm,

sometiendo el brazo a una presión arterial media de 40mmHg con el esfigmomanómetro y medir el tiempo que dura el sangrado [107].

Los límites de referencia normal fluctúan entre 3 a 9 minutos[107].

### **3.3.5.2 Tiempo de Protrombina (TP)**

Esta prueba valora la llamada vía extrínseca de la coagulación, es decir el factor VII; además también valora la vía común, factor X, IX, V, II, I y la formación del coágulo. La tromboplastina tisular y el calcio se añaden al plasma. El tiempo normal de coagulación es de 10 a 14 segundos [108].

El aumento en el TP puede deberse a: deficiencia de vitamina K, terapia con cumarínicos (warfarina), deficiencia del factor VII, deficiencia del factor X, deficiencia del factor II (protrombina), deficiencia del factor V y deficiencia del factor I (fibrinógeno) [108].

### **3.3.5.3 Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (TTpa)**

Determina los factores del sistema intrínseco: VIII, IX, XI y XII además de los factores comunes de ambos sistemas.

Tres sustancias, fosfolípidos sintéticos (cefalina), un activador de superficie y el calcio, se añaden al plasma. El tiempo normal de coagulación es de aproximadamente 25 a 46 segundos [109].

Un resultado del TTpa anormal (demasiado prolongado) puede deberse a: deficiencia del factor XII, hemofilia A, hemofilia B, hipofibrinogenemia, anticoagulantes lúpicos, malabsorción, deficiencia de vitamina K o enfermedad de von Willebrand [110].

#### **3.3.5.4 Anti-Xa**

Esta prueba mide el factor anti-Xa en sangre. La cantidad de factor Xa en la sangre disminuye en función de los niveles de heparina, es decir, a mayores niveles de heparina en sangre, mayor inhibición del FXa. Por dicho motivo, esta prueba se usa para monitorizar los niveles de heparina en pacientes que están con éste tratamiento [111].

#### **3.3.5.5 Tiempo de trombina (TT)**

Esta prueba mide el tiempo necesario para que el plasma coagule cuando se le añade trombina. Normalmente el coágulo se forma con rapidez, si no lo hace, significa que existe una deficiencia de fibrinógeno [112].

El TT mide formación de fibrina inducida por trombina y la agregación de fibrina.

El TT es una pruebas de screening para diagnosticar los defectos en la formación de fibrina. Depende de la calidad y cantidad del fibrinógeno de la muestra.

Es sensible a la presencia de heparina.

Su tiempo de coagulación oscila entre 10 y 12 segundos [112].

### **3.4 Relación entre los mediadores mastocitarios y la activación del sistema de contacto.**

Hay muy pocos estudios que evalúen la relación entre los mediadores mastocitarios y el sistema de contacto en humanos, porque es extremadamente difícil medir la bradicinina de forma directa, por su vida media cortísima y sus bajas concentraciones. La forma para evaluar una activación del sistema de contacto es mediante métodos de inmunodetección, objetivando la escisión del HK (que de forma indirecta indica la formación de BK) [95].

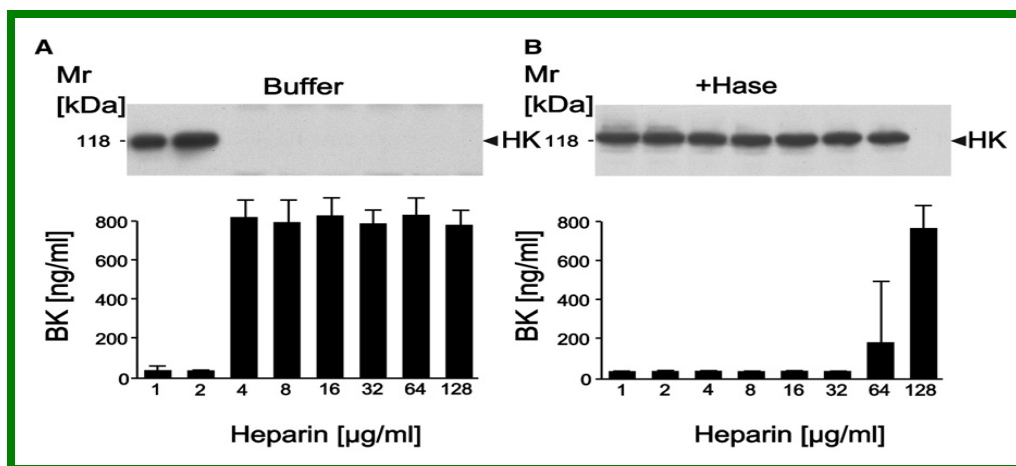
Se ha descrito la posible implicación del sistema de contacto en la fisiopatología de enfermedades alérgicas en algunos estudios. En el estudio de Lötvall y colaboradores [113], usando un modelo animal con cobayas, objetivaron que después de la inhalación de bradicinina a nivel pulmonar, los niveles de exudación plasmática aumentaban progresivamente dependiendo de la dosis de BK y además se producían cambios a nivel de la función pulmonar. En otro estudio, Proud y colaboradores [114], también demostraron la implicación de la Bk en los síntomas nasales. Teniendo en cuenta que en la rinitis alérgica, existe una activación de los mastocitos con liberación de sus mediadores inflamatorios y que en la nariz existen receptores B1 y B2 de la BK y dado que es un lugar accesible, en este mismo estudio [114], pudieron objetivar que después de la insuflación de BK nasal se reproducían los síntomas de rinitis alérgica mucho más que con histamina. No obstante, en anafilaxia no hay prácticamente ningún estudio, a excepción del trabajo de Van der Linden y colaboradores [115], en el cual evaluaron la activación del sistema de contacto después de la picadura de abejas en pacientes alérgicos.

Objetivaron una activación del sistema de contacto en 7 de los 12 pacientes y en ninguno de los controles. Sin embargo, la mayoría de los pacientes incluidos sólo habían presentado urticaria y el mecanismo por el que el sistema de contacto se activó no fue estudiado.

Recientemente en un modelo murino de anafilaxia se ha demostrado el posible papel de la heparina liberada por el mastocito en la activación del sistema de contacto [116].

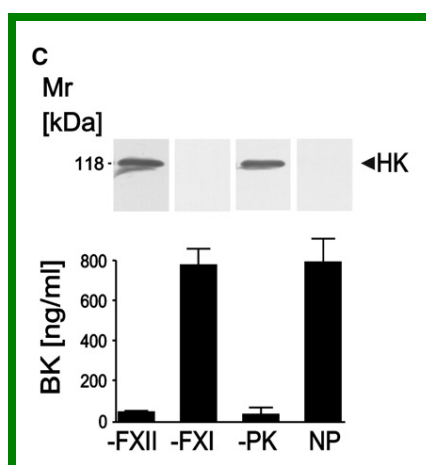
#### **3.4.1 La heparina mastocitaria activa el sistema de contacto.**

En un modelo murino descrito recientemente [116] se ha demostrado que la heparina derivada de los mastocitos es capaz de activar el sistema de contacto. Oschartz y colaboradores [116], aislaron heparina de alto peso molecular (500-750KDa) de los mastocitos peritoneales de ratas y analizaron la potencia de estos glicosaminoglicanos para formar BK. Posteriormente se incubaron cantidades crecientes de heparina con plasma humano y se analizó la capacidad de escindir el HK y por tanto de formar BK mediante inmunodetección y ELISA. Como control, los glicosaminoglicanos de los mastocitos fueron incubados previamente con heparinasa y posteriormente con plasma humano. Este enzima digiere específicamente la heparina y tal y como se muestra en la figura 14, inhibe la formación de bradicinina [116].



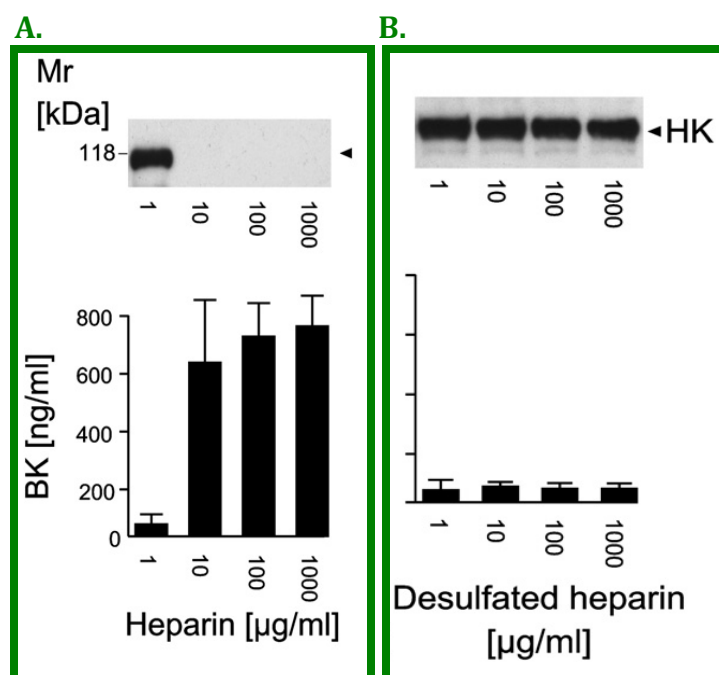
**Figura 14. La heparina de los mastocitos inicia la formación de BK mediante la activación del sistema de contacto.** El plasma humano fue incubado a 37° con heparina derivada de los mastocitos y se analizó la integridad de la molécula de HK (118KDa) por inmunodetección y la formación de BK por ELISA. (A) Una concentración de glicosaminoglicanos (heparina) de más de 4 µg/ml inicia la escisión del HK en plasma y por ende la formación de BK. (B) Incubación del plasma con heparinasas con la consecuencia de la abolición de la formación de BK. Imagen reproducida con el permiso de Thomas Renné [116].

Además, se demostró que la activación del sistema de contacto por parte de la heparina era a partir de la activación del FXII y de la PK, dado que como se puede observar en la figura 15, en plasma humano deficiente de FXII o PK la heparina es incapaz de iniciar la escisión del HK.



**Figura 15. La heparina de los mastocitos inicia la formación de BK mediante la activación del sistema de contacto.** (C) La incubación de 20 µg/ml de heparina derivada de los mastocitos durante 30 minutos con plasma deficiente de FXII, FXI, PK y plasma normal (NP), permite observar que la formación de BK queda abolida en plasma deficiente de FXII o de PK. Imagen reproducida con el permiso de Thomas Renné [116].

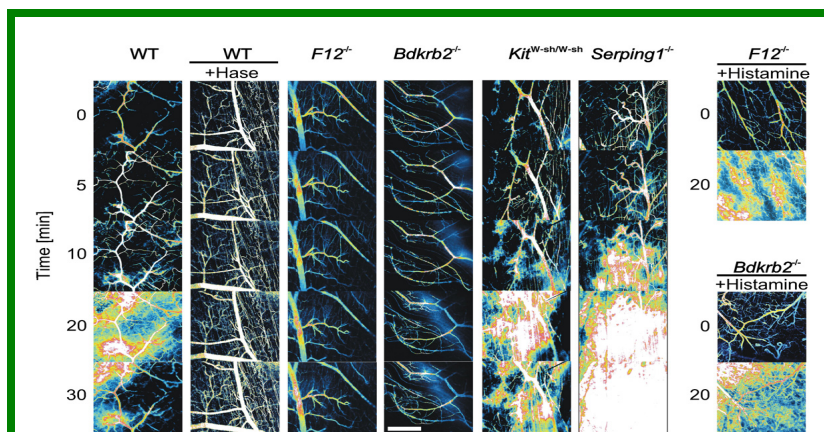
Esta capacidad de activar el sistema de contacto es dependiente de la carga negativa de la heparina. De lo contrario, si la heparina es desulfatada, su capacidad de formar BK queda abolida también, como se muestra en la figura 16.



**Figura 16. La heparina derivada de los mastocitos induce la formación de BK dependiendo de su carga negativa.** El plasma humano fue incubado a 37<sup>o</sup> con heparina derivada de los mastocitos (A) y con heparina desulfatada (B) y se analizó la integridad de la molécula de HK (118KDa) por inmunodetección y la formación de BK por ELISA. Imagen reproducida con el permiso de Thomas Renné [116].

Para confirmar “in vivo” que la heparina es capaz de producir edema a partir de la formación de bradicinina, se aplicó heparina en distintos tipos de ratones de forma tópica (figura 17), a nivel cutáneo, y se pudo observar que en los ratones deficitarios de FXII o del receptor de la bradicinina no se producía edema, contrariamente en los “wild type” (cepa salvaje) (WT) se producía edema y en los ratones con déficit de Serping1 (proteína que codifica para el inhibidor del C1, el más potente inhibidor del sistema de contacto) el edema fue exagerado, igual que en los ratones con mutación en el Kit (ya que tienen más mastocitos), como se muestra en la figura 17.



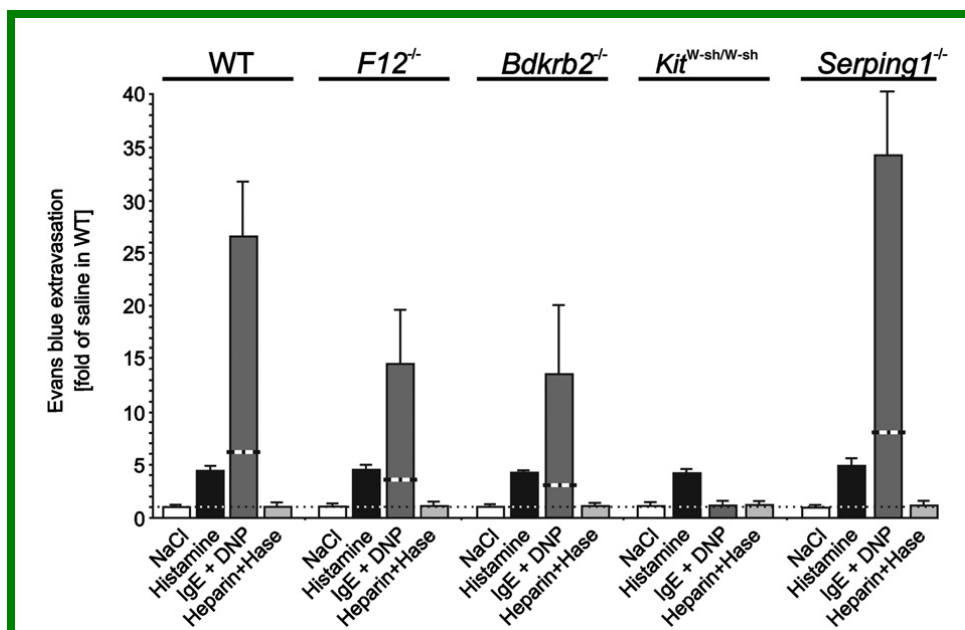


**Figura 17. La heparina aumenta la permeabilidad vascular de la microvascularidad cutánea.** La extravasación de un marcador fluorescente, de los microvasos cutáneos de la parte dorsal de los ratones, fue grabada a través de un microscopio con laser que escaneó las imágenes a tiempo real. La heparina fue tópicamente aplicada sobre la piel de ratones salvajes (WT), con deficiencia de FXII ( $F12^{-/-}$ ), con deficiencia de receptor 2 de la BK ( $Bdkrb2^{-/-}$ ), con la mutación del Kit ( $Kit^{W-sh/W-sh}$ ) y con deficiencia del serping1 ( $Serping1^{-/-}$ ). Como control, se aplicó heparina tratada con heparinasa a los WT (columna 2) y histamina a los ratones con deficiencia de FXII y  $Bdkrb2^{-/-}$  (columna 7). El marcador de intensidad blanco representa la máxima extravasación y el negro la mínima, respectivamente. Las imágenes fueron tomadas a los 5, 10, 20 y 30 minutos después de la estimulación con heparina en el minuto 0. Imagen reproducida con el permiso de Thomas Renné [116].

### 3.4.2 La estimulación de los mastocitos a través de un alérgeno induce edema mediado por bradicinina en un modelo murino.

Para evaluar el papel de los mastocitos en la producción de edema cutáneo a través del sistema de contacto, en condiciones patológicas, se creó un modelo murino de anafilaxia cutánea pasiva, una reacción de hipersensibilidad mediada por IgE [117]. La histamina fue aplicada como control positivo e indujo edema a nivel cutáneo comparable en todos los ratones (WT,  $F12^{-/-}$ ,  $Bdkrb2^{-/-}$ ,  $Kit^{W-sh/W-sh}$ ,  $Serping1^{-/-}$ ) como se muestra en la figura 18. Contrariamente, la aplicación de heparina tratada con heparinasa no aumentaba la permeabilidad vascular en ningún tipo de ratón. Además, se sensibilizó tópicamente a los ratones mediante una inyección con IgE anti-DNP, se provocaron 20 horas después con una inyección retroorbitaria de

dinitrofenil-albúmina sérica humana (DNP-HAS), y se analizó la extravasación a los 30 minutos posteriores a la provocación (Figura 18). La exposición al alérgeno provocó un incremento de la permeabilidad vascular en los WT de más de  $26.6 \pm 5.0$  campos, mientras que los otros ratones deficientes de  $F12^{-/-}$ ,  $Bdkrb2^{-/-}$  y con la mutación del  $Kit^{W-sh/W-sh}$ , fueron resistentes al edema provocado por la estimulación alérgica. Por el contrario, los ratones con un déficit del *Serping1*, proteína que codifica el inhibidor del C1 (potente inhibidor del sistema de contacto) presentaron un aumento de la permeabilidad vascular mucho más importante que los WT. Éstos resultados son consistentes con la hipótesis de que la BK juega un papel importante en el edema producido durante la anafilaxia.



**Figura 18. La Bradicicnina contribuye al edema en un modelo murino de anafilaxia.** Se inyectó suero salino e IgE a los ratones y 20 horas después fueron provocados, con una inyección intravenosa de DNP-HSA con el marcador azul Evans y con heparina tratada con heparinasa (Hase). El marcador de Evans fue extraído en su totalidad del lugar del edema cutáneo de los ratones WT,  $F12^{-/-}$ ,  $Bdkrb2^{-/-}$ ,  $Kit^{W-sh/W-sh}$  y  $Serping1^{-/-}$  y fue cuantificado. Imagen reproducida con el permiso de Thomas Renné [116].

## 4 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El mastocito libera durante el proceso de anafilaxia distintos mediadores. Algunos de éstos como la histamina presentan escasa utilidad como marcadores séricos diagnósticos en la práctica clínica habitual dado la rápida ventana de liberación que presentan en suero y la dificultad para obtener y procesar las muestras adecuadamente (procesamiento, refrigeración, etc). Sin embargo, la determinación de marcadores proteicos que son más estables y con importante trazabilidad como la triptasa (el único marcador hoy en día disponible de forma rutinaria junto con la histamina) son útiles en la práctica clínica diaria especialmente para el diagnóstico y tratamiento preventivo de nuevos episodios de anafilaxia.

En la actualidad sólo hay un estudio de una serie amplia que evalúe la utilidad de la triptasa para el diagnóstico de anafilaxia [36], pero no existen estudios que evalúen a parte de su utilidad como marcador diagnóstico midiendo la triptasa en distintos tiempos, su utilidad como marcador de gravedad y su relación con distintas etiologías.

De todas formas, sigue habiendo desconocimiento de muchos de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la anafilaxia. Recientemente, se ha descrito, en un modelo murino de anafilaxia, el posible papel de la heparina liberada por los mastocitos en la activación del sistema de contacto y la formación de la BK [116], pero no ha sido demostrado en humanos.

Todos éstos hechos, hacen que la anafilaxia, una reacción de rápida instauración y potencialmente mortal, y de la cual su incidencia está en aumento, siga estando infradiagnosticada por parte de los profesionales sanitarios e infratratada, por lo

que es muy importante avanzar en el conocimiento de sus mecanismos fisiopatológicos para encontrar marcadores más sensibles y poder buscar nuevas vías de tratamiento.

Por todo ello, los resultados de este estudio pretenden contribuir a: 1) valorar la utilidad de la triptasa en el diagnóstico de la anafilaxia, ya que es el marcador actualmente disponible y utilizado para su diagnóstico; 2) detectar factores de riesgo que puedan indicar una evolución fatal de la reacción; 3) mejorar el conocimiento fisiopatológico de la anafilaxia; 4) demostrar la implicación de otros sistemas en la fisiopatología de la anafilaxia, como el sistema de contacto y el de coagulación.

Todo ello, permitirá abrir nuevas líneas de investigación para mejorar el diagnóstico y el tratamiento de esta reacción potencialmente mortal.

#### **4.1 HIPÓTESIS DEL PRIMER TRABAJO**

La triptasa es un marcador óptimo para el diagnóstico de la anafilaxia, además de correlacionarse con la gravedad de la reacción.

#### **4.2 HIPÓTESIS DEL SEGUNDO TRABAJO**

El sistema de contacto está activado durante la anafilaxia, además de correlacionarse con la gravedad de la reacción y de activar el sistema de la coagulación.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 PRINCIPAL**

Investigar biomarcadores mastocitarios implicados en la fisiopatología de la anafilaxia

### **5.2 ESPECÍFICOS**

#### **5.2.1 Primer trabajo**

1. Determinar la utilidad y las limitaciones de la triptasa en el diagnóstico de la anafilaxia
2. Correlacionar la gravedad de la anafilaxia con los niveles de triptasa
3. Correlacionar la etiología de la anafilaxia con los niveles de triptasa
4. Determinar factores de riesgo de gravedad de la anafilaxia

#### **5.2.2 Segundo trabajo**

5. Demostrar si hay activación del sistema de contacto durante la anafilaxia
6. Correlacionar la gravedad de la reacción con la activación del sistema de contacto
7. Correlacionar la activación del sistema de contacto con los niveles de triptasa
8. Evaluar el sistema de la coagulación durante la anafilaxia



## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 *Diseño del estudio y selección de pacientes*

#### 6.1.1 Primer trabajo

Estudio observacional de cohorte única longitudinal, unicéntrico.

Todos los pacientes adultos ( $\geq 18$  años) que atendieron al Departamento de Urgencias del Hospital Universitario Vall d'Hebron de Barcelona, y que cumplían criterios clínicos de anafilaxia según los criterios de la NIAID/FAAN [1], desde Septiembre de 2009 a septiembre de 2010 y que además tenían como mínimo una determinación de triptasa durante el episodio de anafilaxia y otra en condiciones basales, se incluyeron. Los pacientes fueron visitados posteriormente en la Sección de Alergología donde se realizó un estudio alergológico para confirmar el diagnóstico de anafilaxia por un alergólogo y se registraron los datos demográficos (edad, expresada en años y sexo, expresado en hombre o mujer) y sus comorbilidades.

#### 6.1.2 Segundo trabajo

Estudio observacional, exploratorio, de casos y controles, unicéntrico.

Dado que se trata de un estudio exploratorio, se decidió incluir sólo los 10 primeros pacientes adultos ( $\geq 18$  años) que atendieron al Departamento de Urgencias del Hospital Universitario Vall d'Hebron de Barcelona, y que cumplían criterios clínicos de anafilaxia según los criterios de la NIAID/FAAN [1], desde Julio de 2011 a septiembre de 2011 y que además tenían como mínimo una determinación de triptasa

sérica y una extracción de un tubo de plasma durante el episodio de anafilaxia y una determinación basal. Los pacientes fueron visitados posteriormente en la Sección de Alergología donde se realizó un estudio alergológico para confirmar el diagnóstico de anafilaxia por un alergólogo y se registraron los datos demográficos (edad, expresada en años y sexo, expresado en hombre o mujer) y sus comorbilidades.

También se incluyeron durante éste periodo, el mismo porcentaje de controles sanos ajustados por sexo y edad, realizándose también en todos una determinación de triptasa y una extracción de plasma.

## **6.2 Aspectos éticos. Consentimiento informado**

Todos los pacientes dieron su consentimiento por escrito (anexo 1) para participar en el estudio, que fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario Vall d'Hebron. No obstante, la inclusión en este estudio, no suponía de exploraciones adicionales a las realizadas en la práctica clínica habitual.

## **6.3 Clasificación de la gravedad de la anafilaxia**

La gravedad de la anafilaxia se clasificó en función del sistema de gradación publicado por Brown S.G.A [30] basado en síntomas clínicos (Tabla 9). Esta clasificación fue adaptada y el grupo moderado se dividió en: moderado A (si los pacientes presentaban clínica gastrointestinal) y moderado B (si los pacientes presentaban clínica respiratoria o cardiovascular). Sólo los pacientes con reacciones moderadas o graves se incluyeron en el análisis (ya que fueron los que cumplían criterios clínicos de anafilaxia).



Tabla 9. Grados de gravedad de la anafilaxia. Adaptado de Brown et al [30].

Grado	Definido por
Leve (piel y tejido subcutáneo sólo)	Eritema generalizado, urticaria, o angioedema
Moderado (características sugestivas de involucrar el aparato respiratorio, cardiovascular, o gastrointestinal)	A Náuseas, vómitos o dolor abdominal
	B Disnea, estridor, sibilantes, mareo, (presíncope), diaforesis, u opresión de garganta
Grave (hipoxemia, hipotensión, o compromiso neurológico)	Cianosis o *SpO2 ≤92%, hipotensión (Presión Arterial sistólica < 90 mmHg en adultos), confusión, colapso, pérdida de conciencia o incontinencia

\*SpO2: Saturación de Oxígeno de hemoglobina medida por pulsioximetría

Nota: Las reacciones leves no corresponden al diagnóstico de anafilaxia según los criterios de NIAID/FAAN [1].

#### 6.4 Tratamiento recibido en el Departamento de urgencias

El tratamiento recibido en urgencias se recogió en el cuaderno de recogida de datos, después de revisar la historia con la hoja de tratamiento de urgencias. También se registraron los efectos adversos, en el caso de que los hubiera.

#### 6.5 Etiología

La etiología de la anafilaxia se registró realizando una historia clínica detallada, por un alergólogo, de las exposiciones a alérgenos de los pacientes en relación con la reacción y posteriormente realizando un estudio alergológico, según necesidad, para llegar al diagnóstico etiológico (prick tests, IgE específica, prueba del cubito o prueba de provocación).

## **6.6 Factores de riesgo para anafilaxia grave**

Los factores clínicos de riesgo de gravedad para la anafilaxia según describió Simons y colaboradores [34], [27] fueron evaluados: edad, factores de riesgo cardiovascular, asma, rinitis y mastocitosis. También se recogieron las medicaciones concomitantes como beta-bloqueantes, IECA y los antidepresivos [34].

## **6.7 Pruebas cutáneas (prick test)**

Para llevar a cabo estas pruebas, el paciente debía suspender la toma de antihistamínicos una semana antes de su realización.

Los pacientes fueron sometidos a pruebas cutáneas en prick (pruebas intraepidérmicas) para determinar el posible alérgeno responsable de la anafilaxia. Se realizó una batería estándar de neumoaérgenos y de alimentos para comprobar o descartar sensibilización alérgica. Esta batería incluía los neumoaérgenos y los alimentos habituales en nuestro medio. La batería estándar está compuesta por los siguientes extractos, todos ellos de la casa comercial Leti (Unipersonal SL Madrid, España): *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, Epitelio de perro, epitelio de gato, *Aspergillus* spp, *Alternaria alternata*, *Penicillium* spp, *Cladosporium herbarum*, Látex, polen de *Cupressus sempervirens*, polen de *Olea europea*, polen de *Platanus acerifolia*, polen de *Parietaria judaica*, polen de *Artemisa vulgaris*, polen de *Mercurialis annua*, polen de *Plantago lanceolata*, polen de mezcla de gramíneas, polen de *Cynodon dactylon* y polen de *Phragmites*

*communis*, Anisakis sp, avellana, almendra, nuez, piñón, pistacho, manzana, melocotón piel y pulpa, fresa, plátano, lechuga, tomate, judía verde, lentejas, garbanzos, mostaza, soja, cacahuete, cereales, gluten, gliadina, arroz, pescado, pollo, cerdo, ternera, huevo, leche.

En el caso de sospechar alergia a medicamentos se realizaron las pruebas cutáneas (prick y/o intradérmica) con los medicamentos implicados para intentar confirmar sensibilización.

Como control positivo se utilizó histamina a una concentración de 10 mg/ml y como control negativo suero fisiológico estéril 0,9% .

Las pruebas cutáneas se realizaron mediante el procedimiento estándar [118] en la cara volar del antebrazo, utilizando lancetas de punta de 1mm estériles Dome-Hollister-Stier (DHS-Stallergenes, París, Francia). Se utilizó una lanceta para cada alérgeno. Las pruebas se midieron según el diámetro mayor y el perpendicular de la pápula, transcurridos 15 minutos. Se consideraron positivas las pápulas cuyo diámetro mayor era igual o superior a 3mm, siendo el control con suero fisiológico negativo.

## **6.8 Prueba del cubito de hielo**

En el caso de sospechar una anafilaxia *a frigore* se realizó la prueba del cubito para confirmar la causa. Esta prueba consiste en la aplicación de un cubito de hielo en el antebrazo del paciente durante 5-15 minutos. La lectura se realiza a partir de los 10 minutos, cuando se recalienta el brazo [119]. Es positiva si se observan habones en la zona de aplicación.

### **6.9 Extracción de sangre y obtención de suero**

La extracción se realizó utilizando tubos Vacutainer SST® (BD S.A, Madrid, España) con gelosa. A cada paciente se le extrajeron 2 tubos de 5 ml. Tras la extracción, se dejaba coagular la sangre a temperatura ambiente (TA) durante una hora y posteriormente se centrifugaba a 3000 g durante 5 minutos. El suero sobrenadante se recogía con una pipeta Pasteur y se procedía a alicuotar 500 µl en tubos Eppendorf® (Eppendorf Ibérica, Madrid, España) de 1,5 ml. Los tubos fueron debidamente etiquetados con el número correspondiente del paciente y almacenados a -20°C hasta su utilización.

### **6.10 IgE específica**

Las concentraciones de IgE específica frente a los alérgenos potencialmente implicados se cuantificaron con ImmunoCAP (Phadia, ahora Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Suecia), siguiendo las instrucciones del fabricante [120]. Los resultados se expresan en KU/l como lo indica el fabricante. Se consideraron resultados positivos si la IgE específica era >0,35 KU/l.

### **6.11 Determinación de triptasa sérica**

La triptasa se midió usando el UniCAP-Tryptase fluoroimmunoassay (Phadia, ahora Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Suecia), siguiendo las instrucciones del fabricante [120]. La sensibilidad de la prueba es de 1 µg/L. Una concentración de triptasa sérica superior a  $\geq 11.4 \mu\text{g/L}$  se consideró elevada.

Después del inicio de los síntomas la triptasa se determinó en: T1) 1-2 horas, T2) 4-6 horas, y T3) 12-24 horas. Una determinación basal se realizó, como mínimo, una semana más tarde de la resolución de los síntomas (TB). Los tubos fueron debidamente etiquetados con el número correspondiente del paciente y almacenados a -20°C hasta su utilización.

### ***6.12 Extracción de sangre y obtención de plasma***

La extracción de sangre se realizó utilizando un tubo azul de extracción sanguínea con citrato sódico (1/9). Inmediatamente tras la extracción se invirtió suavemente el tubo para favorecer que la sangre se mezclara bien con el anticoagulante. A cada paciente se le extrajeron 2 tubos de 5 ml. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 2500 g durante 15 minutos. El plasma sobrenadante se recogió con una pipeta Pasteur y se procedió a alicuotar 500 µl en tubos Eppendorf® (Eppendorf Ibérica, Madrid, España) de 1,5 ml. Los tubos fueron debidamente etiquetados con el número correspondiente del paciente y almacenados a -20°C hasta su utilización.

### ***6.13 Validez interna del plasma para el estudio del sistema de contacto***

Cuantificar el sistema de contacto es difícil y se pueden producir errores en la cuantificación si no se procesa el plasma correctamente. Para poder confirmar la validez interna de nuestras muestras, realizamos un estudio mediante la extracción de plasma de controles sanos (siguiendo el mismo procedimiento comentado en el apartado anterior) y posteriormente los almacenamos de 7 formas distintas (se

repitió el estudio 5 veces en distintos controles sanos, para comprobar reproducibilidad). Un tubo de plasma se dejó a temperatura ambiente durante 24 horas y después se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$ , otro se dejó a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas y después se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$ , otro directamente se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  y otro a  $-80^{\circ}\text{C}$  y todos se almacenaron durante un mínimo de 6 meses. Además, otro plasma después del almacenamiento  $-20^{\circ}\text{C}$  se sometió a varios ciclos de congelación-descongelación hasta su análisis. No obstante, para disponer de un control fiable (asegurar la no activación del sistema de contacto al 100%), en uno de los plasmas controles se aplicó de forma instantánea a su extracción una mezcla de inhibidores del sistema de contacto [Pefabloc (Boehringer Mannheim Corporation, Indianapolis, IN) y Aprotinin (Sigma-Aldrich Company, Scotland, UK)], y se analizó inmediatamente.

Todos los plasmas de pacientes y controles utilizados para nuestro estudio fueron directamente congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  menos de 6 meses y sólo se descongelaron una vez para su análisis.

#### **6.14 SDS-PAGE e Inmunodetección de HK, PK y FXII**

Los SDS-PAGE se realizaron mediante el método de Laemmli [121]. Para separar las proteínas se utilizó un gel de acrilamida del 8%.

Las muestras de plasma citratado de los pacientes y los controles fueron diluidas en un tampón que contenía 0,125 mol/L HCL-Tris (pH 6.8) y desnaturalizadas con 0,1% de SDS y 5% de 2-beta-mercaptoetanol (2ME) a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos (no se añadió 2ME cuando se midió PK, para que las muestras estuvieran en condiciones no reductoras). Posteriormente, y de acuerdo con la

técnica propuesta por Bradford, se aplicaron 20 µl (0,5 µl de plasma) de solución en cada carril [122].

Después de la electroforesis, las proteínas separadas se identificaron mediante la tinción en un gel control con 0,1% de Coomassie Brilliant Blue R-250 diluido en metanol/ ácido acético/ agua destilada (4:1:5). Las bandas proteicas separadas (en otro gel) fueron transferidas electroforéticamente en una membrana de nitrocelulosa (NTC), tal y como describieron Towbin y colaboradores [122]. Tras comprobar que la transferencia había sido correcta mediante la tinción de la membrana con una solución de Rojo Ponceau (0,2% Rojo Ponceau, 2% ácido acético), era bloqueada durante una hora a temperatura ambiente con 5% de leche en polvo y 0,05% Tween-20 en PBS.

Las inmunodetecciones (*Western Blottings*) se realizaron incubando las membranas durante 2 horas a 4°C con el anticuerpo policlonal del FXII (Nordic Laboratories, αFXII), con el anticuerpo policlonal del PK (affinity biological laboratories, SAPK-AP) y con el anticuerpo policlonal I107 contra la cadena ligera del HK (dominio D5-D6) del grupo de Renné y colaboradores [123] en una dilución 1:1500. Para la detección se incubaron las membranas (después del lavado) durante 1 hora a temperatura ambiente con peroxidasa de rábano (HRP) y después del lavado con PBS/Tween la señal fue detectada usando el método de quimoluminiscencia como recomienda el fabricante (ECL-Plus; Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buck, Reino Unido).

#### **6.14.1 Escisión del HK como biomarcador de activación del sistema de contacto y creación de una curva estándar de cuantificación del porcentaje de escisión del HK**

Como se ha comentado anteriormente la escisión del HK produce BK, y dado que es muy difícil la cuantificación de la BK por su rápida degradación y su poca concentración en plasma, la mejor forma de demostrar la activación del sistema de contacto y por lo tanto la formación de BK es demostrando la escisión del HK mediante la inmunodetección (siguiendo los pasos comentados en el apartado anterior). No obstante, no siempre nos vamos a encontrar con una escisión del 100% o del 0%, por lo que para cuantificar el porcentaje de escisión en estos pacientes, en función de la intensidad del *Western Blotting*, fue necesario realizar previamente una curva estándar de escisión del HK usando dextrán sulfato (que es un activador artificial del sistema de contacto) a distintas concentraciones en un plasma de control sano.

Para preparar las muestras, se extrajo plasma de un control sano y se precalentó a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, en este plasma se añadió dextrán sulfato (100µg/ml) en presencia de tampón Tris 75mM con Zinc (pH 7.4) y se calentó a 37°C durante 1 hora. Después la muestra siguió el mismo proceso comentado anteriormente para realizar el SDS-PAGE y la inmunodetección. Este plasma con 100µg/ml de dextrán sulfato escindía el 100% el HK. Por otro lado, el mismo plasma de un control sano se analizó sin añadir el dextrán sulfato y no se objetivó activación del sistema de contacto (0% de escisión del HK). Por lo tanto, teniendo en cuenta ésto, se diseñó una curva con distintos porcentajes de escisión del HK mediante distintas diluciones de las dos muestras.



Posteriormente, para estudiar la intensidad de escisión de la molécula de HK, se realizó un densitometrado de las inmunodetecciones con un escáner GS 800 (Bio-Rad, Richmond, CA, EUA), analizando las imágenes con el software ImageQuant (Bio-Rad). Para confirmar la reproducibilidad, esta prueba se repitió cinco veces.

Posteriormente, esta curva fue usada con las muestras de pacientes y controles para cuantificar, en función de la intensidad de la inmunodetección del HK, el porcentaje de escisión del HK y, por lo tanto, el porcentaje de activación del sistema de contacto.

### **6.15 Cuantificación del TTPa**

El TTPa es una prueba que se fundamenta en la medición del tiempo que tarda en coagular el plasma en presencia de un reactivo (cefalina, que es como un sustituto de los fosfolípidos de las plaquetas) de tromboplastina parcial activada mediante una sustancia de contacto (caolín) más la presencia de calcio. Refleja la integridad global del sistema intrínseco de la coagulación. Esta prueba se basa en la recalcificación del plasma in vitro en presencia de fosfolípidos como sustituto de plaquetas y de una sustancia activadora. Para determinarlo se utilizó plasma obtenido con un tubo citratado (tubo con el tapón azul). Después se centrifugó la muestra por 15 minutos a 2500 g para obtener plasma pobre en plaquetas. La formación del coágulo se inició, siguiendo las instrucciones preestablecidas[124], con la preincubación de la solución de 100µl/25mM CaCl<sub>2</sub> en el coagulómetro (KC10; Amelung) a 37°C. Posteriormente se calentaron por separado a 37°C 100µl de plasma anticoagulado con citrato de las muestras de pacientes con anafilaxia y

100µg del reactivo de tromboplastina parcial activada [cefalina más caolín de una concentración final 30µg/ml (Dade Behring, Marburg, Germany)] y después se incubaron y mezclaron conjuntamente durante 3 minutos a 37 grados. Inmediatamente se añadió 100µl CaCl<sub>2</sub> precalentado y se registró el tiempo hasta la formación del coágulo mediante un cronómetro (KC4; Amelung). Se consideró normal un tiempo de hasta 46 segundos.

### **6.16 Cuantificación del anti-Xa**

Los niveles de anti-Xa (kIE/L) se determinaron con el sistema automático de coagulación sanguínea (BCS® XP; Dade Behring) con los reactivos que indican los protocolos detallados por el fabricante (<http://dadebehring.com>), para determinar de forma indirecta los niveles de heparina.

### **6.17 Análisis estadístico**

#### **6.17.1 Primer trabajo**

Los datos fueron recogidos y analizados con el programa SPSS versión 17 (SPSS Inc, Chicago IL, USA) y el programa Prisma 5 (GraphPad Software, La Jolla, Calif). Las variables continuas se describen como media ± DS con su intervalo de confianza del 95% (IC95%). Las variables categóricas fueron comparadas usando la prueba del  $\chi^2$  y el test exacto de Fisher. El análisis estadístico que se usó para comparar la concentración de triptasa en los diferentes tiempos y con las diferentes etiologías fue la prueba *T de Student* para datos apareados y para datos

independientes, respectivamente. Para comparar los niveles de triptasa en T1 con los distintos grados de gravedad de la anafilaxia se usó el test no paramétrico Kruskal-Wallis y U-Mann Whitney. Un valor de  $P$  de 0.05 o inferior bilateral fue considerado estadísticamente significativo.

#### **6.17.2 Segundo trabajo**

Los datos fueron recogidos y analizados con el programa Prisma 5 (GraphPad Software, La Jolla, Calif, USA). Las variables continuas están descritas como mediana y rango intercuartílico (RIC). Las variables continuas fueron comparadas con variables categóricas usando los test no paramétricos Kruskal-Wallis y U-Mann-Whitney en función del número de variables categóricas comparadas, y en el caso de datos apareados, usando el test de los rangos de Wilcoxon para datos apareados. Las correlaciones fueron analizadas con la prueba de los rangos de Spearman. Un valor de  $P$  de 0.05 o inferior bilateral fue considerado estadísticamente significativo.



## 7 RESULTADOS

### 7.1 Primer trabajo

#### 7.1.1 Algoritmo del estudio y características de los pacientes

De los 37.568 pacientes que atendieron al departamento de urgencias de Medicina Interna durante el periodo de estudio (Septiembre 2009 - Septiembre 2010), 102 pacientes cumplieron los criterios de inclusión y se incluyeron finalmente en el estudio, como se muestra en la *figura 19*.

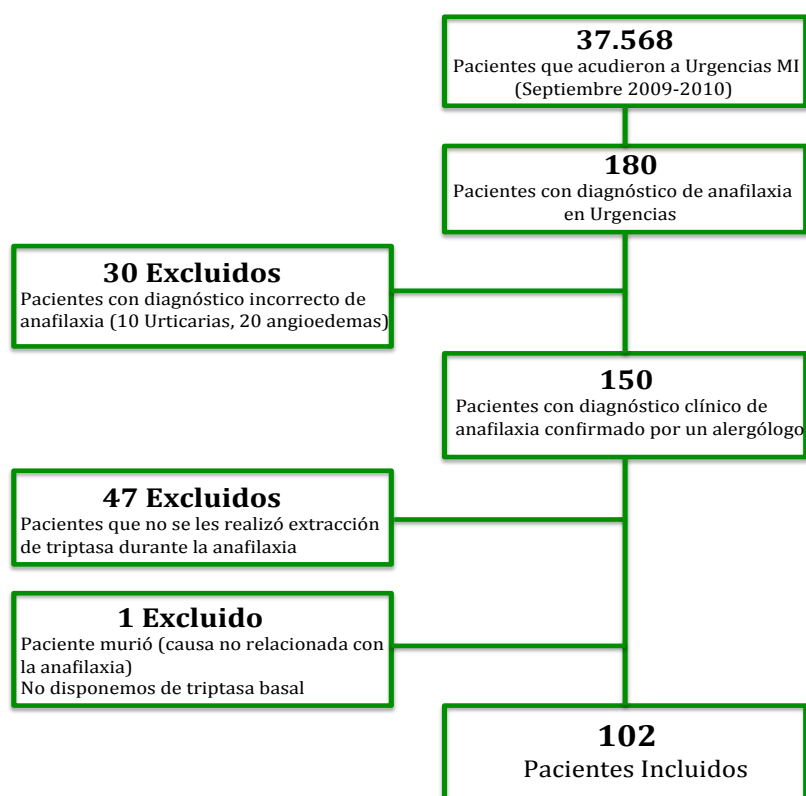


Figura 19. Algoritmo del estudio.

La media de edad de los pacientes fue de  $47,4 \pm 19,1$  años (rango de 18 a 91), con un predominio de mujeres (61,8%) sobre hombres (38,2%). Las características demográficas y clínicas de los pacientes se muestran en la *Tabla 10*.

Tabla 10. Características demográficas y clínicas de los pacientes

	Nº Pacientes	Porcentaje (%)
<b>Total</b>	102	100
<b>Sexo</b>		
Hombre	39	38,2
Mujer	63	61,8
<b>Edad, años</b>		
18-65	83	81,6
> 65	19	18,4
<b>Gravedad de la Anafilaxia:</b>		
Grado Moderado	56	54,9
A	14	13,7
B	42	41,2
Grado Grave	46	45,1
<b>Etiología de la Anafilaxia:</b>		
Fármacos	51	50
Alimentos	35	34,5
Anisakis	5	4,9
Látex	3	2,9
Himenópteros	3	2,9
Frío	1	0,9
Idiopática	4	3,9
<b>Historia familiar de atopía</b>	21	20,6
<b>Historia personal de atopía</b>	39	38,2
<b>Comorbilidades</b>		
Rinitis	33	32,4
Enfermedades cardiovasculares	32	31,4
Asma y otras enfermedades respiratorias	13	12,7
Enfermedad psiquiátrica	10	9,8
Enfermedad neurológica	4	3,9
Enfermedad tiroidea	3	2,9
Mastocitosis	2	1,96
<b>Medicación Concomitante</b>		
IECA	18	17,6
Sedantes/Hipnóticos/Antidepresivos	9	8,8
Beta-bloqueantes	4	3,9
Otros	50	49

IECA, Inhibidor del Enzima Convertidor de la Angiotensina

De los 102 pacientes incluidos, 39 referían historia personal previa de alergia, que se distribuyó de la siguiente forma: rinitis 32,4%, alergia alimentaria 13,7%, asma 10,8%, anafilaxia 4,9% y dermatitis atópica 1%. Sólo 5 pacientes (4,9%) habían presentado algún episodio previo de anafilaxia.

Teniendo en cuenta la causa de la anafilaxia (**Tabla 11**), analizando los dos grupos etiológicos más frecuentes (alimentos y fármacos), se observó, que de los 35 pacientes que presentaron anafilaxia por alimentos, sólo 11 (31,4%) tenían un diagnóstico establecido de alergia alimentaria y referían haber presentado anafilaxia, urticaria o síndrome de alergia oral (SAO) después de consumir el alimento causante de la anafilaxia. No obstante, en los 24 pacientes restantes (68,6%) la anafilaxia fue la primera manifestación de la enfermedad. En cambio, en el 98% de las reacciones provocadas por fármacos (50/51), la anafilaxia fue la primera manifestación.

### 7.1.2 Grados de gravedad de la anafilaxia y etiología

Los distintos grados de gravedad de la anafilaxia que presentaron los pacientes, con sus respectivos factores etiológicos están detallados en la **Tabla 11**.

Como se puede observar en la tabla 10, la anafilaxia causada por fármacos fue la causa más frecuente, seguida por los alimentos. Además, la anafilaxia en éste grupo fue significativamente más grave que la causada por alimentos [anafilaxia grave en medicamentos 32/51(62,7%) *versus* anafilaxia grave en alimentos 10/35(28,5%),  $p=0.001$ ].

En cuanto a la gravedad de la reacción, la anafilaxia grave fue la más frecuente, presentándose en un 45,1% de los pacientes, seguido por la moderada B, presentada en un 41,2% de los pacientes y la moderada A en un 13,7%.

**Tabla 11. Etiología de la anafilaxia de acuerdo con los grados de gravedad**

Grados de Anafilaxia:	Moderada		Grave	Nº total pacientes (%)
	A	B		
<b>Etiología de la Anafilaxia:</b>				
Fármacos	3	16	32	51 (50)
Alimentos	8	17	10	35 (34,5)
Anisakis	2	2	1	5 (4,9)
Látex	0	2	1	3 (2,9)
Himenópteros	0	1	2	3 (2,9)
Frío	0	1	0	1 (0,9)
Idiopática	1	3	0	4 (3,9)
<b>Nº Total pacientes (%)</b>	<b>14 (13,7)</b>	<b>42 (41,2)</b>	<b>46 (45,1)</b>	<b>102 (100)</b>

### 7.1.3 Factores de riesgo de gravedad

Los pacientes que referían alguna comorbilidad presentaron una anafilaxia significativamente más grave que los pacientes que no referían ninguna patología asociada [55.5% de los pacientes con comorbilidades (30/54) presentaron anafilaxia grave vs. 33.3% de los pacientes sin patologías (16/48),  $p=0,024$ ].

Posteriormente, se analizó cada factor de riesgo de anafilaxia grave descrito por Simons y colaboradores [34],[27] por separado (**Tabla 12**). La edad avanzada (>65 años) se asoció de una forma estadísticamente significativa con la anafilaxia grave, así como también se asoció de forma significativa el hecho de presentar factores de riesgo



cardiovascular y de tomar IECA. No obstante, no se encontraron diferencias significativas en los pacientes que presentaban patología respiratoria asociada, aunque si que éstos presentaban más anafilaxia moderada grado B (53,9%) (con síntomas respiratorios), ni tampoco en pacientes que estaban en tratamiento con medicamentos. Los dos pacientes con mastocitosis presentaron anafilaxia grave.

**Tabla 12. Factores de riesgo de pacientes asociados a anafilaxia grave**

	Nº. *	Nº. de pacientes con anafilaxia grave (%)	Valor de P
Edad ≥ 65 años	19/102	16 (84)	<b>0,002</b>
Factores de riesgo cardiovascular	32/102	23 (72)	<b>0,001</b>
Enfermedades respiratorias	13/102	6 (46,1)	0,935
Rinitis	33/102	7 (21,2%)	0,939
<b>Medicación concomitante</b>			
IECA	18/102	15 (83,3)	<b>0,001</b>
Beta-bloqueantes	4/102	2 (50)	0,325
Sedanes/hipnóticos/Antidepresivos	9/102	4 (44,4)	0,613

Los valores de p en negrita indican significación estadística ( $P < .05$ ).

IECA, inhibidores del enzima convertidor de la Angiotensina

\*El número de pacientes con cada factor de riesgo entre todos los pacientes

#### 7.1.4 Concentración de triptasa sérica en los distintos intervalos de tiempos

Sólo en 63 de los 102 pacientes (61,8%) se observó una concentración de triptasa sérica elevada durante el episodio de anafilaxia.

En la **tabla 13** y en la **figura 20** se muestra el porcentaje de pacientes con triptasa sérica elevada en los distintos tiempos de medición. En T1, sólo 58 de los 91 pacientes (63,7%) mostraron niveles elevados de triptasa durante la reacción.

Aún así, la concentración de triptasa sérica medida en éste intervalo de tiempo (T1) fue significativamente más alta que en los otros tiempos (T2, T3 y TB), en los que bajo rápidamente. La diferencia entre la concentración de triptasa en T1 y en los otros intervalos de tiempo fue en todos los casos estadísticamente significativa tal y como se describe a continuación. En T1 versus T2 fue de 5,4 µg/L [IC del 95% de 2,7 a 8,2];  $P < 0,001$ , en T1 versus T3 fue de 11,7 µg/L [IC 95% de 7,3 a 16,1];  $P < 0,001$  y en T1 versus TB fue de 14.4 µg/L [IC del 95% de 11,2 a 17,6],  $P < 0,0001$ .

De todas formas, las concentraciones de triptasa en los otros intervalos de tiempo durante la anafilaxia (T2 y T3) seguían siendo, de forma estadísticamente significativa, más altos que a nivel basal (TB), aunque con menos diferencias que cuando comparamos los niveles entre T1 y TB, como se muestra en la figura 20.

**Tabla 13. Concentración de triptasa sérica en diferentes tiempos y porcentaje de pacientes con triptasa elevada.**

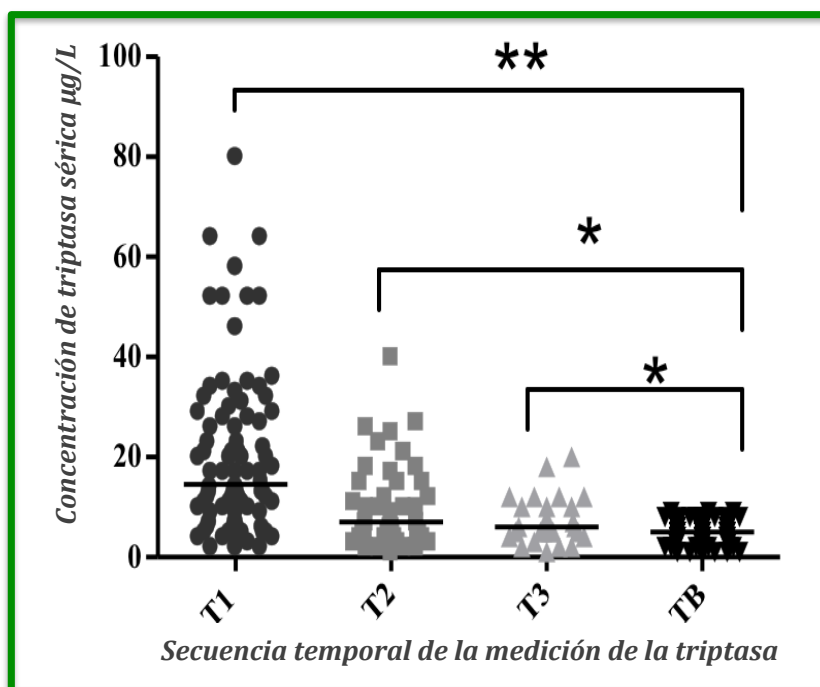
	Media (µg/L)	DS (µg/L)	Nº Total pacientes (%)*	Nº#
<b>T1</b>	19,3	15,1	58 (63,7)	91
<b>T2</b>	10,2	8,5	20 (46,6)	45
<b>T3</b>	7,3	4,7	9 (33,3)	27
<b>TB</b>	4,5	2	0 (0)	100&

T1, 1-2 horas; T2, 4-6 horas; T3 12-24 horas; TB basal; DS, Desviación Estándar.

\* Número total de pacientes (porcentaje) con triptasa elevada (>11.4 µg/L) en cada grupo.

# Número total de pacientes en cada grupo

& Los dos pacientes que faltan, de los 102 totales, son los dos con mastocitosis que se excluyeron del análisis estadístico para evitar sesgos

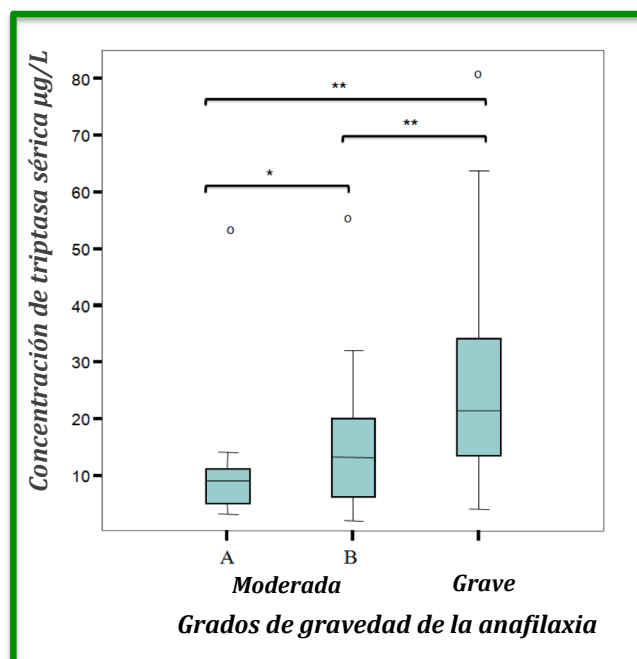


**Figura 20. Concentración sérica de triptasa en distintas mediciones temporales.** Los resultados son expresados como medias. Las diferencias entre las concentraciones de triptasa en los distintos intervalos de tiempo son: T1 vs TB 14,4 µg/L [IC del 95%, 11,2-17,6],  $**P<0,0001$ ; T2 vs TB 6,3 µg/L [IC del 95%, 3,9-8,6],  $*P<0,001$ ; T3 vs TB 3,1 µg/L [IC del 95%, 1,7-4,6],  $*P<0,001$ .

Por otro lado, un 36,3% (33/91) de los pacientes presentaron unas concentraciones de triptasa normal en T1 ( $< 11,4\mu\text{g/L}$ ). De éstos, sólo un 39,4% (13/33) presentó diferencias significativas al realizar la ratio entre T1 (mediana 5,9; RIC 3,2-7,3 µg/L) y TB (mediana 3,1; RIC 2,5-5,1 µg/L)], con una diferencia de 2,8 µg/L; IC del 95% de 2,13 a 3,44;  $P<0,001$ . Sorprendentemente, en 60,6% (20/33) de los pacientes con triptasa normal, los niveles de triptasa se mantuvieron estables cuando comparamos sus niveles en T1 y TB ( $\Delta\text{T1-TB}=0$ ).

### 7.1.5 Concentración de triptasa sérica según los grados de gravedad de la anafilaxia

De los 46 pacientes que presentaron una anafilaxia grave, un 76% (35/46) de ellos presentaban unos niveles elevados de triptasa (mediana 25,3; RIC 17  $\mu\text{g/L}$ ); mientras que en el grupo moderado B sólo el 55% (23/42) de los pacientes (mediana 14,6; RIC 10,7  $\mu\text{g/L}$ ); y en el grupo moderado A sólo el 36% (5/14) (mediana 12,7; RIC 14,2  $\mu\text{g/L}$ ) con diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos ( $P=0,024$ ) tal y como se muestra en la figura 21. Además, la concentración de triptasa fue más elevada en los pacientes con anafilaxia grave, con una correlación positiva entre los distintos grados de gravedad ( $P<0,001$ ;  $r=0,49$ ).

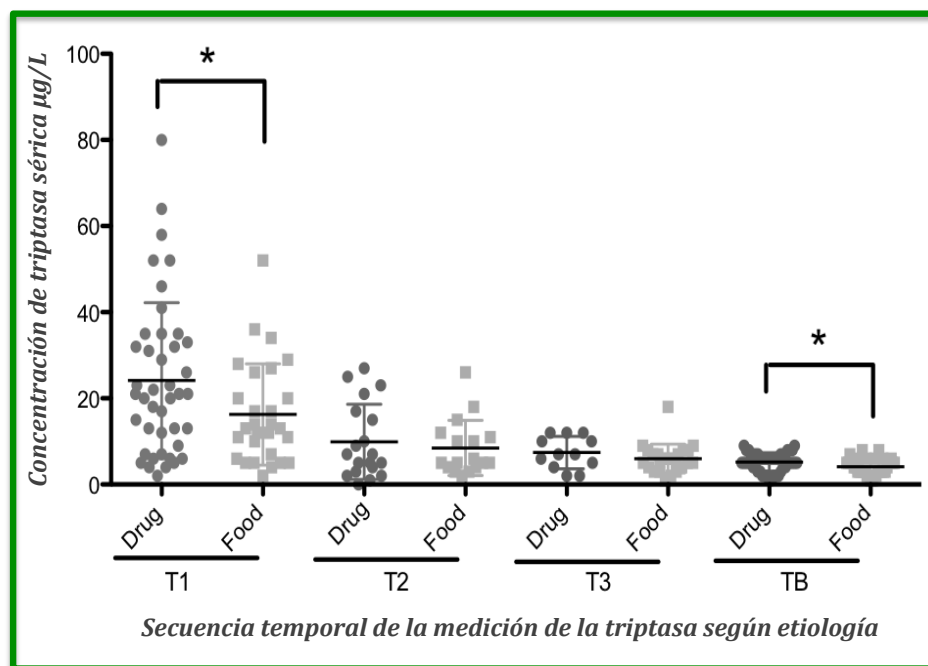


**Figura 21. Concentración de triptasa sérica durante la anafilaxia (T1) en función de los grados de gravedad de la anafilaxia.** Los resultados están expresados como medianas y rango intercuartílico (RIC). La prueba de Kruskal-Wallis comparando todos los grupos  $P<0,001$ . Anafilaxia moderada-A vs moderada-B ( $*P<0,05$ ), moderada-B vs grave ( $**P<0,001$ ) y moderada-A vs grave ( $**P<0,001$ ).  
o (fuera de rango).

### 7.1.6 Concentración de triptasa sérica según la etiología de la anafilaxia

Si observamos la concentración de triptasa en los dos grupos etiológicos más frecuentes (fármacos y alimentos), observamos que no hay diferencias significativas en el porcentaje de pacientes con triptasa sérica elevada. En el grupo de la anafilaxia causada por fármacos, 65% (33/51) de los pacientes presentaron triptasa elevada, comparado con el 57% (20/35) de los pacientes con anafilaxia causada por alimentos ( $p=0,523$ ).

Sin embargo, si nos fijamos en la concentración de triptasa sérica en T1, el grupo de pacientes con anafilaxia por fármacos presentó niveles séricos de triptasa más altos (media de  $24,14 \pm 18,08$   $\mu\text{g/L}$  [IC del 95% de 18,51 a 29,78];  $n=51$ ), comparado con el grupo de alimentos (media  $16,25 \pm 11,76$   $\text{mg/L}$  [IC del 95% de 11,69 a 20,81];  $n=35$ ) ( $P=0,045$ ) (**Figura 22**). No hubo diferencias significativas en los otros tiempos, a excepción de TB, donde se observó también que el grupo de pacientes con anafilaxia por fármacos presentaba unos niveles de triptasa sérica más altos que el grupo de pacientes con anafilaxia por alimentos (media  $5,21 \pm 2,13$   $\text{mg/L}$  [IC del 95% de 4,58 a 5,82] en el grupo de fármacos vs. media  $4,14 \pm 1,87$   $\text{mg/L}$  [IC del 95% de 3,51 a 4,76] en el grupo de alimentos;  $p=0.019$ )(Figura 22).

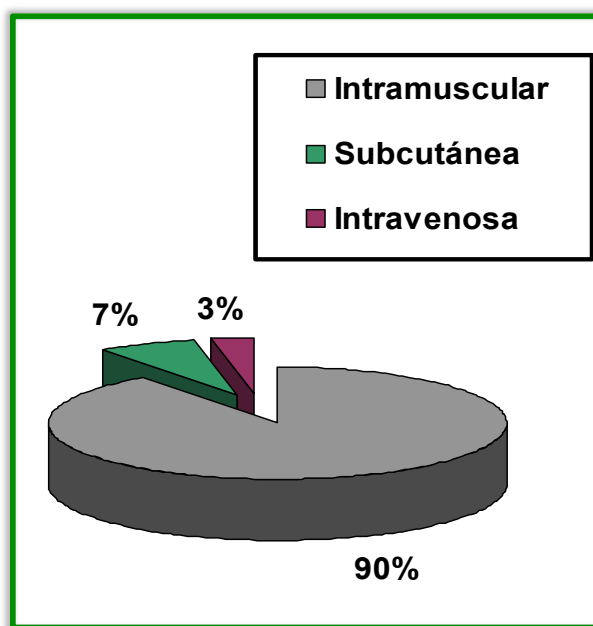


**Figura 22. Concentración de triptasa en los diferentes tiempos de medición dependiendo de la causa: fármacos (drug) y alimentos (food).** Los resultados están expresados en medias y DS. Hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ( $* < P.05$ ) solo en T1 y TB.

### 7.1.7 Tratamiento recibido en urgencias

Aunque la adrenalina es el tratamiento de elección en la anafilaxia, sólo fue administrada en 67 pacientes (65,7%), mientras que los corticosteroides y los antihistamínicos se administraron en el 100% de los casos.

La adrenalina se administró de forma intramuscular (IM) en 55 casos, de forma subcutánea (SC) en 11 casos y intravenoso (IV) en un paciente (ver figura 23). En dos pacientes con historia de isquemia coronaria, se administró glucagón IM, con buena respuesta y sin efectos secundarios.



**Figura 23. Vías de administración de la adrenalina.** De los 67 pacientes que recibieron adrenalina, un 90% la recibieron IM, 7% SC y 3% IV.

Sólo dos pacientes (1,9%) presentaron complicaciones después de la administración de adrenalina. En un caso, el paciente presentó fibrilación auricular después de la administración de adrenalina IM (dosis correcta); pero posteriormente, en el mismo ingreso, se le diagnosticó de hipertiroidismo. En otro paciente, un hombre con historia previa de IAM, después de la administración IV de adrenalina presentó dolor torácico y elevación de los enzimas cardíacos. No se recogieron en urgencias las dosis de adrenalina IV que le administraron.

## 7.2 Segunda parte (segundo artículo)

### 7.2.1 Características de los pacientes

Se incluyeron un total de 10 pacientes con anafilaxia, seis mujeres y cuatro hombres, con una mediana de edad de 40 (RIC 31.75-47.75) años.

Las características clínicas y demográficas de los pacientes están resumidas en la **tabla 14**.

Se incluyeron también diez controles, ajustados por sexo y edad. La mediana de edad fue de 38 (RIC 28.75-49.85) años. Ninguno de los controles tomaba medicación habitual, ni presentaba alguna enfermedad importante.

**Tabla 14. Características demográficas y clínicas de los pacientes**

Nº. *	Tm#	Sexo	Edad	Etiología	Manifestaciones Clínicas				Grados de gravedad de la anafilaxia	IECA	Historia personal de atopía	Comorbilidades
					U	GI	R	CV				
1 a1	30min	M	40	AAS	+	-	+	-	2	No	No	No
a2	2h											
b	Basal											
2 a	1.5h	H	40	Lechuga+AAS	+	+	-	-	1	No	AA	No
b	Basal											
3 a	3h	M	20	Nuez	+	+	-	+	3	No	AA;RC	No
b	Basal											
4 a	2h	M	65	Naranja	+	+	-	+	3	No	AA	
b	Basal											
5 a	2h	M	42	Amoxicilin	+	-	+	+	3	No	No	No
b	Basal											
6 a	3h	H	39	Anisakis	+	+	-	-	1	No	No	No
b	Basal											
7 a1	1,5h	M	28	Mango	+	-	+	-	2	No	AB;RC;AA	No
a2	6h											
b	Basal											
8 a	30min	H	41	AAS	+	-	+	-	2	No	No	No
b	Basal											
9 a1	30min	M	33	Infliximab	+	+	+	-	2	No	No	Colitis Ulcerosa
a2	2h											
b	Basal											
10 a	10h	H	79	Dipirona	+	-	-	+	3	Si	No	HTA
b	Basal											

M=Mujer H=Hombre U=urticaria o otra clínica cutánea GI= Síntomas gastrointestinales R= síntomas respiratorios CV= Síntomas Cardiovasculares

AB= Asma bronquial RC=Rinoconjuntivitis AA=Alergia alimentaria HTA=Hipertensión

\* Número de identificación de los pacientes

#Tiempo en el que se realizó la extracción de sangre después del inicio de la anafilaxia

Grados de anafilaxia según la clasificación de Brown adaptada (ver apartado de métodos): 1= moderada A 2= moderada B 3= grave

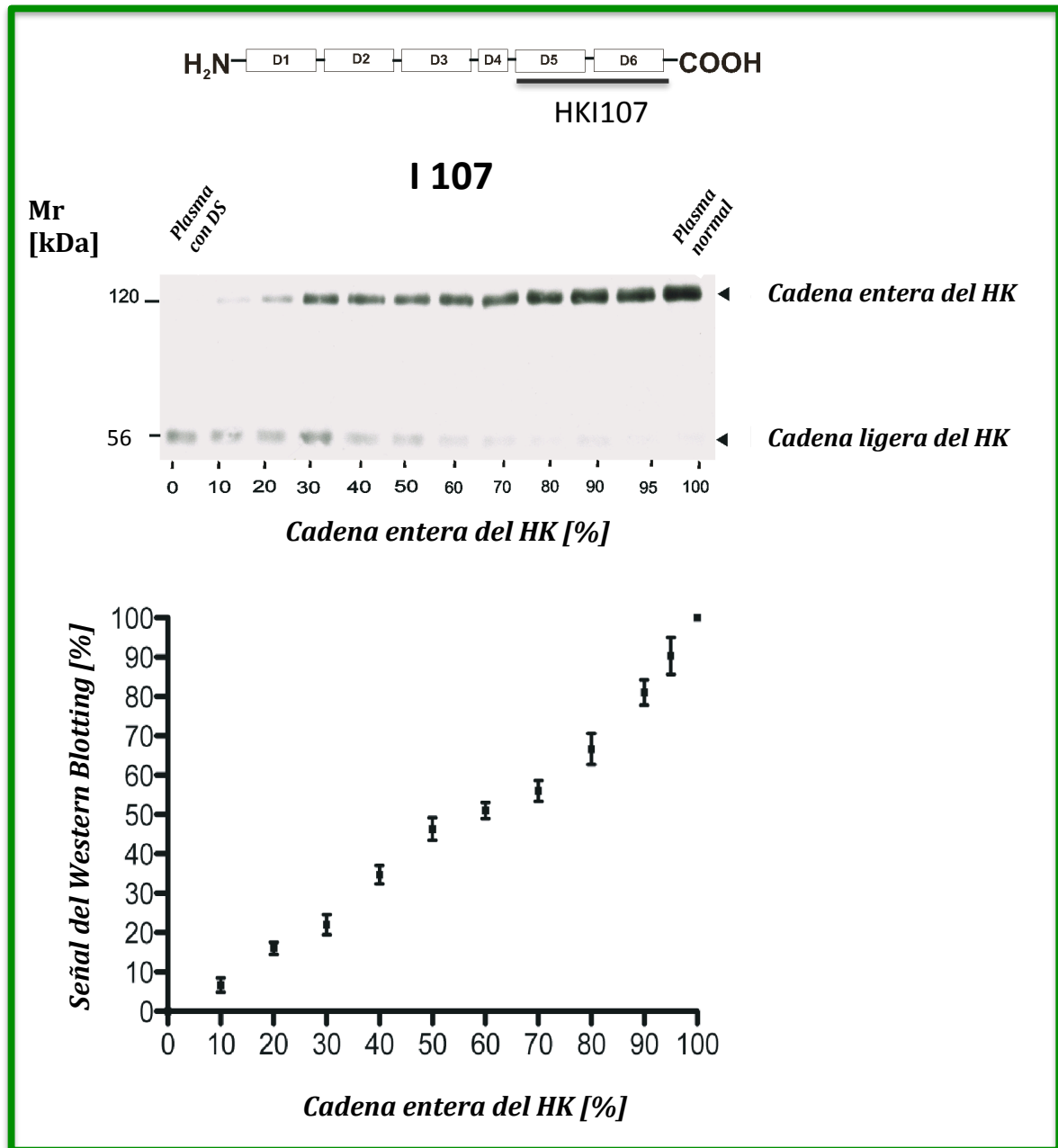


### 7.2.2 Escisión del HK como biomarcador de activación del sistema de contacto

Dado que medir la BK es muy difícil, analizamos la activación del sistema de contacto usando un método específico, sensible y estable de detección de escisión del HK por inmunodetección (detallado en métodos). Si tenemos en cuenta que la cadena completa de HK tiene un peso molecular de unos 120 KDa en un SDS-PAGE en condiciones de reducción y que éste contiene la molécula de BK, si el sistema de contacto está activado, la cadena de HK se escinde (y deja de visualizarse a 120 Kda) y se generan tres cadenas, una de pesada de 65 KDa, una de ligera de 56 y la Bk de 0,9 Kda.

Para poder activar el sistema de contacto, incubamos el plasma humano de un control sano con un activador del sistema de contacto, dextrán sulfato (DS), y pudimos observar que hay una escisión del 100% de la molécula de HK, con la aparición de fragmentos de ésta, y la visualización de la cadena ligera del HK, como se muestra en la primera línea de la **Figura 24**. Se visualiza la cadena ligera del HK porque se utilizó un anticuerpo policlonal I107 contra el dominio 5 y 6 de la cadena ligera (parte superior de la figura 24). Por otro lado, analizamos plasma de un control sano con varios inhibidores del sistema de contacto y observamos que no se producía escisión del HK, ni por lo tanto activación del sistema de contacto, ya que sólo se observaba una molécula de 120 KDa y no sus productos, como se muestra en la última línea de la figura 24. Las distintas diluciones, entre el control sano y el activador del sistema de contacto, muestran los distintos porcentajes de escisión del HK (figura 24). Posteriormente la intensidad de la banda entera del HK fue cuantificada por un escáner

de densitometría y se comparó ésa intensidad con el porcentaje de escisión del HK para después poderlo aplicar a nuestra población de estudio (parte inferior de figura 24).



**Figura 24. Inmunodetección de los distintos porcentajes de escisión del HK y sus productos derivados de la proteólisis.**

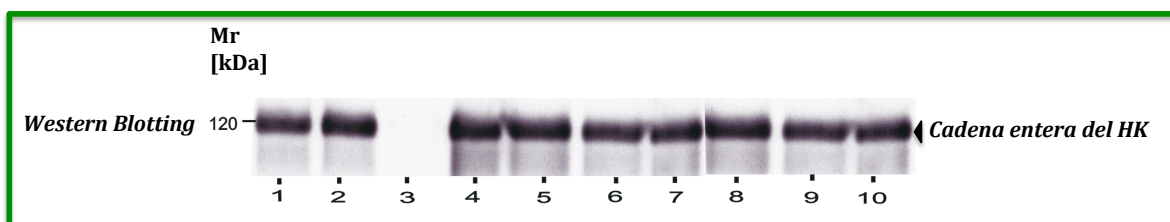
Inmunodetección de la molécula de HK en un plasma estimulado con dextrán sulfato (DS) (primera línea) y plasma normal (última línea), donde se muestra una escisión del HK del 100% y del 0% respectivamente. El plasma normal fue incubado con DS en diferentes concentraciones, separado por SDS-PAGE, y se realizó una inmunodetección con el anticuerpo I107, que es un anticuerpo policlonal contra la cadena ligera del HK (dominio 5 y 6 como se muestra en la parte superior de la figura). En la parte inferior de la figura, se representa la señal de la inmunodetección (*Western blotting*) dependiendo del porcentaje de escisión del HK.

### 7.2.3 Validez interna del plasma para el estudio del sistema de contacto

En la **figura 25** se muestra el resultado del estudio de la estabilidad del sistema de contacto comparando distintas formas de almacenaje del plasma, observando la integridad de la molécula del HK mediante inmunodetección. Sólo en el caso de que haya activación del sistema de contacto, se produce una escisión del HK y como consecuencia desaparece la molécula de HK en el lugar de 120 KDa.

Como se muestra en la figura 25, sólo cuando la muestra recibió varios ciclos de congelación-descongelación se pudo apreciar una activación del sistema de contacto (como se observa en la columna 3), mientras que almacenando las muestras durante unas horas a temperatura ambiente o a 4°C y después congelarlas a -20°C, o congelarlas directamente a -20°, -80°C durante mínimo 6 meses, no se observó ninguna señal de activación del sistema de contacto. Este estudio se repitió 5 veces en distintos controles sanos, siguiendo el mismo procedimiento y obteniendo el mismo resultado.

Todos los plasmas, de los pacientes durante la anafilaxia y en condiciones basales y de los controles, fueron congelados a -20°C por menos de 3 meses y sólo se descongelaron una vez, <15 minutos antes de analizarlos para todos nuestros estudios.



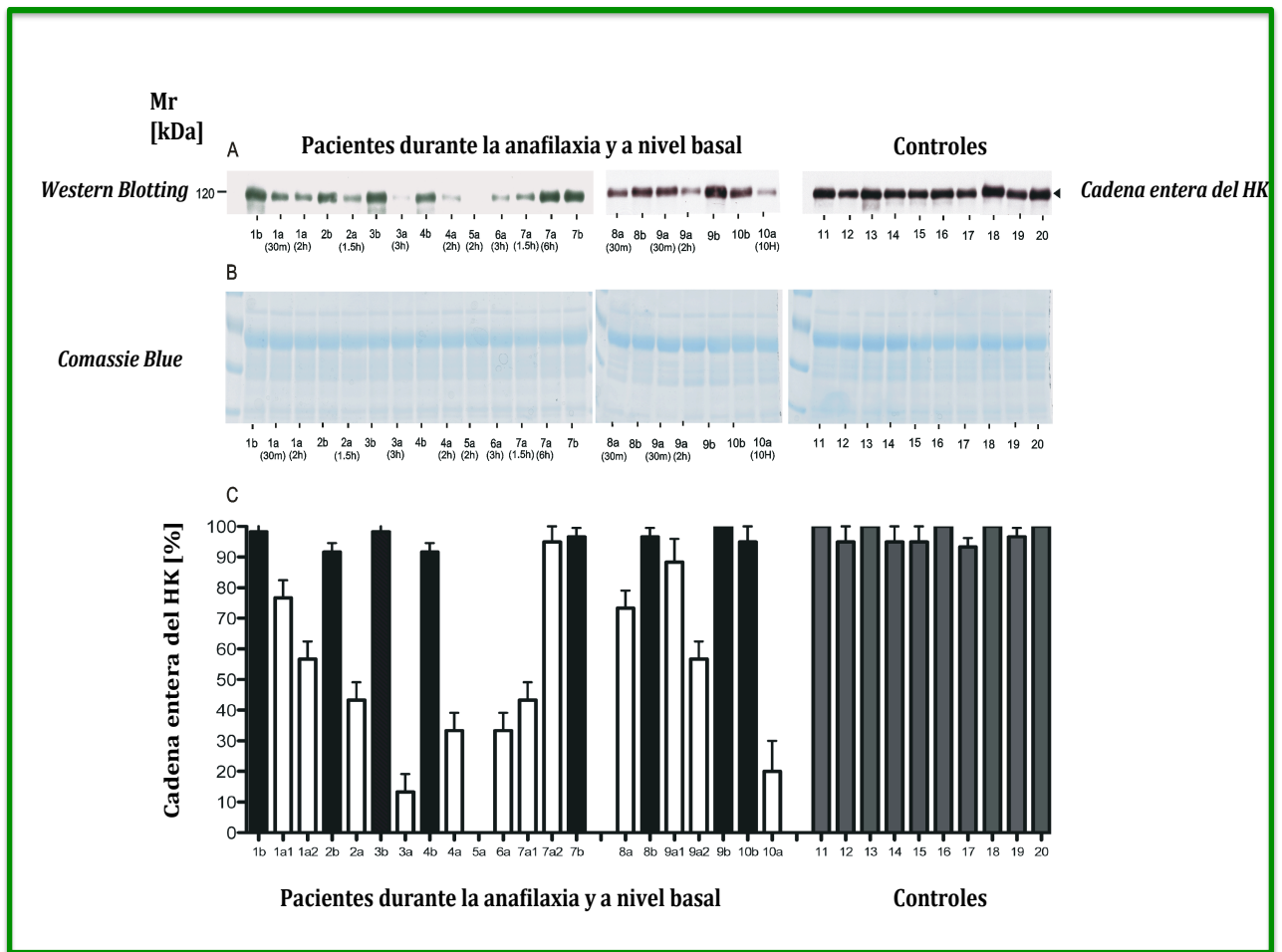
**Figura 25. Inmunodetección de la molécula del HK en las distintas formas de almacenaje del plasma, como prueba de validez interna.** Plasma fresco congelado inmediatamente a  $-20^{\circ}\text{C}$  después de añadirle inhibidores (*columna 1*). Plasma fresco congelado inmediatamente a  $-20^{\circ}\text{C}$  sin inhibidores (*columna 2*). Plasma fresco congelado inmediatamente a  $-20^{\circ}\text{C}$ , con ciclos de descongelación posteriormente y nuevamente congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  (*columna 3*). Plasma fresco congelado inmediatamente a  $-20^{\circ}\text{C}$  (con inhibidores) con ciclos de descongelación-congelación posteriormente y nuevamente congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  (*columna 4*). Plasma fresco a temperatura ambiente durante 6 horas y después congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  (*columna 5*). Plasma fresco a temperatura ambiente durante 24 horas y después congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  (*columna 6*). Plasma fresco en nevera a  $4^{\circ}$  durante 6 horas y después congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  (*columna 7*). Plasma fresco en nevera a  $4^{\circ}$  durante 24 horas y después congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  (*columna 8*). Plasma fresco congelado inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  (*columna 9*). Plasma fresco congelado inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  con inhibidores del sistema de contacto (*columna 10*).

#### 7.2.4 Análisis de la activación del sistema de contacto en pacientes y controles

Analizamos la escisión del HK en el plasma de 10 pacientes durante el episodio de anafilaxia y en condiciones basales y en 10 controles sanos.

En la figura 26.A se muestra la inmunodetección del HK, con el anticuerpo policlonal I107, en los 10 pacientes durante la anafilaxia (a) y en condiciones basales (b) y en los 10 controles. En algunos pacientes (1, 7, 9) la escisión del HK se analizó en distintos tiempos durante la anafilaxia (Fig26.A). La tinción del gel, después del SDS-PAGE, con Coomassie brilliant blue confirma la misma cantidad de proteínas por línea (Fig26.B).

Tal y como se observa en la figura 26.C, el porcentaje de escisión del HK en los pacientes durante la anafilaxia (a) fue mucho más alto que en los mismos pacientes en condiciones basales (b) y que en todos los controles, donde prácticamente no se detectaba escisión del HK.

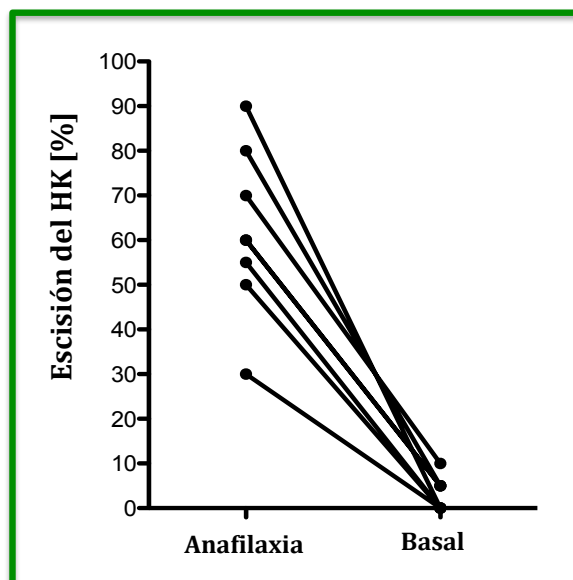


**Figura 26. Escisión del HK en pacientes durante distintos tiempos de la anafilaxia (a) y en condiciones basales (b) y en controles.**

- Se muestra la inmunodetección de la molécula entera del HK en todos los pacientes y controles.
- Se muestra el Comassie blue del gel de todos los pacientes y controles, después de realizar un SDS-PAGE, mostrando la misma cantidad de plasma en cada columna.
- Se muestran los distintos porcentajes de escisión del HK en pacientes durante la anafilaxia (barras blancas), en condiciones basales (barras negras) y en controles (barras grises), dependiendo de la señal de la inmunodetección.

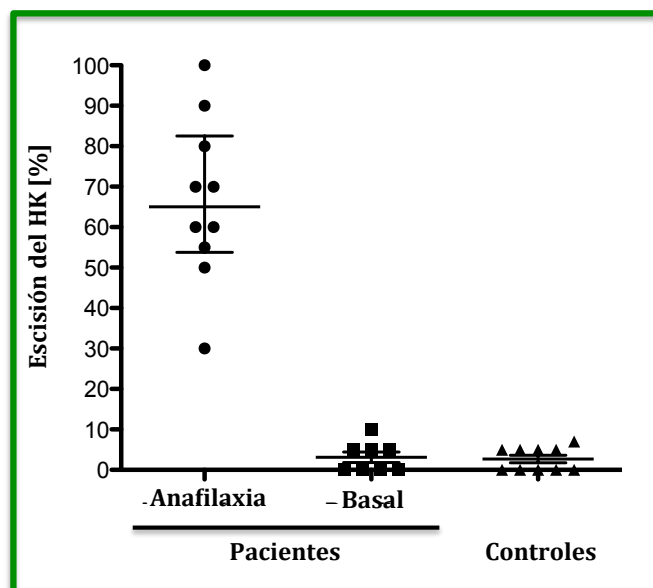
En todos los pacientes, durante la anafilaxia, se detectó una activación del sistema de contacto. Por el contrario en los mismos pacientes pero en condiciones basales, no se detectó prácticamente activación. Tal y como se muestra en la **figura 27**, podemos observar una reducción estadísticamente significativa ( $p=0,0008$ ) entre la escisión del HK en los pacientes durante la anafilaxia, con una mediana del 60% (RIC 51,25-

77,50%; IC del 95% 46,4-77,35) comparando en condiciones basales con una mediana del 2,5% (RIC 0-5% ; IC del 95% 0,1-6,235).



**Figura 27. Porcentaje de escisión del HK en pacientes durante la anafilaxia y en condiciones basales.** La prueba de Wilcoxon para datos apareados demostró una reducción estadísticamente significativa ( $p=0,0008$ ) entre la escisión del HK durante la anafilaxia y en condiciones basales.

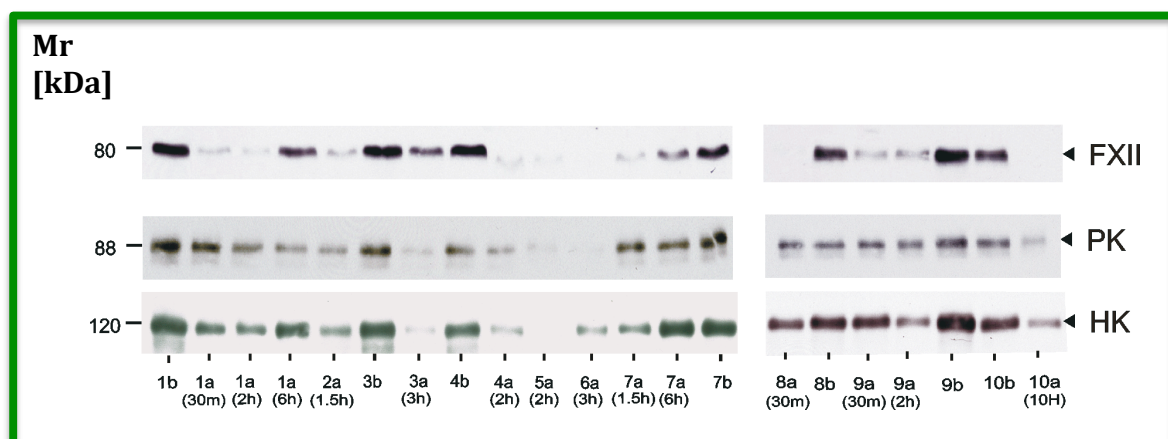
Además, se demostró que no había activación del sistema de contacto en los controles, con una mediana del porcentaje de escisión del HK del 2,5% (RIC 0-5,1; IC del 95% 0,6-4,1) con diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes durante la anafilaxia y los controles ( $p<0,0001$ ), sin encontrar diferencias entre los pacientes en condiciones basales y los controles, tal y como se muestra en la **figura 28**.



**Figura 28. Porcentaje de escisión del HK en pacientes durante la anafilaxia, en condiciones normales y en controles.** Los datos están expresados en mediana y rango intercuartílico. La prueba de Kruskal Wallis muestra diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,0001$ ) entre el porcentaje de escisión del HK durante la anafilaxia comparando en condiciones basales y controles (donde no hay diferencias entre ellos).

### 7.2.5 Inmunodetección del FXII, PK y HK

Para analizar el mecanismo de escisión del HK, analizamos el FXII y PK en todos los pacientes durante la anafilaxia y en condiciones basales (como se muestra en la **figura 29**) para comprobar si había activación en estas dos proteínas también (es decir, si se escindían) y observamos el mismo patrón de escisión que en el HK tanto al realizar la inmunodetección de los pacientes con el anticuerpo del FXII, como con el anticuerpo del PK. Por el contrario no se demostró ninguna escisión al medir el FXI (no se muestran los datos).



**Figura 29. Immunodetección del FXII y del PK, comparando con la inmunodetección del HK en los pacientes durante la anafilaxia (a) y en condiciones basales (b).**

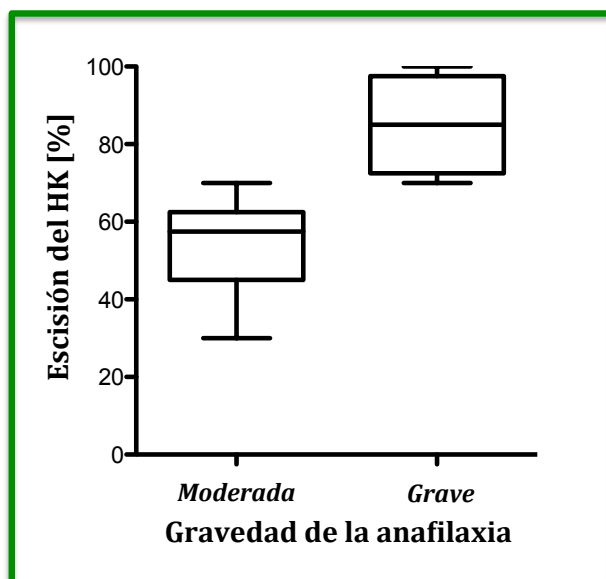
Tal y como se muestra en la figura 29, la inmunodetección indica que la activación de las proteasas del sistema de contacto a través del FXII, es el causante de la escisión del HK.

### 7.2.6 Grados de gravedad de la anafilaxia y correlación con el sistema de contacto

De los 10 pacientes con anafilaxia, 4 (40%) presentaron una anafilaxia grave, 4 (40%) presentaron una anafilaxia moderada B y 2 (20%) presentaron una anafilaxia moderada A, tal y como se muestra en la **Tabla 15**.

Se correlacionó la gravedad de la anafilaxia con el porcentaje de escisión del HK y pudimos comprobar que había una mayor activación del sistema de contacto en los pacientes con anafilaxia grave, con una mediana de la escisión del HK del 85% (RIC 72,5-97,5; IC del 95% 64,4-105,5) comparado con los pacientes con anafilaxia moderada (A y B) que presentaron una mediana del 57,6% (RIC 45,0-62,0; IC del 95% 39,9-68,4), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,018$ ) tal y como se muestra en la **figura 30**.





**Figura 30. Porcentaje de escisión del HK en función de la gravedad de la anafilaxia.** Los gráficos están expresados en mediana y rango intercuartílico. La prueba no paramétrica de U-MannWithney muestra diferencias estadísticamente significativas entre la anafilaxia grave y moderada ( $p=0,018$ ).

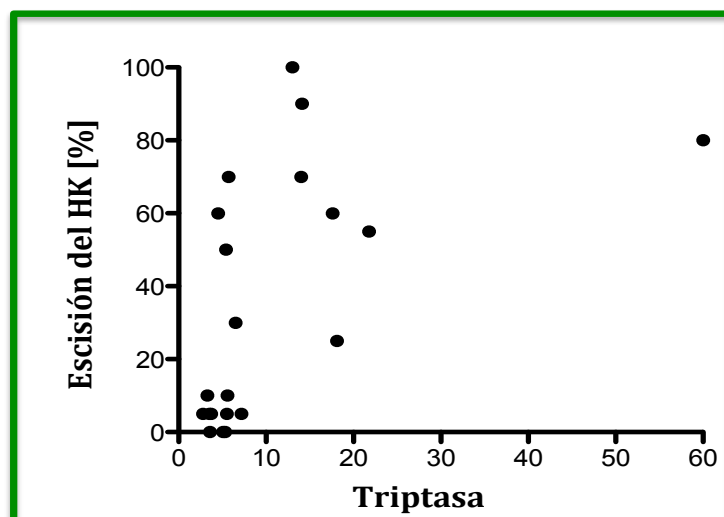
### 7.2.7 Concentración de triptasa sérica en los pacientes con anafilaxia y correlación con la activación del sistema de contacto

A todos los pacientes se les había realizado, como mínimo, una determinación de triptasa sérica durante la anafilaxia y otra en condiciones basales.

La concentración mediana de triptasa sérica durante la anafilaxia fue tan solo de 13,5  $\mu\text{g/L}$  (RIC 11,7  $\mu\text{g/L}$ ; IC del 95% 8-17). No obstante, si observamos a los pacientes de forma individual, podemos ver que sólo 6 de los 10 pacientes (60%) presentaron niveles de triptasa elevados ( $>11,4 \mu\text{g/L}$ ) durante la anafilaxia, tal y como se muestra en la **tabla 14**. Los niveles de triptasa también se correlacionaron bien con la gravedad de la reacción.

Sin embargo, aunque los niveles de triptasa no se mostraron elevados en todos los pacientes, si que hubo una activación del sistema de contacto en todos ellos. No

obstante, si correlacionamos los niveles de triptasa sérica en los pacientes durante la anafilaxia con el porcentaje de escisión del HK, como se muestra en la **figura 31**, podemos observar que existe una correlación positiva entre ellos ( $p=0,0014$ ,  $R$  Spearman  $0,65$ ).



**Figura 31. Correlación de la triptasa sérica en los pacientes durante la anafilaxia con el porcentaje de escisión del HK.** Se muestra una correlación estadísticamente significativa ( $p=0,001$ ,  $R$   $0,65$ ).

### 7.2.8 Evaluación del sistema de la coagulación en pacientes con anafilaxia

Para evaluar la posible implicación de la vía intrínseca de la coagulación en la anafilaxia, a partir de la activación del FXII, determinamos el TTpa en los pacientes durante la anafilaxia y en condiciones basales. Tal y como se muestra en la **tabla 14**, se detectó un alargamiento del TTpa en dos pacientes (nº 3 y 5), en los que posteriormente, en condiciones basales, se normalizó. Curiosamente, éstos dos pacientes presentaron una anafilaxia grave y mostraron en la inmunodetección una escisión del 100% y del 90% del HK respectivamente.

No obstante no podemos discernir si el alargamiento del TTpa es por el consumo de las proteínas del sistema de contacto o por la heparina, o bien por la combinación de los dos efectos.

**Tabla 15. Datos de laboratorio de los pacientes durante la anafilaxia (a) y en condiciones basales (b)**

Número Paciente	Tiempo Extracción*	Escisión del HK [%]	TTpa	Concentración de Triptasa	Grados de gravedad de la anafilaxia
<b>1 a1</b>	30min	25	33,9	18,1	Moderada B
<b>a2</b>	2h	55	29,9	21,8	
<b>b</b>	Basal	0	29,5	5,1	
<b>2 a</b>	1.5h	60	35,3	17,6	Moderada A
<b>b</b>	Basal	5	36,2	5,5	
<b>3 a</b>	3h	90	<b>102</b>	14,1	Grave
<b>b</b>	Basal	0	35,1	3,6	
<b>4 a</b>	2h	70	27,6	14	Grave
<b>b</b>	Basal	5	27,2	3,71	
<b>5 a</b>	2h	100	<b>111</b>	13	Grave
<b>b</b>	Basal	ND	34,6	3,4	
<b>6 a</b>	3h	70	29,5	5,71	Moderada A
<b>b</b>	Basal	ND	27,2	2,5	
<b>7 a1</b>	1.5h	60	35,5	4,5	Moderada B
<b>a2</b>	6h	10	34,8	3,3	
<b>b</b>	Basal	5	34,9	2,8	
<b>8 a</b>	30min	30	38,4	6,5	Moderada B
<b>b</b>	Basal	5	34,7	3,5	
<b>9 a1</b>	30min	10	45,5	5,6	Moderada B
<b>a2</b>	2h	50	39,4	5,4	
<b>b</b>	Basal	0	40,2	5,3	
<b>10 a</b>	10h	80	40,5	60	Grave
<b>b</b>	Basal	5	35,2	7,2	

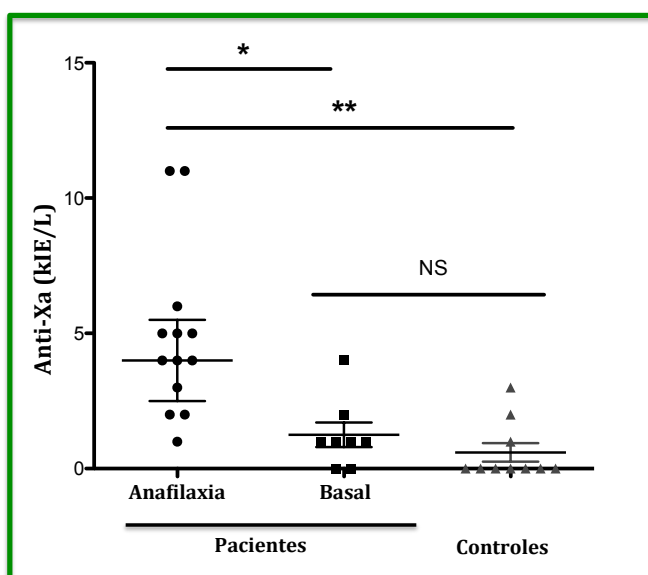
ND: no disponible

### 7.2.9 La heparina inicia la activación del sistema de contacto en pacientes con anafilaxia

La heparina liberada por los mastocitos ha sido identificada como activadora del sistema de contacto por vía FXII en un modelo murino de anafilaxia [116]. En este estudio, se determinaron los niveles plasmáticos de heparina en pacientes durante la anafilaxia y en condiciones normales usando la actividad del anti-FXa, que depende de la interferencia del complejo heparina-antitrombina en la actividad proteolítica del factor X. La actividad del anti-FXa es una medida diagnóstica sensible y específica para

detectar los niveles de heparina, sobretodo en pacientes que están tomando anticoagulantes. Tal y como se muestra en la **figura 32**, la actividad del anti-FXa fue cuatro veces más elevada en los pacientes durante la anafilaxia comparando con los mismos pacientes en condiciones basales (4 kIE/L, RIC 2,5-5,5; CI del 95% 2,98-6,706 versus 1 kIE/L RIC 0,25-1,75; IC 95% 0,1784-2,322 ,  $p=0,0021$ ).

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó la actividad de la heparina entre los controles y los pacientes en condiciones basales (Fig.32).



**Figura 32. Niveles de anti-Xa (kIE/L) en los pacientes durante la anafilaxia y en condiciones basales y en los controles.** Los datos se expresan en mediana y su rango intercuartílico. Tal y como se muestra en la figura no se aprecian diferencias significativas entre los pacientes en condiciones basales y los controles, sin embargo hay diferencias significativas entre los pacientes durante la anafilaxia y en condiciones normales ( $*p=0,0021$ ) y entre los pacientes durante la anafilaxia y los controles ( $**p=0,0007$ ).

## 8 DISCUSIÓN

El conocimiento de la fisiopatología de la anafilaxia es esencial para el avance en el diagnóstico y mejoría en el tratamiento, ya que sigue siendo una patología infradiagnosticada e infratratada. Con este interés se ha planteado el trabajo de la presente Tesis Doctoral, que recoge dos estudios cuyo objetivo principal es mejorar el conocimiento de los biomarcadores mastocitarios implicados en la fisiopatología de la anafilaxia.

Para facilitar la discusión, se seguirá con la estructura propuesta en los objetivos generales de la Tesis.

### 8.1 Primer trabajo

En este primer estudio se seleccionaron a los pacientes que acudieron a urgencias desde Septiembre de 2009 a Septiembre de 2010 y que cumplían criterios clínicos de anafilaxia según los criterios de la NIAID/FAAN [1] y que además tenían como mínimo una determinación de triptasa durante el episodio de anafilaxia y en condiciones basales. Los 102 pacientes incluidos, posteriormente, fueron visitados por un alergólogo quien confirmó el diagnóstico y quien realizó los estudios *in vitro* e *in vivo* pertinentes para llegar al diagnóstico etiológico de la anafilaxia, para poder prevenir, en el caso que fuera posible, nuevos episodios en el futuro y adecuar el tratamiento. Una vez estudiados a todos los pacientes analizamos los resultados de cada uno de los aspectos propuestos en los objetivos del estudio. A continuación se discuten cada uno de éstos aspectos:

### 8.1.1 Triptasa como marcador diagnóstico en la anafilaxia

Aunque la triptasa sérica está considerada un marcador específico de degranulación mastocitaria, y la mejor prueba diagnóstica de anafilaxia disponible en la actualidad, hemos demostrado que no siempre está elevada, ya que en 36,3% de nuestros pacientes no se observó un incremento de la triptasa durante el episodio. Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio monocéntrico con un número tan grande de pacientes con diagnóstico consistente de anafilaxia y con varias determinaciones de triptasa durante el episodio y que evalúe la concentración de éste marcador dependiendo de la gravedad, la etiología y los factores de riesgo. Nuestros resultados están en consonancia con otro amplio estudio, multicéntrico, de Stone y colaboradores [36], quienes encontraron que 36% de los 76 pacientes que incluyeron, no presentaban una triptasa elevada durante la anafilaxia. Sin embargo, en su trabajo observaron que en estos pacientes, en los que la triptasa no se elevó, al realizar la ratio de la triptasa (triptasa durante el episodio/ en condiciones basales), la mayoría presentaban una ratio mayor de dos, sugiriendo liberación mastocitaria y permitiendo diagnosticar a estos pacientes de anafilaxia, como también describe Brown y colaboradores [125] en otro artículo .

En nuestro estudio, aunque obtuvimos la triptasa sérica en distintos tiempos durante la anafilaxia y se realizó una ratio con la basal, en un 60,6% (20/30) de los pacientes con triptasa normal (21,9% del total de todos los pacientes), los niveles de triptasa se mantuvieron estables en todas las determinaciones, incluso en algunos pacientes con anafilaxia grave. Esto es contrario a lo que sugieren varios trabajos descritos anteriormente [36],[125], en los que se propone que una ratio elevada (>2)

puede ayudar a confirmar el diagnóstico de los pacientes con una triptasa sérica no elevada durante el episodio. Esto puede ser debido, a que nosotros hemos incluido en nuestro estudio todas las etiologías y puede que haya algunos alérgenos, como los alimentos (se comentará posteriormente) que sean menos capaces de inducir la liberación de triptasa que otros. Otro interesante estudio es el de Enrique y colaboradores [126], que incluye 30 pacientes con reacciones alérgicas, de los cuales 17 habían presentado una anafilaxia. Determinaron una triptasa durante el episodio y en condiciones basales en todos ellos, y también observaron que los pacientes con anafilaxia presentaban una ratio de triptasa superior a 2 en comparación con los pacientes con urticaria. Además, observaron que unos niveles de triptasa de 8,23 ng/ml tenían una sensibilidad del 94% y especificidad del 92% para la anafilaxia. La limitación más importante de este estudio es que la muestra de pacientes es muy reducida y no se presentan datos referentes a la etiología de la anafilaxia ni a la gravedad de ésta en estos pacientes.

Estudios previos recomiendan obtener la triptasa sérica durante las 3 primeras horas del inicio de los síntomas [127]. Nuestros resultados sugieren que la mejor ventana de oportunidad para el diagnóstico de anafilaxia es entre la primera y segunda hora, ya que posteriormente, decrece rápidamente. De hecho, en nuestro estudio objetivamos que en T1 un 63,7% de los pacientes presentaban triptasa elevada, en T2 un 46,6% y en T3 sólo un 33,3% .

Hay otros estudios que también evalúan la triptasa durante las reacciones alérgicas, como el de Lin y colaboradores [128], quienes a parte de medir la triptasa, también determinaron la histamina en pacientes con reacciones alérgicas, pero sólo una determinación y observaron que la histamina estaba más frecuentemente elevada que la triptasa. De acuerdo con los autores, esto podría ser atribuido a que la mayoría

de los pacientes incluidos habían presentado reacciones leves, mayoritariamente urticaria. El grupo de Laroche y colaboradores, encontraron resultados semejantes en un estudio similar de reacciones alérgicas a fármacos [129]. En comparación con estos últimos estudios, nuestro estudio cobra importancia ya que es de los pocos que mide la triptasa en varios tiempos y en un número muy grande de pacientes con anafilaxia, en un único centro, sin incluir urticarias u otras reacciones leves que pueden inducir a más sesgos a la hora de la interpretación de resultados para valorar la utilidad de la triptasa en el diagnóstico de anafilaxia.

### **8.1.2 Etiología de la anafilaxia según los niveles de triptasa**

Respecto a la etiología de la anafilaxia en nuestros pacientes, los fármacos y los alimentos fueron las causas más frecuentes implicadas en las reacciones. Los fármacos representaron un 50% de todas las anafilaxias y los alimentos un 34,5%. Estos resultados van en consonancia con los resultados descritos en la Guía de Actuación en Anafilaxia (GALAXIA) [11], donde se recoge que en series españolas la anafilaxia por fármacos representa un 46% y por alimentos, un 24%.

Teniendo en cuenta que los alimentos y los fármacos eran los dos grupos más frecuentes, y que las otras etiologías estaban poco representadas, decidimos, para tener más potencia estadística, comparar los niveles de triptasa en cada intervalo de tiempo sólo entre estos dos grupos etiológicos más frecuentes. Pudimos observar que los niveles de triptasa eran significativamente más altos en el grupo de anafilaxia por fármacos (media de 24,14) comparado con el grupo de alimentos (media 16,25). Estos resultados van en consonancia con otros estudios, como el de Sampson y colaboradores [130] quienes observaron que en dos pacientes con anafilaxia fatal por



alimentos no se detectaron niveles elevados de triptasa. Resultados similares se encontraron en un estudio de Yunginger y colaboradores [131] y de Bengtsson y colaboradores [132] donde los pacientes con anafilaxia inducida por alimentos infrecuentemente elevaban los niveles de triptasa sérica. Presumiblemente esto es debido a que la degranulación mastocitaria a nivel local, más que a nivel sistémico, se traduce como una menor concentración de triptasa liberada a circulación y que por lo tanto, menos posibilidad de detectar un aumento de sus niveles séricos en las distintas determinaciones [29],[132]. Otra hipótesis por el cual no se eleva la triptasa en los alimentos, es que en algunas anafilaxias pueden estar implicados mayoritariamente los basófilos más que los mastocitos y dado que éstos no contienen triptasa, no poder detectarla en suero [130].

### **8.1.3 Gravedad de la anafilaxia según los niveles de triptasa**

Se han propuesto varias clasificaciones de gravedad de la anafilaxia, con la finalidad de unificar criterios, pero siguen habiendo diferencias en cada una de ellas. La más utilizada anteriormente, sobretodo por reacciones a himenópteros, es la clasificación de Müller [35], que clasifica la anafilaxia en cuatro grados según su gravedad, pero sólo los grados III y IV corresponden realmente a anafilaxia según la definición FAAN/NIAID. Hay otra clasificación, la de Ring [28], que añade un quinto grado en el que existe paro respiratorio, bradicardia extrema y/o hipotensión o parada cardíaca. Posteriormente el grupo de trabajo en anafilaxia de la Academia Europea de Alergia, Muraro y colaboradores [50], publicaron un artículo de posicionamiento para la población pediátrica, quien clasificó la anafilaxia en leve, moderada y grave. De hecho, recientemente, el grupo de Stoevesandt y colaboradores [133] han realizado un

estudio donde evaluaban las características de los pacientes que habían presentado anafilaxia por himenópteros desde el año 2003 al 2010. En total incluyeron 657 pacientes y usaron la clasificación de Muraro [50] para clasificarlos según la gravedad. Pero el objetivo del trabajo era estudiar los factores de riesgo de éstos pacientes, y no lo correlacionaban con la triptasa durante el episodio, sólo disponían de triptasa basal, por lo que no se ha confirmado si ésta gradación se correlaciona bien con los niveles de triptasa.

No obstante, nosotros hemos escogido la clasificación de Brown y colaboradores [30], la cual posteriormente se ha validado en otro estudio de Stone y colaboradores [36], quienes confirmaron una buena correlación entre el nivel de gravedad de la anafilaxia y los niveles de triptasa. Esta clasificación divide a las reacciones alérgicas en leves, moderadas y graves y hay que destacar que sólo los grados moderados y graves cumplen los criterios diagnósticos de anafilaxia según la FAAN/NIAID. Sin embargo, nosotros realizamos un sub-análisis dentro del grupo de anafilaxia moderada dependiendo de los síntomas de los pacientes. Realizamos éste subanálisis para confirmar una observación, de que los pacientes con clínica gastrointestinal (anafilaxia moderada-A) presentaban niveles de triptasa más bajos que los pacientes con clínica respiratoria o síntomas cardiovasculares (anafilaxia moderada-B). Nuestro estudio pudo confirmar que la clasificación de gravedad modificada de Brown [30] propuesta por nosotros, se correlaciona bien con los niveles de triptasa. Esto es consistente con la idea de que los mastocitos localizados a nivel intestinal contienen, predominantemente quimasa más que triptasa. Por tanto, nuestro estudio, replica los hallazgos encontrados por Stone y colaboradores [36], incluso usando nuestro sistema de gradación de gravedad modificada que además proporciona una información más acurada.

En nuestro estudio, la anafilaxia grave fue la más frecuente, representando un 45,1% de todos los pacientes, seguido por un 41,2% de pacientes con anafilaxia moderada B y un 13,7% de pacientes con anafilaxia moderada A. Esta proporción difiere con otros estudios en los cuales la anafilaxia grave es la menos frecuente, como el estudio de Stoevesand y colaboradores [133] donde sólo un 26% de los pacientes presentaron anafilaxia grave y el de Stone [36] donde un 45% presentaron anafilaxia grave y un 55% anafilaxia moderada. Este número tan elevado de anafilaxias graves en nuestro estudio puede ser debido a que se ha realizado en un hospital de tercer nivel y teniendo en cuenta que las anafilaxias leves son atendidas más frecuentemente en ambulatorios, eso supone que a nuestro hospital se deriven las que son más graves.

La anafilaxia causada por fármacos fue significativamente más grave que la causada por alimentos, ya que el 62,7% de los pacientes con anafilaxia por fármacos presentaron una anafilaxia grave y en cambio en el grupo de los alimentos, sólo el 28,5%. Esto está en consonancia con el estudio de Park y colaboradores [134] que también encontraron que las anafilaxias por fármacos estaban asociadas a más gravedad y presentaban más shock que las anafilaxias por alimentos. Todavía se desconoce el motivo por el cual los fármacos provocan anafilaxia más grave que los alimentos. Una de las hipótesis es la comentada anteriormente, según la cual los alimentos sólo provocan liberación mastocitaria a nivel local intestinal, mientras que los fármacos suelen ser administrados parenteralmente, por lo que llega una concentración alta del fármaco a nivel sanguíneo y puede provocar una liberación más masiva de mediadores mastocitarios, causando una anafilaxia más grave. Otra posible causa podría ser el hecho que la población que más fármacos toma es la de edad avanzada, que tienen más factores de riesgo cardiovascular y que también predisponen a presentar una anafilaxia más grave, a diferencia de los alimentos que ocurren en

gente más joven y que habitualmente tienen menos factores de riesgo. Pero faltan más estudios para poder demostrar estas hipótesis.

#### **8.1.4 Factores de riesgo de la anafilaxia**

Tal y como se ha descrito en varios estudios [135], [27], [16], [136], [137], [138], [139] existen distintos factores que pueden suponer un riesgo de padecer una anafilaxia más grave. Estos factores de riesgo son: la edad avanzada (>65 años), enfermedades concomitantes (enfermedades cardiovasculares, mastocitosis, asma, rinitis y enfermedades psiquiátricas) y uso de medicación concomitante (betabloqueantes, IECA, antidepresivos).

En nuestro estudio, encontramos que la edad avanzada, presentar factores de riesgo cardiovascular y tomar IECA se asociaron más frecuentemente a anafilaxia grave. Estos resultados son consistentes con los estudios anteriores descritos y con las guías de manejo de anafilaxia. Así mismo, coincide con otro estudio reciente de Park y colaboradores [134], donde se analizaron a 294 pacientes con anafilaxia que fueron divididos en dos grupos, aquellos que presentaron anafilaxia grave (con shock) y otros que no. Observaron que los pacientes más mayores, cuando la etiología eran los fármacos y si el paciente era trasladado en ambulancia se asociaba con anafilaxia más grave. No obstante, no evaluaron otros factores de riesgo como la medicación concomitante ni la triptasa.

Contrariamente a lo descrito en las guías, en nuestro estudio no encontramos asociación entre padecer asma grave y presentar anafilaxia grave, sin embargo si que estos pacientes presentaron más clínica respiratoria durante el episodio de anafilaxia. Tampoco encontramos asociación entre padecer rinitis previa o estar en tratamiento

con beta-bloqueantes o antidepresivos, y presentar una anafilaxia grave. Esto podría deberse al reducido tamaño de la muestra de pacientes en estos grupos y que dificultaría alcanzar la potencia estadística necesaria. No obstante, otros estudios están en consonancia con nuestros resultados, como el estudio de Stoevesandt y colaboradores [133], quienes evaluaron a 657 pacientes con anafilaxia por himenópteros y observaron que sólo el hecho de tener una edad avanzada y una triptasa basal más elevada iba asociado a una anafilaxia más grave. Sin embargo, presentar patología respiratoria y tomar medicación concomitante no iba asociado a más riesgo de presentar anafilaxia grave. Por lo tanto, harán falta más estudios, prospectivos, para determinar si éstos factores suponen realmente un riesgo de anafilaxia grave.

Dos pacientes fueron diagnosticados de mastocitosis sistémica, confirmado por biopsia de médula ósea. Ambos presentaron una anafilaxia grave con shock. Esto es consistente con lo publicado en las guías [5], [135], [27] y lógicamente se puede explicar por el aumento de mastocitos que presentan éstos pacientes y por lo tanto, una mayor liberación de mediadores cuando se degranulan los mastocitos.

#### **8.1.5 Tratamiento de la anafilaxia**

Aunque la anafilaxia es una reacción potencialmente mortal que requiere tratamiento urgente, es importante destacar que sólo el 65,7% de los pacientes recibieron adrenalina, que está considerada el tratamiento de elección en estos casos [54], [55], [56]. Sin embargo, los antihistamínicos y los corticoides fueron administrados a todos los pacientes. Este hecho ilustra el infratratamiento de la anafilaxia, ya que aún tratándose de un hospital de tercer nivel, donde los médicos

están más preparados para manejar reacciones graves, la anafilaxia sigue estando infradiagnosticada e infratratada. Por lo que hacen falta más esfuerzos para educar a los profesionales sanitarios para mejorar el manejo de la anafilaxia.

Nuestros resultados son consistentes con otros estudios publicados que también observan un importante infratratamiento en pacientes con anafilaxia. Una publicación reciente de Grabenhenrich y colaboradores [140], en el que se evaluó la implementación de las guías sobre el manejo de la adrenalina en países de habla germánica, que incluía 2114 pacientes con anafilaxia grave de 58 centros distintos, se observó que el porcentaje de pacientes tratados con adrenalina era sorprendentemente bajo (teniendo en cuenta que además evaluaban sólo anafilaxias graves). Sólo el 11,5% recibieron tratamiento con adrenalina (3,9% intramuscular y 7,6% endovenosa). Otro estudio retrospectivo de 208 pacientes con anafilaxia, de Campbell y colaboradores [141], evaluó a cuantos pacientes con anafilaxia se les prescribía la adrenalina en el momento del alta desde urgencias, observando que a sólo un 36% se los pacientes se les prescribía adrenalina y que ésto iba asociado a haber recibido adrenalina en urgencias, por lo que también traducía un infratratamiento de la anafilaxia. Además, observaron que sólo el 31% de los casos se derivaban al Servicio de Alergia para estudio. En otro estudio, Droste y colaboradores [142] evaluaron el manejo de la anafilaxia por 284 médicos de distintos hospitales de Inglaterra y sólo el 14% administra correctamente la adrenalina, tal y como recomiendan las guías. Todos éstos estudios ponen de manifiesto el infradiagnóstico e infratratamiento de la anafilaxia por parte de los propios médicos. De ahí, la importancia de investigar nuevos mediadores, para desarrollar nuevas pruebas *in vitro* rápidas que confirmen el diagnóstico de anafilaxia en urgencias, de esta forma, mejorando el diagnóstico de anafilaxia se mejoraría el tratamiento.

A parte de la falta de reconocimiento del cuadro clínico de la anafilaxia y la subóptima indicación del tratamiento con adrenalina, muchos profesionales se resisten a administrarla por el temor a sus efectos adversos.

No obstante, nuestra experiencia indicaría que es un tratamiento seguro cuando se administra correctamente. Sólo dos pacientes desarrollaron efectos adversos, debidos a una patología de base reconocida como factor de riesgo para presentar efectos adversos (crisis tiro tóxica y cardiopatía isquémica) y más cuando la adrenalina se administra de forma endovenosa. Por ésta razón es muy importante evaluar la relación riesgo/beneficio antes de administrar la adrenalina en pacientes con factores de riesgo. Sheilkh y colaboradores [143], realizaron una revisión Cochrane en el 2012 de todos los estudios que hay publicados sobre el uso de adrenalina en anafilaxia (ensayos clínicos aleatorizados, controlados con placebo o con no intervención). Observaron que ninguno de los 1328 estudios encontrados cumplía los criterios de inclusión. No obstante, teniendo en cuenta que no es ético y por lo tanto, que es muy difícil desarrollar un estudio de estas características, los autores concluyen que la adrenalina, por sus efectos fisiológicos, es el tratamiento de elección y el recomendado en la anafilaxia por los años de experiencia y por los pocos o inexistentes efectos adversos demostrados si se administra adecuadamente durante la anafilaxia.

#### **8.1.6 Limitaciones del estudio**

Existen algunas limitaciones del estudio que se deben puntualizar. La primera es que existe un sesgo de selección en cuanto a la gravedad de la anafilaxia, ya que nuestro estudio incluye a todos los pacientes con anafilaxia que atendieron a urgencias de nuestro hospital, que es un hospital universitario de tercer nivel. Este hecho, supone

que los grupos de gravedad no sean homogéneos. Así por ejemplo, el grupo moderado-A está infrarrepresentado y la mayoría son anafilaxias moderadas-B o graves. Una posible explicación es que los pacientes que acuden a un hospital de tercer nivel, suelen presentar síntomas más graves, ya que los que presentan reacciones leves suelen acudir a sus centros de atención primaria más cercanos a su domicilio. Otra explicación es que las anafilaxias moderadas-A pueden ser más difíciles de reconocer ya que la clínica digestiva puede ser poco llamativa y si no se realiza una anamnesis dirigida puede pasar inadvertida. Por consiguiente, esto va a suponer diagnosticar al paciente sólo de urticaria y consecuentemente, no utilizar la adrenalina.

Finalmente, dado que la anafilaxia se diagnostica por criterios clínicos, y aunque se ha demostrado que éstos tienen una buena sensibilidad y especificidad [144], al no existir una prueba “gold standard” para confirmar el diagnóstico clínico, en algunos casos puede haber habido un diagnóstico falso de anafilaxia.



## **8.2 Segunda parte**

En este segundo estudio, dado que se trataba de un estudio exploratorio, muy costoso metodológicamente, se seleccionaron sólo a los primeros 10 pacientes que acudieron a urgencias desde julio de 2011 a Septiembre de 2011 que cumplían criterios clínicos de anafilaxia según los criterios de la NIAID/FAAN [1] de los cuales se disponía de una muestra de suero para la determinación de triptasa y de una muestra de plasma para el estudio del sistema de contacto, tanto durante el episodio como en condiciones basales. Todos los 10 pacientes incluidos, posteriormente, fueron visitados por un alergólogo quien confirmó el diagnóstico y quien realizó los estudios *in vitro* e *in vivo* pertinentes para llegar al diagnóstico etiológico de la anafilaxia. También se seleccionaron a 10 controles sanos ajustados por sexo y edad. Posteriormente estudiamos el sistema de contacto tal y como se ha explicado en la metodología y se analizaron los resultados de cada uno de los aspectos propuestos en los objetivos del estudio. A continuación se discuten cada uno de éstos aspectos:

### **8.2.1 Escisión del HK como biomarcador de activación del sistema de contacto**

Para evaluar el sistema de contacto en los pacientes con anafilaxia se siguió el esquema planteado en la introducción y desarrollado en el apartado de métodos.

El primer paso consistió en generar una curva estándar de cuantificación del porcentaje de escisión del HK. De ésta forma, posteriormente, en función de la intensidad de la inmunodetección del HK de la curva, en los distintos porcentajes de escisión del HK y por tanto de activación del sistema de contacto, poder medir el

porcentaje de escisión del HK en el plasma de nuestros pacientes y por lo tanto, el porcentaje de activación del sistema de contacto.

Se decidió emplear este sistema, ya que medir directamente la BK es prácticamente imposible, dado que se metaboliza rápidamente, en cuestión de segundos, y aún más si tenemos en cuenta que nuestro estudio se realizó a pacientes que acudían a urgencias en el momento agudo de la anafilaxia y que por lo tanto, el tiempo desde que se realizaba la extracción del plasma hasta que se analizó era largo.

Por dicho motivo, como se ha descrito previamente [145], [95], la única forma de analizar la activación del sistema de contacto es usando un método específico, sensible y estable de detección de la escisión del HK por inmunodetección (detallado en métodos). De esta forma, si en un plasma se detecta la molécula entera del HK (120 KDa aproximadamente) significa que no ha habido escisión del HK y por consiguiente no ha habido producción de BK y activación del sistema de contacto. Contrariamente, si el sistema de contacto es activado, la cadena de HK se escinde (y deja de visualizarse total o parcialmente a nivel de 120 KDa) y se generan tres cadenas, una de pesada de 65 KDa, una de ligera de 56KDa y la BK de 0,9 KDa.

Tras demostrar que nuestra curva estándar era reproducible y estable, ya que se repitió el experimento 5 veces con unos resultados prácticamente idénticos, se procedió a estudiar el sistema de contacto en nuestros pacientes.

No obstante, para confirmar que las muestras de nuestros pacientes no habían sufrido ninguna activación previa y que tenían validez para el estudio, realizamos un estudio sobre la estabilidad del sistema de contacto dependiendo de la forma de almacenaje del plasma, ya que no encontramos ningún estudio sobre esto en la literatura. Pudimos concluir (como se muestra en la figura 25) que sólo en el caso de producirse varios ciclos de congelación-descongelación el sistema se activaba. Este

estudio se repitió 5 veces en distintos controles sanos, siguiendo el mismo procedimiento y obteniendo el mismo resultado. Por lo tanto, teniendo en cuenta que todas las muestras de los pacientes usados en nuestro estudio fueron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  y sólo se descongelaron una vez, menos de 15 minutos antes de analizarlos, demostramos la validez interna de las muestras para poder realizar el estudio del sistema de contacto.

### **8.2.2 El sistema de contacto durante la anafilaxia**

En el presente estudio se demuestra que todos los pacientes presentaban una importante proteólisis del HK durante la anafilaxia, por lo tanto se demuestra una activación del sistema de contacto en todos los pacientes. Como se ha comentado anteriormente en la introducción, la activación y la escisión del HK produce la formación de la BK, la cual es bien conocida por sus propiedades inflamatorias [67], [95]. Además, esa escisión del HK en los pacientes durante la anafilaxia no se observó en los mismos pacientes en condiciones basales ni en los controles, sugiriendo que el sistema de contacto, en concreto la BK, puede tener un importante rol en la fisiopatología de la anafilaxia. El azul de Coomassie confirma la misma cantidad de albúmina plasmática en cada línea. Las pruebas se repitieron tres veces, con los mismos resultados siempre, demostrando la fiabilidad de los resultados.

Nuestros resultados están en consonancia con el estudio de Van der Linden y colaboradores [115], quienes evaluaron la activación del sistema de contacto en 12 pacientes con anafilaxia por veneno de abeja después de provocarlos, y encontraron una activación del sistema de contacto en algunos de sus pacientes (sólo en siete). No encontraron activación en ningún control ni en los mismos pacientes en situación

basal. No obstante, hay que remarcar, que los casos que incluyeron como anafilaxia, en su mayoría sólo presentaron urticaria y angioedema, por lo que no cumplían los criterios de anafilaxia FAAN/NIAID. Esto puede explicar porque sólo en algunos pacientes se detectó una activación del sistema de contacto, que interesantemente fueron los que habían presentado shock o una clínica más grave. En la actualidad, no existen otros estudios, que nosotros conozcamos, sobre la implicación del sistema de contacto en la anafilaxia. De hecho, este único estudio de Van der Linden y colaboradores [115] sólo incluyeron reacciones por himenópteros, que ya es conocido, que los propios venenos son capaces de activar el sistema de contacto por si solos. En el estudio de Bohrer y colaboradores [146], demostraron que el veneno inyectado por la picadura de *Lonomia obliqua* provocaba una activación del sistema de contacto, con liberación de BK, y edema e hipotensión y muerte. Además, demostraron en un modelo murino, que si trataban a los ratones con inhibidores del RBK2, la hipotensión y el edema se reducía significativamente en comparación a las no tratadas, por lo que los resultados demostraban la implicación directa del sistema de contacto en la sintomatología causada por el veneno.

Sin embargo, no hay ningún estudio, que haya demostrado la implicación del sistema de contacto durante la anafilaxia en otras etiologías.

Por todo ello, los resultados de nuestro estudio son de gran importancia, ya que suponen un avance en el conocimiento fisiopatológico de la anafilaxia, por ser el primer estudio realizado en humanos, que demuestra la activación del sistema de contacto durante un episodio de anafilaxia (de etiología diferente a la alergia al veneno de himenópteros). Además es el único estudio que ofrece un control interno del almacenaje de las muestras, con una curva estándar de proteólisis del HK, confirmando una mayor validez a los resultados.

Posteriormente, para descubrir la vía responsable de activación del HK, analizamos si había activación también en la molécula del FXII y de la PK en nuestros pacientes y observamos el mismo patrón de proteólisis que con el HK en todos los pacientes durante la anafilaxia y en ninguno en situación basal. Esto sugiere que la activación del HK y por lo tanto, la formación de BK era por vía del FXII. Estos resultados son consistentes con el estudio realizado por Oschatz y colaboradores [116], quienes estudiaron en un modelo murino de anafilaxia el papel de la heparina del mastocito en la activación del sistema de contacto y objetivaron que durante la anafilaxia se producía una extensa proteólisis del HK con liberación de BK . Además, demostraron que ésta activación era a partir de la activación del FXII y de la PK secundaria a la carga negativa de la heparina liberada por los mastocitos, tal y como se ha descrito en la introducción. Por dicho motivo, posteriormente procedimos a estudiar el sistema de la coagulación para poder determinar de forma indirecta un posible liberación de heparina por parte de los mastocitos que pudiera explicar la activación del FXII con la consecuente formación de BK (estos resultados se discuten más adelante).

### **8.2.3 Gravedad de la anafilaxia y activación del sistema de contacto**

Se han propuesto varias clasificaciones de gravedad de la anafilaxia, discutidas ya en la primera parte de la Tesis. La clasificación de Brown y colaboradores [30], ha demostrado tener una buena correlación entre el nivel de gravedad de la anafilaxia y los niveles de triptasa y es la que se ha usado para el presente estudio. No obstante, teniendo en cuenta que en el estudio previo demostramos que ésta clasificación modificada [realizando una subdivisión entre moderada A (con síntomas digestivos) y

B (con síntomas respiratorios)], aportaba más información, hemos aplicado también esta sub-clasificación en éste segundo estudio.

En el primer estudio pudimos observar que los pacientes que presentaron una anafilaxia grave, presentaban una activación del sistema de contacto significativamente más importante que los demás. De hecho, en el paciente número 5, que presentó un shock anafiláctico, se observó una activación total (escisión total del HK) del sistema de contacto. Esto iría en consonancia con el estudio de Van der Linden y cols [115], quienes encontraron unos niveles de escisión del HK más altos en los pacientes que presentaron un shock anafiláctico por veneno de abeja que en los que no.

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el sistema de contacto es clave en los efectos vasculares de nuestros pacientes con anafilaxia, dato ya sugerido pero no demostrado con anterioridad por Kaplan [147].

Ayudando estos resultados, está el estudio de Summers y colaboradores [148]. Se trata de un estudio en el que se incluyeron 1094 pacientes alérgicos a frutos secos y donde el objetivo era determinar factores predictivos de riesgo de anafilaxia grave y de edema laríngeo grave. En 122 de éstos pacientes, se estudiaron los niveles de ECA y observaron que los niños con niveles bajos de ECA (que inactiva la bradicinina) tenían 9 veces más de riesgo de presentar reacciones más intensas con edema laríngeo grave. Estos datos sugieren que niveles altos de BK son los responsables de la hipotensión y del edema laríngeo grave, en consonancia con nuestros hallazgos ya que los pacientes con más escisión del HK (por lo tanto más producción de BK) presentaron anafilaxias más graves asociadas con hipotensión.

Otro estudio que está en consonancia con nuestros resultados, es el estudio de Corbier y cols [149], donde demostraron en un modelo murino de ratas el papel del sistema de contacto en los efectos vasculares después de la administración de heparina

contaminada por OSCS. El grupo de Corbier quiso estudiar el efecto de la heparina contaminada por OSCS en las ratas, ya que como se ha explicado en la introducción, esta heparina contaminada se había administrado en el 2007-2008 provocando muchos efectos adversos, entre ellos reacciones anafilácticas con hipotensión importante como síntoma más frecuente [150]. Posteriormente se demostró que la hipotensión presentada en éstos pacientes era debida a una activación del sistema de contacto, a partir de la activación del FXII por un contaminante polianiónico de las heparinas, conduciendo a la formación de BK [20]. Ya se había descrito previamente que los polianiones (como el dextran sulfato y el condroitín sulfato) y los polisacáridos altamente sulfatados tenían una importante carga negativa que era capaz de iniciar la activación del sistema de contacto [151], [152]. Posteriormente, Li y cols [153], proponen éste mecanismo como el causante de la generación de BK y además explican que el mecanismo por el cual la heparina actúa sobre el sistema de contacto es distinto a la heparina contaminada con OSCS, que tiene unas características moleculares distintas y se une fuertemente al FXIIa activado, a diferencia de la heparina cuya acción inhibitoria se produce a través de la antitrombina III.

Por todo ello, el grupo de Corbier [149] estudiaron, en ratas, el efecto de la heparina contaminada-OSCS sobre el sistema cardiovascular y observaron que cuando las ratas habían estado pretratadas con inhibidores del receptor 2 de la BK, no presentaban hipotensión después de la inyección de heparina contaminada-OSCS. Sin embargo, si se habían pretratado con antihistamínicos solamente, los efectos se mantenían. Por lo que sus datos, sugieren que la BK es la responsable de los efectos vasculares (hipotensión) que se produjeron en las ratas, secundarios a la administración de heparina contaminada-OSCS. Otro estudio apunta al mismo mecanismo. El-Mas y colaboradores [154], también en ratas, demostraron que un

aumento de los receptores B2 de la BK junto con un aumento de la expresión del ACE producidos por la ingesta crónica de alcohol, era la responsable de que la administración de enalapril (IECA) a estas ratas, produjera más hipotensión que en las que no habían consumido alcohol, que tenían niveles más bajos de R2BK y por lo tanto hacía que la BK no pudiera unirse tanto a sus receptores y no provocara hipotensión.

#### **8.2.4 La triptasa y el sistema de contacto**

En nuestro estudio, aunque todas las reacciones eran consistentes con anafilaxia y el suero y plasma se obtuvieron en distintos tiempos, en el 40% de los pacientes la triptasa permaneció normal. Esto está en consonancia con los resultados de otro estudio de Stone y cols [36] comentado anteriormente, quienes encontraron que en un 36% de los pacientes con anafilaxia la triptasa permanecía normal, al igual que en nuestro anterior estudio donde encontramos que de 102 pacientes con anafilaxia, en 36,6% la triptasa permanecía normal.

No obstante, aunque la triptasa permaneció normal en algunos de nuestros pacientes, encontramos activación del sistema de contacto en todos los pacientes con anafilaxia. Esto es importante, ya que puede ayudar a encontrar marcadores más sensibles que la triptasa (que ya se ha demostrado que no es un marcador óptimo), como por ejemplo algunos productos del sistema de contacto, y así llegar a disponer de un marcador “gold standard” para apoyar el diagnóstico clínico de la anafilaxia. Sin embargo, si se pudo hallar una correlación positiva entre los niveles de triptasa y el grado de activación del sistema de contacto.

Es el primer estudio, según nuestro conocimiento, en el que se correlacionan los niveles de triptasa con la activación del sistema de contacto durante la anafilaxia.



### 8.2.5 El sistema de la coagulación durante la anafilaxia

El FXII, como se ha descrito en la introducción, activa el sistema de contacto produciendo BK, pero además puede producir la activación de la vía intrínseca de la coagulación a partir de la activación del FXI. Teniendo en cuenta que en nuestros pacientes existe una activación del sistema de contacto secundario a una activación del FXII, quisimos comprobar también, si había afectación de la vía intrínseca de la coagulación durante la anafilaxia. Para estudiar la vía intrínseca de la coagulación medimos el TTpa en todos nuestros pacientes. Observamos que en dos de ellos (el número 3 y el número 5) había un alargamiento importante del TTpa. Sin embargo, no presentaron ningún proceso hemorrágico. Interesantemente, los dos pacientes con alargamiento del TTpa son los que presentaban una escisión del 100% del HK (es decir, no se detectaba en la inmunodetección, sólo sus productos de degradación), sugiriendo que el aumento del TTpa podría ser debido a un consumo del FXII y de todos los factores implicados en el sistema de contacto.

En un estudio de Cheng y colaboradores [155], estudiaron el efecto del FXII y del FXI en la formación del trombo en modelos de ratones con déficit de FXII y FXI. Observaron que los ratones con déficit de FXII presentaban un alargamiento del TTpa, y más resistencia a la formación del trombo que los deficitarios de FXI, sin embargo no presentaban más riesgo de sangrado. Estos resultados irían en consonancia con los de nuestro estudio, en el que los dos pacientes con escisión total del HK y del FXII, por lo tanto, con consumo de estos factores, presentaron un alargamiento del TTpa y sin embargo, no presentaron ningún sangrado durante el episodio.

En otro estudio de Lombardini y colaboradores [156], de un solo paciente con anafilaxia por veneno de abeja, encontraron también, en consonancia con nuestros resultados, un aumento del TTPa junto con un aumento del anti-Xa y disminución del fibrinógeno con aumento del D-Dímero. La hipótesis que sugieren es que la triptasa es la responsable de éstos hallazgos, ya que escinde la cadena alfa y beta del fibrinógeno y que por lo tanto el aumento de TTPa igual como la hiperfibrinogenolisis, puede ser secundario a una disminución del fibrinógeno, aunque añaden que el aumento de anti-Xa puede ser secundario a la heparina mastocitaria. Igual que en nuestro estudio, este paciente no presento ningún sangrado. Posteriormente, el grupo de Kounis y cols [157] respondieron a éste caso argumentando los resultados. Sugerían también que el efecto de la hiperfibrinogenolisis podría ser por los propios mediadores mastocitarios, ya que la triptasa degrada el fibrinógeno [158] y además puede activar la urokinasa [159]. Por otro lado, la quimasa puede inactivar a la trombina [160]. Además, los mastocitos son los únicos que contienen una cantidad importante de heparina, que aunque no ejerce actividad fibrinolítica, previene la coagulación actuando como cofactor en la antitrombina [161], y además se ha descrito que es un potente cofactor de la triptasa y del activador del plasminógeno tisular [162]. Kounis y colaboradores [157] después de argumentar esto, añaden que esto explicaría porque pocos pacientes desarrollan cambios electrocardiográficos durante los episodios de anafilaxia (el denominado síndrome de Kounis [163]).

Además, según demostraron recientemente el grupo de Oschatz y colaboradores [115], en un modelo murino de anafilaxia, la heparina liberada por los mastocitos durante la anafilaxia era la responsable por su carga negativa de producir una autoactivación del FXII. Teniendo en cuenta que uno de los efectos de la heparina es ser el cofactor de la antitrombina, que inhibe el FXa, midiendo el anti-Xa, como se ha

descrito en la introducción, se pueden monitorizar los niveles de heparina en sangre de forma indirecta. De hecho es el marcador que se utiliza para monitorizar a los pacientes que están en tratamiento con heparina [111]. Por éste motivo, decidimos también evaluar el anti-Xa y pudimos observar, de acuerdo con los resultados del estudio de Oschatz [115] y de Lombardini [156], que la concentración del anti-Xa estaba cuatro veces más elevada en los pacientes durante la anafilaxia comparado con los mismos pacientes en condiciones basales y con los controles. Por lo que esto sugiere una liberación de heparina durante la anafilaxia por parte de los mastocitos y por lo tanto puede explicar el mecanismo fisiopatológico por el cual se activa el sistema de contacto con la consecuente producción de BK, responsable de los síntomas.

Teniendo en cuenta que hemos demostrado un aumento del anti-XA durante la anafilaxia, es decir, un aumento de heparina y también una activación del FXII en nuestros pacientes, no podemos discernir si el alargamiento del TTpa que hemos encontrado en algunos de nuestros pacientes es por el consumo de FXII, por la propia heparina, o bien por la combinación de los dos efectos. Esto mismo se plantearon Oschartz y colaboradores [115], ya que encontraron en los ratones, después de realizarles la provocación con alérgeno, un TTpa muy alargado. Ellos demuestran que el aumento de heparina detectada en plasma fue suficiente para activar la formación de BK. Inicialmente, las pequeñas cantidades de heparina secretada por parte de los mastocitos, pueden generar BK que actuará a la superficie de los mastocitos ya que expresan receptor 2 de la BK [164] y la BK induce la degranulación mastocitaria [165]. Teniendo en cuenta este circuito, un formación inicial de BK puede multiplicar la liberación de heparina y por lo tanto desencadenar una gran activación del sistema de contacto. El FXIIa puede iniciar varias cascadas de proteasas en plasma, desde el sistema de las cininas, a la vía intrínseca de la coagulación, del complemento y al

sistema fibrinolítico [99]. De hecho, el grupo de Renné y colaboradores [103] han descrito recientemente que el FXIIa inicia la formación de fibrina que es esencial para la formación del trombo [166] y para la reperfusión en modelos experimentales de isquemia. Además, describieron que la actividad procoagulante del FXII es debida a la secreción de un polímero inorgánico de las plaquetas, el polifosfato. El polifosfato activa el FXII, y éste activará a sus substratos, el FXI y la PK, conduciendo a una activación de la vía intrínseca de la coagulación y del sistema de contacto, respectivamente [167]. Por el contrario, la heparina parece que específicamente activa el FXII para la formación de BK, sin tener acción proteolítica sobre el FXI [115]. Esto podría explicar porque en la anafilaxia, en la mayoría de pacientes no se produce un alargamiento del TTPa, ya que son necesarios niveles muy altos de heparina o bien consumo completo del FXII para que se produzca.

Otra cuestión que nos planteamos, es que si la heparina es capaz de activar el sistema de contacto, porque los pacientes que están bajo tratamiento con heparina no presentan desórdenes en éste sistema de forma habitual. Revisando la literatura podemos responder a esto, porque los procesos de purificación de la heparina, modifican su estructura haciendo que sea incapaz de activar el sistema de contacto [168], [169].

A parte de describirse la implicación del sistema de contacto en otras enfermedades alérgicas, como en el asma [113] y en la rinitis [114] (ver introducción), también se ha implicado en otras patologías como en la sepsis [170], en la colitis ulcerosa y enterocolitis [171],[172], en la enfermedad de alzheimer [173] y en niños con vasculitis [174]. Esto sugiere que una activación incontrolada del sistema de contacto puede estar implicada en la fisiopatología de distintas enfermedades de muy diversa causa.

No obstante, en la patología donde se ha podido estudiar más este sistema y que ha permitido un avance más grande en el entendimiento de la fisiopatología del sistema de contacto es en el angioedema hereditario (AEH) [175]. Los pacientes con AEH presentan brotes de angioedema relacionados con un aumento de la BK. Al igual que ocurre en los pacientes con anafilaxia, en los pacientes con AEH, la activación del FXII no se acompaña de un aumento de riesgo protrombótico [176].

### **8.2.6 Limitaciones del estudio**

Existen algunas limitaciones del estudio que se deben puntualizar. La primera es que dado que es un estudio exploratorio, la muestra de pacientes incluidos es pequeña, por lo que la potencia estadística de los cálculos es limitada. De todas formas, al demostrar que existe una activación del sistema de contacto en todos los pacientes durante la anafilaxia y no en condiciones basales ni en los controles, ya es un hallazgo muy relevante, y abre una línea de investigación prometedora en el estudio de los mecanismos patogénicos de la anafilaxia y sobre potenciales biomarcadores diagnósticos.

Otra limitación es que no hemos podido medir directamente la BK y que la activación del sistema de contacto la hemos demostrado por inmunodetección a partir de la escisión del HK, que de forma indirecta se traduce como formación de BK. No obstante, como se ha comentado previamente, resulta muy difícil detectarla ya que se degrada en pocos segundos. Además, aun es más complicado cuando la muestra es con pacientes que no están en ningún ensayo sino que acuden a urgencias cuando tienen una reacción alérgica.

Finalmente, dado que la anafilaxia se diagnostica por criterios clínicos, y aunque se ha demostrado que éstos tienen una buena sensibilidad y especificidad [144], al no existir una prueba “gold standard” para confirmar el diagnóstico, en algunos casos puede haber habido un diagnóstico falsamente positivo.

## 9 CONCLUSIONES

Analizando los resultados de éstos dos trabajos se puede concluir que:

1. Hemos demostrado que la triptasa no es un marcador óptimo para el diagnóstico de anafilaxia, ya que sólo estuvo elevada en un 63% de los pacientes con diagnóstico clínico confirmado de anafilaxia.
2. Hemos demostrado una buena correlación entre los niveles de triptasa y la gravedad de la reacción empleando la gradación de Brown con una modificación propia que nos ofrece más información.
3. La anafilaxia producida por fármacos se asocia a anafilaxia más grave y a niveles más altos de triptasa sérica en comparación con la anafilaxia producida por alimentos
4. Hemos demostrado que la edad avanzada (>65años) y los factores de riesgo cardiovascular se asocian a anafilaxia más grave.
5. Hemos demostrado que existe una activación del sistema de contacto en todos los pacientes con anafilaxia y en ningún paciente control.
6. Hemos demostrado que existe una mayor activación del sistema de contacto en los pacientes con anafilaxia grave
7. Hemos observado una buena correlación entre los niveles de triptasa sérica y la activación del sistema de contacto
8. Hemos demostrado un aumento de anti-Xa en los pacientes durante la anafilaxia, sugiriendo una posible acción de la heparina como activadora del sistema de contacto.

9. Hemos demostrado un alargamiento del TTPa en pacientes con consumo total del FXII



## 10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sampson HA, Munoz-Furlong A, Campbell RL, Adkinson NF, Jr., Bock SA, Branum A, *et al.* Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report--Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *J Allergy Clin Immunol* 2006,**117**:391-397.
2. Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Brujnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, *et al.* A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 2001,**56**:813-824.
3. Cardona Dahl V. [Guideline for the management of anaphylaxis]. *Med Clin (Barc)* 2011,**136**:349-355.
4. Marques L BM, Granel C, Guspí R. Anafilaxia. In: *Tratado de Alergología de la SEAIC*. Edited by Pelaez A DI. Ergon ed. Madrid; 2007. pp. 1633-1655.
5. Simons FE. Anaphylaxis: Recent advances in assessment and treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2009,**124**:625-636; quiz 637-628.
6. Simons FE, Sampson HA. Anaphylaxis epidemic: fact or fiction? *J Allergy Clin Immunol* 2008,**122**:1166-1168.
7. Lieberman P, Camargo CA, Jr., Bohlke K, Jick H, Miller RL, Sheikh A, *et al.* Epidemiology of anaphylaxis: findings of the American College of Allergy, Asthma and Immunology Epidemiology of Anaphylaxis Working Group. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006,**97**:596-602.
8. Yocum MW, Butterfield JH, Klein JS, Volcheck GW, Schroeder DR, Silverstein MD. Epidemiology of anaphylaxis in Olmsted County: A population-based study. *J Allergy Clin Immunol* 1999,**104**:452-456.
9. Golden DB. What is anaphylaxis? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007,**7**:331-336.
10. Brown AF, McKinnon D, Chu K. Emergency department anaphylaxis: A review of 142 patients in a single year. *J Allergy Clin Immunol* 2001,**108**:861-866.
11. V C. *Guía de Actuación en Anafilaxia*. Editorial Elsevier ed; 2009.
12. Fernandez Rivas M. Food allergy in Alergologica-2005. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009,**19 Suppl 2**:37-44.
13. Gamboa PM. The epidemiology of drug allergy-related consultations in Spanish Allergology services: Alergologica-2005. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009,**19 Suppl 2**:45-50.
14. Acero S TA, Garcia BE, Echechipia S, Olaguibel JM. Anafilaxia: diagnóstico etiológico. *Alergol Inmunol Clin* 1999,**14**:133-137.
15. Coombs RR. The Jack Pepys Lecture. The hypersensitivity reactions--some personal reflections. *Clin Exp Allergy* 1992,**22**:673-680.
16. Simons FE, Frew AJ, Ansotegui IJ, Bochner BS, Golden DB, Finkelman FD, *et al.* Risk assessment in anaphylaxis: current and future approaches. *J Allergy Clin Immunol* 2007,**120**:S2-24.
17. Rivera J, Gilfillan AM. Molecular regulation of mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 2006,**117**:1214-1225; quiz 1226.
18. Greenberger PA, Ditto AM. Chapter 24: anaphylaxis. *Allergy Asthma Proc* 2012,**33 Suppl 1**:80-83.

19. Labrador-Horrillo MyML, L. Compendio Iconográfico de Inmunología. 2005:78-80.
20. Schwartz LB. Heparin comes clean. *N Engl J Med* 2008,**358**:2505-2509.
21. Kalesnikoff J, Galli SJ. New developments in mast cell biology. *Nat Immunol* 2008,**9**:1215-1223.
22. Abraham SN, St John AL. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol* 2010,**10**:440-452.
23. Cheifetz A, Smedley M, Martin S, Reiter M, Leone G, Mayer L, *et al.* The incidence and management of infusion reactions to infliximab: a large center experience. *Am J Gastroenterol* 2003,**98**:1315-1324.
24. Finkelman FD. Anaphylaxis: lessons from mouse models. *J Allergy Clin Immunol* 2007,**120**:506-515; quiz 516-507.
25. Zanoni G, Puccetti A, Dolcino M, Simone R, Peretti A, Ferro A, *et al.* Dextran-specific IgG response in hypersensitivity reactions to measles-mumps-rubella vaccine. *J Allergy Clin Immunol* 2008,**122**:1233-1235.
26. Kishimoto TK, Viswanathan K, Ganguly T, Elankumaran S, Smith S, Pelzer K, *et al.* Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact system. *N Engl J Med* 2008,**358**:2457-2467.
27. Simons FE, Arduzzo LR, Bilo MB, El-Gamal YM, Ledford DK, Ring J, *et al.* World Allergy Organization anaphylaxis guidelines: summary. *J Allergy Clin Immunol* 2011,**127**:587-593 e581-522.
28. Ring J, Behrendt H. Anaphylaxis and anaphylactoid reactions. Classification and pathophysiology. *Clin Rev Allergy Immunol* 1999,**17**:387-399.
29. Lieberman P. Anaphylaxis and anaphylactoid reactions. In: *Middleton's Allergy Principles and Practice 7th Edition*. Edited by Adkinson N. F. BBS, Busse W.W., Holgate S.T., Lemanske R.K, Simons FER. Mosby Elsevier ed. Philadelphia; 2009. pp. 1027-1049.
30. Brown SG. Clinical features and severity grading of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2004,**114**:371-376.
31. Gonzalo-Garijo MA, Perez-Rangel I, Alvarado-Izquierdo MI, Perez-Calderon R, Sanchez-Vega S, Zambonino MA. Metrorrhagia as an uncommon symptom of anaphylaxis. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010,**20**:540-541.
32. Mingomataj EC, Bakiri AH. Episodic hemorrhage during honeybee venom anaphylaxis: potential mechanisms. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2012,**22**:237-244.
33. Kim YI, Park CK, Park DJ, Wi JO, Han ER, Koh YI. A case of famotidine-induced anaphylaxis. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010,**20**:166-169.
34. Simons FE. Anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2010,**125**:S161-181.
35. Mueller HL. Diagnosis and treatment of insect sensitivity. *J Asthma Res* 1966,**3**:331-333.
36. Stone SF, Cotterell C, Isbister GK, Holdgate A, Brown SG. Elevated serum cytokines during human anaphylaxis: Identification of potential mediators of acute allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol* 2009,**124**:786-792 e784.
37. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev* 1997,**77**:1033-1079.
38. Schwartz LB. Diagnostic value of tryptase in anaphylaxis and mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006,**26**:451-463.
39. Brown SG, Blackman KE, Heddle RJ. Can serum mast cell tryptase help diagnose anaphylaxis? *Emerg Med Australas* 2004,**16**:120-124.
40. M C. *Mast cell-driven mediators*. 5th ed. Philadelphia; 1998.

41. Nishio H, Takai S, Miyazaki M, Horiuchi H, Osawa M, Uemura K, *et al.* Usefulness of serum mast cell-specific chymase levels for postmortem diagnosis of anaphylaxis. *Int J Legal Med* 2005,**119**:331-334.
42. Springman EB, Dikov MM, Serafin WE. Mast cell procarboxypeptidase A. Molecular modeling and biochemical characterization of its processing within secretory granules. *J Biol Chem* 1995,**270**:1300-1307.
43. Ogawa Y, Grant JA. Mediators of anaphylaxis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2007,**27**:249-260, vii.
44. Santos J, Bayarri C, Saperas E, Nogueiras C, Antolin M, Mourelle M, *et al.* Characterisation of immune mediator release during the immediate response to segmental mucosal challenge in the jejunum of patients with food allergy. *Gut* 1999,**45**:553-558.
45. Wenzel SE, Westcott JY, Larsen GL. Bronchoalveolar lavage fluid mediator levels 5 minutes after allergen challenge in atopic subjects with asthma: relationship to the development of late asthmatic responses. *J Allergy Clin Immunol* 1991,**87**:540-548.
46. Bochenek G, Nizankowska E, Gielicz A, Swierczynska M, Szczeklik A. Plasma 9alpha,11beta-PGF<sub>2</sub>, a PGD<sub>2</sub> metabolite, as a sensitive marker of mast cell activation by allergen in bronchial asthma. *Thorax* 2004,**59**:459-464.
47. Ono E, Taniguchi M, Mita H, Akiyama K. Salicylamide-induced anaphylaxis: increased urinary leukotriene E<sub>4</sub> and prostaglandin D<sub>2</sub> metabolite. *Allergy* 2008,**63**:480-482.
48. Vadas P, Gold M, Perelman B, Liss GM, Lack G, Blyth T, *et al.* Platelet-activating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis. *N Engl J Med* 2008,**358**:28-35.
49. Brown SG, Mullins RJ, Gold MS. Anaphylaxis: diagnosis and management. *Med J Aust* 2006,**185**:283-289.
50. Muraro A, Roberts G, Clark A, Eigenmann PA, Halken S, Lack G, *et al.* The management of anaphylaxis in childhood: position paper of the European academy of allergology and clinical immunology. *Allergy* 2007,**62**:857-871.
51. (UK) WGoRC. Emergency treatment of anaphylactic reactions. In.
52. Visscher PK, Vetter RS, Camazine S. Removing bee stings. *Lancet* 1996,**348**:301-302.
53. Biarent D, Bingham R, Richmond S, Maconochie I, Wyllie J, Simpson S, *et al.* European Resuscitation Council guidelines for resuscitation 2005. Section 6. Paediatric life support. *Resuscitation* 2005,**67 Suppl 1**:S97-133.
54. Brown SG. Cardiovascular aspects of anaphylaxis: implications for treatment and diagnosis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005,**5**:359-364.
55. Anchor J, Settipane RA. Appropriate use of epinephrine in anaphylaxis. *Am J Emerg Med* 2004,**22**:488-490.
56. Simons FE. First-aid treatment of anaphylaxis to food: focus on epinephrine. *J Allergy Clin Immunol* 2004,**113**:837-844.
57. Simons FE, Gu X, Simons KJ. Epinephrine absorption in adults: intramuscular versus subcutaneous injection. *J Allergy Clin Immunol* 2001,**108**:871-873.
58. Marone G, Bova M, Detoraki A, Onorati AM, Rossi FW, Spadaro G. The human heart as a shock organ in anaphylaxis. *Novartis Found Symp* 2004,**257**:133-149; discussion 149-160, 276-185.
59. Rainbow J, Browne GJ. Fatal asthma or anaphylaxis? *Emerg Med J* 2002,**19**:415-417.

60. Thomas M, Crawford I. Best evidence topic report. Glucagon infusion in refractory anaphylactic shock in patients on beta-blockers. *Emerg Med J* 2005,**22**:272-273.
61. Brown AF. Anaphylaxis gets the adrenaline going. *Emerg Med J* 2004,**21**:128-129.
62. Schummer W, Schummer C, Wippermann J, Fuchs J. Anaphylactic shock: is vasopressin the drug of choice? *Anesthesiology* 2004,**101**:1025-1027.
63. Brown SG, Blackman KE, Stenlake V, Heddle RJ. Insect sting anaphylaxis; prospective evaluation of treatment with intravenous adrenaline and volume resuscitation. *Emerg Med J* 2004,**21**:149-154.
64. Sheikh A, Ten Broek V, Brown SG, Simons FE. H1-antihistamines for the treatment of anaphylaxis: Cochrane systematic review. *Allergy* 2007,**62**:830-837.
65. Rowe BH, Spooner C, Ducharme FM, Bretzlaff JA, Bota GW. Early emergency department treatment of acute asthma with systemic corticosteroids. *Cochrane Database Syst Rev* 2001:CD002178.
66. Renne T. The procoagulant and proinflammatory plasma contact system. *Semin Immunopathol* 2012,**34**:31-41.
67. Colman RW, Schmaier AH. Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood* 1997,**90**:3819-3843.
68. Schousboe I. Contact activation in human plasma is triggered by zinc ion modulation of factor XII (Hageman factor). *Blood Coagul Fibrinolysis* 1993,**4**:671-678.
69. Bernardo MM, Day DE, Halvorson HR, Olson ST, Shore JD. Surface-independent acceleration of factor XII activation by zinc ions. II. Direct binding and fluorescence studies. *J Biol Chem* 1993,**268**:12477-12483.
70. Bernardo MM, Day DE, Olson ST, Shore JD. Surface-independent acceleration of factor XII activation by zinc ions. I. Kinetic characterization of the metal ion rate enhancement. *J Biol Chem* 1993,**268**:12468-12476.
71. Pixley RA, Schapira M, Colman RW. The regulation of human factor XIIa by plasma proteinase inhibitors. *J Biol Chem* 1985,**260**:1723-1729.
72. Pixley RA, Schapira M, Colman RW. Effect of heparin on the inactivation rate of human activated factor XII by antithrombin III. *Blood* 1985,**66**:198-203.
73. Berrettini M, Schleef RR, Espana F, Loskutoff DJ, Griffin JH. Interaction of type 1 plasminogen activator inhibitor with the enzymes of the contact activation system. *J Biol Chem* 1989,**264**:11738-11743.
74. Asakai R, Davie EW, Chung DW. Organization of the gene for human factor XI. *Biochemistry* 1987,**26**:7221-7228.
75. McMullen BA, Fujikawa K, Davie EW. Location of the disulfide bonds in human plasma prekallikrein: the presence of four novel apple domains in the amino-terminal portion of the molecule. *Biochemistry* 1991,**30**:2050-2056.
76. McMullen BA, Fujikawa K, Davie EW. Location of the disulfide bonds in human coagulation factor XI: the presence of tandem apple domains. *Biochemistry* 1991,**30**:2056-2060.
77. Fisher CA, Schmaier AH, Addonizio VP, Colman RW. Assay of prekallikrein in human plasma: comparison of amidolytic, esterolytic, coagulation, and immunochemical assays. *Blood* 1982,**59**:963-970.

78. Mandle R, Jr., Kaplan AP. Hageman factor substrates. Human plasma prekallikrein: mechanism of activation by Hageman factor and participation in hageman factor-dependent fibrinolysis. *J Biol Chem* 1977,**252**:6097-6104.
79. Schmaier AH, Gustafson E, Idell S, Colman RW. Plasma prekallikrein assay: reversible inhibition of C-1 inhibitor by chloroform and its use in measuring prekallikrein in different mammalian species. *J Lab Clin Med* 1984,**104**:882-892.
80. Lahiri B, Bagdasarian A, Mitchell B, Talamo RC, Colman RW. Antithrombin-heparin cofactor: an inhibitor of plasma kallikrein. *Arch Biochem Biophys* 1976,**175**:737-747.
81. Espana F, Estelles A, Griffin JH, Aznar J. Interaction of plasma kallikrein with protein C inhibitor in purified mixtures and in plasma. *Thromb Haemost* 1991,**65**:46-51.
82. Chung DW, Fujikawa K, McMullen BA, Davie EW. Human plasma prekallikrein, a zymogen to a serine protease that contains four tandem repeats. *Biochemistry* 1986,**25**:2410-2417.
83. Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 1992,**44**:1-80.
84. Kaplan AP, Joseph K, Silverberg M. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. *J Allergy Clin Immunol* 2002,**109**:195-209.
85. Kitamura N, Kitagawa H, Fukushima D, Takagaki Y, Miyata T, Nakanishi S. Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution. *J Biol Chem* 1985,**260**:8610-8617.
86. Jacobsen S, Kriz M. Some data on two purified kininogens from human plasma. *Br J Pharmacol Chemother* 1967,**29**:25-36.
87. Nishikawa K, Shibayama Y, Kuna P, Calcaterra E, Kaplan AP, Reddigari SR. Generation of vasoactive peptide bradykinin from human umbilical vein endothelium-bound high molecular weight kininogen by plasma kallikrein. *Blood* 1992,**80**:1980-1988.
88. Thompson RE, Mandle R, Jr., Kaplan AP. Characterization of human high molecular weight kininogen. Procoagulant activity associated with the light chain of kinin-free high molecular weight kininogen. *J Exp Med* 1978,**147**:488-499.
89. Reddigari SR, Kaplan AP. Monoclonal antibody to human high-molecular-weight kininogen recognizes its prekallikrein binding site and inhibits its coagulant activity. *Blood* 1989,**74**:695-702.
90. You JL, Page JD, Scarsdale JN, Colman RW, Harris RB. Conformational analysis of synthetic peptides encompassing the factor XI and prekallikrein overlapping binding domains of high molecular weight kininogen. *Peptides* 1993,**14**:867-876.
91. Meneton P, Bloch-Faure M, Hagege AA, Ruetten H, Huang W, Bergaya S, *et al.* Cardiovascular abnormalities with normal blood pressure in tissue kallikrein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001,**98**:2634-2639.
92. Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev* 1998,**50**:357-386.
93. Nussberger J, Cugno M, Cicardi M, Agostoni A. Local bradykinin generation in hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 1999,**104**:1321-1322.
94. Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, Adam A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci* 2005,**99**:6-38.

95. Maurer M, Bader M, Bas M, Bossi F, Cicardi M, Cugno M, *et al.* New topics in bradykinin research. *Allergy* 2011,**66**:1397-1406.
96. Mathis SA, Criscimagna NL, Leeb-Lundberg LM. B1 and B2 kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling in single cultured vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 1996,**50**:128-139.
97. Cicardi M, Banerji A, Bracho F, Malbran A, Rosenkranz B, Riedl M, *et al.* Icatibant, a new bradykinin-receptor antagonist, in hereditary angioedema. *N Engl J Med* 2010,**363**:532-541.
98. Kaplan AP, Ghebrehiwet B. The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement. *Mol Immunol* 2010,**47**:2161-2169.
99. Muller F, Renne T. Novel roles for factor XII-driven plasma contact activation system. *Curr Opin Hematol* 2008,**15**:516-521.
100. Muller F, Renne T. Platelet polyphosphates: the nexus of primary and secondary hemostasis. *Scand J Clin Lab Invest* 2011,**71**:82-86.
101. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* 2008,**359**:938-949.
102. Colman RW. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. 4th ed. Philadelphia, Lippincott. ; 1996.
103. Renne T, Pozgajova M, Gruner S, Schuh K, Pauer HU, Burfeind P, *et al.* Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med* 2005,**202**:271-281.
104. Furie B, Furie BC. Thrombus formation in vivo. *J Clin Invest* 2005,**115**:3355-3362.
105. Kemball-Cook G TEaMJ. *Normal haemostasis*. 5th ed. Oxford:Wiley-Blackwell; 2005.
106. Crawley JT, Zanardelli S, Chion CK, Lane DA. The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost* 2007,**5 Suppl 1**:95-101.
107. Rodgers RP, Levin J. Bleeding time: a guide to its diagnostic and clinical utility. *Arch Pathol Lab Med* 1990,**114**:1187-1188.
108. Jackson CM, Esnouf MP, Lindahl TL. A critical evaluation of the prothrombin time for monitoring oral anticoagulant therapy. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003,**33**:43-51.
109. Bajaj SP, Joist JH. New insights into how blood clots: implications for the use of APTT and PT as coagulation screening tests and in monitoring of anticoagulant therapy. *Semin Thromb Hemost* 1999,**25**:407-418.
110. Chng WJ, Sum C, Kuperan P. Causes of isolated prolonged activated partial thromboplastin time (APTT) in an acute general hospital: a guide to fresh frozen plasma (FFP) usage. *Ann Acad Med Singapore* 2004,**33**:S72-73.
111. Kitchen S, Theaker J, Preston FE. Monitoring unfractionated heparin therapy: relationship between eight anti-Xa assays and a protamine titration assay. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000,**11**:137-144.
112. Jespersen J, Sidelmann J. A study of the conditions and accuracy of the thrombin time assay of plasma fibrinogen. *Acta Haematol* 1982,**67**:2-7.
113. Lotvall JO, Tokuyama K, Barnes PJ, Chung KF. Bradykinin-induced airway microvascular leakage is potentiated by captopril and phosphoramidon. *Eur J Pharmacol* 1991,**200**:211-217.
114. Proud D, Togias A, Naclerio RM, Crush SA, Norman PS, Lichtenstein LM. Kinins are generated in vivo following nasal airway challenge of allergic individuals with allergen. *J Clin Invest* 1983,**72**:1678-1685.

115. van der Linden PW, Hack CE, Eerenberg AJ, Struyvenberg A, van der Zwan JK. Activation of the contact system in insect-sting anaphylaxis: association with the development of angioedema and shock. *Blood* 1993,**82**:1732-1739.
116. Oschatz C, Maas C, Lecher B, Jansen T, Bjorkqvist J, Tradler T, *et al.* Mast cells increase vascular permeability by heparin-initiated bradykinin formation in vivo. *Immunity* 2011,**34**:258-268.
117. Siebenhaar F, Magerl M, Peters EM, Hendrix S, Metz M, Maurer M. Mast cell-driven skin inflammation is impaired in the absence of sensory nerves. *J Allergy Clin Immunol* 2008,**121**:955-961.
118. Dreborg S. Skin testing. The safety of skin tests and the information obtained from using different methods and concentrations of allergen. *Allergy* 1993,**48**:473-475.
119. Kontou-Fili K, Borici-Mazi R, Kapp A, Matjevic LJ, Mitchel FB. Physical urticaria: classification and diagnostic guidelines. An EAAACI position paper. *Allergy* 1997,**52**:504-513.
120. Product P. In.
121. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970,**227**:680-685.
122. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976,**72**:248-254.
123. Renne T, Schuh K, Muller-Esterl W. Local bradykinin formation is controlled by glycosaminoglycans. *J Immunol* 2005,**175**:3377-3385.
124. Moreno M. Consenso sobre estandarización de las pruebas de coagulación. *Revista de Hemostasia y Trombosis* 2008,**2**:102-114.
125. Brown SG, Stone SF. Laboratory diagnosis of acute anaphylaxis. *Clin Exp Allergy* 2011,**41**:1660-1662.
126. Enrique E, Garcia-Ortega P, Sotorra O, Gaig P, Richart C. Usefulness of UniCAP-Tryptase fluoroimmunoassay in the diagnosis of anaphylaxis. *Allergy* 1999,**54**:602-606.
127. Schwartz LB, Yunginger JW, Miller J, Bokhari R, Dull D. Time course of appearance and disappearance of human mast cell tryptase in the circulation after anaphylaxis. *J Clin Invest* 1989,**83**:1551-1555.
128. Lin RY, Schwartz LB, Curry A, Pesola GR, Knight RJ, Lee HS, *et al.* Histamine and tryptase levels in patients with acute allergic reactions: An emergency department-based study. *J Allergy Clin Immunol* 2000,**106**:65-71.
129. Laroche D, Vergnaud MC, Sillard B, Soufarapis H, Bricard H. Biochemical markers of anaphylactoid reactions to drugs. Comparison of plasma histamine and tryptase. *Anesthesiology* 1991,**75**:945-949.
130. Sampson HA, Mendelson L, Rosen JP. Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N Engl J Med* 1992,**327**:380-384.
131. Yunginger JW, Nelson DR, Squillace DL, Jones RT, Holley KE, Hyma BA, *et al.* Laboratory investigation of deaths due to anaphylaxis. *J Forensic Sci* 1991,**36**:857-865.
132. Bengtsson U, Hanson LA, Ahlstedt S. Survey of gastrointestinal reactions to foods in adults in relation to atopy, presence of mucus in the stools, swelling of joints and arthralgia in patients with gastrointestinal reactions to foods. *Clin Exp Allergy* 1996,**26**:1387-1394.

133. Stoevesandt J, Hain J, Kerstan A, Trautmann A. Over- and underestimated parameters in severe Hymenoptera venom-induced anaphylaxis: Cardiovascular medication and absence of urticaria/angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 2012,**130**:698-704 e691.
134. Park HJ, Kim SH. Factors associated with shock in anaphylaxis. *Am J Emerg Med* 2012.
135. Simons FE, Arduzzo LR, Bilo MB, Dimov V, Ebisawa M, El-Gamal YM, *et al.* 2012 Update: World Allergy Organization Guidelines for the assessment and management of anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012,**12**:389-399.
136. Rueff F, Przybilla B, Bilo MB, Muller U, Scheipl F, Aberer W, *et al.* Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with Hymenoptera venom allergy: importance of baseline serum tryptase-a study of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 2009,**124**:1047-1054.
137. Mueller UR. Cardiovascular disease and anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007,**7**:337-341.
138. Lang DM. Do beta-blockers really enhance the risk of anaphylaxis during immunotherapy? *Curr Allergy Asthma Rep* 2008,**8**:37-44.
139. Triggiani M, Patella V, Staiano RI, Granata F, Marone G. Allergy and the cardiovascular system. *Clin Exp Immunol* 2008,**153 Suppl 1**:7-11.
140. Grabenhenrich L, Hompes S, Gough H, Rueff F, Scherer K, Pfohler C, *et al.* Implementation of anaphylaxis management guidelines: a register-based study. *PLoS One* 2012,**7**:e35778.
141. Campbell RL, Luke A, Weaver AL, St Sauver JL, Bergstralh EJ, Li JT, *et al.* Prescriptions for self-injectable epinephrine and follow-up referral in emergency department patients presenting with anaphylaxis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008,**101**:631-636.
142. Droste J, Narayan N. Anaphylaxis: lack of hospital doctors' knowledge of adrenaline (epinephrine) administration in adults could endanger patients' safety. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2012,**44**:122-127.
143. Sheikh A, Simons FE, Barbour V, Worth A. Adrenaline auto-injectors for the treatment of anaphylaxis with and without cardiovascular collapse in the community. *Cochrane Database Syst Rev* 2012,**8**:CD008935.
144. Campbell RL, Hagan JB, Manivannan V, Decker WW, Kanthala AR, Bellolio MF, *et al.* Evaluation of national institute of allergy and infectious diseases/food allergy and anaphylaxis network criteria for the diagnosis of anaphylaxis in emergency department patients. *J Allergy Clin Immunol* 2012,**129**:748-752.
145. Reddigari S, Kaplan AP. Cleavage of human high-molecular weight kininogen by purified kallikreins and upon contact activation of plasma. *Blood* 1988,**71**:1334-1340.
146. Bohrer CB, Reck Junior J, Fernandes D, Sordi R, Guimaraes JA, Assreuy J, *et al.* Kallikrein-kinin system activation by *Lonomia obliqua* caterpillar bristles: involvement in edema and hypotension responses to envenomation. *Toxicon* 2007,**49**:663-669.
147. Kaplan AP. Kinins, airway obstruction, and anaphylaxis. *Chem Immunol Allergy* 2010,**95**:67-84.
148. Summers CW, Pumphrey RS, Woods CN, McDowell G, Pemberton PW, Arkwright PD. Factors predicting anaphylaxis to peanuts and tree nuts in patients referred to a specialist center. *J Allergy Clin Immunol* 2008,**121**:632-638 e632.



149. Corbier A, Le Berre N, Rampe D, Meng H, Lorenz M, Vicat P, *et al.* Oversulfated chondroitin sulfate and OSCS-contaminated heparin cause dose- and route-dependent hemodynamic effects in the rat. *Toxicol Sci* 2011,**121**:417-427.
150. Blossom DB, Kallen AJ, Patel PR, Elward A, Robinson L, Gao G, *et al.* Outbreak of adverse reactions associated with contaminated heparin. *N Engl J Med* 2008,**359**:2674-2684.
151. Hojima Y, Cochrane CG, Wiggins RC, Austen KF, Stevens RL. In vitro activation of the contact (Hageman factor) system of plasma by heparin and chondroitin sulfate E. *Blood* 1984,**63**:1453-1459.
152. Siebeck M, Cheronis JC, Fink E, Kohl J, Spies B, Spannagl M, *et al.* Dextran sulfate activates contact system and mediates arterial hypotension via B2 kinin receptors. *J Appl Physiol* 1994,**77**:2675-2680.
153. Li B, Suwan J, Martin JG, Zhang F, Zhang Z, Hoppensteadt D, *et al.* Oversulfated chondroitin sulfate interaction with heparin-binding proteins: new insights into adverse reactions from contaminated heparins. *Biochem Pharmacol* 2009,**78**:292-300.
154. El-Mas MM, Abdel-Rahman AA. Bradykinin B2 receptor-dependent enhancement of enalapril-evoked hypotension in ethanol-fed female rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011,**57**:72-78.
155. Cheng Q, Tucker EI, Pine MS, Sisler I, Matafonov A, Sun MF, *et al.* A role for factor XIIa-mediated factor XI activation in thrombus formation in vivo. *Blood* 2010,**116**:3981-3989.
156. Lombardini C, Helia RE, Boehlen F, Merlani P. "Heparinization" and hyperfibrinogenolysis by wasp sting. *Am J Emerg Med* 2009,**27**:1176 e1171-1173.
157. Kounis NG, Tsigkas G, Almpanis G, Kouni SN, Kounis GN, Mazarakis A. Anaphylaxis-induced hyperfibrinogenolysis and the risk of Kounis syndrome: the dual action of tryptase. *Am J Emerg Med* 2011,**29**:1229-1230.
158. Schwartz LB, Bradford TR, Littman BH, Wintroub BU. The fibrinogenolytic activity of purified tryptase from human lung mast cells. *J Immunol* 1985,**135**:2762-2767.
159. Stack MS, Johnson DA. Human mast cell tryptase activates single-chain urinary-type plasminogen activator (pro-urokinase). *J Biol Chem* 1994,**269**:9416-9419.
160. Pejler G, Karlstrom A. Thrombin is inactivated by mast cell secretory granule chymase. *J Biol Chem* 1993,**268**:11817-11822.
161. Sakai K, Ren S, Schwartz LB. A novel heparin-dependent processing pathway for human tryptase. Autocatalysis followed by activation with dipeptidyl peptidase I. *J Clin Invest* 1996,**97**:988-995.
162. Sillaber C, Baghestanian M, Bevec D, Willheim M, Agis H, Kapiotis S, *et al.* The mast cell as site of tissue-type plasminogen activator expression and fibrinolysis. *J Immunol* 1999,**162**:1032-1041.
163. Kounis NG, Zavras GM. Histamine-induced coronary artery spasm: the concept of allergic angina. *Br J Clin Pract* 1991,**45**:121-128.
164. Dlamini Z, Bhoola KD. Upregulation of tissue kallikrein, kinin B1 receptor, and kinin B2 receptor in mast and giant cells infiltrating oesophageal squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 2005,**58**:915-922.
165. Ishizaka T, Iwata M, Ishizaka K. Release of histamine and arachidonate from mouse mast cells induced by glycosylation-enhancing factor and bradykinin. *J Immunol* 1985,**134**:1880-1887.

166. Kleinschnitz C, Stoll G, Bendszus M, Schuh K, Pauer HU, Burfeind P, *et al.* Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. *J Exp Med* 2006,**203**:513-518.
167. Muller F, Mutch NJ, Schenk WA, Smith SA, Esterl L, Spronk HM, *et al.* Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell* 2009,**139**:1143-1156.
168. Brunnee T, Reddigari SR, Shibayama Y, Kaplan AP, Silverberg M. Mast cell derived heparin activates the contact system: a link to kinin generation in allergic reactions. *Clin Exp Allergy* 1997,**27**:653-663.
169. Fareed J, Walenga JM, Hoppensteadt D, Racanelli A, Coyne E. Chemical and biological heterogeneity in low molecular weight heparins: implications for clinical use and standardization. *Semin Thromb Hemost* 1989,**15**:440-463.
170. Mattsson E, Herwald H, Cramer H, Persson K, Sjobring U, Bjorck L. Staphylococcus aureus induces release of bradykinin in human plasma. *Infect Immun* 2001,**69**:3877-3882.
171. Stadnicki A, Gonciarz M, Niewiarowski TJ, Hartleb J, Rudnicki M, Merrell NB, *et al.* Activation of plasma contact and coagulation systems and neutrophils in the active phase of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 1997,**42**:2356-2366.
172. Colman RW, Stadnicki A, Kettner CA, Adam AA, DeLa Cadena RA, Sartor RB. Activation of the kallikrein-kinin system in arthritis and enterocolitis in genetically susceptible rats: modulation by a selective plasma kallikrein inhibitor. *Proc Assoc Am Physicians* 1997,**109**:10-22.
173. Bergamaschini L, Parnetti L, Pareyson D, Canziani S, Cugno M, Agostoni A. Activation of the contact system in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1998,**12**:102-108.
174. Kahn R, Herwald H, Muller-Esterl W, Schmitt R, Sjogren AC, Truedsson L, *et al.* Contact-system activation in children with vasculitis. *Lancet* 2002,**360**:535-541.
175. Schapira M, Silver LD, Scott CF, Schmaier AH, Prograis LJ, Jr., Curd JG, *et al.* Prekallikrein activation and high-molecular-weight kininogen consumption in hereditary angioedema. *N Engl J Med* 1983,**308**:1050-1053.
176. Nzeako UC, Frigas E, Tremaine WJ. Hereditary angioedema: a broad review for clinicians. *Arch Intern Med* 2001,**161**:2417-2429.

## 11 ANEXOS

## Original Paper

International Archives of  
Allergy and  
Immunology

Int Arch Allergy Immunol 2013;160:192–199  
DOI: 10.1159/000339749

Received: April 4, 2012  
Accepted after revision: May 24, 2012  
Published online: September 25, 2012

## Usefulness and Limitations of Sequential Serum Tryptase for the Diagnosis of Anaphylaxis in 102 Patients

Anna Sala-Cunill<sup>a,b</sup> Victoria Cardona<sup>a,b</sup> Moises Labrador-Horrillo<sup>a,b</sup>  
Olga Luengo<sup>a,b</sup> Olga Esteso<sup>a,b</sup> Teresa Garriga<sup>a</sup> Maria Vicario<sup>c</sup>  
Mar Guilarte<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Allergy Section, Internal Medicine Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, and <sup>b</sup>Allergy Research Unit, Allergy Department, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, and <sup>c</sup>Laboratory of Neuro-Immuno-Gastroenterology, Digestive Diseases Research Unit, Department of Gastroenterology, Institut de Recerca Vall d'Hebron, CIBERehd, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

### Key Words

Adrenaline · Epinephrine · Anaphylaxis · Emergency · Mast cell · Tryptase · Drug allergy · Food allergy

### Abstract

**Background:** The diagnosis of anaphylaxis is based on clinical history since no reliable biological marker is currently available to confirm the diagnosis. **Objective:** It was the aim of this study to determine sequential serum tryptase concentrations during anaphylaxis and to evaluate its potential as a diagnostic marker. **Methods:** We performed a prospective study including patients with acute anaphylaxis (according to the National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network criteria) attending the emergency department. Demographic characteristics, anaphylactic triggers, specific risk factors, clinical characteristics and management of anaphylaxis were recorded. Serum tryptase was measured at 1–2 h (T1), 4–6 h (T2) and 12–24 h (T3) following onset of the episode and at basal conditions (TB). **Results:** A total of 102 patients were included (63 females, mean age 47.4 ± 19.1 years). Tryptase concentration at T1 (19.3 ± 15.4 µg/l) was significantly high-

er than at T2, T3 and TB (all <11.4 µg/l; p < 0.0001). Importantly, tryptase was not raised in 36.3% of cases; furthermore, in 60.6% of these patients, no changes were observed in tryptase levels comparing T1 and TB ( $\Delta T1-TB = 0$ ). Tryptase was more frequently elevated in more severe anaphylaxis (p < 0.0001) and positively correlated with the grades of severity (p < 0.001, r = 0.49). Anaphylaxis was more severe and tryptase concentration higher when the causative agent was a drug compared to food, both at T1 (p = 0.045) and at TB (p = 0.019). Age and coronary risk factors were associated with more severe anaphylaxis (p = 0.001). **Conclusion:** Tryptase is a biomarker related to the severity of anaphylaxis. However, since its concentration remains unaltered in a considerable number of patients during acute anaphylaxis, there is a need for more reliable diagnostic biological tests.

Copyright © 2012 S. Karger AG, Basel

### Introduction

Diagnosis of anaphylaxis is based on suggestive clinical symptoms after exposure to a potential triggering agent or event [1, 2]. The clinical diagnosis may be sup-

### KARGER

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

© 2012 S. Karger AG, Basel  
1018–2438/13/0002–0192\$38.00/0

Accessible online at:  
www.karger.com/oa

Correspondence to: Dr. Anna Sala-Cunill  
Allergy Research Unit, Allergy Department, Institut de Recerca Vall d'Hebron  
Universitat Autònoma de Barcelona  
Passeig Vall d'Hebron 119–125, ES–08035 Barcelona (Spain)  
Tel. +34 93 274 6160, E-Mail annasala7@gmail.com

**Table 1.** Grades of severity

Grade	Defined by
Mild <sup>1</sup> (skin and subcutaneous tissues only)	generalized erythema, urticaria, or angioedema
Moderate (features suggesting respiratory, cardiovascular or gastrointestinal involvement)	
A	nausea, vomiting or abdominal pain
B	dyspnea, stridor, wheeze, dizziness (presyncope), diaphoresis, chest or throat tightness
Severe (hypoxemia, hypotension or neurologic compromise)	cyanosis or SpO <sub>2</sub> ≤92% at any stage, hypotension (systolic blood pressure <90 mm Hg in adults), confusion, collapse, loss of consciousness or incontinence

Grades were adapted from the grading system for generalized hypersensitivity reactions by Brown [10]. SpO<sub>2</sub> = Oxygen saturation of hemoglobin, measured by pulse oximetry.

<sup>1</sup> The mild grade does not correspond with a diagnosis of anaphylaxis according to the criteria of the National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network.

ported by *in vitro* tests [1, 3]. Currently, plasma histamine (or its metabolite, methylhistamine in urine) and total serum tryptase are the only biomarkers available for routine use. The rationale for the use of these mediators for diagnosis is based on the fact that tryptase and histamine contained in mast cell granules are released upon activation of the cell [4]. However, their use in the diagnosis of an acute anaphylactic event has several limitations.

Plasma histamine peaks within 5–10 min of the onset of symptoms and declines to baseline within 60 min as a result of rapid metabolism by N-methyltransferase and diamine oxidase [4, 5]. Therefore, blood samples need to be obtained at the onset of the episode, which might only be possible in a small proportion of reactions but precludes it in most circumstances when reactions occur outside a hospital.

Nowadays, serum tryptase concentration is the most used laboratory test to confirm anaphylaxis. According to current knowledge, tryptase is the best biomarker to assess mast cell activation. Levels are increased from 15 min to 3 h after anaphylaxis onset [4, 6]. Although an elevated tryptase concentration supports this diagnosis, failure to document an elevation does not refute anaphylaxis. This is true even if the blood sample has been obtained adequately, and especially in cases of food-induced anaphylaxis where tryptase often remains low [7]. Serial measurements of total serum tryptase have been shown to increase the sensitivity and specificity of the test [8, 9]. Also, measurement of tryptase at baseline, obtained at least 24 h after resolution of symptoms, has been recommended in ascertaining whether or not anaphylaxis has occurred [8].

Therefore, the aim of our study was to determine sequential serum tryptase concentration in patients with anaphylaxis, both during the acute episode and at baseline, and to evaluate its usefulness in the diagnosis of anaphylaxis and as a marker related to the clinical severity of the reaction.

## Methods

### Study Population and Clinical Assessment

An observational prospective study of cases of anaphylaxis was performed. All adult patients (≥18 years old) attending the medicine emergency department (ED) of the Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain, from September 2008 to September 2009 with a diagnosis of anaphylaxis were pre-included. Anaphylaxis cases were defined based on the criteria proposed at the 2006 National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network meeting [1]. Patients fulfilling these criteria, in which at least one tryptase serum concentration during the episode of anaphylaxis and one at baseline had been determined, were included. Patients were followed up at the allergy outpatient department where an allergological work-up was performed and the diagnosis of anaphylaxis was confirmed by an allergist.

Anaphylaxis severity was classified according to a grading system published by Brown [10] based on clinical symptoms (table 1). This classification was adapted and the moderate group was subdivided into group A, patients presenting with gastrointestinal symptoms, and group B, patients presenting with respiratory or cardiovascular symptoms. Only patients with moderate or severe reactions were included for analysis.

Suspected triggers of anaphylaxis were registered using a detailed history of exposure in relation to the anaphylactic reaction. Conventional allergy diagnostic procedures were applied as needed (skin prick tests, specific IgE or challenge tests).

All patients signed an informed consent form on recruitment and the study was approved by the Hospital Ethics Committee.

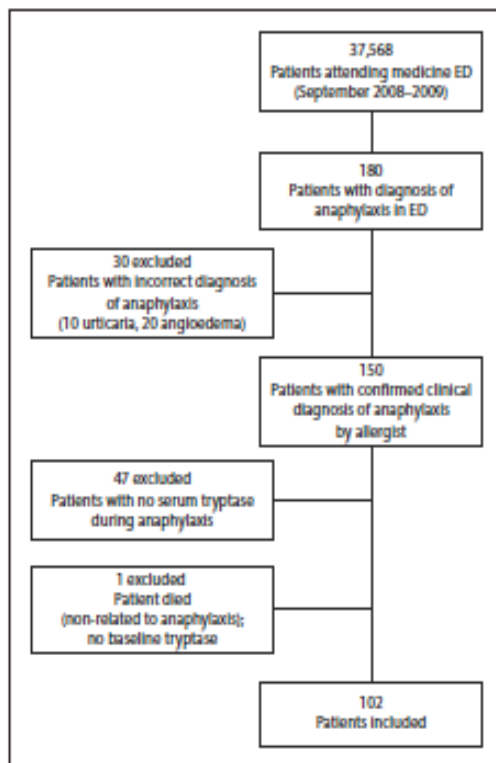


Fig. 1. Study flow chart.

#### Serum Tryptase Concentration

Tryptase was measured using the UniCAP-Tryptase fluoroimmunoassay (Phadia, now Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden), following the manufacturer's instructions. The sensitivity of the assay is 1 µg/l. A serum tryptase concentration  $\geq 11.4$  µg/l was considered high [11].

Following the onset of symptoms, time points for tryptase measurement were: T1, 1–2 h; T2, 4–6 h; and T3, 12–24 h. A basal measurement was performed at least 1 week later when patients were completely asymptomatic (basal condition, TB).

Blood samples were kept at room temperature and centrifuged for 5 min at 2,500 g. Serum samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until assessment of tryptase.

Two patients with indolent systemic mastocytosis were excluded from some analysis in order to avoid bias due to the persistently elevated tryptase concentrations.

#### Specific Risk Factors for Severity

Clinical risk factors for severity of anaphylaxis [12, 13] were evaluated: age, comorbidities, such as cardiovascular diseases, asthma or other chronic respiratory diseases, and mastocytosis. The use of concurrent medication, especially  $\beta$ -blockers, angio-

tensin-converting enzyme inhibitors (ACEi) and sedatives/hypnotics/antidepressants was documented [12].

#### Statistical Analysis

Data were collected and analyzed with SPSS version 17 (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA) and Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, Calif., USA). Continuous variables are reported as the mean  $\pm$  SD, and exact 95% confidence interval (CI) is indicated. Categorical data were compared using the  $\chi^2$  and Fisher's exact test. Statistical analysis for comparison of tryptase concentration at different time points and between different etiologies was performed using paired and unpaired two-sided Student's *t* tests, respectively. Statistical analysis for comparison of tryptase concentration at T1 between different grades of severity was performed by using the non-parametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U* tests. A *p* value  $\leq 0.05$  indicates statistical significance.

## Results

#### Patient Characteristics

Out of 37,568 patients admitted to the medicine ED during the study period, 102 were finally included, with a mean age of  $47.4 \pm 19.1$  years (range 18–91; fig. 1). Patient demographics and clinical characteristics are outlined in table 2.

Thirty-nine patients had a personal history of allergic diseases, distributed as follows: rhinitis 32.4%, food allergy 13.7%, asthma 10.8%, anaphylaxis 4.9% and atopic dermatitis 1%. Only 5 patients (4.9%) reported a previous anaphylactic event. When analyzing food-induced anaphylaxis (35/102), only 11/35 patients (31.4%) had an established diagnosis of food allergy and recalled having had urticaria or oral symptoms, after previous consumption of the eliciting food; in the other 24/35 patients (68.6%), anaphylaxis was the first manifestation of the disease. In 98% of drug-induced events, anaphylaxis was the first manifestation.

#### Anaphylaxis Severity and Triggers

Anaphylactic triggers and severity grades are shown in table 3. Drug-induced anaphylaxis was significantly more frequent and more severe than anaphylaxis caused by food [severe grade in 32/51 patients (62.7%) vs. 10/35 (28.5%); *p* = 0.001].

#### Serum Tryptase Concentration

Only 63 of all 102 patients (61.8%) showed elevated tryptase concentration during anaphylaxis.

Tryptase concentrations and percentages of patients with elevated tryptase at different time points are shown in figure 2a and table 4, respectively. At T1, only 58 of 91

**Table 2.** Patient demographics and clinical characteristics

	n	%
Overall	102	100
Sex		
Male	39	38.2
Female	63	61.8
Age		
18–65 years	83	81.6
>65 years	19	18.4
Anaphylaxis severity		
Moderate	56	54.9
A	14	13.7
B	42	41.2
Severe	46	45.1
Etiology of anaphylaxis		
Drug	51	50
Food	35	34.5
Anisakis	5	4.9
Latex	3	2.9
Hymenoptera	3	2.9
Cold	1	0.9
Unknown	4	3.9
Family history of atopy	21	20.6
Personal history of atopy	39	38.2
Comorbidities		
Rhinitis	33	32.4
Cardiovascular diseases	32	31.4
Asthma and other respiratory diseases	13	12.7
Psychiatric disease	10	9.8
Neurologic disorders	4	3.9
Thyroid disease	3	2.9
Mastocytosis	2	1.96
Concurrent medication		
ACEi	18	17.6
Sedatives/hypnotics/antidepressants	9	8.8
β-Blockers	4	3.9
Other	50	49

patients (63.7%) showed elevated tryptase and it was significantly higher than at any other time point: T1 versus T2 ( $\Delta$  5.4  $\mu\text{g/l}$ , range 2.7–8.2;  $p < 0.001$ ) and T1 versus T3 ( $\Delta$  11.7  $\mu\text{g/l}$ , range 7.3–16.1;  $p = 0.001$ ).

In the severe group, serum tryptase was elevated in 35/46 patients [76%; median 25.3, interquartile range (IQR) 17  $\mu\text{g/l}$ ], in the moderate grade subgroup B in 23/42 patients (55%; median 14.6, IQR 10.7  $\mu\text{g/l}$ ), and in the moderate grade subgroup A in 5/14 patients (36%; median 12.7, IQR 14.2  $\mu\text{g/l}$ ) with a statistically significant difference in median tryptase concentration between groups of subjects with anaphylaxis of severe and moderate A and B grade ( $p = 0.024$ ; fig. 3). Moreover,

**Table 3.** Etiologic agents according to severity of anaphylaxis

Grades of anaphylaxis	Moderate		Severe	Total patients
	A	B		
Etiology of anaphylaxis				
Drug	3	16	32	51 (50)
Food	8	17	10	35 (34.5)
Anisakis	2	2	1	5 (4.9)
Latex	0	2	1	3 (2.9)
Hymenoptera	0	1	2	3 (2.9)
Cold	0	1	0	1 (0.9)
Unknown	1	3	0	4 (3.9)
Total patients	14 (13.7)	42 (41.2)	46 (45.1)	102 (100)

Figures in parentheses are percentages.

**Table 4.** Serum tryptase at different time points and percentage of patients with elevated tryptase

	Mean, $\mu\text{g/l}$	SD, $\mu\text{g/l}$	Total patients <sup>1</sup>	n <sup>2</sup>
T1 (1–2 h)	19.3	15.1	58 (63.7)	91
T2 (4–6 h)	10.2	8.5	20 (46.6)	45
T3 (12–24 h)	7.3	4.7	9 (33.3)	27
TB (basal)	4.5	2	0	100 <sup>3</sup>

Figures in parentheses are percentages.

<sup>1</sup> Total number of patients with elevated tryptase ( $>11.4 \mu\text{g/l}$ ) in each group.

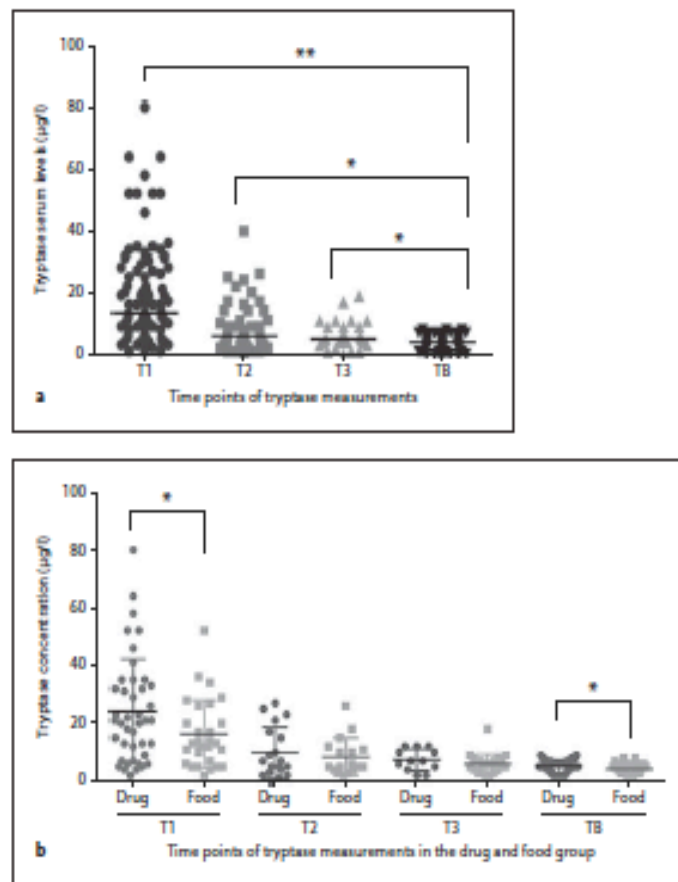
<sup>2</sup> Total number of patients in each group.

<sup>3</sup> The 2 patients with mastocytosis were excluded from the analysis to avoid bias.

tryptase concentration was more frequently elevated in severe anaphylaxis, with a positive correlation between grades of severity and serum tryptase ( $p < 0.001$ ;  $r = 0.49$ ).

On the other hand, 36.3% of patients (33/91) showed normal tryptase concentration at T1 ( $<11.4 \mu\text{g/l}$ ). In only 39.4% of these cases (13/33) was there a difference between T1 ( $5.9 \pm 3.2 \mu\text{g/l}$ ) and TB ( $3.1 \pm 2.5 \mu\text{g/l}$ ). Interestingly, in 60.6% of these patients (20/33) tryptase remained unaltered when comparing T1 and TB ( $\Delta$ T1–TB = 0).

There were no significant differences in the number of patients with elevated tryptase when the cause was drug



**Fig. 2. a** Tryptase concentration at different time points. Results are expressed as means. Differences in tryptase concentration: T1 versus TB, 14.4 µg/l (95% CI 11.2–17.6), \*\*  $p < 0.0001$ ; T2 versus TB, 6.3 µg/l (95% CI 3.9–8.6), \*  $p < 0.001$ ; T3 versus TB, 3.1 µg/l (95% CI 1.7–4.6), \*  $p < 0.001$ . **b** Tryptase concentration at different time points depending on the etiology: drug versus food. Results are expressed as means and SD. There were statistically significant differences (\*  $p < 0.05$ ) only in T1 and TB.

or food [65% (33/51) vs. 57% (20/35);  $p = 0.523$ ], but concentration at T1 was higher when the reaction was caused by drugs (mean  $24.14 \pm 18.08$  µg/l, 95% CI 18.51–29.78;  $n = 51$ ) than by food (mean  $16.25 \pm 11.76$  µg/l, 95% CI 11.69–20.81;  $n = 35$ ;  $p = 0.045$ ). There were no differences at other time points, except at TB when tryptase was also higher in the drug group compared to the food group [mean  $5.21 \pm 2.13$  µg/l (95% CI 4.58–5.82) vs.  $4.14 \pm 1.87$  µg/l (95% CI 3.51–4.76);  $p = 0.019$ ] (fig. 2b).

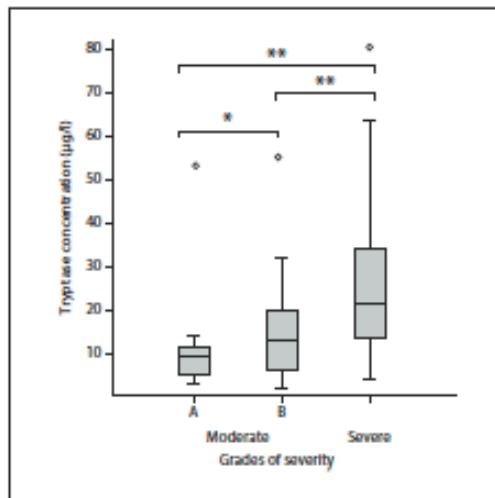
#### Specific Risk Factors for Severity

In patients with comorbidities, anaphylaxis was significantly more severe than in patients without a relevant past medical history [55.5% (30/54) vs. 33.3% (16/48);  $p = 0.024$ ].

Severe anaphylaxis was significantly associated with old age (>65 years), coronary risk factors and ACEi intake, but not with respiratory diseases or other medications (table 5). The 2 patients with indolent systemic mastocytosis presented a severe anaphylaxis.

#### Discussion

The present study demonstrates that although tryptase is considered a specific marker of mast cell degranulation [4, 8], it is not always elevated during anaphylaxis. In fact, in 36.3% of our patients with clinically defined anaphylaxis, tryptase remained low during the acute episode (T1).



**Fig. 3.** Tryptase concentration during anaphylaxis (T1) depending on severity. Results are expressed as the median and IQR. Kruskal-Wallis test among all groups,  $p < 0.001$ . Moderate-A versus moderate-B, \*  $p < 0.05$ ; moderate-B versus severe, \*\*  $p < 0.001$ ; moderate-A versus severe, \*\*  $p < 0.001$ .

To our knowledge, this is the first study with such a large number of patients in a single center with a clinical syndrome consistent with anaphylaxis and with serial serum tryptase determinations during an acute episode, which evaluates tryptase concentration depending on severity, etiology (drug vs. food) and risk factors for severity. A previous large multicentric study by Stone et al. [14] including 78 patients evaluated serial tryptase determinations and found that a non-negligible percentage of patients (36%) did not have elevated tryptase during acute anaphylaxis. Nevertheless, they recommend to assess the increase in tryptase compared to baseline ( $\Delta T1-TB$ ), as they did find differences even within normal tryptase concentration.

In our study, even though all the reactions were consistent with anaphylaxis and blood had been obtained at different time points, there was also a considerable percentage of patients in which tryptase remained normal during anaphylaxis (almost two thirds) even when anaphylaxis was severe. This is in contrast with the assumption that in many patients the difference or the ratio of tryptase during anaphylaxis and at baseline might aid in the diagnosis of anaphylaxis, as suggested by Brown and

**Table 5.** Patient factors associated with anaphylaxis severity

	n <sup>1</sup>	Patients with severe anaphylaxis	Effect p value
Age $\geq 65$ years	19/102	16 (84)	<b>0.002</b>
Coronary risk factors	32/102	23 (72)	<b>0.001</b>
Respiratory disease	13/102	6 (46.1)	0.935
Rhinitis	33/102	7 (21.2)	0.939
Concurrent medication			
ACEi	18/102	15 (83.3)	<b>0.001</b>
$\beta$ -Blockers	4/102	2 (50)	0.325
Sedatives/hypnotics/antidepressants	9/102	4 (44.4)	0.613

Figures in parentheses are percentages. Boldfaced values indicate  $p < 0.05$ .

<sup>1</sup> The number of patients with each risk factor among all patients.

Stone [15]. Therefore, neither tryptase concentration during acute anaphylaxis nor the difference between anaphylaxis and baseline were useful for the diagnosis in 20 of 91 patients (21.9%).

Previous studies recommend obtaining serum samples within 3 h of onset of symptoms in order to measure tryptase [9]. Our results suggest that the window of opportunity for a good diagnostic sensitivity of tryptase is within the first 2 h, rapidly decreasing after that.

Lin et al. [16] published a study in which a single determination of histamine and tryptase in patients with acute allergic reactions was evaluated. The majority of cases presented mild reactions (such as urticaria) and only a few had systemic anaphylaxis. Histamine was more frequently elevated than tryptase and, according to the authors, this could be attributed to the inclusion of mild reactions [14]. In fact, some studies on drug-induced anaphylactic reactions suggest that milder allergic reactions are associated with histamine and not tryptase increase [17]. In another study of food-associated severe anaphylaxis in children and adolescents, Sampson et al. [7] did not find tryptase elevations in the 2 patients whose serum was available. The hypothesis is that some anaphylaxis may primarily involve basophils rather than mast cells. Other authors have described that anaphylaxis induced by food infrequently elevates tryptase levels [18, 19]. Presumably, this is due to a localized rather than a generalized mast cell degranulation, rendering a small amount of tryptase entering the circulation too small to raise serum levels [19, 5]. In accordance with these find-



ings, we have observed that in anaphylaxis induced by food, only 57% of cases presented elevated tryptase. Although the percentage was very similar in drug-induced reactions, the mean concentration of tryptase in these cases was significantly higher.

A number of severity grading systems of anaphylaxis have been described [20–26]. We use the clinical grading system developed by Brown [10], which was later used by Stone et al. [14] who found a correlation between severity grades and tryptase concentration at different time points. However, we subdivided the moderate group into 2 subgroups (groups A and B) depending on the symptoms of the patients. We performed this subanalysis to confirm our observation that patients with gastrointestinal symptoms (moderate-A) presented lower levels of serum tryptase than patients with respiratory or cardiovascular symptoms (moderate-B). This severity grading correlated with levels of serum tryptase, which is in line with the fact that gastrointestinal mast cells predominantly contain chymase over tryptase. Thus, our study replicates the findings by Stone et al. [14], even when using the modified grading system that provides more refined information.

As described in the literature, elderly adults are at increased risk of fatality during anaphylaxis for a variety of reasons [12, 27], including concomitant diseases [28, 29], such as respiratory conditions, cardiovascular disease, and the use of concurrent medications such as ACEi and  $\beta$ -adrenergic blockers [6, 12, 29, 30]. In our study, older age and the presence of cardiovascular disease was associated with more severe anaphylaxis, highlighting the importance of these risk factors during an episode of anaphylaxis. On the contrary, we have not found significant association between rhinitis or respiratory disease and the severity of anaphylaxis, although these patients tended to develop respiratory involvement more frequently.

Despite some authors having recognized concurrent medication, such as  $\beta$ -adrenergic blockers, ACEi and antidepressants, as being associated with severe reactions and death [12, 31, 32], in our study, only ACEi were associated with severe reactions. This may be the case because the size of each group is small; another plausible explanation is that patients on ACEi are often older and affected by cardiovascular disease, so these could be confounding factors.

Methodological limitations inherent to the study design must be pointed out. The first is a selection bias. We included patients with anaphylactic reactions attending the ED of a tertiary university hospital in which tryptase had been determined; therefore, severity groups are not homogeneous, as the moderate-A group is underrepre-

sented and the great majority of anaphylaxis was moderate-B or severe. Possible explanations are that patients referred to our ED presented more severe symptoms, since this is a referral center, or that milder reactions were not recognized or managed as anaphylaxis. A further confusion bias in assessing risk factors for severity of anaphylaxis, such as age, is that a high number of these patients have coronary risk factors and are on ACEi, also considered risk factors for severe anaphylaxis. Finally, although the clinical diagnostic criteria used have been shown to perform well [33], having no gold standard to ascertain the diagnosis of anaphylaxis, some cases may have been falsely diagnosed.

In conclusion, tryptase is not an optimal marker for the diagnosis of anaphylaxis, since although the concentration of tryptase correlates with severity, levels are not increased in a considerable number of patients during acute anaphylaxis. Therefore, further studies are needed in order to identify additional sensitive markers to support the clinical diagnosis of anaphylaxis.

#### Acknowledgements

This work has been made possible by the participation of physicians working in the Emergency Department of Hospital Vall d'Hebron, especially the allergy trainees Adriana Izquierdo, Lorena Soto, Alba García, Sonia Gelis and Roger Ocaña. We also thank Adrià Curran for a critical revision of the manuscript. The study was supported in part by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria: PI10/01871 to M.L.H., CM09/00212 to A.S.C., and CP10/00502 to M.V., and the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas CB06/04/0021 to M.V.

#### Disclosure Statement

The authors have no conflict of interest to declare.

#### References

- ▶ 1 Sampson HA, Muñoz-Furlong A, Campbell RL, Adkinson NF Jr, Bock SA, Branum A, et al: Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report – Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:391–397.
- ▶ 2 Simons FE: Anaphylaxis pathogenesis and treatment. *Allergy* 2011;66(suppl 95):31–34.
- ▶ 3 Lee JK, Vades P: Anaphylaxis: mechanisms and management. *Clin Exp Allergy* 2011;41:923–938.

- ▶4 Hogan AD, Schwartz LB: Markers of mast cell degranulation. *Methods* 1997;13:43–52.
- ▶5 Lieberman PL: Anaphylaxis; in Adkinson NF Jr, Bochner BS, Busse WW, Holgate ST, Lemanske RF Jr, Simons FER (eds): *Middleton's Allergy: Principles and Practice*, ed 7. St. Louis, Mosby, 2009, pp 1027–1049.
- ▶6 Simons FER, Frew AJ, Ansotegui IJ, Bochner BS, Pinedman F, Golden DBK, et al: Risk assessment in anaphylaxis: current and future approaches. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120(suppl):S2–S24.
- ▶7 Sampson HA, Mendelson I, Rosen JP: Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N Engl J Med* 1992;327:380–384.
- ▶8 Schwartz LB: Diagnostic value of tryptase in anaphylaxis and mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006;26:451–463.
- ▶9 Schwartz LB, Yunginger JW, Miller JS, Bokhart R, Dull D: Time course of appearance and disappearance of human mast cell tryptase in the circulation after anaphylaxis. *J Clin Invest* 1989;83:1551–1555.
- ▶10 Brown SGB: Clinical features and severity grading of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:371–376.
- ▶11 Phadta product. <http://www.phadta.com/en/Health-Care-Providers/Allergy/Products/ImmunoCAp-Tryptase/> (accessed April 2012).
- ▶12 Simons FER: Anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:S161–S181.
- ▶13 Simons FER, Arduso LRF, Biló MB, El-Gamal Y, Ledford DK, Rting J, et al: World Allergy Organization anaphylaxis guidelines: summary. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:587–593.
- ▶14 Stone SF, Cotterell C, Ishister GK, Holdgate A, Brown SGA: Elevated serum cytokines during human anaphylaxis: identification of potential mediators of acute allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:786–792 e4.
- ▶15 Brown SGA, Stone SF: Laboratory diagnosis of acute anaphylaxis. *Clin Exp Allergy* 2011;41:1660–1662.
- ▶16 Lin RY, Schwartz LB, Curry A, et al: Histamine and tryptase levels in patients with acute allergic reactions: an emergency department-based study. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:65–71.
- ▶17 Laroche D, Vergnaud MC, Stillard B, et al: Biochemical markers of anaphylactoid reactions to drugs. Comparison of plasma histamine and tryptase. *Anesthesiology* 1991;75:945–949.
- ▶18 Yunginger JW, Nelson DR, Squillace DL, Jones RT, Holley KE, Hyma BA, Biedrzycki L, Sweeney KG, Sturmer WQ, Schwartz LB: Laboratory investigation of deaths due to anaphylaxis. *J Forensic Sci* 1991;36:857–865.
- ▶19 Bengtsson U, Hanson LA, Ahlstedt S: Survey of gastrointestinal reactions to food in adults in relation to atopy, presence of mucus in stools, swelling of joints and arthralgia in patients with gastrointestinal reactions to food. *Clin Exp Allergy* 1996;26:1387–1394.
- ▶20 Mueller HL: Further experiences with severe allergic reactions to insect stings. *N Engl J Med* 1959;261:374–377.
- ▶21 Mueller HL: Diagnosis and treatment of insect sensitivity. *J Asthma Res* 1966;3:331–333.
- ▶22 Reisman RE: Natural history of insect sting allergy: relationship of severity of symptoms of initial sting anaphylaxis to re-sting reactions. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:335–339.
- ▶23 Glosen DB, Kwitnerovitch KA, Kagey-Sobotka A, Lichtenslein LM: Discontinuing venom immunotherapy: extended observations. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:298–305.
- ▶24 Kemp SF, Lockey RF, Wolf BI, Lieberman P: Anaphylaxis: a review of 266 cases. *Arch Intern Med* 1995;155:1749–1754.
- ▶25 Brown AF, McKinnon D, Chu K: Emergency department anaphylaxis: a review of 142 patients in a single year. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:861–866.
- ▶26 Smit DV, Cameron PA, Ralner TH: Anaphylaxis presentations to an emergency department in Hong Kong: incidence and predictors of biphasic reactions. *J Emerg Med* 2005;28:381–388.
- ▶27 Simons FER: Anaphylaxis: recent advances in assessment and treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:625–636.
- ▶28 Triggiani M, Patella V, Stasano RI, Granata F, Marone G: Allergy and the cardiovascular system. *Clin Exp Immunol* 2008;153(suppl 1):7–11.
- ▶29 Mueller UR: Cardiovascular disease and anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7:337–341.
- ▶30 Greenberger PA, Rotkoff BD, Lifschaltz B: Fatal anaphylaxis: postmortem findings and associated comorbid diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007;98:252–257.
- ▶31 Lang DM: Do beta-blockers really enhance the risk of anaphylaxis during immunotherapy? *Curr Allergy Asthma Rep* 2008;8:37–44.
- ▶32 Rueff F, Przybilla B, Biló MB, Müller U, Scheipl F, Aberer W, et al: Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with Hymenoptera venom allergy: importance of baseline serum tryptase – a study of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:1047–1054.
- ▶33 Campbell RL, Hagan JB, Manivannan V, Decker WW, Kanthala AR, Bellolo MF, Smith VD, Li JT: Evaluation of National Institute of Allergy and Infectious Diseases/Food Allergy and Anaphylaxis Network criteria for the diagnosis of anaphylaxis in emergency department patients. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:748–752.

## Oral Session 16

## Management of anaphylaxis

adrenaline use and clinical severity of reactions by paramedics ( $P < 0.01$ ), but not by first responders where history of previous reaction and location were most relevant.

**Conclusion:** Emergency calls out for allergic reactions made up <1% of total ambulance workload. Most cases were successfully managed without intramuscular adrenaline. Although adrenaline appeared to be used appropriately by paramedics, the lack of correlation between adrenaline use by first responders and clinical severity suggests that they often may not have the training necessary to deliver the drug to those in need.

#### 94 Anaphylaxis: usefulness of tryptase in patients attending an emergency department

Sala-Cunill A<sup>1</sup>, Gúrdia, M<sup>2</sup>; Labrador, M<sup>2</sup>; Luengo, O<sup>1</sup>; Garriga, T<sup>1</sup>; Gerdona, V<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Hospital Universitari Vall de Hebron, Allergy Unit, Internal Medicine Department, Barcelona; <sup>2</sup>Hospital Universitari de la Vall de Hebron, Allergy Unit, Internal Medicine Department, Barcelona, Spain

**Background:** Anaphylaxis is a severe immediate hypersensitivity reaction that is rapid in onset and potentially fatal. The diagnosis of anaphylaxis is primarily based on clinical history since no reliable biological marker is currently available to confirm the diagnosis, thus leading to underrecognition and undertreatment of anaphylaxis. The aim of this study was to assess serum tryptase of patients with anaphylaxis.

**Methods:** Patients with acute anaphylaxis attending the Emergency Room of Vall de Hebron Hospital (Sept 08-Sept 09) were evaluated. Only patients fulfilling NIAID/FAAN (Food Allergy and Anaphylaxis Network) anaphylaxis criteria were included. Clinical characteristics and management were assessed. Tryptase was measured at 1-2, 4-6 and 12-24 h following onset of the episode and at basal conditions using UniCAP system (PHADIA<sup>®</sup>) and was considered elevated 10 µg/L according to manufacturer instructions. Anaphylaxis was classified in four grades depending on severity: Grade I (Skin + Rhinitis), Grade II (Skin + Gastrointestinal symptoms), Grade III (Skin + Respiratory ± Gastrointestinal symptoms) and Grade IV (Skin + Cardiovascular Respiratory ± Gastrointestinal symptoms).

**Results:** One hundred and one patients presented highly suggestive clinical anaphylaxis, 62 women/39 men, mean age 47 (17-90) years. Anaphylaxis severity was classified as Grade I 0.9%, Grade II 11.8%, Grade III 40.5% and Grade IV 43.5%. Tryptase during the anaphylaxis was elevated

only in 61% of cases (86% of grade IV, 53% of grade III, 33% of grade II and 0% of grade I). In all cases basal tryptase was lower than tryptase during anaphylaxis. The mean of tryptase ratio (anaphylaxis/basal) was 5.27 at 1-2 h, 2.78 at 4-6 h and 1.63 at 12-24 h. Anaphylaxis was more severe and tryptase was higher when the culprit factor was a drug. Epinephrine was administered only in 66% of cases, while corticosteroids and antihistamines were administered in all cases. Epinephrine administration was subcutaneous in 4 patients (6%), intramuscular in 59 (90%) and intravenous in 2 (3%). Only two cases developed complications after epinephrine treatment.

**Conclusion:** Tryptase levels are low in a considerable number of patients during acute anaphylaxis, although they are always higher when compared with baseline. Furthermore, tryptase could be an indicator of the severity of anaphylaxis.

#### 95 Optimising anaphylaxis discharge management

Hudson, P; Kupa, A  
 Flinders Medical Centre, Respiratory Allergy and Sleep Services, Adelaide, Australia

**Background:** Best practice guidelines recommend that all anaphylaxis patients being discharged from hospital receive: advice regarding trigger avoidance; an anaphylaxis action plan; prescription of, and education about, use of an adrenaline auto-injector; case note alert and referral to allergy clinic. Our previous audit of anaphylaxis management in 2004 had revealed poor compliance with such guidelines. The aim of this project was to ensure that 100% of patients presenting to emergency departments (EDs) in an area health service would be discharged with agreed best practice discharge management.

**Methods:** Clinical Practice Improvement (CPI) methodology involved firstly, obtaining baseline data by clinical audit of coded anaphylaxis cases and secondly, recruiting a project team comprising allergy and ED doctors and nurses, pharmacy, paediatric and quality and safety representatives. Causes of suboptimal management were identified and interventions suggested for improvement. The outcome of such interventions was measured by monthly case note auditing.

**Results:** Causes of poor compliance ranked from highest to least significance were: staff uncertainty about anaphylaxis management; lack of availability of adrenaline device; medical officer (MO) lack of knowledge of anaphylaxis grading; educa-

#### Oral Session 16 - Management of anaphylaxis

tion kit not available; high staff turnover in EDs leading to loss of knowledge and awareness; insufficient time to educate patient; poor availability of case note alert sheets; limited access to allergy team advice. Interventions undertaken were: (1) Regular face-to-face in-service education of nurses, junior MOs and registrars in ED; (2) Provision of anaphylaxis management kits with tools for patient education and references for health care professionals; (3) Recruitment of anaphylaxis champions at each hospital to maintain the momentum of change. There was progressive improvement in all parameters compared with baseline data: Allergen avoidance advice 28% → 50% Anaphylaxis action plan 4% → 80% Adrenaline prescription 43% → 60% Patient education adrenaline auto injector 20% → 30% Case note alert 9% → 30% Allergy clinic referral 24% → 100%.

**Conclusion:** Improved anaphylaxis discharge management resulted from a structured quality improvement intervention. Strategies for sustaining the improvement include: the development of state-wide anaphylaxis clinical guidelines; continued regular in-service education and improved clinical networking with regional emergency departments.

#### 96 Anaphylaxis treatment are adrenaline auto-injectors fit for purpose?

Schwarz, A  
 Pharma Consult GmbH, Research & Development, Vienna, Austria

**Background:** Anaphylaxis is a growing clinical emergency worldwide. The largest number of anaphylactic cases is among children and adolescents, with food allergy being the most common cause in children. Several intramuscular adrenaline auto-injector (AAI) devices that utilise either a cartridge- or a syringe-based delivery system are available for the treatment of anaphylaxis.

**Methods:** This pilot study was designed to investigate and compare two junior AAI devices: EpiPen<sup>®</sup> Junior (cartridge AAI) versus Anapen<sup>®</sup> Junior (syringe AAI). In the first series of experiments, each auto-injector was allocated to 1 of 3 groups: (1) preconditioning - free-fall (dynamic) test ( $n = 15$ ), (2) preconditioning - static-load test ( $n = 15$ ) and (3) no preconditioning - control ( $n = 15$ ). Group A devices were dropped three times in free fall from a height of one metre onto a hard, concrete plate. Group B devices were subject to a static load of 400 N, for 10 s. Safety cap removal and activation force were then

© 2010 The Authors

Journal Compilation © 2010 Blackwell Publishing Ltd *Allergy* 65 (Suppl. 92): 1-77



This is to certify that the abstract

**Anaphylaxis: usefulness of tryptase in patients attending an emergency department**

presented by

**Anna Sala Cunill**

has won the prize in the abstract session

**OAS 16 - Management of anaphylaxis**

at the 29<sup>th</sup> Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology in London, United Kingdom  
5 - 9 June, 2010

**Anthony Frew**  
Congress President

**Jan Lötvall**  
EAACI President

EAACI 2010 Congress Secretariat  
114, Cornhill, London, EC3A 3DF, UK. Tel: +44 (0)20 7552 2222. Fax: +44 (0)20 7552 2223. Email: [congress@eaaci.eu](mailto:congress@eaaci.eu)  
EAACI Headquarters  
Lindberghgatan 21, SE-141 86 Järfälla, Sweden. Tel: +46 (0)8 730 12 00. Fax: +46 (0)8 730 12 01. Email: [office@eaaci.eu](mailto:office@eaaci.eu)


**Abstract Control Panel**
**Abstract ID: 2857**
**Abstract Number: 456846**
**Activation of the Plasma Contact-System in Patients with Anaphylaxis**

**Anna Sala-Cunill**<sup>1,2</sup>, Mar Guilarte<sup>1,2</sup>, Vicky Cardona<sup>1,2</sup>, Jenny Björkqvist<sup>3</sup>, Moises Labrador<sup>1,2</sup>, Katrin Nickel<sup>3</sup>, Olga Luengo<sup>1,2</sup> and Thomas Renné<sup>3,4</sup>, (1)Allergy Section, Internal Medicine Department. Hospital Universitari Vall d'Hebron, (2)Allergy Research Unit, Allergy Department, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, (3)Center of Molecular Medicine Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden., (4)) Clinical Chemistry, Department of Molecular Medicine and Surgery

**Rationale:** Mast cells mediators play a central role in the pathophysiology of anaphylaxis. Recently, the potential role of mast-cell-driven heparine activating the plasma contact system has been described in a murine model, a protease cascade which proteolyzes high molecular weight kininogen (HK) to liberate bradykinin. Our aim was to investigate the role of contact system activation in anaphylaxis.

**Methods:** We compared 10 patients with an acute anaphylaxis and at baseline with 10 age- and sex-matched controls. The proteolysis of HK, plasma Kalikrein (PK) and Factor XII (FXII) was determined by immunoblotting. Mast cell activation and heparin release were determined by serum tryptase levels and aPTT or anti-Xa-activity.

**Results:** We noted extensive proteolysis of HK in the plasma of all anaphylactic patients at the onset of symptoms but not during remission and in none of 10 controls. Degree of HK breakdown correlated with the severity of anaphylactic reactions and with tryptase levels. All anaphylactic patients also showed an activation of FXII and PK but not at baseline or in control patients. The aPTT was prolonged in three patients and the levels of anti-Xa were higher during anaphylaxis compared with basal conditions or healthy controls (4 kIE/L, IQR 2.5-5.5 versus 1 kIE/L IQR 0.25-1.75,  $p < 0.005$ ).

**Conclusions:** Mast cell-driven activation of the contact system is essential for the systemic manifestations of anaphylaxis. Interference with this system can provide an effective strategy for the treatment of allergic reactions.

**Title:** Activation of the Plasma Contact-System in Patients with Anaphylaxis

**Submitter's E-mail Address:** annasala7@gmail.com

**Keywords:** Allergy: Pathophysiology, Anaphylaxis and Mast Cells

**Presenting Author**

Anna Sala-Cunill, Allergy Research Unit, Allergy Department, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain