






Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Medicina

**ANAFILAXIA POR ALIMENTOS DEPENDIENTE DE COFACTOR:
DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL Y ESTUDIO DEL PAPEL DEL
MASTOCITO EN LA PERMEABILIDAD INTESTINAL**

Tesis Doctoral

Programa de Doctorat de Medicina

Departament de Medicina

Olga Esteso Hontoria

Diciembre 2020

Digirida por: Mar Guilarte Clavero y Victoria Cardona Dahl

Tutor: Albert Selva O'Callaghan

AGRADECIMIENTOS:

Érase una vez, que una residente decidió que su tesis doctoral la quería hacer de anafilaxia por cofactor, ese día empezó una ilusión que pudo materializarse gracias a la Dra Mar Guilarte, que creyó que el proyecto era viable, sin su sabiduría, su apoyo y su fe en mí, esto no hubiera sido posible. Agradezco a la Dra Victoria Cardona, que apostara por este proyecto, con su optimismo, que en los momentos más difíciles me dieron la fuerza para seguir adelante. Para el equipo de alergia de Vall d'Hebron, por aconsejarme siempre lo mejor para mí, sobre todo en los momentos más difíciles, les estaré siempre agradecida .

Agradezco al Dr Selva su generosidad al aceptar ser mi tutor.

El equipo del Dr Jordana (McMaster University, Hamilton, Ontario, Canadá), fue el que me enseñó a trabajar con modelos muridos experimentales, todos sin distinción me acogieron desde primer día, y aprendí que hay un mundo apasionante en la investigación básica. La Dra María Vicario, me acompañó parte de este recorrida, aportó su gran profesionalidad y su conocimiento para técnicas de laboratorio complejas

No puedo olvidarme del Eleanett Pérez, mi otra mitad durante todo el proceso de experimentación animal, aprendimos juntas que ser un equipo solo suma nunca resta.

Finalmente, mi familia, mis padres por su cariño incondicional, mi tío porque en momentos muy duros siempre ha estado a mi lado, y a mi pareja David, por su paciencia y absoluta convicción que llegaría al final sin derrumbarme.

Esta travesía os la debo a cada uno de vosotros, y os la dedico a todos.

Agradezco las becas de investigación que fueron necesarias para poder realizar el proyecto murido de investigación de la SEAC y de la SCAIC

ABREVIATURAS

AA: Ácido araquidónico

AINE: Antiinflamatorios no esteroideos

ATP: Adenosín trifosfato

BLG: β -Lactoglobulina

BP: Bordatella Pertusis

CCD: Determinantes de carbohidratos

CCL2: Ligando de quimiocina 2

CGRP: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina

CXCL12 : Quimiocina 12 con motivo C-X-C

GAG: Glucosaminoglicanos altamente sulfatados

GS: Gránulos secretores

ITAM: Motivos de activación basado en tirosinas

JAM: Moléculas de adhesión molecular

LPS: Lipopolisacárido

LT: Leucotrienos

LTP: Proteínas de transferencia lipídica

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos

MC: Mastocitos

NGF: factor de crecimiento nervioso factor de crecimiento transformante beta ($-\beta$),

PAF: Factor activador de plaquetas

PG: Prostaglandinas

PGN: Peptidoglicano

PLA2: Fosfolipasa A2

S1P: Esfingosina 1-fosfato

SCF: Factor de células madre

SEB: Enterotoxina B Estafilocócica

SRP: Señal de reconocimiento proteico

TC: Toxina del cólera

TGF: Factor de crecimiento de transformación

TLP: Proteína taumatina like

TLR: Receptores Toll Like (TLR)

TNF: Factor de necrosis tumoral

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	4
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 ANAFILAXIA.....	7
1.1.1 Definición.....	7
1.1.2 Epidemiología	7
1.1.3 Sintomatología.....	8
1.1.4 Diagnóstico	9
1.1.4.1 Diagnóstico Clínico.....	9
1.1.5 Fisiopatología	10
1.1.5.1 El mastocito: célula efectora en anafilaxia	12
1.1.5.2 Progenitores mastocitarios y distribución	13
1.1.5.3 Mediadores mastocitarios	15
1.1.5.4 Mecanismos de secreción mastocitaria	19
1.1.5.5 Distribución de las células mastocitarias	20
1.2 PERMEABILIDAD INTESTINAL	23
1.2.1 Transporte intestinal DE antígenos.....	23
1.2.2 Estudio de la permeabilidad intestinal en modelos múridos	24
1.3 ALERGIA ALIMENTARIA.....	24
1.3.1 Prevalencia y etiología de la alergia alimentaria	25
1.4 Proteínas de transferencia lipídica	25
1.4.1 Generalidades	25
1.4.2 Pru p3.....	26
1.5 Cofactores en alergia a alimentos.....	27
1.6 Modelos animales de alergia alimentaria	30
1.6.1 Generalidades:	30
1.6.2 Características de los modelos múridos	31
1.6.3 Adyuvantes utilizados en modelos múridos de alergia a alimentos	32
1.6.4 Provocación con alérgeno (Anafilaxia).....	34
1.6.5 Cepas de ratones utilizados en modelos múridos de alergia a alimentos	35
1.6.6 Modelo múrido con Pru p 3	36
1.6.7 Modelos múridos con AINE como cofactor	36
2. HIPÓTESIS.....	38
3. OBJETIVOS.....	39
4. MATERIAL Y MÉTODOS	40

4.1	Trabajo 1: caracterización de la anafilaxia en urgencias hospitalarias.....	40
4.1.1	Selección de pacientes.....	40
4.1.2	Datos demográficos y características de la anafilaxia.....	41
4.1.3	Clasificación de la anafilaxia	41
4.1.4	Análisis estadístico.....	42
4.2	Trabajo 2. modelo experimental múrido de anafilaxia por alimentos mediada por cofactor.....	43
4.2.1	Población a estudio.....	43
4.2.2	Metodología del modelo experimental	44
4.2.3	Primer diseño experimental	44
4.2.4	Segundo diseño experimental:	47
4.2.4.1	Estudio de la permeabilidad intestinal	49
4.2.5	Tercer diseño experimental.....	49
4.2.5.1	Obtención del extracto de piel melocotón	50
4.2.5.1.1	Obtención del extracto de piel de melocotón.....	50
4.2.5.1.2	Detección proteica del extracto	50
4.2.5.1.3	Cuantificación proteica del extracto.....	51
4.2.5.2	Protocolo de sensibilización y de provocación	52
4.2.6	Estudio del papel del cofactor en la anafilaxia por extracto de melocotón	53
4.2.7	Determinación de mediadores mastocitarios durante la anafilaxia por LTP de melocotón.....	54
4.2.8	Estudio de la permeabilidad intestinal en el modelo múrido de anafilaxia por LTP de melocotón	54
4.2.9	Análisis estadístico.....	55
5.	RESULTADOS.....	56
5.1	Trabajo 1. caracterización de la anafilaxia en urgencias hospitalarias	56
5.1.1	Población a estudio y características demográficas	56
5.1.2	Etiología de la anafilaxia	56
5.1.3	Gravedad de la anafilaxia:.....	60
5.1.4	Tratamiento recibido en urgencias.....	61
5.1.5	Determinación de triptasa sérica durante el episodio de anafilaxia	62
5.1.6	Concordancia del diagnóstico de Urgencias con el diagnóstico alergológico.....	62
5.2	Trabajo 2. modelo experimental múrido de anafilaxia por alimentos mediada por cofactorR	64
5.2.1	Primer diseño experimental	64
5.2.2	segundo diseño experimental.....	65
5.2.3	Tercer diseño experimental.....	70
6.	DISCUSIÓN:.....	77
6.1	trabajo 1. caracterización de la anafilaxia en urgencias hospitalarias.....	77
6.2	trabajo 2. modelo experimental múrido de anafilaxia por alimentos mediada por cofactor	80
7.	CONCLUSIONES.....	84
8.	LÍNEAS DE FUTURO:	85
9.	BIBLIOGRAFIA.....	86

RESUMEN

Introducción: La anafilaxia es una reacción de hipersensibilidad generalizada o sistémica, grave que amenaza la vida. Se han descrito diferentes vías de activación celular que desencadenan la reacción anafiláctica, que pueden ser dependientes o independientes de la inmunoglobulina E (IgE). El mastocito es la principal célula efectora en la anafilaxia. En nuestra zona geográfica, la alergia mediada por IgE a las proteínas de transferencia de lípidos (LTP) de alimentos vegetales (como la Pru p 3 del melocotón) es una de las causas más frecuentes. La anafilaxia potenciada por cofactor es una entidad frecuente en los casos de alergia a LTP. El ejercicio y los AINE (antiinflamatorios no esteroideos) son los cofactores más estudiados; no obstante el mecanismo subyacente no está bien identificado. El objetivo de este estudio fue desarrollar un modelo experimental murino de anafilaxia por LTP por alimento mediada por cofactor (AINE).

Métodos: Para evaluar la relevancia de la anafilaxia alimentaria mediada por cofactores, se realizó una caracterización de los casos de anafilaxia atendidos en Urgencias del Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona (Enero a Octubre de 2009), mediante un estudio retrospectivo de los informes de alta con el diagnóstico codificado de anafilaxia, shock anafiláctico u otros términos sugestivos de reacción anafiláctica. Se incluyeron los casos que cumplían los criterios clínicos de anafilaxia de la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica. Se analizaron los datos demográficos, etiología de la anafilaxia, gravedad, presencia de cofactores (alcohol, ejercicio, AINE), triptasa sérica y tratamiento.

Para desarrollar un modelo experimental murino de anafilaxia mediada por cofactor se utilizaron dos cepas de ratones macho, C57BL/6J y Balb c. Se sensibilizó a los ratones con proteína natural purificada Pru p3 (Laboratorios Leti, Madrid, España) o con un extracto estandarizado de piel de melocotón, y a los controles solo con suero salino tamponado. Se añadía Bordetella Pertussis (BP) o Toxina Cólera (TC) (ambas de Sigma Aldrich, Madrid, España) como adyuvante. Se compararon las vías de sensibilización intragástrica y enteral/peritoneal. La provocación se realizó vía intraperitoneal. Se estudiaron las dosis más efectivas de alérgeno para la sensibilización y provocación. La anafilaxia se evaluó mediante temperatura rectal, escala

de síntomas/signos, y elevación del hematocrito. Para determinar si existía activación del mastocito determinaron los niveles de *mouse mast cell protease-1* (mMCP-1) mediante técnica ELISA Mouse MCPT-1 (Bioscience, Madrid, España). La permeabilidad intestinal se evaluó según las concentraciones de β -lactoglobulina en suero mediante el kit ELISA bovina (Bethyl, Bionova científica, Madrid, España) tras su administración vía sonda enteral. Se estudió el efecto del cofactor AINE (diclofenaco) sobre la permeabilidad intestinal.

Resultados: De 43855 pacientes que acudieron a Urgencias en el periodo de estudio, en 324 informes de alta constaba algún diagnóstico que sugiriera anafilaxia. De estos, 51 casos (0,12%) cumplían criterios clínicos de anafilaxia y fueron incluidos. Un 63% (32/51) fueron mujeres y 37% (19/51) varones, con una edad media de 48 años (rango 18-84 años). Un 6% (3/51) de los pacientes estaba en tratamiento con fármacos betabloqueantes y un 11,8% (6/51) con IECA (inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina). Los medicamentos fueron la causa más frecuente (43,1%), seguida por los alimentos (33%). En el 30% de los casos de anafilaxia por alimento, estaba asociado al episodio un cofactor, y entre ellos los AINE representaron el 60%. La sensibilidad de la triptasa sérica elevada ($>11,4 \mu\text{g/l}$), fue del 48% y la especificidad del 75%, con un VPP (valor predictivo positivo) del 85% y un VPN (valor predictivo negativo) del 31%. La adrenalina fue administrada solamente en un 55% (28/51) de los pacientes.

El primer modelo experimental murino de anafilaxia, ratones C57BL/6J sensibilizados con Pru p3 y BP, no mostraron una respuesta anafiláctica significativa, independientemente de la dosis de Pru p3 usada para la sensibilización o para la provocación. En el segundo modelo se sustituyó la BP por TC. No se observaron diferencias según la vía de sensibilización (intragástrica exclusiva vs combinada intragástrica/intraperitoneal). No se objetivaron cambios significativos de la temperatura, pero si en la escala de signos/síntomas y en el hematocrito en los grupos activos comparados con controles. En un tercer grupo de ratones sensibilizados exclusivamente por vía enteral, si se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) respecto a los controles, en todos los signos de respuesta anafiláctica (temperatura,

score y hematocrito). En los ratones sensibilizados con Pru p3 la concentración de mMCP-1 fue superior a los ratones control ($p < 0.05$). Asimismo, se comprobó un aumento significativo de la permeabilidad intestinal durante la anafilaxia inducida por Pru p 3. En el tercer modelo, ratones Balb/c se sensibilizaron con el extracto de piel de melocotón y TC. La vía intragástrica y la combinada enteral /intraperitoneal fueron similares. El descenso de temperatura fue significativa a los 20 min con la dosis de 2 mg, y a los 30 y 40 min con la de 1mg . Todas mostraron resultados significativamente superiores a los controles en score y hematocrito. En este modelo también se objetivó un efecto significativo del diclofenaco en el aumento de la permeabilidad intestinal, con una correlación positiva entre los niveles de BLG y MMCP-I ($R=0,71$, $p=0,02$) sugiriendo el efecto directo de la activación mastocitaria en la permeabilidad.

Conclusiones: Los cofactores están implicados en un porcentaje relevante de las anafilaxias por alimentos. El modelo murino de anafilaxia por proteína de transferencia lipídica, mediante la sensibilización a Pru p 3 purificado o a un extracto de piel de melocotón, con posterior provocación intraperitoneal, resulta en una respuesta anafiláctica con activación del mastocito, condicionada por la dosis del alérgeno, el adyuvante utilizado, pero no por la vía de sensibilización. La anafilaxia se asocia a un aumento de la permeabilidad intestinal que además se incrementa por la presencia de cofactor (AINE) probablemente mediada por la activación del mastocito.

ABSTRACT

Introduction: Anaphylaxis is a severe, life-threatening generalized or systemic hypersensitivity reaction. Different cell activation pathways have been described that trigger the anaphylactic reaction, which can be dependent or independent of immunoglobulin E (IgE). The mast cell is the main effector cell in anaphylaxis. In our geographical area, an IgE-mediated allergy to lipid transfer proteins (LTPs) from plant foods (such as Pru p 3 from peaches) is one of the most frequent causes. Cofactor-potentiated anaphylaxis is a frequent entity in cases of LTP allergy. Exercise and NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) are the most studied cofactors; however the underlying mechanism is not well identified. The aim of this study was to develop a murine experimental model of cofactor-mediated food-LTP anaphylaxis (NSAID).

Methods: To assess the relevance of cofactor-mediated food anaphylaxis, a characterization of anaphylaxis cases seen in the Emergency Department of the Hospital Universitari Vall d'Hebron in Barcelona (January to October 2009) was carried out, through a retrospective study of the discharge reports with the coded diagnosis of anaphylaxis, anaphylactic shock or other terms suggestive of anaphylactic reaction. Cases that met the clinical criteria for anaphylaxis of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology were included. Demographic data, anaphylaxis etiology, severity, presence of cofactors (alcohol, exercise, NSAIDs), serum tryptase, and treatment were analyzed.

Two strains of male mice, C57BL / 6J and Balb c, were used to develop a murine experimental model of cofactor-mediated anaphylaxis. The mice were sensitized with purified natural protein Pru p3 (Laboratorios Leti, Madrid, Spain) or with a standardized extract of peach peel, and the controls only with buffered saline. Bordetella Pertussis (BP) or Cholera Toxin (TC) (both from Sigma Aldrich, Madrid, Spain) were added as adjuvants. Intra-gastric and enteral/peritoneal sensitization pathways were compared. The provocation was carried out intraperitoneally. The most effective doses of allergen for sensitization and challenge were studied. Anaphylaxis was assessed by rectal temperature, symptom/sign scale, and elevated hematocrit. To determine whether there was mast cell activation, the levels of mouse mast cell protease-1 (mMCP-1) were

determined using the Mouse MCPT-1 ELISA technique (Bioscience, Madrid, Spain). Intestinal permeability was evaluated according to serum β -lactoglobulin concentrations using the bovine ELISA kit (Bethyl, Scientific Bionova, Madrid, Spain) after administration via enteral tube. The effect of the NSAID cofactor (diclofenac) on intestinal permeability was studied.

Results: Of 43,855 patients who came to the emergency department during the study period, 324 discharge reports contained a diagnosis that suggested anaphylaxis. Of these, 51 cases (0.12%) met clinical criteria for anaphylaxis and were included. 63% (32/51) were women and 37% (19/51) were men, with a mean age of 48 years (range 18-84 years). 6% (3/51) of the patients were under treatment with beta-blockers and 11.8% (6/51) with ACEIs (angiotensin converting enzyme inhibitors). Medications were the most frequent cause (43.1%), followed by food (33%). In 30% of the cases of anaphylaxis due to food, a cofactor was associated with the episode, and among them NSAIDs accounted for 60%. The sensitivity of elevated serum tryptase ($> 11.4 \mu\text{g} / \text{l}$) was 48% and the specificity was 75%, with a positive predictive value of 85% and a negative predictive value of 31%. Epinephrine was administered in only 55% (28/51) of the patients.

The first murine experimental model of anaphylaxis, C57BL / 6J mice sensitized with Pru p3 and BP did not show a significant anaphylactic response, regardless of the dose of Pru p 3 used for sensitization or for challenge. In the second model, BP was replaced by CT. No differences were observed according to the sensitization route (exclusive intragastric vs combined intragastric / intraperitoneal). No significant changes in temperature were observed, but there were changes in the signs/symptoms scale and in the hematocrit in the active groups compared with controls. In a third group of mice sensitized exclusively by the enteral route, significant differences ($p < 0.05$) were observed compared to the controls, in all signs of anaphylactic response (temperature, score and hematocrit). In mice sensitized with Pru p3, the concentration of mMCP-1 was higher than in control mice ($p < 0.05$). Likewise, a significant increase in intestinal permeability was found during Pru p 3-induced anaphylaxis. In the third model, Balb/c mice were sensitized with the peach peel extract and TC. The intragastric route and the combined enteral/intraperitoneal route were similar.

The drop in temperature was significant at 20 min with the 2 mg dose, and at 30 and 40 min with the 1 mg dose. All showed significantly superior results to the controls in score and hematocrit. In this model, a significant effect of diclofenac in increasing intestinal permeability was also observed, with a positive correlation between BLG and MMCP-I levels ($R = 0.71$, $p = 0.02$) suggesting the direct effect of mast cell activation in permeability.

Conclusions: Cofactors are involved in a relevant percentage of food anaphylaxis. The murine model of anaphylaxis by lipid transfer protein, through sensitization to purified Pru p 3 or to a peach skin peel, with subsequent intraperitoneal provocation, results in an anaphylactic response with mast cell activation, conditioned by the dose of the allergen, the adjuvant used, but not by route of sensitization. Anaphylaxis is associated with an increase in intestinal permeability that is also increased by the presence of a cofactor (NSAID), probably mediated by mast cell activation.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANAFILAXIA

1.1.1 DEFINICIÓN

La anafilaxia se considera la reacción alérgica más grave posible, que habitualmente implica la afectación de múltiples sistemas del organismo. El término anafilaxia, fue acuñado por Richet y Portier. En 1901 fueron escogidos para estudiar las propiedades tóxicas de la medusa. Su experimento versó, en la administración de una primera dosis del veneno de Actina (una anémona) a perros, y a los que sobrevivían reinyectarles una con la intención de inmunizarlos, pero observaron que un de ellos, al cual denominaron Neptuno, presentó diarrea intensa, asfixia, síncope y muerte en pocos minutos. Los resultados obtenidos se publicaron en 1902, en una nota a la Sociedad de Biología de París, como el descubrimiento sorprendente: “buscábamos inmunidad y descubrimos la hipersensibilidad”, al fenómeno se le acuñó el nombre de “anafilaxis”, en contraposición a profilaxis. En 1913 Richet y Portier fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina (1).

Según la definición propuesta por la EAACI (European Academy of Allergy and Clinical Immunology), se trata de una reacción de hipersensibilidad generalizada o sistémica, grave que amenaza la vida. El panel de expertos que desarrolló la Guía de Actuación en Anafilaxia (GALAXIA), avalada por la Sociedad Española de (Alergología e Inmunología Clínica SEAIC) define la anafilaxia, como una reacción alérgica grave de instauración rápida y potencialmente mortal .(2)(3)

1.1.2 EPIDEMIOLOGÍA

La incidencia sugerida en una revisión de ámbito Europeo, es 1,5-7,9 /100.000 personas/año (rango 1,5-32), con una prevalencia estimada de 0, 3% y una mortalidad entorno al 0,001% (4)(5). Dos estudios realizados en España, incluidos en dicha revisión, circunscritos a una misma población, mostraron una incidencia de 112/100.000 habitantes, algo superior a la media europea (6)(7).

Si se circunscribe a las urgencias hospitalarias de ámbito estatal, la incidencia se sitúa en 0,9/1000 visitas, y de 0,8/1000 habitantes, sin diferencias significativas por sexos, pero si en edades siendo mayor en el rango de edad de 0-4 años.(8).

La etiología de la anafilaxia, engloba un amplio abanico de agentes casuales, que incluyen fármacos, alimentos, venenos de himenópteros, látex, o parásitos (*Anisakis*). En un 20% de los casos no se identifica la causa. (4), cifra que se eleva al 42,2% en diagnósticos realizados en el departamento de urgencias médicas (9).

La etiología de la anafilaxia es variable en función de la zona geográfica así como de la edad de los pacientes estudiados. Los alimentos serían la causa más frecuente en población pediátrica, mientras que en adultos son los fármacos y las picaduras de himenópteros (4). En rangos de edades, para menores de 18 años se ha descrito que en un 65% el agente casual serían alimentos y un 15% fármacos y 0% himenópteros, siendo un 12,5% , 46,1% y 32,7% respectivamente ,en mayores de 18 años (10). En adultos, se han descrito proporciones similares y estables a lo largo del tiempo (11).

1.1.3 SINTOMATOLOGÍA

La anafilaxia se caracteriza por la presencia de síntomas y signos muy diversos que afectan a diversos órganos o sistemas. En la mayoría de reacciones anafilácticas, alrededor del 84% de los casos, se observan síntomas cutáneos, pero un 15% corresponderían a las que se presentan en forma de compromiso cardiocirculatorio (disfunción de la tensión arterial, síncope), sin lesiones cutáneas. (4) (2).

Las reacciones anafilácticas se caracterizan por una instauración rápida y más o menos simultánea de las manifestaciones que son fruto de la afectación de diferentes órganos: habones, congestión nasoocular, eritema generalizado, angioedema, estornudos, rinorrea, estridor, brocoespasmo, vómitos, disfagia, diarrea, calambres abdominales, palpitaciones, hipotensión, colapso, shock, insuficiencia coronaria con posible parada cardíaca, ansiedad, convulsiones, etc.

En algunas reacciones anafilácticas, se pueden observar reacciones bifásicas, con una incidencia que había sido estimada entre el 5-20%, pero en estudios recientes, se ha sugerido que puede ser substancialmente menor, entorno al 4-4,5%. No existen estudios concluyentes sobre la fisiopatología, factores de riesgo o momento de aparición.(12)

1.1.4 DIAGNÓSTICO

1.1.4.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

El diagnóstico de la anafilaxia es clínico; en la actualidad no existe un biomarcador validado que pueda detectar todos los casos, por lo que la experiencia y conocimiento de los síntomas es fundamental para el diagnóstico.

En 2006 se establecieron por consenso unos criterios clínicos de anafilaxia (13). Según estos criterios, la anafilaxia es muy probable cuando se cumple uno de los tres criterios:

1. Inicio agudo (minutos a horas) de un síndrome que afecta a la piel o las mucosas, junto con al menos uno de los siguientes:
 - 1.1 compromiso respiratorio
 - 1.2 Descenso de la presión arterial o síntomas asociados a la disfunción orgánica
2. Aparición rápida (minutos a algunas horas) de dos o más de los siguientes síntomas tras la exposición de un alérgeno potencial para ese paciente:
 - 2.1 afectación de piel o mucosas
 - 2.2 compromiso respiratorio
 - 2.3 descenso de la presión arterial o síntomas asociados a la disfunción orgánica

2.4 síntomas gastrointestinales persistentes

3. Descenso de la presión arterial en minutos o algunas horas tras la exposición a un alérgeno conocido para ese paciente.

3.1 lactantes y niños: presión arterial baja o descenso superior al 30% de la sistólica

3.2 adultos: presión arterial sistólica inferior a 90mmHg o descenso superior al 30% respecto a la basal.

Estos criterios han sido adoptados por las guías clínicas de la mayoría de sociedades científicas internacionales (EAACI, WAO, AAAAI/ACAAI) y también por las nacionales, como la Sociedad española de Alergia e Inmunología Clínica (SEAIC). Recientemente, la WAO ha publicado unos criterios diagnósticos ligeramente modificados (14).

1.1.5 FISIOPATOLOGÍA

Se han propuesto varios mecanismos fisiopatológicos que pueden estar involucrados en el desarrollo de anafilaxia: mecanismos inmunológicos y mecanismos no inmunológicos. Mecanismos inmunológicos en anafilaxia

Se han descrito diferentes vías de activación celular que desencadenan la reacción anafiláctica, que pueden ser dependientes o independientes de la inmunoglobulina E (IgE).

- Anafilaxia dependiente de IgE o mediada por IgE: Se desarrolla en 2 fases, una de sensibilización y una efectora. En la fase de sensibilización, un alérgeno (habitualmente una proteína o una glicoproteína) induce en el organismo la producción de anticuerpos IgE específicos por parte de las células plasmáticas. Una vez sensibilizado el individuo, en posteriores exposiciones, ese alérgeno es capaz de unirse a la IgE específica sintetizada. El alérgeno al unirse al anticuerpo IgE fijado al receptor de alta afinidad FcεRI, presente en la superficie del mastocito y basófilo, es capaz de

inducir el entrecruzamiento entre complejos IgE- Fc ϵ RI, activando a las células y dando lugar a la liberación de mediadores. En concreto en el mastocito, las cadenas α del receptor, activan las tirosina quinasas Lyn y Fyn, asociadas a cadena β . Esto ocasiona una fosforilización de motivos de activación basado en tirosinas (ITAM), y posterior reclutamiento de las Syk cinasa. Estos pasos de activación, con la fusión de la membrana intragranular y la plasmática, conducirán a la formación de conductos de secreción para la liberación masiva del contenido granular al espacio pericelular. Los mediadores liberados por los mastocitos se clasifican en preformados, neoformados neosintetizados . Los preformados incluyen, entre otros, aminas biogénicas como la histamina y proteasas como la triptasa Los neoformados destacan los metabolitos fosfolípidos y en los neosintetizados las citoquinas y las quimiocinas. (15)(16).

- Anafilaxia no dependiente de IgE: Este mecanismo se ha descrito en modelos murinos, aunque hasta la fecha aún no se ha podido comprobar de forma inequívoca en humanos. Existen diversos posibles mecanismos.

➤ Anafilaxia mediada por IgG: La IgG es la implicada en la anafilaxia pasiva, a través del receptor Fc γ Rs. Precisa una elevada concentración a nivel sistémico de antígeno, en comparación con la anafilaxia mediada por IgE, y donde la liberación del mediador factor activador de plaquetas (PAF) sería el más característico e importante. Se ha descrito en la infusión de grandes cantidades de un fármaco, o en terapias con anticuerpos monoclonales (mAb)(17).

➤ Activación del complemento: El complemento, C3, C5 y péptidos derivados denominados anafilatoxinas, son capaces de activar mastocitos y basófilos estimulando la desgranulación. Se postula que los niveles de anafilatoxinas, están correlacionados con la gravedad de la reacción. Se ha visto implicada en reacciones con veneno himenópteros.

En la figura 1 se muestra gráficamente como la concentración relativa de antígeno y anticuerpo (IgE e IgG) puede modular la respuesta inmunológica frente a los antígenos.

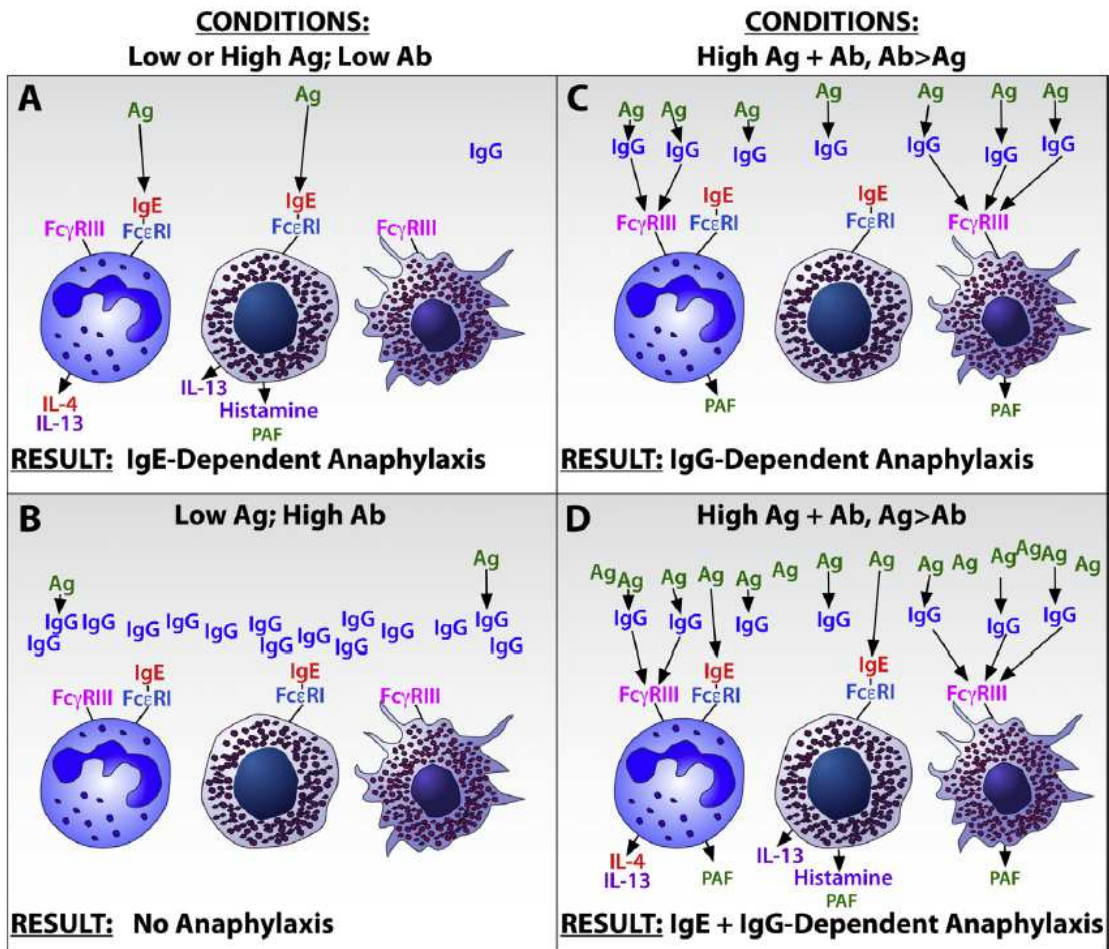


Figura 1. Concentraciones relativas de antígeno y anticuerpo en la anafilaxia mediada por anticuerpos (IgE o IgG) (De: Finkelman, Khodoun, and Strait 2016)

1.1.5.1 EL MASTOCITO: CÉLULA EFECTORA EN ANAFILAXIA

Los mastocitos (MC) son unas células complejas, que están presentes en una amplia variedad de sistemas (cutáneo, respiratorio, gastrointestinal, linfático y genitourinario). Se ha estimado que el número de mastocitos, según sistema estudiado, puede variar desde 500 a 20000/mm³, siendo más elevado su número en el tracto gastrointestinal. Su tamaño se estima de 7 a 20 μm de diámetro. (19)

1.1.5.2 PROGENITORES MASTOCITARIOS Y DISTRIBUCIÓN

Los MC son células terminales diferenciadas, son células inmunes granulares de origen hematopoyético de la médula ósea que derivan del progenitor CD34 / CD117 altamente distribuidas en el organismo (19).; En uno de los estudios más recientes, (20) se identificó un perfil de progenitor del mastocito de tipo multipotencial, alejado de los más comunes tipo mieloides o granulocíticos/macrófagos, Los progenitores de MC, migran hasta los tejidos diana, como piel, mucosas del tracto respiratorio, y el tracto gastrointestinal dónde completan su maduración y diferenciación en presencia de factores de crecimiento como interleucina (IL) 9, IL-10, IL-3, IL-4, IL-33, quimiocina 12 con motivo C-X-C (CXCL12 factor), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), que bajo un control de estimulación específico, da lugar a diferentes subtipos de MC. (19).

Los MC se clasifican según su contenido granular enzimático, específicamente las proteasas (19), en los siguientes subtipos:

- MC_T: contienen triptasa, y se localizan principalmente en mucosa alveolar e intestino delgado
- MC_C: contienen quimasa, y están presentes en tejido sinovial
- MC_{TC}: contienen triptasa y quimasa, y se localizan en piel, submucosa intestinal y amígdalas

En los modelos murinos también presenta localizaciones similares y se clasifican en los siguientes subtipos (19):

- CTMC: mastocitos de tejido conectivo que expresan una amplia variedad de proteasas y carboxipeptidasa 3 (CPA 3), ; los homólogos en humano son los MCTC
- MMC: mastocitos de mucosas (pulmonar, gastrointestinal), que expresan dos tipos de proteasas (mMCP-1 y mMCP-2); los homólogos en humanos son los McT (21)(tabla 1)

Tabla 1. Características de las subpoblaciones de mastocitos humanos y murinos

MASTOCITO	Murino MMC	Murino CTMCs	Humano MCT	Humano MCT C
LOCALIZACIÓN	Epitelio lámina propia de la mucosa intestinal /pulmonar	submucosa, serosa y mesenterio intestinal, piel	Mucosa intestinal (98%), Alveolo pulmonar (93%)	Submucosa intestinal (87%) Piel (88%) / ganglios linfáticos
CONTENIDO GRANULAR	1. Proteasas (quimasas): mMCP-1, mMCP-2 2. Proteoglicano: Condroitina sulfato E (bajos niveles heparina)	1. Proteasas (quimasas): MMCP-4, mMCP-5, mMCP-6, CPA 3 2. Proteoglicano: Heparina (altos niveles heparina)	Triptasa Condroitina sulfato	Triptasas Quimasa Carboxipeptidasa Catepsina G Heparina
DEPENDENCIA CÉLULAS T	SÍ	NO	NO	SÍ

Los datos pueden presentar variaciones en función de la cepa de ratón, zonas del tejido afectadas y tipo de inflamación tisular.(19)(22)(23)

1.1.5.3 MEDIADORES MASTOCITARIOS

Los mediadores mastocitarios que se liberan tras la activación pueden ser preformados o de nueva síntesis y se describen a continuación(19)(24)(25):

Mediadores preformados

Estos mediadores se almacenan en gránulos citoplasmáticos. Las propiedades metacromáticas de los gránulos son debidas a la interacción de tintes básicos con residuos ácidos en cadenas de glucosaminoglicanos altamente sulfatados (GAG) junto a proteoglicanos de serglicina, el constituyente mayor de los gránulos. Los GAG cargados negativamente concentran proteasas, histamina, y otras enzimas cargadas positivamente:

- Las aminas biogénicas histamina, serotonina, y dopamina, son 1,4/1,3 diaminas producidas por aminoácidos decarboxilasas . Están implicada en la vasodilatación, angiogénesis, mitogénesis y dolor . La **histamina** es la más más conocida por su implicación en la cascada alérgica.- Su concentración en mastocitos humanos es de 3-8pcg/ml y tiene una vida media corta (10-30 minutos), lo que dificulta su medición. En modelos múridos está en concentraciones elevadas en mastocitos de tejido conectivo (CTMCs) siendo menor en mastocitos de las mucosas. Es uno de los principales mediadores de los mastocitos, con capacidad para vehicular su efecto a través de cuatro receptores (H1-4). Los receptores H1 y H2 son responsables de la reacción cutánea en forma de urticaria, eritema, broncoconstricción, aumento actividad intestinal e hipotensión. La **serotonina** está implicada especialmente en la vasoconstricción y el dolor; actúa como neurotransmisor y posiblemente esté implicada en las interacciones mastocito-neuronales. La **dopamina** funciona como neurotransmisor, y posiblemente esté implicada en la señalización mediada por mastocitos de las terminaciones nerviosas.

- Entre los enzimas lisosomales, la **β -hexosaminidasa** es la más representativa. Está presente en todos los subtipos de mastocitos de todas las especies, y su determinación se ha utilizado para analizar la degranulación mastocitaria. (25)
- Las proteasas se hallan almacenadas en los gránulos y constituyen el 25% del contenido proteico del mastocito. Están implicadas en una amplia variedad situaciones fisiológicas y patológicas (p. ej. artritis, inflamación de la vía aérea, angiogénesis, mantener la barrera intestinal o modulación en las reacciones alérgicas). Incluyen la **quimasa**, la **triptasa**, y la **carboxipeptidasa A3**, expresadas exclusivamente en células mastocitarias. La **quimasa** es una serin-proteasa unida a proteoglicanos, que contribuyen al remodelado de la matriz extracelular mediante un mecanismo directo, por la escisión de la fibronectina y del colágeno no helicoidal, o por un mecanismo indirecto como la activación de las metaloproteinasas (MMP) que a su vez son liberadas por el mastocito. La **triptasa** es el componente proteico principal que se encuentra en gránulos secretores de MC humanos. Las principales triptasas en humanos incluyen β I-, β II- y β III y la α -triptasa enzimáticamente inactiva. Las β -triptasas solubles estimulan los nervios activando el receptor PAR2 activando el músculo liso de las vías respiratorias y los fibroblastos actuando como mitógeno. Ayuda a reclutar neutrófilos y eosinófilos. Tienen especificidades de escisión de tipo tripsina y pertenecen a la clase de serina proteasa. Su determinación sérica se usa en el diagnóstico de mastocitosis sistémica y de reacciones anafilácticas. (19)
- Los mastocitos también producen citoquinas. El **TNF α** se libera en los primeros 10 minutos, induciendo la expresión de la molécula de adhesión induciendo el reclutamiento de neutrófilos y otros leucocitos a las zonas de activación mastocitaria. También interviene en la migración de células dendríticas cutáneas o del epitelio respiratorio a los ganglios linfáticos. La **IL-4** se produce tras la estimulación a través de la IgE o en respuesta a calcio. Está involucrada en respuesta TH2, modula la función y diferenciación/crecimiento de mastocitos. La **IL-5** es liberada tras la activación

mastocitaria a través de la IgE, IL-33, lipopolisacárido (LPS) o peptidoglicano (PGN). Se ha demostrado su presencia en duodeno, mucosa bronquial y nasal, tanto en modelos humanos como murinos. (19)

- Entre las quimiocinas del mastocito destacan las siguientes: RANTES (CCL5), exotoxinas (CCLII); IL-8, CXCL8, MCP-1 (CCL2 o proteína quimiotaxis de monocito -1); MCP-3 (CCL7); MCP-4. (24)(19).
- Los mastocitos contienen factores de crecimiento (GF: grow factor) como el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1), que se secreta bajo el estímulo antigénico, rápidamente, mejorando la eficiencia del fibroblasto en la producción de colágeno. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), es liberado bajo diversos estímulos, entre ellos el antigénico., el factor de células madre (SCF), es importante en la diferenciación, crecimiento y supervivencia mastocitaria a través del receptor c-Kit (CD117). (19)(24)(25) -
- Entre los péptidos destacan la hormona de liberación corticotrópica, sustancia P, y el péptido vasoactivo intestinal. (19)

Mediadores neoformados

El aumento de los niveles de calcio intracelular y la fosforilación de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) en los mastocitos activados conduce a la rápida producción y liberación de mediadores neoformados, conocidos como eicosanoides. Los eicosanoides se producen mediante la conversión catalítica del ácido araquidónico (AA), que se libera mediante la acción enzimática de la fosfolipasa A2 (PLA2) sobre los fosfolípidos de membrana(25). Dan lugar a la producción de:

- **Prostaglandinas (PG):** EL AA se convierte en prostanglandina PGH2 mediante la acción de la ciclooxigenasa (COX), tanto en su forma constitutiva COX-1 como por la inducible COX-2. La PGH2 es el precursor bioactivo de todas las PG, de las cuales la más importante es la PGD2. Las PG

contribuyen al aumento de la permeabilidad vascular, el reclutamiento de leucocitos, la producción mucosa y la activación de células nerviosas.

- **Leucotrienos (LT):** Los CysLT también unen y se activan dos receptores acoplados a proteínas G (GPCR), CysLT1 y CysLT2. Los eicosanoides intervienen en la regulación de la permeabilidad vascular, contracción del músculo liso, reclutamiento de células efectoras, y en los patrones de presentación de antígenos.
- **Factor de activación plaquetario (PAF):** Tiene la capacidad de inducir broncroconstricción, quimiotaxis de células mastocitarias, incrementar la permeabilidad vascular, y acumular células inflamatorias. Se ha demostrado en humanos incrementos en sus concentraciones plasmáticas durante la anafilaxia(26) . En modelos murinos, se ha estudiado la PAF como mediador implicado en la vía alternativa de la anafilaxia. En un estudio comparativo de anafilaxia por cacahuete en tres cepas diferentes de ratones (C3H/HeOuj, Balb c y C57BL/6), al inhibir la PAF, únicamente la cepa C57BL/6 presentó una disminución de la respuesta anafiláctica significativa, lo que sugería una mayor implicación de la vía alternativa en esta cepa(27)

Mediadores neosintetizados

Los mediadores neosintetizados se sintetizan después de la activación transcripcional como resultado de la activación de los mastocitos. Su regulación depende del tipo de estímulos así como del receptor específico involucrado en la activación. Estos mediadores incluyen citocinas y quimiocinas, que se liberan horas después de la activación. Los mastocitos sintetizan y liberan citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Las citocinas antiinflamatorias comprenden TGF- β e IL-10. Las citocinas proinflamatorias incluyen citocinas asociadas con respuestas de células T colaboradoras (Th2) de tipo 2, como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 y citocinas asociadas con respuestas Th1, incluido interferón-gamma (IFN- γ) IL-2, IL-3, IL-12, IL-18 y TNF- α . Las quimiocinas CCL5 y CXCL8 también son sintetizadas por mastocitos y reclutan células inmunes a los sitios de

infección. Otras quimiocinas producidas por mastocitos múridos son MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4) y MCP-1 (CCL2) que ayudan a perpetuar la inflamación. (25)

1.1.5.4 MECANISMOS DE SECRECIÓN MASTOCITARIA

El mecanismo secretor mastocitario, al igual que en el caso de otras células, se inicia cuando la señal de proteínas neoformadas, pasa al retículo endoplasmático, donde es reconocido por señal de reconocimiento proteico (SRP), que lo une al receptor. Este complejo, mediante un intrincado proceso de modificación, atraviesa el aparato de Golgi, madura y alcanza la red trans-Golgi, el centro de clasificación para tráfico proteico. En la vía constitutiva secretora, el complejo proteico modificado mediante glicosilación, se une a transportadores vesiculo-tubulares, y alcanza la membrana plasmática (MP), con la que realiza la fusión y liberación del contenido. (28)

Diversos mecanismos de liberación del contenido de los gránulos secretores (GS) al espacio extracelular a través de la MP han sido descritos, y se resumen a continuación (29):

- Exocitosis completa: los GS se fusionan completamente con la MP, con intercambio lípido-proteico, se colapsan y liberan todo su contenido. Implica el reciclaje de toda la MP para formar nuevos GS
- “Kiss and run” exocitosis: un GS, se fusiona con la MP mediante un poro transitorio, libera una pequeña cantidad de contenido y se cierra el poro, reciclando el GS al citoplasma.
- Cavicaptura: es similar al “kiss and run”, pero se libera mayor contenido granular por una dilatación del poro. En ambas el reciclaje del GS es más rápido que en la exocitosis completa
- Degranulación lenta o “piecemeal”: es un tipo infrecuente de degranulación. El GS se abulta, genera una vesícula con contenido, de un tamaño entre 30-150 nm, la cual libera y acaba fusionándose con la MP, liberando su contenido.

- Exocitosis compuesta: En la respuesta mediada por IgE, predomina liberación de mediadores por este tipo de exocitosis. Se han descrito dos mecanismos: a) Multigranular, cuando varios GS se unen hasta formar un GS gigante, que se fusiona con la MP para liberar su contenido y b) Secuencial: Un GS se fusiona con la MP, pero antes de su colapso, se une otro GS a éste, para ir liberando el contenido de forma secuencial, sin la necesidad de trasladar todos los SG a la periferia. La exocitosis compuesta, permite que, ante un estímulo antigénico, en pocos minutos puede liberarse todo el contenido granular del mastocito, generando una respuesta clínica generalizada y grave como en el shock anafiláctico.

(29)(28)

1.1.5.5 DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS MASTOCITARIAS

Los mastocitos tienen una amplia distribución tisular y se encuentran predominantemente en la interfaz entre el organismo y el entorno externo en lugares de potencial entrada de patógenos o contacto con sustancias nocivas, como como piel, mucosa respiratoria y tracto gastrointestinal.

Mastocitos cutáneos

Los MC cutáneos provienen de progenitores mastocitarios (MCp), que pasan del torrente circulatorio a la dermis, donde entran en contacto con el microambiente de la zona, proliferan y se diferencian. Su localización principal en individuos con piel sana, es en la zona perivascular de la dermis, y cercana a glándulas eccrinas, y están ausentes en la epidermis. Su distribución es heterogénea, con mayor densidad en la zona interna del antebrazo y parte distal de extremidades inferiores, probablemente por ser las zonas más afectadas por estímulos externos, que predisponen a un reclutamiento mayor de células mastocitarias.

(19)

En modelos murinos, los MC cutáneos expresan MCPT-4 quimasa, MCPT-5 elastasa, triptasas MCPT-6 y 7, y CPA3 carboxipeptidasa. En humanos, expresan triptasa β , quimasas y carboxipeptidasas homólogas. Existen diferencias en la composición de sus gránulos según la zona donde está ubicado el mastocito. Por ejemplo,

en la zona mamaria presenta mayor contenido de triptasa, respecto a otras zonas del cuerpo donde los gránulos contienen más histamina y quimasa. (22) Respecto a la expresión de receptores, se encuentran diferencias entre los MC de piel y otros tejidos como el pulmonar, especialmente en los Toll like receptors (TLR). Así, en los MC cutáneos predominan los TLR 7, TLR 10 y TLR 9; en cambio, este último no está presente en MC pulmonares. (28)

Mastocitos intestinales

Los MC intestinales son de gran importancia por estar implicados en un amplio abanico de funciones, desde la eliminación de patógenos a la preservación de la integridad epitelial. Los MC están principalmente situados en las áreas alrededor de fibras nerviosas, interviniendo en la red neuroimmune de respuesta intestinal ante estímulos tanto fisiológicos como patológicos. (28) Un 90% del total de MC están situados a 2 µm de las fibras nerviosas, con uniones sinápticas. Las moléculas de adhesión nectina 1 y 3, y la liberación mastocitaria de mediadores neurotróficos son facilitadores de esta unión. Aumenta el número de MC en función de la disfunción intestinal y la afectación de fibras nerviosas, aumentando también el contenido mastocitario de sustancia P y de péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), tanto en modelos humanos como murinos. La histamina es el mediador más importante en la respuesta neuroimmune intestinal, con aumento del número de receptores de histamina H1 y H2 en reacciones alérgicas y en intestino irritable, pero con diferencias significativas en modelos animales y humanos, puesto que en humanos están implicados los 4 receptores de histamina (H1, H2, H3, H4), mientras que en animales sólo están implicados los dos primeros. Las proteasas como la triptasa actúan sobre receptores activados por proteasas (PAR). A nivel intestinal están descritos 4, pero también existen diferencias entre humanos y animales en su activación. En la reacción de hipersensibilidad estarían implicados varios mediadores, que activarían la respuesta en submucosa, donde están presentes el mayor número de MC cercanos a fibras nerviosas entéricas. Otras señales neuronales que activan los MC además del alérgeno

serían, sustancia P, somatostatina, adenosín trifosfato (ATP), factor corticotrofin neuropéptido, lo que implica una activación bidireccional de los MC–fibras nerviosas (22)

Los receptores expresados por los mastocitos varían según su localización. En intestino delgado los MC expresan un menor número de TLR, probablemente porque no intervienen tanto en la defensa frente a infecciones, mientras que es elevada en colon. Expresan integrina, no presente en otros tejidos y órganos. En la anafilaxia aumenta la producción de esfingosina 1-fosfato (S1P), que se une a su receptor S1PR-1, para activar la migración mastocitaria hacia la mucosa intestinal. La IL-9 está involucrada en anafilaxia en modelos murinos, incrementando la permeabilidad intestinal y reclutamiento mastocitario. (30)(31)

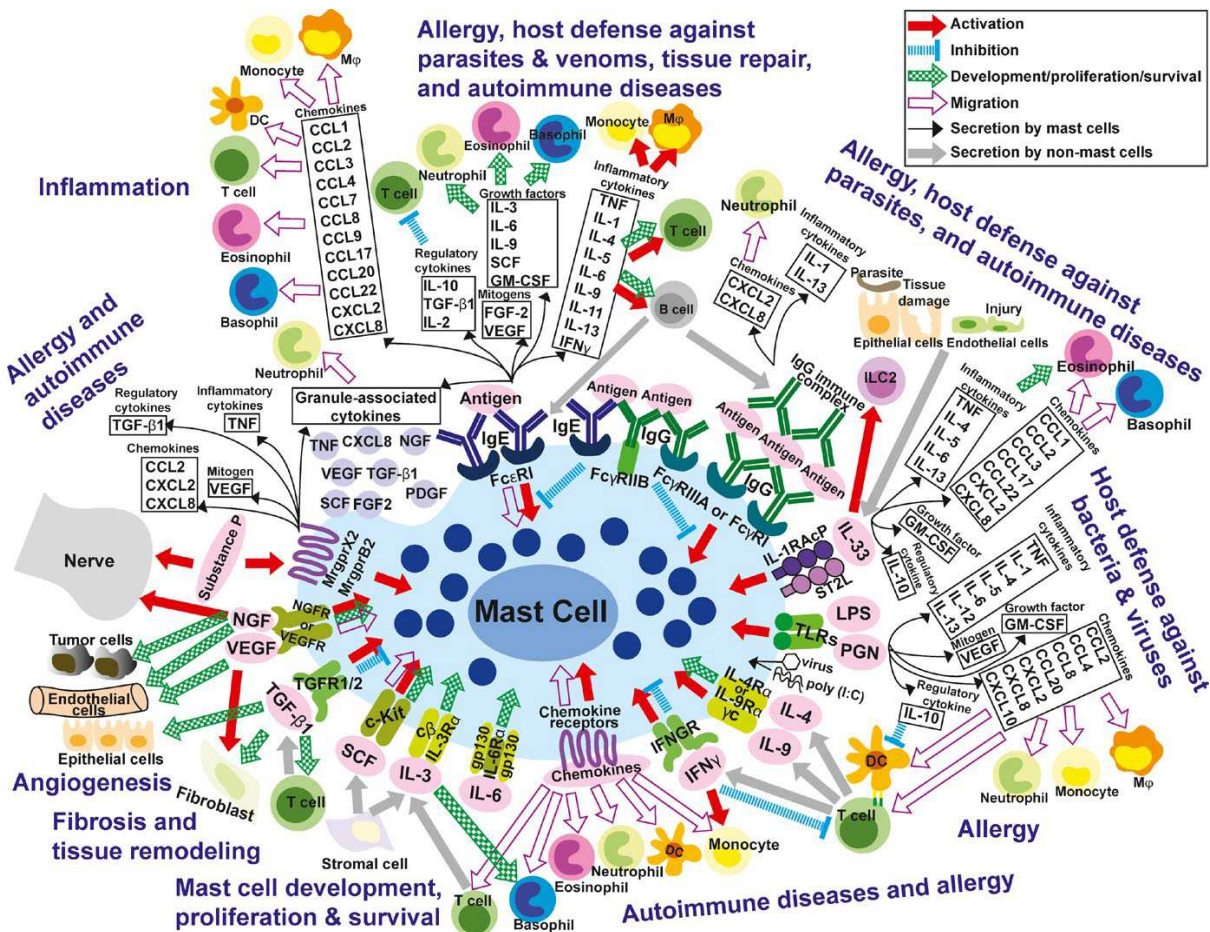


Figura 3. Mediadores – Receptores y funciones mastocitarias. De (24)

1.2 PERMEABILIDAD INTESTINAL

La permeabilidad intestinal es la facilidad/habilidad con la que epitelio intestinal permite el paso de moléculas, principalmente inertes de bajo peso molecular e iones, mediante una difusión pasiva no mediada (cm s^{-1}). El transporte intestinal es el número de moléculas que atraviesan la capa epitelial en un tiempo dado mediante un flujo unidireccional ($\text{mol h}^{-1}\text{cm}^{-2}$). (Ménard S, Cerf-Bensussan N 2010)

1.2.1 TRANSPORTE INTESTINAL DE ANTÍGENOS

Se han descrito dos mecanismos de transporte del lumen intestinal a lámina propia, que se detallan a continuación(32):

1. Difusión paracelular, a través de las uniones herméticas o *tight junctions* existentes entre las células intestinales epiteliales adyacentes. Su posición más apical, les hace el factor limitante en la velocidad de transporte molecular. Son más abundantes en la zona vellosa que la cripta. Están reguladas por múltiples moléculas, como las ocludinas, claudinas, y las junctional adhesion molecules (JAM-A). Existe una vía de alta capacidad, que está afectada por el tamaño de la molécula y una vía baja capacidad, independiente del tamaño. Esta última vía podría deberse a uniones fijas o interrupciones transitorias de la capa epitelial. Pueden utilizar esta vía, moléculas de masa molecular menor a 6000 Da, lo que permite utilizar moléculas como el manitol como marcador de transporte paracelular.
2. Transporte transcelular mediante endocitosis/exocitosis que pueden implicar a receptores de membrana o no.

1.2.2 ESTUDIO DE LA PERMEABILIDAD INTESTINAL EN MODELOS MÚRIDOS

Diferentes métodos se han investigado para valorar la permeabilidad intestinal(33):

1. Trazadores no digeribles: lactulosa, manitol, polietilenglicol (PEG), dextranos fluorescentes (fluoresceína iso-tio-cianato dextrano (FITC-D), Cr-EDTA, peroxidasa de rábano (HRP)
2. Cámaras de Ussing: permiten la medición de la resistencia eléctrica trans epitelial, en pequeños segmentos de tejido (1cm²)
3. Proteínas de expresión de Tight Junctions: ZO-1, Claudinas, o mRNA expresión, JAM-2,
4. Proteínas transeúntes : Beta lactoglobulina (34)
5. Sistema de resistencia eléctrica transepitelial: mide la integridad de la monocapa y las tight junctions en cultivos celulares (35)(36)

1.3 ALERGIA ALIMENTARIA

Una alergia alimentaria es una respuesta inmunitaria anormal a los alimentos, en la mayoría de ocasiones, mediada por un mecanismo dependiente de IgE.. Aunque los alimentos alergénicos más comúnmente contienen miles de proteínas, las reacciones alérgicas son típicamente provocadas por un subconjunto definido de proteínas que se encuentran en los alimentos. La estructura molecular de la proteína y sus propiedades físico-químicas, son las que confieren su capacidad alergénica, entre ellas la homología estructural y la estabilidad (37)

Las principales familias proteicas en las que se dividen los alérgenos alimentarios son :(37)

1. Moléculas asociadas a alergia a alimentos de origen vegetal: Proteínas PR-10 (homólogas a Bet v 1), Proteínas de transferencia de lípidos no específicas (nsLTP), Profilinas, Proteínas de

almacenamiento, Proteínas similares a la taumatina (TLP), Determinantes de carbohidratos de reacción cruzada (CCD)

2. Moléculas asociadas a alergia a alimentos de origen animal: Tropomiosinas, Parvalbuminas, Caseínas, Lipocalina, Familia de lisozimas, Familia Transferrinas, Ovomucoides

1.3.1 PREVALENCIA Y ETIOLOGÍA DE LA ALERGIA ALIMENTARIA

En un estudio reciente en Europa, se estableció que la prevalencia combinada de por vida y puntual de alergia a alimentos autoinformada fue del 17,3% y el 5,9% respectivamente. (26). En España, un estudio realizado en servicios de Alergología de todo el territorio, describe un 11,4% de consultas por alergia alimentaria (12,6% en Cataluña), con un aumento progresivo en las últimas dos décadas, especialmente en edades adultas La anafilaxia representaba el 12,1% de las reacciones alérgicas a alimentos. En un 1% eran pacientes con anafilaxia alimentaria inducida por ejercicio. La causa más frecuente de alergia alimentaria fueron las frutas (44,7%), sobretodo la familia de las rosáceas, los frutos secos (28,4%) y el marisco (14,8%) (38). El alérgeno principal de las rosáceas es la proteína de transferencia lipídica (LTP) (39). En nuestro entorno, el porcentaje de sensibilizados a rosáceas es del 48%, con un 94% de positividad a la LTP de melocotón o Pru p 3. (40). Las LTP también son también la primera causa de anafilaxia en la zona Mediterránea (41)

1.4 PROTEÍNAS DE TRANSFERENCIA LIPÍDICA

1.4.1 GENERALIDADES

Las proteínas de transferencia lipídica, son una familia de panalérgenos, ampliamente distribuido en frutas, frutos secos, legumbres, vegetales y también en tejidos estructurales de las plantas. Aunque la función fisiológica de las LTP es controvertida, se ha comprobado que funcionan como portadores intra y extracelulares para un amplio espectro de lípidos necesarios para la biogénesis de la membrana. Además, son miembros de la familia de proteínas relacionadas con la patogénia 14 y están implicadas en la

adaptación de las plantas al estrés abiótico y biótico. Se sugiere que el papel de las LTP en la defensa de las plantas es el resultado de (1) una actividad antimicrobiana directa facilitada por la permeabilización de las membranas celulares de bacterias y hongos fitopatógenos y una supuesta activación de dependiente del receptor elicitor fúngica (homólogo de LTP) del sistema inmunitario de las plantas en presencia de lípidos (42)(43)

1.4.2 PRU P3

En 1999 se identifica por primera vez la Pru p 3, LTP del melocotón, como alérgeno principal (44), con un peso de 9 Kd, con residuos no glicosilados y elevado punto isoeléctrico. Se han descrito 3 regiones con capacidad de unión a IgE, péptido 7 (11-20), 8 (1-80) y 15 (31-40), pudiendo ser similares en otras LTP (45)(Figura 4).

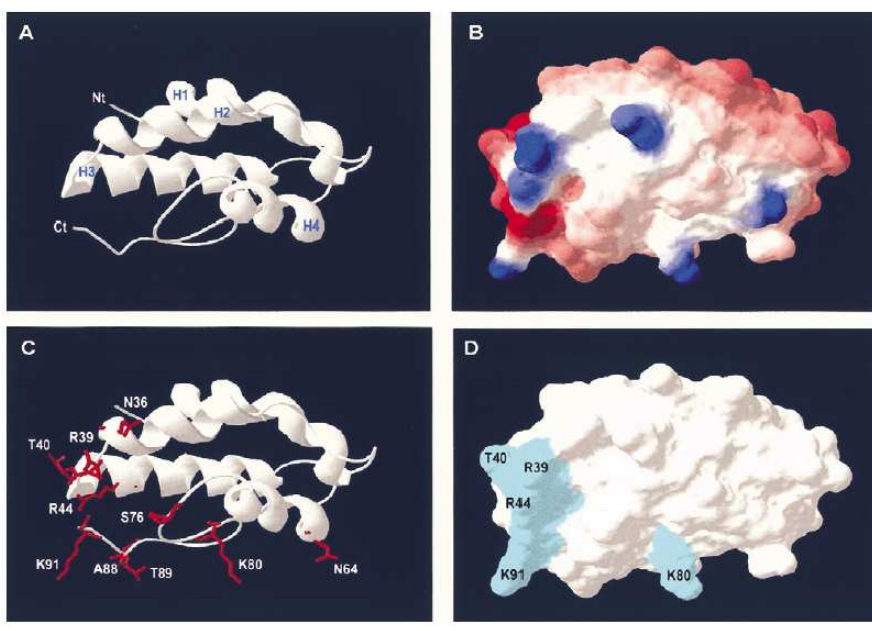


Figura 4. Estructura de Pru p3 (fuente :Garcia casado et al., 2003)

En un estudio de cuantificación de Pru p 3, se detectó una variación del contenido entre lotes de melocotón fresco, que oscilaba de 3,8 a 23,9 mg/kg, siendo la media 16,5 mg/kg. El contenido es 10 veces superior en

piel que en pulpa. (46). Se ha descrito que la Pru p 3 representa 25% de las proteínas de la piel y 7,81 % de la pulpa en melocotón amarillo, siendo un 26% en piel y 6,85 % de la pulpa de melocotón rojo (47)

El proceso de digestión gástrica y en intestino delgado, en condiciones fisiológicas, sólo es capaz de procesar el 60 % de la proteína mediante la pepsina, permaneciendo altamente estable.(46) El transporte transepitelial, no altera la integridad de la monocapa ni las tight junctions, lo que sugiere que es un transporte transcelular, debido a una elevada resistencia a la degradación endolisosomal. El mecanismo de transporte se sugiere vesicular como la de otras LTP, pero específico, puesto que al comparar con una LTP melocotón hipoalérgica (LTP1), la ratio de transporte fue substancialmente menor. Durante el transporte no se altera la estructura conformacional de los epítomos B, manteniendo su capacidad de activar basófilos y de inducir la producción citoquinas Th2 por las células epiteliales, como TLSP, IL33 e IL25. (35). Esta ruta de transporte transcelular, se ha observado para otras LTP, Tri a 14 y proteínas de la leche (β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina).(35)

1.5 COFACTORES EN ALERGIA A ALIMENTOS

Los cofactores se han descrito como amplificadores de una reacción alérgica frente a alérgenos a los cuales está sensibilizado el paciente, incrementando la gravedad de la reacción o disminuyendo la dosis necesaria para provocarla.(48) Los más conocidos son el ejercicio físico, los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y el alcohol. Se ha estimado que hasta un 30% de las reacciones anafilácticas por alimentos está involucrado algún cofactor (49)(50). En nuestra área geográfica, se ha situado entorno al 40% (40)(51) (48)

Aunque no están totalmente dilucidados, se han estudiado y descrito algunos mecanismos relacionados con el efecto de incremento de las reacciones alérgicas ejercidas por los cofactores (52)(52)(49):

1) Antiinflamatorios no esteroideos (AINE): Se describen como cofactor implicado en el 22% de anafilaxias. En Cataluña, un estudio objetivó su implicación en un 58% de los anafilaxis alimentarias

inducidas por cofactor, y en un 33% cuando el alérgeno implicado es la LTP (48). Las hipótesis sobre el posible mecanismo de actuación son:

- a) Aumento de la permeabilidad intestinal, a través de la inhibición de prostaglandinas, que facilita, la acción de los ácidos gástricos y bilis, afectando la barrera epitelial. La AAS (ácido acetil salicílico), disminuye la producción de claudina-7, aumentando la permeabilidad de las tight junctions.
- b) Daño mitocondrial, que afecta la función de las células epiteliales intestinales y aumento de la permeabilidad
- c) Efecto directo sobre las células mastocitarias y basófilos, provocando su activación y amplificación de la señal, que finaliza en el proceso de degranulación. En estudios in vitro, con células mastocitarias pretratadas con AAS, han presentado degranulación vía el receptor FcεRI

2) Ejercicio físico: El síndrome más estudiado es la anafilaxia inducida por ejercicio dependiente de trigo, causada por la sensibilización a w5-gliadina, proteína del gluten. Se han descrito tres hipótesis:

- a) Se forma un complejo w5-gliadina-transglutaminasa, que puede aumentar la capacidad de unión a IgE. La detección de incrementos de IL-6 hasta 50-100 veces más de lo habitual en corredores, bajo regulación de la transglutaminasa tisular, apoyaría esta hipótesis.
- b) El aumento de la temperatura corporal y de la circulación, provoca una redistribución del flujo sanguíneo, disminuyendo el de las arterias esplénicas, ocasionando un daño epitelial de las tight junctions.
- c) El cambio de osmolalidad, y un cambio de pH, producido durante el ejercicio intenso aumenta la activación mastocitaria o disminuye el umbral para su activación.
- d) La β-endorfina segregada durante el ejercicio induce la degranulación mastocitaria.

No se ha establecido umbral de ejercicio que pueda ser indicador de cuando va instaurarse una reacción grave, puesto que se observado el efecto cofactor en ejercicios intensos, moderados y leves.

Se han descrito que otros alérgenos, como la LTP, que están implicados en reacciones con el ejercicio como cofactor (48)(40)

- 3) Alcohol: Según los registros de anafilaxia europeos, está involucrada en 15% de las reacciones anafilácticas. Se postulan estos dos posibles mecanismos:
 - a) Aumento de la permeabilidad intestinal, mediante la modificación de la ZO-1 y claudina -1 de las tight junctions,
 - b) Inhibición de la captación de adenosina, aumentando su nivel extracelular, induciendo la activación mastocitaria.
- 4) Hormonal (menstruación): Se han descrito casos aislados, siempre asociados al cofactor ejercicio, por lo que se considera que es un mecanismo heterogéneo, aún no dilucidado. (53)(54)(55)

Infección: Las infecciones están implicadas un porcentaje de anafilaxis que oscila entre 1,3% al 11%, descrito en casos de alergia alimentaria durante la inducción de tolerancia oral. Se han planteado los distintos mecanismos sobre su efecto, como el aumento de la temperatura afecta el flujo circulatorio y la absorción del alérgeno o la alteración de la integridad intestinal en las infecciones gastrointestinales

1.6.1 GENERALIDADES:

Los animales de experimentación son ampliamente utilizados en el estudio de la alergia alimentaria, principalmente a la limitación de inducir una anafilaxia, reacción potencialmente mortal, en humanos. La elección del modelo animal está condicionado por la ruta de sensibilización y provocación, la sintomatología relevante ante la provocación con alérgeno, la capacidad de identificar epítomos IgE similares a humanos, la detección anticuerpos IgE, la obtención de respuestas selectivas a alérgenos conocidos y la reproductibilidad de los resultados (56).

Los modelos experimentales nos permiten investigar respuestas inmunes en alergia, establecer y comparar la potencia alergénica de moléculas, evaluar potencia y seguridad de nuevas modalidades terapéuticas y vacunas. (57)

Existen modelos experimentales en alergia alimentaria con ratones, ratas, perros y cerdos. El más utilizado es el modelo murino por cumplir los siguientes requisitos (57): tamaño pequeño, tiempo de reproducción corto, coste de mantenimiento asequible, cierta facilidad de manipulación genética y disponibilidad de variantes genéticas y cepas transgénicas/ deficientes bien caracterizadas

En el caso de alergia alimentaria y anafilaxia, se han diseñado múltiples estudios con diferentes cepas(58)(56,59)(57). Los modelos murinos en la alergia a alimentos y en la anafilaxia pueden estar dirigidos a diversas opciones de estudio:

1. Investigación de las respuestas inmunes a alérgenos (respuesta TH2, IgE, IgG₁, activación mastocitaria). Estos modelos, sólo determinan el potencial alérgico de una proteína alimentaria, indican sensibilización al alérgeno.

2. Reproducción de la sintomatología clínica de la reacción alérgica. Estos modelos están orientados a reproducir el mecanismo patogénico in vivo, y evaluar opciones terapéuticas.

1.6.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS MODELOS MÚRIDOS

Los modelos múridos de alergia alimentaria constan de procedimientos: sensibilización, provocación, y evaluación de los signos clínicos e inmunológicos de las fases, principalmente la de la reacción alérgica (anafilaxia). Se han desarrollado diversas categorías de modelos múridos (57):

1. Modelo libre de adyuvante
2. Modelo con adyuvante
3. Modelo genéticamente modificado: permiten una sensibilización más fácil.
4. Modelo humanizado: mediante la modificación de algunos componentes del sistema inmune e introducción de equivalentes humanos, o mediante el reemplazo de todo el sistema inmune por uno humanizado.

Los ratones pueden ser sensibilizados por diversas vías:

1. Intragástrica: utilizada en estudios que precisan valorar los efectos de la digestión, de la interacción alérgeno con epitelio intestinal y sus efectos.(57)(56)
2. Intraperitoneal: ha demostrado repetidamente en modelos con ovoalbúmina la producción significativa de anticuerpos IgE e IgG₁. Se ha publicado un modelo múrido con Pru p 3, con sensibilización intraperitoneal de ratones CBA/J, con producción significativa de anti IgG₁, IgE e IgG_{2a}. (60)

3. Epicutánea: En un modelo de sensibilización a avellana, se demuestra, incluso 8 meses después de finalizar la sensibilización, la presencia de IgE específica y respuesta IL4. Pero para ello precisa una disrupción de la barrera cutánea o un adyuvante, que facilite la sensibilización. Incluso existe una relación de migración desde piel, a mucosa intestinal y a la inversa, de células T antígeno específicas.(61)
4. Nasal: fue la elegida, en un modelo alergia a Pru p 3, con administración en ratones Balb/c una vez a la semana durante 6 semanas y provocación en la séptima semana.(62)

El éxito de una sensibilización, puede estar condicionada por factores intrínsecos del ratón, como la edad, la cepa o el sexo del ratón, factores relacionados con el alérgeno, como efectos de la matriz alérgica, contaminaciones por endotoxinas, la vía de administración, el adyuvante, o la frecuencia de la administración o factores ambientales, como la dieta, el microbioma o la administración de fármacos

1.6.3 ADYUVANTES UTILIZADOS EN MODELOS MÚRIDOS DE ALERGIA A ALIMENTOS

Los ratones, con la administración de una proteína alimentaria, no están codificados para activar el mecanismo de células presentadoras de antígeno, sino que inducen células T naive que se diferencian en T reguladoras. Se precisa romper este mecanismo de tolerancia, y para ello se usa los adyuvantes. Existen varios tipos:

1. Toxina del cólera (TC): Se ha establecido que una dosis de 10 µg en cada sensibilización semanal, es la precisa para inducir respuesta inmunológica IgE, IgG₁ e IgG₂. Un sondaje prolongado no a los resultados, ni se observaron síntomas clínicos, pero sí que influye en la respuesta inmunológica el número de inmunizaciones y el antígeno. (63). Se usa tanto por vía intragástrica, como intraperitoneal y nasal (57)

2. Bordetella Pertusis (BP): se ha demostrado que en cepas Balb/c y C57BL/6 sensibilizadas a antígeno, es capaz de producir respuesta TH2, producción de IgG₁ y IgG_{2a}. Se ha utilizado en modelos de sensibilización intragástrica e intraperitoneal (64)
3. Lipopolisacárido (LPS): es un componente bacteriano que tiene la capacidad de producir una respuesta inmune mediante la interacción con el receptor toll-like 4 (TLR4), y que con una baja dosis puede facilitar la respuesta TH2 en una reacción alérgica. Es utilizado por vía intraperitoneal y nasal (62)(57)
4. Enterotoxina B Estafilocócica(SEB): Se ha descrito su capacidad de inducir respuesta TH2, pero además produce eosinofilia en sangre y tejido intestinal, efecto no observado con TC. Se usa por vía intragástrica, en un ratones Balb/c (65)
5. Hidróxido de aluminio (Al(OH)₃): En un modelo Balb/c con antígeno OVA, comparado con TC, se observó que tenía menor capacidad de generar anticuerpos específicos.(65) En cambio en un modelo humanizado de ratón (IgE_R.TG) también con OVA, si indujo una producción significativa de anticuerpos IgE. Se ha objetivado, que tiene capacidad de provocar síntomas in vivo como diarrea con el mismo antígeno (57). El uso es por vía intraperitoneal.(61)(57)

Se han diseñado modelos múridos libres de adyuvante, mediante la manipulación genética de ratones (61) o con modelos de aplicación transdérmica del alérgeno, si bien este último no refleja la ruta fisiológica de sensibilización. (57)

1.6.4 PROVOCACIÓN CON ALÉRGENO (ANAFILAXIA)

Cuando se realiza la provocación con alérgeno para provocar la reacción anafiláctica, se han establecido unos signos diagnósticos para poder objetivar la reacción clínica de los animales:(66)

1. Escala de signos clínicos, que consisten en:

0	Sin síntomas
1	Rascarse y frotarse alrededor de la nariz y la cabeza.
2	Hinchazón alrededor de los ojos y la boca, diarrea, columna erguida, actividad reducida, y / o disminución de la actividad con aumento de la frecuencia respiratoria
3	Sibilancias, dificultad para respirar y cianosis alrededor de la boca y la cola
4	Sin actividad después de pinchazos o temblores y convulsiones
5	Muerte

2. Disminución de temperatura a los 40 minutos de la provocación, desde una inicial de 38º hasta una reducción de 5 grados, sin alterarse en el grupo control
3. Un incremento del hematocrito a los 10 minutos, que se mantiene durante todo el experimento, alcanzando valores superiores al 60%, siendo en el grupo control máximo del 50%. Se describe que la liberación de metabolitos, es significativa a los 30-40 minutos de la reacción

Los ratones tienen la particularidad de presentar un tipo de anafilaxia dependiente de IgE y una no dependiente de IgE. En la primera son requeridas bajas dosis de anticuerpo para provocar anafilaxia, y en la segunda dosis más altas, para poder activar la vía alternativa, mediada por IgG. Los síntomas de hipotermia y taquicardia son más intensos en la primera, pero el daño miocárdico es mayor en la segunda. (67)

Los alérgenos utilizados en los modelos de alergia alimentaria son variados. El más ampliamente utilizado es la ovoalbúmina seguida del cacahuete, pero también se han realizado con proteínas de la leche, avellana, nuez de Brasil, arroz, soja, lupino, w-5 gliadina, pescado, gamba y melocotón (concretamente con Pru p 3). (57) Los antígenos alimentarios que mostraron bajo potencial alérgico, por su baja capacidad de generar anticuerpos IgE específicos, fueron las espinacas y el pato, además de no presentar resistencia a la pepsina gástrica. (68)

1.6.5 CEPAS DE RATONES UTILIZADOS EN MODELOS MÚRIDOS DE ALERGIA A ALIMENTOS

Según el tipo de modelo que se va a desarrollar, se pueden utilizar diferentes tipos de ratones:

- 1) Con adyuvante: Para estos modelos se utilizan tres cepas de ratones caracterizados por su capacidad de sensibilizarse y de presentar anafilaxia ante alergia a cacahuete con TC (27)
 - a) Balb/c: presenta una elevada IgE específica al alérgeno tras la sensibilización, con IgG₁ alta e IgG₂ baja. En anafilaxia el score clínico es 1, disminución discreta de temperatura, y liberación mastocitaria de MMCP-1 significativa por ambas vías de provocación (intragástrica e intraperitoneal)
 - b) C3H/ HeJ: la IgE específica inducida post sensibilización es baja, IgG₁ baja e IgG₂ alta. En anafilaxia el score clínico es 3-4, presenta bajadas intensas de temperatura, liberación MMCP-1 significativa pero más intensa en provocación intraperitoneal.
 - c) C57BL/6: IgE específica post sensibilización es ligeramente menor a Balb /c, IgG₁ baja y no produce IgG₂. En anafilaxia el score clínico es 2-3 y la disminución de temperatura es inferior a C3H/HeJ, pero la liberación de MMCP-1 no es significativa por ninguna de las vías de administración antígeno.

Estos resultados no se pueden generalizar para todas las proteínas alérgicas, puesto que con TC pueden existir diferencias entre las dosis y tipos de antígeno.

- 2) Libre de adyuvante: Se han usado ratones Balb/c y C3H/HeJ, la primera con antígeno OVA y la segunda con cacahuete.
- 3) Genéticamente modificadas: *Foxp3 CNS1^{-/-}*: deficiencia en CNS 1, que impide la función de Foxp3 y, por tanto, la diferenciación de células T a Treg.(57)
- 4) Humanizadas(61)(57): Las limitaciones de estos modelos humanizados son la eficacia del injerto y la limitación del tiempo ventana para realizar los estudios, debido a una posible reacción injerto-huésped (57)

1.6.6 MODELO MÚRIDO CON PRU P 3

Se han descrito dos modelos múridos utilizando la Pru p 3 como antígeno:

- 1) En el primero se realizaba una comparación de un grupo de ratones CBA/J sensibilizados intraperitonealmente con Pru p3 con otro grupo sensibilizado a una proteína modificada Pru p3, para valorar diferencias inmunológicas en la expresión IgE y la resistencia a la digestión . En este modelo no se realiza una provocación para observar síntomas de anafilaxia(60)(60)
- 2) El segundo es un modelo de anafilaxia con Pru p3 más lipopolisacárido como adyuvante, con sensibilización intranasal y provocación intraperitoneal, para observar tanto la respuesta clínica como la inmunológica. (62)

1.6.7 MODELOS MÚRIDOS CON AINE COMO COFACTOR

Se han diseñado modelos para estudiar el efecto como cofactor de los AINE. En un modelo múrido de alergia a cacahuete, se administró diclofenaco a diferentes dosis 2 horas previo la sensibilización a cacahuete junto con toxina de cólera. Se observó un aumento de la IgE significativo, sin objetivarse una disminución de la expresión de COX-2, ni en los niveles de PGE₂. Las células epiteliales se aplanaron y se dañaron en las administraciones sucesivas a dosis de 10 y 25mg/kg, pero no cuando fue una administración

única. Si se demostró un aumento de los niveles de mMCP-1 después de la provocación con el alérgeno, cuando previamente se había administrado el diclofenaco. (69). En un estudio del efecto del diclofenaco en la permeabilidad intestinal de ratones, se administró una dosis 2,5mg/día durante 3 días, con resultado de un aumento de la concentración de FITC-D y Evans Blue, lo que se traduce en aumento de la permeabilidad, comparado con placebo. La visión con MO, mostraba un daño en la superficie epitelial, microvellosidades y en la tight junctions. También se observó un daño oxidativo y una afectación de las funciones mitocondriales.(70)

2. HIPÓTESIS

La anafilaxia es una reacción grave potencialmente mortal, que se presenta de forma inmediata tras el contacto con alérgenos en la mayoría de los pacientes, cuyo diagnóstico es clínico. La anafilaxia muchas veces no es reconocida, lo que retrasa su diagnóstico y el inicio del tratamiento. Es importante conocer cuál es el manejo de anafilaxia en los servicios de urgencia para poder establecer medidas específicas para mejorar su diagnóstico.

A nivel fisiopatológico, la anafilaxia implica principalmente a los mastocitos como célula efectora. Los mediadores del mastocito aumentan la permeabilidad intestinal lo que facilita el paso de más alérgeno a la lámina propia de la mucosa intestinal, contribuyendo a una mayor activación del mastocito.

Una de las causas más frecuentes de anafilaxia son los alimentos. En nuestro entorno, la principal causa de alergia a alimentos y de anafilaxia por alimentos es la proteína transferido de lípidos, y en concreto la proteína transferidora de lípidos del melocotón o Pru p 3. Distintas circunstancias asociadas a la ingesta del alimento sensibilizante, también conocidas como cofactores, pueden inducir o aumentar la reacción alérgica. De hecho, la anafilaxia mediada por cofactor es una entidad cada vez más frecuente. De estos, el ejercicio y los AINE (antiinflamatorios no esteroideos) son los más estudiados. Sin embargo, el mecanismo subyacente de la anafilaxia por alimentos mediados por cofactor se desconoce.

Nuestra **hipótesis** es que la anafilaxia por alimentos y mediada por cofactor es una causa frecuente de anafilaxia en urgencias y que activación del mastocito secundaria a AINE en la anafilaxia por alimentos implica un mayor aumento de la permeabilidad intestinal, favoreciendo la aparición de la anafilaxia por alimentos potenciada por cofactor.

3. OBJETIVOS

Para demostrar esta hipótesis nos planteamos los **siguientes objetivos**:

Objetivo principal: Desarrollar un modelo experimental murino de anafilaxia por transferidora de lípidos por alimento mediada por cofactor AINE.

Objetivos secundarios:

1. Evaluar el papel de los mastocitos en el aumento de la permeabilidad intestinal en la anafilaxia mediada por proteína transferidora de lípidos

2. Evaluar el conocimiento de la anafilaxia en Urgencias Hospitalarias, así como su manejo, causas y presencia de cofactores

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Esta tesis consta de dos trabajos:

1. Caracterización de la anafilaxia en Urgencias
2. Modelo experimental murino de anafilaxia mediada por cofactor

4.1 TRABAJO 1: CARACTERIZACIÓN DE LA ANAFILAXIA EN URGENCIAS HOSPITALARIAS

Se realizó un estudio retrospectivo de los pacientes de edad adulta con anafilaxia que acudieron a Urgencias del Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona.

4.1.1 SELECCIÓN DE PACIENTES

Los pacientes fueron seleccionados a partir de la revisión de los informes de alta de Urgencias y que habían presentado episodios compatibles con anafilaxia. Para ello se revisaron los informes clínicos informáticos durante un período comprendido de Enero a Octubre de 2009 ambos incluidos. Se revisaron aquellos informes en los que en el diagnóstico codificado de salida de urgencias constara alguno de los siguientes vocablos:

- anafilaxia, shock anafiláctico, urticaria, angioedema, alergia cutánea, prurito, reacción alérgica
- angioedema y/o urticaria asociado a una o más de las siguientes palabras: disnea, dolor abdominal, dolor torácico, mareo, síncope, disfagia, disnea o rinitis.

Posteriormente, se seleccionaron solo aquellos que cumplían criterios clínicos de anafilaxia, según las recomendaciones de la Academia Europea de Alergia e Immunología Clínica (EAACI)(4)

De los pacientes que componían la muestra a estudio (n=51), aquellos que se derivaban a consultas externas de Alergología (76% pacientes de la muestra) se cotejaba el diagnóstico dado en el informe clínico de urgencias, con el del facultativo especialista en Alergia

4.1.2 DATOS DEMOGRÁFICOS Y CARACTERÍSTICAS DE LA ANAFILAXIA

Los informes clínicos que correspondían a pacientes que habían acudido a Urgencias por un episodio compatible con anafilaxia fueron revisados de forma individual y se recogieron los siguientes datos:

- Datos demográficos: edad y género.
- Antecedentes de atopia.
- Antecedentes patológicos.
- Tratamiento con fármacos betabloqueantes y/o IECA en el momento de la reacción.
- Etiología de la anafilaxia
- Presencia de cofactores como alcohol, ejercicio, toma de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).
- Determinación de triptasa y sus niveles.
- Tratamiento administrado en Urgencias para la anafilaxia.

4.1.3 CLASIFICACIÓN DE LA ANAFILAXIA

La anafilaxia se clasificó según la adaptación de la clasificación de Brown (71)

- Anafilaxia de grado 1: afectación cutánea (prurito y/o urticaria y/o angioedema) + síntomas digestivos y/o rinitis.
- Anafilaxia de grado 2: afectación cutánea (prurito y/o urticaria y/o angioedema + afectación respiratoria (afectación laríngea y/o afectación de vía respiratoria inferior +/- afectación digestiva +/- rinitis.
- Anafilaxia de grado 3: afectación cutánea (prurito y/o urticaria y/o angioedema) + afectación cardiovascular (sincope y/o hipotensión y/o colapso) +/- confusión +/- afectación respiratoria

Se revisaron un total de 324 informes de urgencias.

4.1.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó el siguiente análisis estadístico:

- Para variables cuantitativas:
 - Se utilizan métodos descriptivos basados en la media y desviación típica, y la mediana para la triptasa.
- Para variables cualitativas:
 - Se valoró la asociación entre el diagnóstico correcto de anafilaxia, con el diagnóstico de salida y con el uso de adrenalina, mediante tablas de contingencia. Este método estadístico, también fue utilizado para realizar el estudio descriptivo de la etiología de la anafilaxia, en función de la edad de los pacientes y del grado de anafilaxia
 - Se utilizó un método de comparaciones múltiples, para valorar tendencias de asociación, entre el grado de anafilaxia y la edad de los pacientes
 - Chi-cuadrado de Pearson para valorar el grado de asociación entre realizar un diagnóstico correcto de anafilaxia y determinar el valor de la triptasa.
 - El test exacto de Fisher, se realizó para valorar asociación entre diagnóstico correcto y resultado de triptasa positiva.
 - Para valorar el grado de concordancia entre diagnóstico de salida y el diagnóstico correcto se utilizó el índice Kappa.
 - En relación a la triptasa, se analizó la curva ROC, su sensibilidad (S) y especificidad (E). Siendo la S, la presencia de triptasa positiva en aquellos pacientes con diagnóstico correcto de anafilaxia, y la E una prueba de triptasa negativa entre aquellos con diagnóstico correcto. También se obtuvo el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN). Siendo el VPP el ser catalogados correctamente a los pacientes con triptasa positiva.

Los datos se analizaron mediante el programa estadístico SPSS versión 18.0.

El protocolo fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona.

4.2 TRABAJO 2. MODELO EXPERIMENTAL MÚRIDO DE ANAFILAXIA POR ALIMENTOS MEDIADA POR COFACTOR

4.2.1 POBLACIÓN A ESTUDIO

Para los estudios múridos se utilizaron dos cepas de ratones macho , C57BL/6J y Balb c (Charles River, Barcelona, España), edad 6 semanas, realizando en todos con una semana de periodo de aclimatación, tal como previamente se había descrito para modelos múridos de anafilaxia por cacahuete por Smit *et al.* (27)

Se mantuvieron en el estabulario con ciclo de luz /oscuridad de 12 horas, en una habitación que a temperatura estable 22º y humedad ambiental de 55+/-10% durante el tiempo de estudio.

Se administraba alimentación ad libitum durante una semana previo al estudio, retirando las 12 horas previo a la provocación.

Para cada diseño experimental se usaron grupos de seis ratones de las distintas cepas estudiadas. En cada procedimiento de sensibilización ratones se adjudicaban cuatro al grupo activo y dos ratones al grupo control, a los que se les realizaba el mismo diseño procedimiento pero no se sensibilizaban a ningún alérgeno.

El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) del Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR).

4.2.2 METODOLOGÍA DEL MODELO EXPERIMENTAL

El modelo experimental de anafilaxia por alimentos se basó en la adaptación del modelo de sensibilización de cacahuete de Sun J *et al.* (66)

Para desarrollar el modelo experimental de anafilaxia por cofactor se decidió sensibilizar a los ratones con LTP (*lipid transfer protein* o proteína de transferencia de lípidos) de melocotón o Pru p 3, ya que este alérgeno es el principal causante de anafilaxia en nuestro entorno y una de las principales causas de anafilaxia por alimentos mediadas por cofactor. (48)(51). Inicialmente se sensibilizó a los ratos con Pru p 3 natural purificado y posteriormente se obtuvo la LTP de melocotón a partir de un extracto de piel de melocotón.

Se realizaron distintos diseños experimentales con el fin de determinar la metodología, la cepa murina y las dosis de alérgeno más adecuadas para poder establecer el modelo murino experimental de anafilaxia por LTP mediada por cofactor. Como cofactor se utilizó diclofenaco, para simular la anafilaxia por alimentos mediada por AINEs.

4.2.3 PRIMER DISEÑO EXPERIMENTAL

En este modelo experimental se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL/6J. Se realizó un protocolo de sensibilización y un protocolo de provocación a cinco grupos de seis ratones cada uno (cinco ratones se adjudicaban al grupo activo y un ratón al grupo control) en los que se modificaron las dosis de alérgeno para la sensibilización y para la provocación. El alérgeno correspondiente a la proteína transferencia lipídica escogido fue la proteína natural purificada Pru p3 (Laboratorios Leti, Madrid, España). Para estandarizar la dosis óptima para inducir una anafilaxia, se ensayaron diversas dosis de alérgeno, tanto en los procesos de sensibilización como en las provocaciones.

A partir de una cantidad inicial de 2,4mg de Pru p3 liofilizado, se reconstituyeron con 2ml agua destilada, obteniendo una concentración final 1,2mg/ml (muestra inicial). La solución se mantuvo a una temperatura constante de 4°C. De la muestra inicial se realizaron las diferentes diluciones con PBS (*Phosphate Buffer*

Saline) 0,01M que se muestran en la tabla 1 A la concentración proteica en cada ciclo, se le añadió 50ng de *Bordetella Pertussis* (BP) (Sigma Aldrich, Madrid, España), para romper la tolerancia oral al alérgeno.

Posteriormente, se añadía PBS hasta un volumen final de 250µl. Esta solución que contenía LTP+BT+PBS se administraba por vía intragástrica a cada ratón del grupo activo, con una sonda rígida enteral de 20G (Panlab Harvard Apparatus, Barcelona, España) una vez a la semana durante cuatro semanas consecutivas. A los 14 días de finalizar la fase de sensibilización, se realizó la provocación con Pru p3. Ésta se realizó intraperitoneal (IP) y consistía en administrar la misma cantidad de líquido total (250µl), pero con distintas dosis de alérgeno (tabla 1).

Tabla 1 Dosis del alérgeno Pru p3 para la sensibilización y la provocación. Las dosis se cuantificaron en cifra total y respecto a la dosis de sensibilización (xN)

Grupo	Dosis de sensibilización Pru p3	Dosis de provocación Pru p3
1	1,2 µg	x5 = 6(µg)
2	2,4µg	x10 =24(µg)
3	4,8 µg	x20=96 (µg)
4	7,2µg	x5 =36 (µg)
5	7,2µg	x10= 72(µg)

En los siguientes 40 minutos tras la provocación se realizaron determinaciones seriadas de temperatura cada 10 minutos, usando un termómetro digital rectal (VWR International Eurolab, Barcelona, España) y se monitorizaban los síntomas y signos, mediante el siguiente *score* de síntomas adaptado de (66) (tabla 2)

Tabla 2 Tabla de puntuación de síntomas anafilácticos

Grado Score	Síntomas
0	ausencia de síntomas
1	rascado de orejas /boca con las patas traseras,
2	disminución de la actividad; autoaislamiento o hinchazón alrededor de los ojos y/o boca
3	período de inmovilidad durante más de 1 minuto
4	no respuesta a la estimulación del bigote
5	temblor convulsión y muerte

Se realizó extracción de sangre capilar de vena safena al inicio (basal), después de la sensibilización (a las 4 semanas), y después de los 40 minutos de observación de la provocación, se realizaba la extracción de sangre intracardiaca mediante tubos de plasma (Capiject Purples Tub). Se la sangre obtenida se determinó el hematocrito y el resto fue alicuotada en tubos Eppendorf y guardada a -20°C para su posterior análisis. Para medir el hematocrito, la muestra de sangre del capilar fue centrifugada en una centrífuga para micro hematocrito, durante 5 minutos a 12000 rpm. El hematocrito se determinó midiendo la longitud que ocupa en el capilar la columna de glóbulos rojos, y se comparó con la longitud total de la muestra obtenida.

A los ratones del grupo control se les administró 250µl de PBS, mediante el mismo procedimiento y también en un período semanal, durante 4 semanas consecutivas. La provocación a éste grupo se realizó usando el mismo procedimiento y las mismas dosis de alérgeno Pru p3.

El protocolo de sensibilización y provocación se detalla en la figura 1

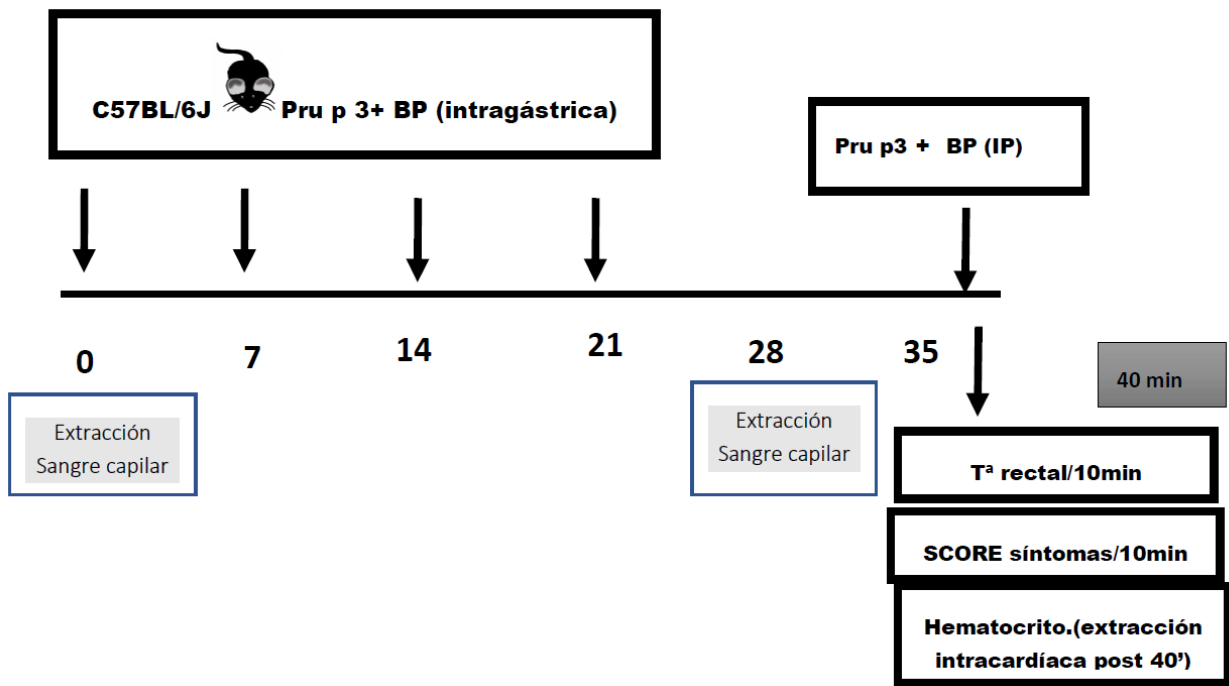


Figura 1. Protocolo de sensibilización del primer diseño experimental

4.2.4 SEGUNDO DISEÑO EXPERIMENTAL:

El procedimiento realizó en tres grupos de ratones macho cepa C57BL/6J. La sensibilización se realizó con Pru p 3 purificada reconstituida como alérgeno (de forma idéntica al primer protocolo descrito anteriormente), pero se cambió el adyuvante por la Toxina Cólera (TC) (Sigma Aldrich, Madrid, España), avalada por estudios previos por su capacidad de romper la tolerancia, sugiriendo que podría más eficaz en romper la tolerancia en nuestro modelo experimental. (Joost J et al). La dosis de TC fue de 10 µg, que se administró conjuntamente Pru p 3 y se completó con PBS hasta los 250 µl. En un grupo se realizó el mismo protocolo de sensibilización que en el primer diseño experimental y en otros dos grupo el procedimiento de sensibilización se combinando la administración enteral una vez por semana durante dos semanas con la intraperitoneal (IP) una vez por semana las dos semanas siguientes, hasta completar un total de cuatro semanas. En el grupo control se usó el mismo protocolo, sustituyendo alérgeno por PBS.

Después de catorce días se realizó el protocolo de provocación, de forma idéntica al primer diseño experimental, pero modificando las dosis de alérgeno administrada, según se especifica en la siguiente tabla (tabla 3):

Tabla 3. Dosis del alérgeno Pru p3 para sensibilización y provocación (las dosis para la provocación se cuantificaron en cifra total y respecto a la dosis de sensibilización (xN)

Grupo	Dosis de sensibilización Pru p3	Dosis de provocación Pru p3 (*)
1	1,2µg	x10 = 12µg
2	2,4µg	x 50 = 120µg
3	1 µg	x20 =20 µg

La obtención de muestras de sangre y la determinación del hematocrito se realizaron usando el mismo procedimiento que en el primer diseño experimental.

4.2.4.1 ESTUDIO DE LA PERMEABILIDAD INTESTINAL

En este segundo diseño experimental se iniciaron los estudios para determinar la permeabilidad intestinal. Una vez realizada la provocación con Pru p 3 en el transcurso del periodo de observación, a los 20 minutos, se administraron a cada ratón del grupo activo y del grupo control 100 µg de β-lactoglobulina (BLG) (Sigma Aldrich, Madrid, España) diluidos en PBS mediante sondaje enteral.

El protocolo de sensibilización y provocación se detalla en la figura 2.

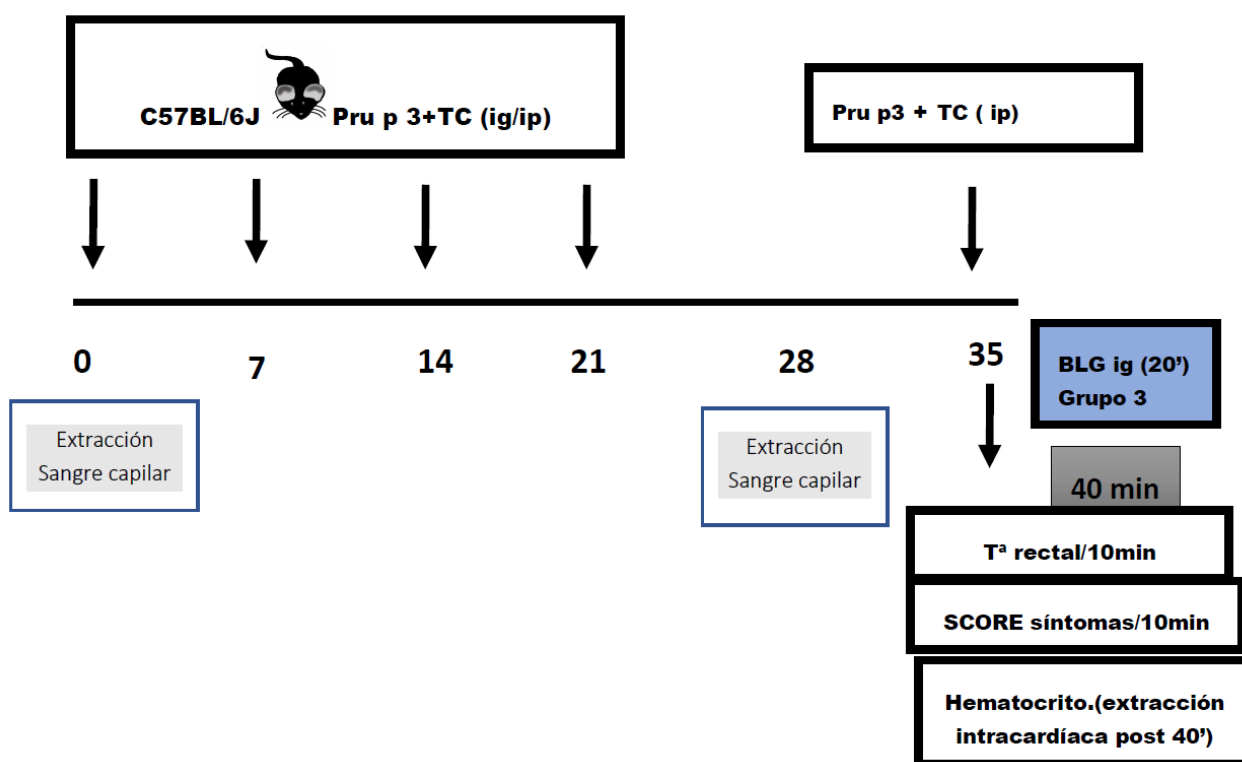


Figura 2. Protocolo de sensibilización del segundo diseño experimental.

4.2.5 TERCER DISEÑO EXPERIMENTAL.

En el tercer diseño experimental se cambió la cepa de ratones a la cepa Balb/ c (Charles River, Madrid, España), machos de 6 semanas edad. SE realizó en tres grupos de ratones. En este diseño se cambió el alérgeno Pru p 3 natural purificado usado en los dos diseños anteriores por extracto de piel de melocotón.

4.2.5.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE PIEL MELOCOTÓN

La metodología para obtener del extracto óptimo se realizó en tres fases: preparación del extracto, detección de la proteína transferencia lipídica y la cuantificación proteica.

4.2.5.1.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE PIEL DE MELOCOTÓN

Para obtener el extracto fue se separó manualmente la piel de melocotones hasta obtener un total de 278,1 g de piel, que se homogenizaron con acetona (133ml) y se almacenaron durante la noche a -80°C ; posteriormente se vertió el producto obtenido en un vaso precipitado, se distribuyó en tubos, centrifugándose a 4500 durante 5 minutos, retirando el sobrenadante al finalizar. Se repitió la técnica, con la finalidad de ir diluyendo el pigmento con los lavados y se almacenó los tubos resultantes, toda la noche a -80°C . El mismo proceso de retirar el sobrenadante, distribución y centrifugación se repitieron en seis ocasiones, obteniéndose un producto con el mínimo posible de pigmentación. El producto resultante, se mantuvo a temperatura ambiente, para la evaporación de acetona; al cabo de 18 horas, se diluyó con 9 ml con agua estéril, se homogenizó, se distribuyó en tubos Falcon, para su posterior centrifugación, y después de retirar sobrenadante el producto obtenido fue liofilizado, para su almacenaje posterior.

4.2.5.1.2 DETECCIÓN PROTEICA DEL EXTRACTO

El siguiente paso, fue la detección de la proteína de transferencia lipídica del extracto, mediante SDS-PAGE. El extracto liofilizado de un tubo falcon 50ml, se reconstituyó con 9ml de agua desionizada, obteniéndose una concentración estimada 1mg/ml. Se preparó el gel comercial de poliacrilamida al 12% (para separar proteínas de bajo peso molecular), de diez pocillos con marcador de peso molecular, y se cargaron 4 muestras de 10 μl , correspondientes a, extracto liofilizado reconstituido, extracto comercial Pru p3 concentración 1mg/ml, y extracto comercial de piel melocotón. En cada una de las muestras se agregó 4 μl de "sample buffer" al 4%, se realizó electroforesis, tinción posterior con azul de Coomassie ($\text{C}_{47}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{S}_2$), y se detectó una banda en el gel entorno al peso molecular de 9KDa (figura 4). En sujeto alérgico a melocotón se le realizó prueba intraepidérmica (prick test) con nuestro extracto a

piel de melocotón, el extracto piel melocotón comercial, el de Pru p3 comercial, con resultado positivo para todos ellos (figura 3)



Figura 3. Detección de proteína de transferencia lipídica en extracto de melocotón. A. La banda marcada con rojo, corresponde a la detectada mediante la técnica SDS-PAGE; B, la pápula resultado en forma de pápula de la prueba intraepidérmica (prick test) con histamina (control positivo), extracto de piel de melocotón, piel de melocotón y Pru p 3 comercial.

4.2.5.1.3 CUANTIFICACIÓN PROTEÍCA DEL EXTRACTO

El último paso fue cuantificar la cantidad proteica del extracto mediante la técnica de ácido bicinónico (BCA). Se suspendió 53mg de extracto melocotón liofilizado, en 1ml de H₂O, se vortió y se resuspendió, constituyendo la que denominaremos sustancia madre (máxima concentración). Se preparó la curva estándar con diluciones de la Albúmina obteniendo la curva patrón (0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2mg/ml). Se utilizó la fórmula: $Conc (i) \times V(i) = Conc (f) \times V(f)$, para calcular cada concentración y se prepararon las diuciones de la sustancia madre a 1/ 2, 1/5, 1/10. En este momento, se preparó el reactivo de trabajo correspondiente a la solución A, tartrato y ácido bicinónico en un tampón de carbonato alcalino (Thermo Scientific, Madrid, España) y la solución B. sulfato de cobre pentahidratado al 4 % (Thermo Scientific, Madrid, España), a una proporción 50:1 (A: B), obteniendo el volumen final: 5ml de solución A + 100 µl de solución B, al igual con muestra estándar. Se homogeneizó con vórtex, se incubó a 37º durante 30 minutos, posterior enfriamiento con bandeja H₂O fría, y finalmente se cargaron 90 µl en cada pocillo de placa. La lectura fue con espectrofotómetro a 570n. El resultado fue de 5,3mg/ml , semejante a la descrita por P.Tobajas (72).Se

calculó que la cantidad aproximada de Pru p3 del extracto sería 1mg/ml , según los porcentajes observados por Carnes J (47)

4.2.5.2 PROTOCOLO DE SENSIBILIZACIÓN Y DE PROVOCACIÓN

La dosis asignada de alérgeno, conjuntamente con 10 µg de TC y PBS hasta un total de 100 µl por ratón, se administró a cada ratón del grupo activo una vez por semana durante cuatro semanas, como en los dos diseños anteriores. En el grupo control se le administró PBS durante la fase de sensibilización y se provocó con el extracto piel melocotón.

La sensibilización se realizó en tres grupos con distintas dosis de proteína: en el primer y tercer grupo se sensibilizó por vía intragástrica con sondaje enteral y en el segundo grupo se realizó la modalidad combinada de 2 semanas sondaje enteral y dos semanas intraperitoneales. Las dosis de sensibilización y de provocación se muestran en la siguiente tabla (tabla 4)

Tabla 4. Dosis de proteína del extracto de melocotón usada para la sensibilización y la provocación. las dosis para la provocación se cuantifican en cifra total y respecto a la dosis de sensibilización (xN).

Grupo	Dosis sensibilización extracto piel	Dosis de provocación (mg)
1	0,5 mg	x 20=10 mg
	1 mg	x10=10 mg
	2 mg	x5=10 mg
2	1 mg	x10 = 10 mg
3	1 mg	x10 =10 mg

El protocolo de provocación y la obtención de muestras fue el mismo que en los dos diseños experimentales anteriores. Asimismo, se administro BLG tras la provocación como se describe en el apartado 2.2.1. Estudio de la permeabilidad intestinal.

4.2.6 ESTUDIO DEL PAPEL DEL COFACTOR EN LA ANAFILAXIA POR EXTRACTO DE MELOCOTÓN

En el tercer grupo de ratones de este diseño experimental, una vez establecida que la dosis de sensibilización y con la intención de valorar la permeabilidad intestinal con la presencia de cofactor AINE o sin su presencia, se administró diclofenaco una dosis correspondiente a 10 μ l, correspondientes 0,025 mg del fármaco, por sondaje enteral 60 minutos previo a la administración del alérgeno intraperitonealmente, y a los 20 minutos de observación se administra 100 μ g de β LG (Sigma Aldrich, Madrid; España) mediante sondaje enteral a todos los ratones del grupo activo y del grupo control.

Detallamos el protocolo de sensibilización y provocación, en la figura 4

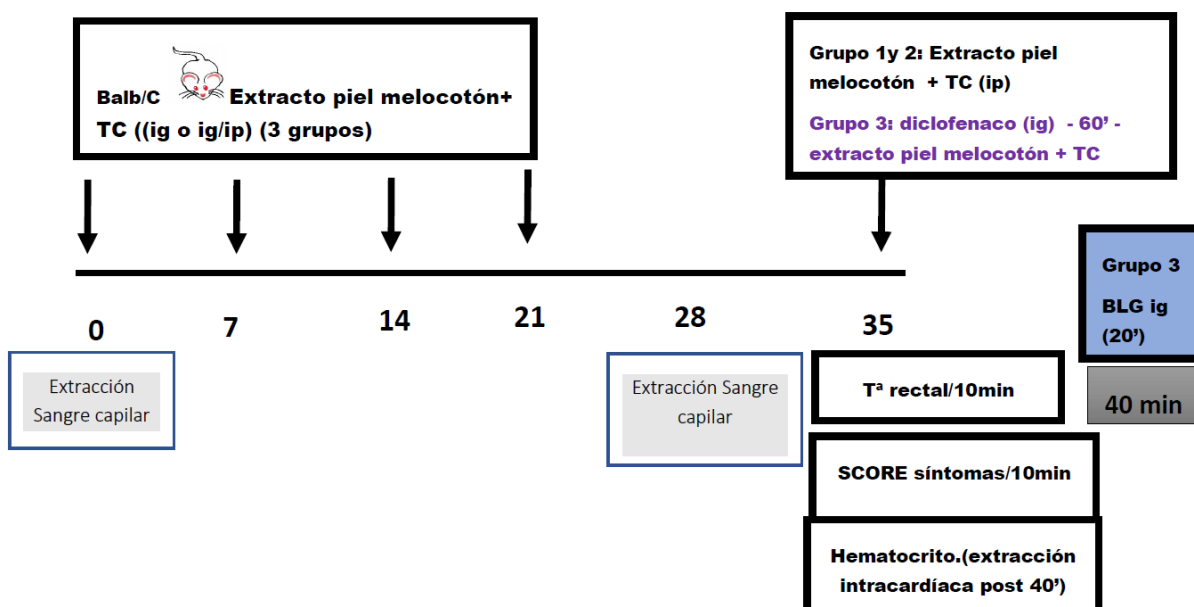


Figura 4. Protocolo de sensibilización y provocación del tercer diseño experimental .

4.2.7 DETERMINACIÓN DE MEDIADORES MASTOCITARIOS DURANTE LA ANAFILAXIA POR LTP DE MELOCOTÓN

Para determinar si existía activación del mastocito en nuestro modelo murino de anafilaxia por Pru p3 (LTP piel melocotón), se determino los niveles de mMCP-1 (*mouse mast cell protease-1*) mediante técnica ELISA Mouse MCPT-1 (mMCP-1) (Bioscience, Madrid, España). El procedimiento consistió en recubrir la base de la placa con el anticuerpo de captura (100 µl/pocillo) y dejar en incubación toda la noche. Después de 3 lavados, se bloquearon los pocillos con 200 µl/ pocillo del diluyente de ensayo, incubación 1 hora. Se prepara los pocillos que corresponderán a la curva estándar, con 100 µl de la máxima concentración estándar y diluciones seriadas hasta 8 puntos. Se añaden 100 µl / pocillo de cada una de las muestras de trabajo, se sella e incuba 2 horas. Después de 3 a 5 lavados, se añade 100 µl del anticuerpo de detección, incubación de 1 hora, 3-5 lavados más. En ese punto, se añade 100 µl del enzima de detección HRP-avidina en cada pocillo, se incuban 30 minutos. Lavados en un total de 5-7 veces, añadiendo previo cada aspiración PBS 0,05% - Tween -20, y posteriormente se añade 100µl/pocillo de solución de TMB. Dejamos incubar 15 minutos, y finalmente se añaden 50µl de la solución STOP. La lectura se realizó a a 450nm.

4.2.8 ESTUDIO DE LA PERMEABILIDAD INTESTINAL EN EL MODELO MÚRIDO DE ANAFILAXIA POR LTP DE MELOCOTÓN

Para medir los efectos de la respuesta anafiláctica en la permeabilidad intestinal se determinó la β -lactoglobulina en suero que se administrado en el grupo control y activo, mediante el kit ELISA bovina (Bethyl, Bionova científica, Madrid, España). La metodología consistía en añadir 100 µl de anticuerpo purificado β , diluido con tampón de recubrimiento (0,05M carbonato-bicarbonato) en cada pocillo e incubación a temperatura ambiente durante 1 hora., añadir 200µl de solución bloqueante (50mM Tris, 0,14 M NaCl 0,05%, Tween 20, pH 8.0) en cada pocillo ,lavados (5 veces) (Solución de lavado: 50mM Tris, 0,14 M NaCl 0,05%, Tween 20, pH 8.0), incluir 100 µl de solución estándar (50mM Tris, 0,14 M NaCl 0,05%, Tween 20, pH 8.0) o muestra en cada pocillo, volver a Incubar 1 hora a temperatura ambiente , otros cinco lavados, al finalizar se añade el anticuerpo de detección HRP (anticuerpo anti β -lactoglobulina peroxidasa)

100µl por pocillo. Dos ciclos de incubación y lavados y es el momento de aportar los 100 µl de solución sustrato TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametil-benzidina), después de 15 minutos a temperatura ambiente, se distribuye la solución stop (0,18 M H₂SO₄), con la dosis 100 µl por pocillo y se mide la absorbancia en el lector de placa 450nm

4.2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron recogidos con el programa Graph Prism 6 (Graph Software, USA). Mediante test no paramétricos (Kruskal-Wallis y Mann-Whitney U, múltiple t test) se analizaron el score, temperatura, hematocrito, la determinación de mMCP-1 y Beta lactoglobulina. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para valores $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 TRABAJO 1. CARACTERIZACIÓN DE LA ANAFILAXIA EN URGENCIAS HOSPITALARIAS

5.1.1 POBLACIÓN A ESTUDIO Y CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

En el período a revisión (de Enero a Octubre de 2009) acudieron al Servicio de Urgencias del Hospital General Vall d'Hebron un total de 43855 pacientes. En un total de 324 pacientes en el informe de alta constaba algún diagnóstico de salida que sugiriera que había acudido a Urgencias por anafilaxia, tal y como se detalla en la sección material y métodos, y fueron seleccionados para su revisión. Finalmente, 51 pacientes de los 324 revisados cumplían criterios clínicos de anafilaxia y fueron seleccionados para el estudio, representando un 0,12% respecto el total de pacientes que acudieron a Urgencias.

Un 63% (32/51) fueron mujeres y el 37% (19/51) varones. La edad media fue de 48 años (rango 18-84 años). Un 6% (3/51) de los pacientes estaba en tratamiento con fármacos betabloqueantes y un 11,8% (6/51) con IECA (inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina). (Tabla 1)

5.1.2 ETIOLOGÍA DE LA ANAFILAXIA

Entre las desencadenantes de la anafilaxia, los medicamentos fueron la causa más frecuente, presente en un 43,1% (22/51) de los casos, seguida por los alimentos, que fueron causa de anafilaxia en un 33% (17/51) de los casos. En el 30% de los pacientes con anafilaxia por alimento, estaba asociado al episodio un cofactor, y entre ellos los AINE representaron el 60% de los casos (Tabla 1). (tabla 2)

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de los pacientes

	Número pacientes	Porcentaje (%)
MUESTRA DE INDIVIDUOS	51 (324 historias revisadas)	100 de muestra (15,4 del total historias revisadas)
SEXO		
MUJERES	32	63
HOMBRES	19	37
EDAD (años)		
media	48 años (rango 18-84 años)	
18-40	19	37,3
41-60	15	24,9
61-74	13	25,5
>= 75	4	7,8
ANTECEDENTES PATOLÓGICOS CARDIACOS	4	7,8
TRATAMIENTO		
CON:		
Betabloqueantes	3	6
IECA	6	11,8

Tabla 2. Características etiológicas y gravedad de la anafilaxia

	Número pacientes	Porcentaje (%)
ETIOLOGIA		
ANAFILAXIA		
MEDICAMENTOSA	22	43,1
ALIMENTOS	17	33,3
ANISAKIS	2	3,9
HIMENOPTEROS	2	3,9
IDIOPATICA	8	15,6
COFACTOR ASOCIADO		
SI:	5	9,9
AINE	3	5,9
EJERCICIO	1	2
ALCOHOL	1	2
GRADO ANAFILAXIA		
1	8	16
2	32	63
3	11	21

En relación a la edad, el 81% (n=18) pacientes con anafilaxia por medicamentos, fueron mayores de 40 años, mientras que en la anafilaxia de etiología alimentaria fue del 41% (n=7). (Tabla 3)

Tabla 3. Etiología de la anafilaxia por grupos de edad

ETIOLOGÍA/ RANGO DE EDAD (AÑOS)	ALIMENTO	FÁRMACO	ANISAKIS	HIMENÓPTERO	IDIOPATICA
18-40	10 (58,8%)	4 (18,2%)	0	1 (50%)	4(50%)
41-60	5(29,4%)	6(27,2%)	0	1(50%)	3(37,5%)
61-74	2 (11,8%)	8 (36,4%)	2(100%)	0	1(12,5%)
Mayor o igual a 75	0	4(18,2%)	0	0	0
TOTAL	17 (100%)	22 (100%)	2(100%)	2 (100%)	8(100%)

5.1.3 GRAVEDAD DE LA ANAFILAXIA:

El 63% (n=32) de los pacientes, presentó una anafilaxia de grado 2, siendo éste el grado más frecuente para cualquier etiología (tabla 4), pero por rango de edad se observó una tendencia significativa entre la gravedad de anafilaxia y su presencia en pacientes de más alto rango de edad ($p=0'046$) (Tabla 5)

Tabla 4. Grado de anafilaxia en función de la etiología

ETIOLOGIA / GRADO ANAFILAXIA	ALIMENTOS	MEDICAMENT O	ANISAKI S	HIMENÓPTER O	IDIOPATIC A	TOTAL
GRADO 1	3 (6%)	1 (2%)	0	0	4(8%)	8 (16%)
GRADO 2	10 (19,5%)	14 (27,5%)	2 (4%)	2 (4%)	4(8%)	32 (63%)
GRADO 3	4 (8%)	7 (13%)	0	0	0	11 (21%)
TOTAL	17 (33,5%)	22 (42,5%)	2 (4%)	2 (4%)	8(16%)	51 (100%)

Tabla.5. Comparaciones múltiples de medias de la gravedad de anafilaxia respecto a la edad.

GRADO ANAFILAXIA		Diferencia de medias	Significación estadística (p)	IC (95%) (mínima, - máximo)
1	2	-12,267	0,179	(-28,24 - ,3,71)
	3	-17,964	0,046	(-35,69 - -0,24)
2	1	12,267	0,179	(-3,71 - 28,24)
	3	-5,697	0,663	(-18,71 - 7,32)
3	1	17,964	0,046	(0,24 - 35,69)
	2	5,697	0,633	(-7,32 - 18,71)

Las comparaciones múltiples se realizaron usando la prueba Sidak. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05. El grado de anafilaxia es indicado en la columna mediante formato numérico.1 es la afectación cutánea (prurito y/o urticaria y/o angioedema+ síntomas digestivos y/o rinitis .2 es la afectación cutánea+ afectación respiratoria (edema glotis y/o afectación de vías aéreas bajas y/o mareo .3 es el síncope y/o hipotensión

5.1.4 TRATAMIENTO RECIBIDO EN URGENCIAS

Se evaluaron los tratamientos recibidos durante el episodio agudo en urgencias, principalmente la adrenalina, los antihistamínicos y los glucocorticoides.

La adrenalina fue administrada solamente en un 55% (28/51) de los pacientes. La vía intramuscular fue la más utilizada, en un 71% (20/28) de los casos. En siete pacientes (13,7%) se administró adrenalina por vía subcutánea y en un paciente por vía endovenosa (2%). El 94,1% de los pacientes (48/51) recibieron antihistamínicos y el 96,1% (49/51) corticoides.

5.1.5 DETERMINACIÓN DE TRIPTASA SÉRICA DURANTE EL EPISODIO DE ANAFILAXIA

Se determinó la triptasa sérica en el 66,7% (36/51) de los pacientes. DE estos, en 33 pacientes en un intervalo de 2 a 4 horas del inicio de la reacción, con mediana de 6µg/L (rango 1-144) de triptasa sérica, en 12 pacientes la triptasa sérica estaba elevada (>11,4 µg/L).

5.1.6 CONCORDANCIA DEL DIAGNÓSTICO DE URGENCIAS CON EL DIAGNÓSTICO ALERGOLÓGICO

El 76% (39/51) de los pacientes fueron derivados al servicio de alergia al alta hospitalaria para poder ser estudiados. De éstos, el 64,7% cumplían los criterios de diagnóstico y eran etiquetados correctamente de anafilaxia por los facultativos del servicio de urgencias. Se estimó que el grado de concordancia entre el diagnóstico al alta hospitalaria y el correcto etiquetado era de 0,609 (Kappa =0,609, (IC 95%: 0,375-0,843), que corresponde a un grado moderado debido a un amplio intervalo de confianza.

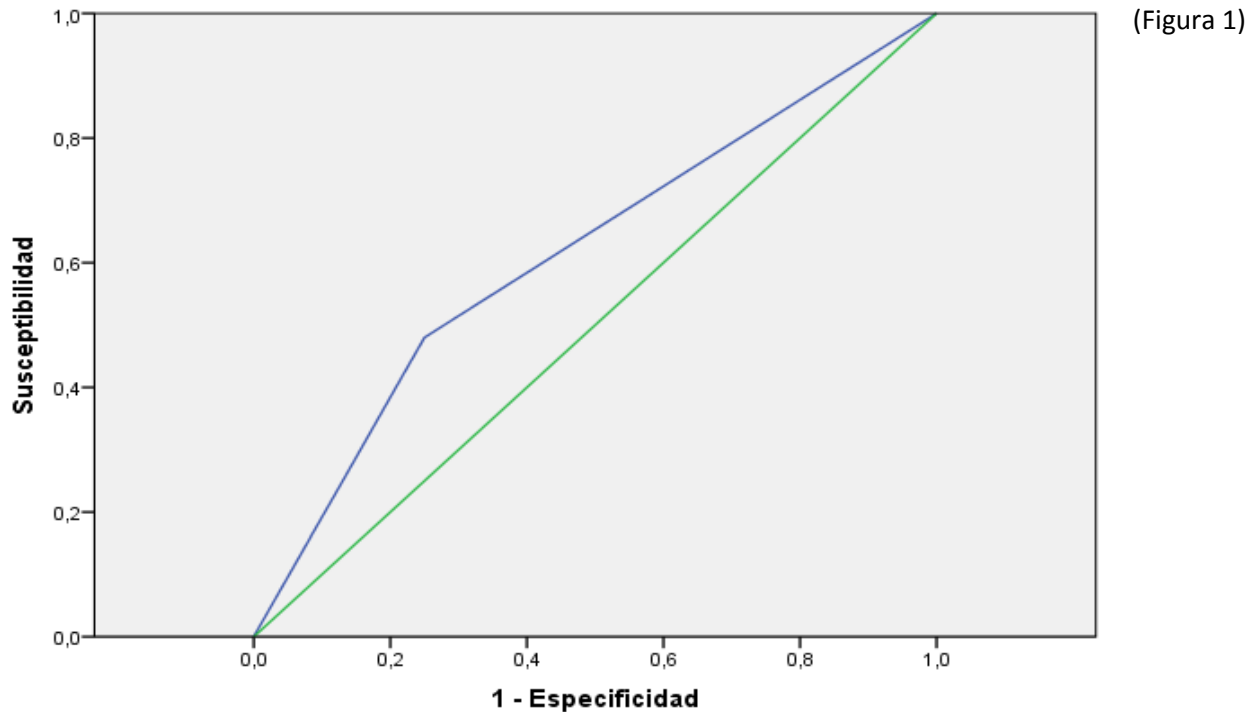
En los pacientes con correcto diagnóstico de anafilaxia, se les determinó la triptasa en el 78,8% (n=25), siendo el valor superior a 11,4 µg/L en un 52% (n=13) (tabla 6).

Tabla 6. Resultado de triptasa en función del diagnóstico anafilaxia mediante un análisis mediante Test exacto de Fisher (p=:0,416)

	DIAGNOSTICO CORRECTO		TOTAL
	NO	SI	
TRIPTASA POSITIVA*	6	13	19
TRIPTASA NEGATIVA	2	12	14
TOTAL	8	25	33

* triptasa positiva si era mayor de 11,4 µg/L

Mediante una curva ROC se determinó que la sensibilidad de la triptasa sérica elevada ($>11,4 \mu\text{g/l}$), fue del 48% y la especificidad del 75%, con un VPP (valor predictivo positivo) del 85% y un VPN (valor predictivo negativo) del 31%, con un Área bajo la curva (AUC) del 0,615 y un IC (95%): 0,396 - 0,83



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

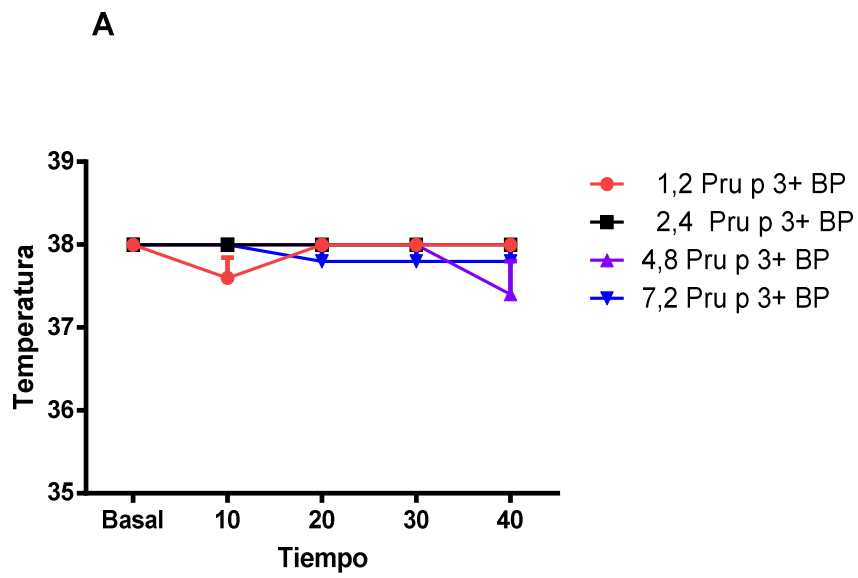
	Sensibilidad	Especificidad
-1	1	1
0,5	0,48	0,25
2	0	0

Figura 1. Curva ROC para triptasa ($>11,4 \mu\text{g/L}$)

5.2 TRABAJO 2. MODELO EXPERIMENTAL MÚRIDO DE ANAFILAXIA POR ALIMENTOS MEDIADA POR COFACTOR

5.2.1 PRIMER DISEÑO EXPERIMENTAL

La muestra de ratones C57BL/6J, que fueron sensibilizados a diferentes dosis del alérgeno Pru p3 y Bordatella Pertussis (BP) como adyuvante, durante el tiempo de observación posterior a la provocación (40 minutos), no presentaron variaciones estadísticamente significativas en la temperatura ni score de síntoma, en ninguno de los cinco grupos evaluados, independientemente de la cantidad de Pru p 3 usado para la sensibilización o para la provocación, lo que significaba que no existía respuesta anafiláctica. (figura 2). No se determinó el hematocrito al no obtener respuesta anafiláctica.



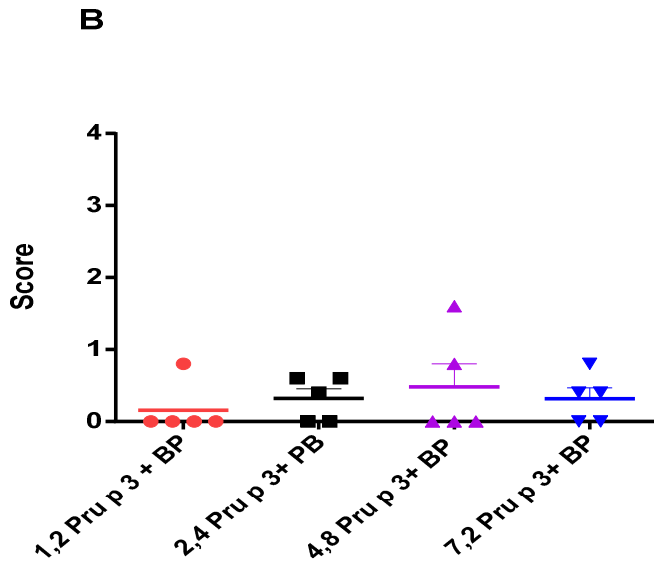


Figura 2. Variables medidas durante la inducción de anafilaxia en el primer diseño experimental . A)

Temperatura medida en grados centígrados, tiempo calculado en minutos. Pru p3+ BP corresponde a la

dosis de sensibilización de Pru p3 en microgramos (μg) y BP: *Bordetella Pertussis* al adyuvante B) Score es

una valoración numérica en 4 grados de los movimientos del ratón. Los datos en A, B son las medias \pm SEM para 5 ratones

5.2.2 SEGUNDO DISEÑO EXPERIMENTAL

Dado que no habíamos obtenidos los resultados esperados en el primer diseño experimental, decidimos

cambiar el adyuvante a Toxina *Cholera* (TC) y ensañar distintas dosis y vías de sensibilización en este

segundo diseño experimental. Los ratones C57BL/6J, distribuidos en 2 grupos fueron sensibilizados con Pru

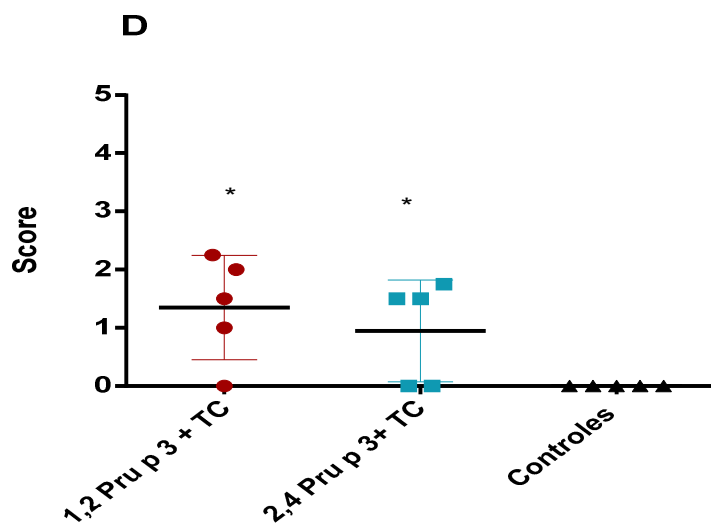
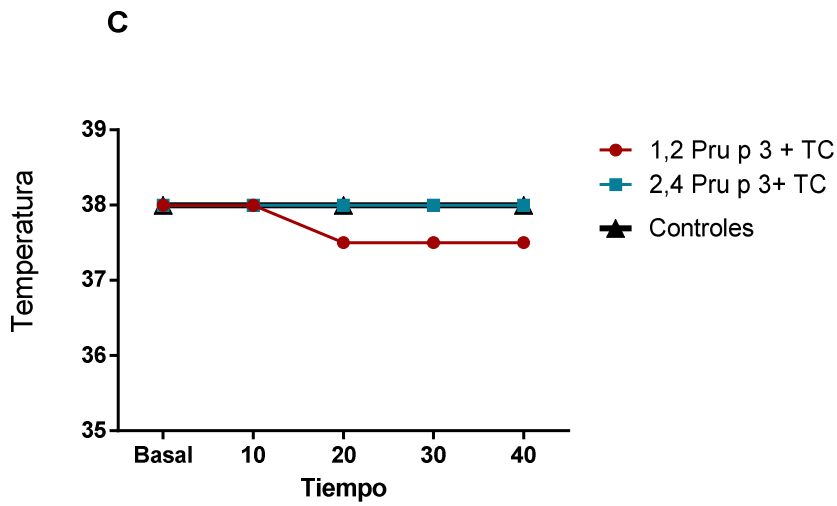
p 3 (μg) y con TC (μg) como nuevo adyuvante. La vía de sensibilización se evaluó para observar diferencias

entre la intragástrica exclusiva y la combinada intragástrica(ig) + intraperitoneal (ip) como se detalla en la

sección de material y métodos.

En el grupo 1 y el grupo 2 no se observaron cambios en temperatura estadísticamente significativos, mientras que el Score de síntomas y los niveles de hematocrito si son fueron superiores en el grupo activo ($p < 0,05$)

Los resultados obtenidos no diferían entre los dos métodos de administración del alérgeno durante la sensibilización, por lo que se analizaron los datos globalmente para cada grupo. (**Figura 3**)



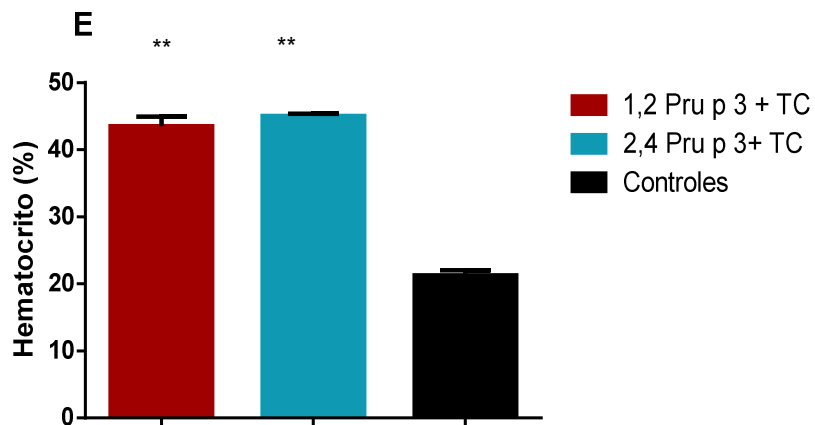
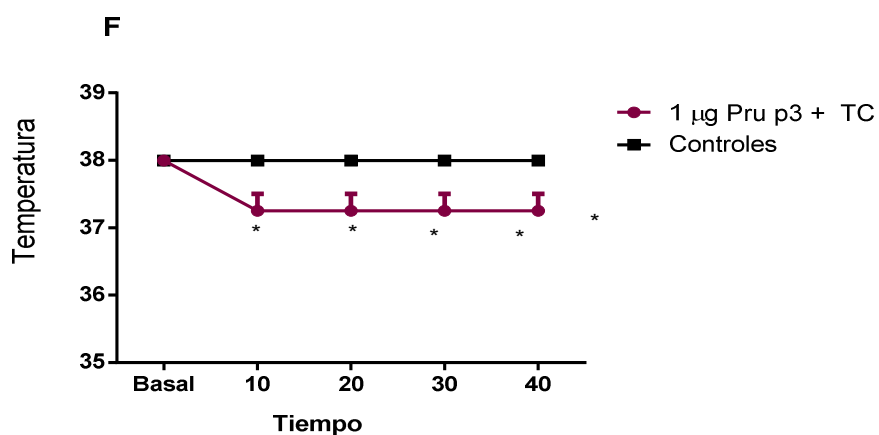


Figura 3. Variables analizadas durante la inducción de anafilaxia en el grupo 1 y 2 del segundo diseño experimental.

C) Temperatura medida en grados centígrados, tiempo calculado en minutos. Grupo 1 correspondería a 1,2µg Prup3+ TC (Toxina Cholera), Grupo 2 corresponde a 2,4 µg Prup3+ TC. D) Score es una valoración numérica en 4 grados de los movimientos del ratón. E) Hematocrito medido en porcentaje. Los datos en C, D, E son las medias ± SEM. ** p<0,005

En un tercer grupo de ratones macho C57BL/6J sensibilizados exclusivamente por vía enteral, si se observaron diferencias significativas (p<0,05) respecto a los controles, en todos los signos de respuesta anafiláctica (temperatura, score y hematocrito). (Figura 4)



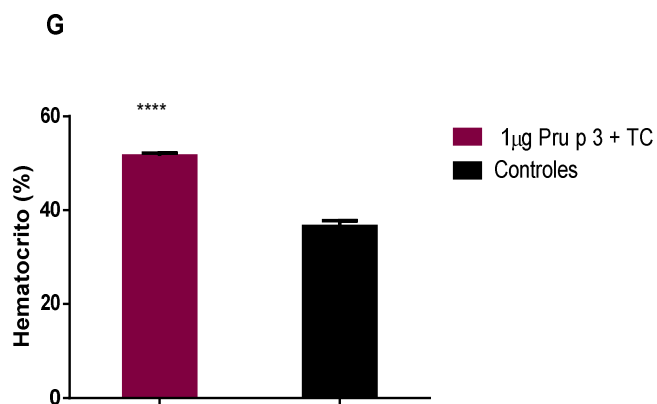
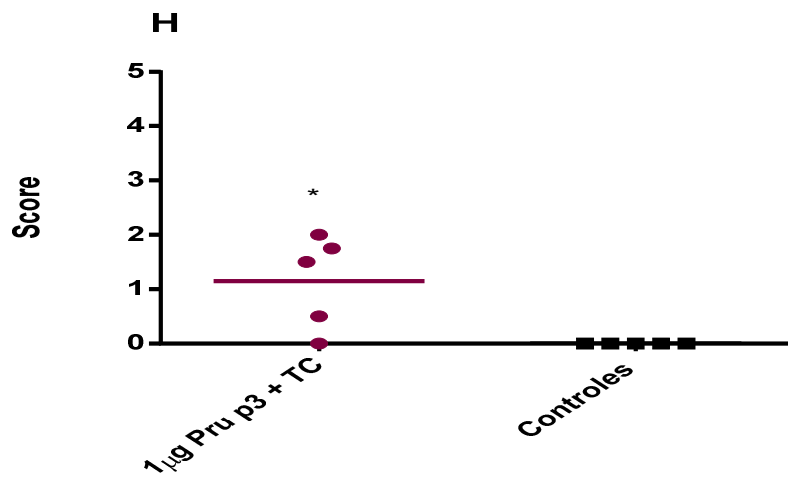


Figura 4: Variables medidas durante la inducción de anafilaxia en el grupo 3 del segundo diseño

experimental. F) Temperatura medida en grados centígrados, tiempo calculado en minutos. Grupo 3 correspondería a 1µg Prup3+ TC (Toxina Cholera).H) Score es una valoración numérica en 4 grados de los movimientos del ratón.G) Hematocrito medido en porcentaje. Los datos en C, D, E son las medias \pm SEM para 4 ratones. ** $p < 0,005$. Los datos en F, G, H son las medias \pm SEM. * $p < 0,05$ *** $p < 0.0001$

Se analizó la concentración del mediador de desgranulación mastocitaria mMCP-1, los ratones sensibilizados con Pru p3, dieron valores superiores a los ratones control ($p < 0,05$) (figura 5).

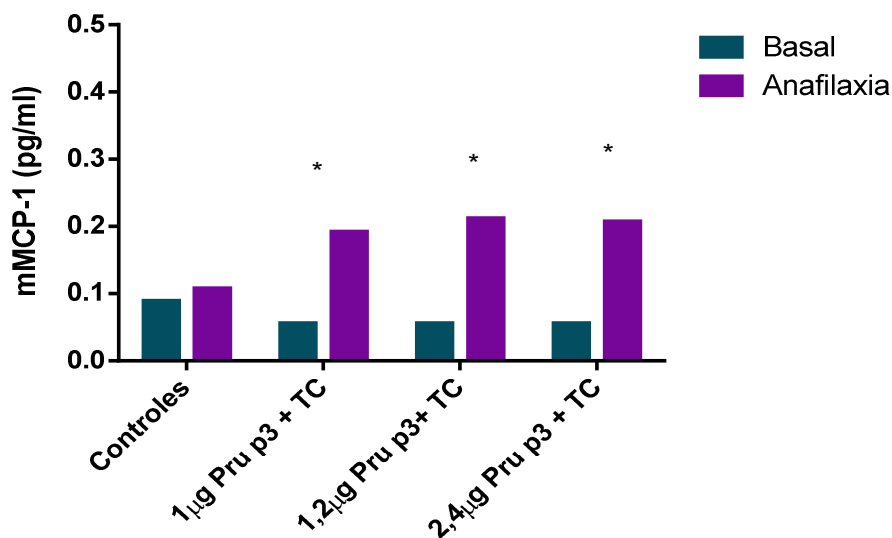


Figura 5. Niveles mMCP-1 en pg/ml basal y en anafilaxia Grupo 1 correspondería a 1,2µg Prup3+ TC (Toxina Cholera), Grupo 2 corresponde a 2,4 µg Prup3+ TC, Grupo 3 correspondería a 1µg Prup3+ TC (Toxina Cholera) los resultados son las medias \pm SEM * $p < 0,05$.

El grupo 3 fue objeto de estudio de cambios en la permeabilidad intestinal durante la inducción de anafilaxia mediante la medición de la concentración de β -lactoglobulina en suero, detectando mayor concentración los ratones sensibilizados a Pru p 3 respecto a los controles. ($p < 0,05$), lo que demostraba un aumento de la permeabilidad intestinal durante la anafilaxia inducida por Pru p 3. (figura 6)

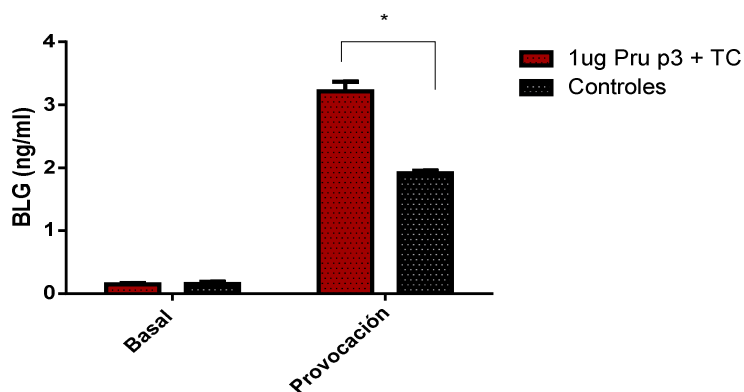


Figura 6. Niveles de BLG (betalactoglobulina) (ng/ml). los resultados representan las medias \pm SEM

* $p < 0,05$. TC: toxina Cholera.

5.2.3 TERCER DISEÑO EXPERIMENTAL

Una vez establecimos el modelo murino de anafilaxia por Pru p3 , decidimos experimentar con un modelo donde el alérgeno fuera el extracto piel de melocotón para simular en la mayor medida posible a los pacientes que presenta anafilaxia cuando comen melocotón, y cambiar la cepa a ratones Balb/c para intentar reproducir la respuesta anafiláctica en una cepa diferente.

Los ratones Balb/c se distribuyeron en 3 grupos, en el primer grupo se utilizaron tres dosis de extracto para la sensibilización (0,5mg, 1mg, 2 mg) en los dos grupos restantes fue la dosis idéntica (1mg). En la inducción de anafilaxia, la temperatura de los ratones sensibilizados a 1mg presentaron diferencias significativas respecto a los controles a los 30 y 40 minutos, mientras que el grupo de 2 mg se detectó a los 20 minutos. Fueron las dosis de 1 y 2 mg las que mostraron resultados significativamente superiores a los controles en score y hematocrito. (**figura 7**)

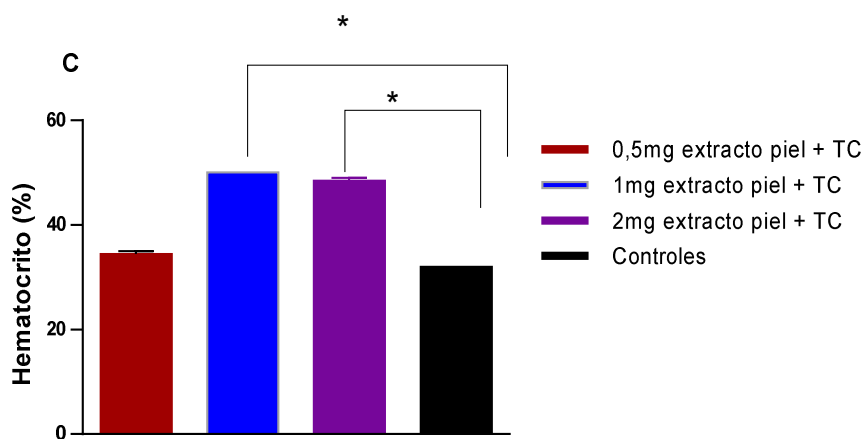
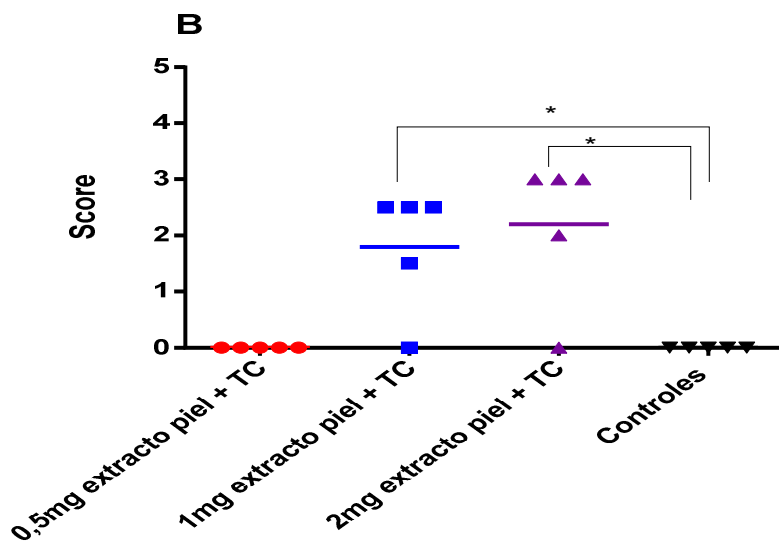
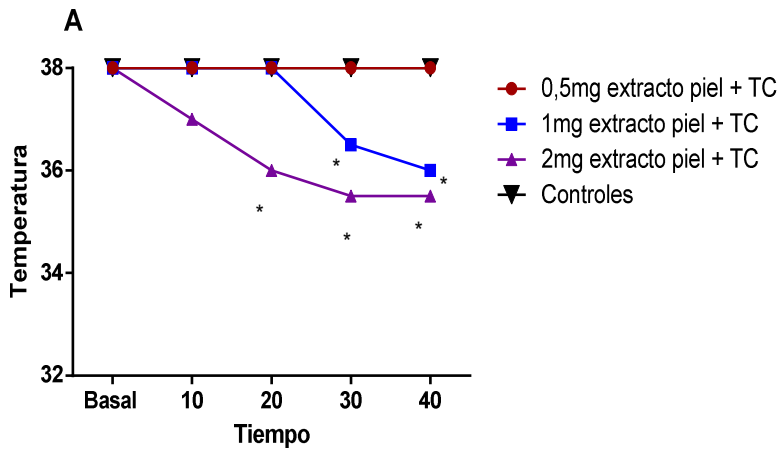
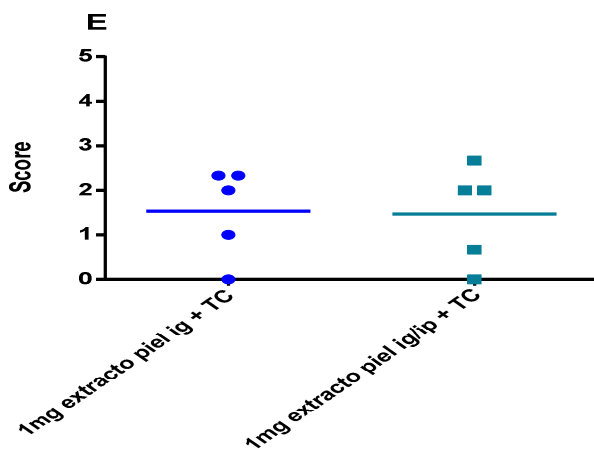
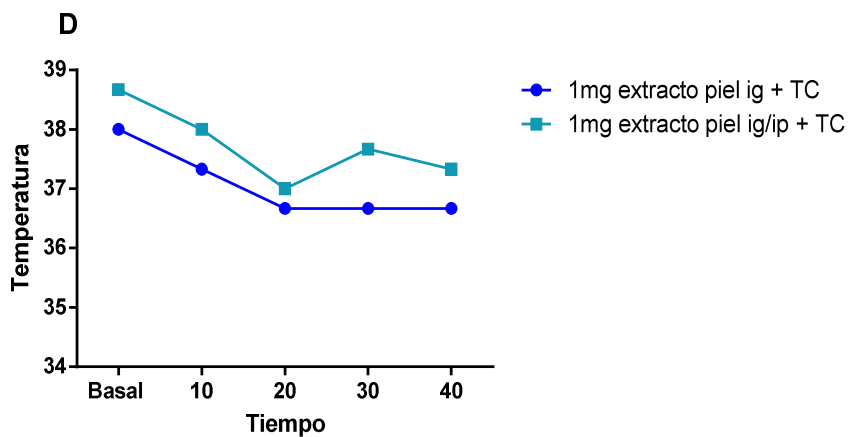


Figura 7. **Variables medidas durante la inducción de anafilaxia en los tres grupos del tercer diseño experimental.** A) la temperatura se mide en grados centígrados B) Score se mide en grados, C) el hematocrito se cuantifica en porcentaje. Los datos en A, B y C son las medias \pm SEM. * $p < 0,05$. TC: Toxina Cholera.

En el segundo grupo se comparó la respuesta anafiláctica, de ratones sensibilizados con 1mg extracto piel melocotón + TC en un subgrupo se administró por vía enteral exclusiva y a otro subgrupo se alternó la vía enteral con la intraperitoneal. En los signos de respuesta anafiláctica no se observaron predominancia de un subgrupo sobre el otro. ($p > 0,05$) (figura 8)



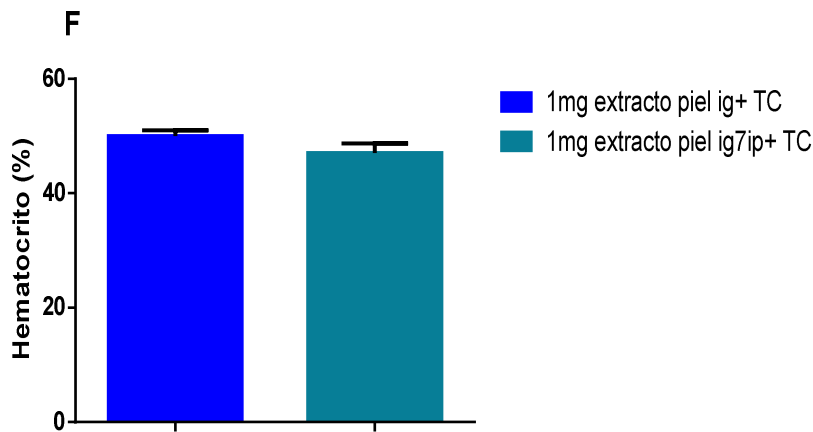


Figura 8. Variables medidas durante la inducción de anafilaxia en grupo 2 del tercer diseño experimental

D) la temperatura se mide en grados centígrados E) Score se mide en grados, F) el hematocrito se cuantifica en porcentaje. Los resultados en D, E y F son las medias \pm SEM. * $p < 0,05$. TC: toxina Cholera. ig: intragástrica. ip: intraperitoneal

Una vez analizados todos los resultados, fue en el tercer grupo de sensibilización exclusiva enteral con 1mg extracto de melocotón, en el que se estudió además de la respuesta anafiláctica, los cambios en permeabilidad intestinal con y sin cofactor AINE (diclofenaco). Diferencias significativas respecto a los controles fueron observadas en temperatura, score y hematocrito ($p < 0,05$). En los subgrupos activos, se comprobaron que el grupo en que se había administrado diclofenaco una mayor disminución de temperatura y un grado superior de score de síntomas (**figura 9**).

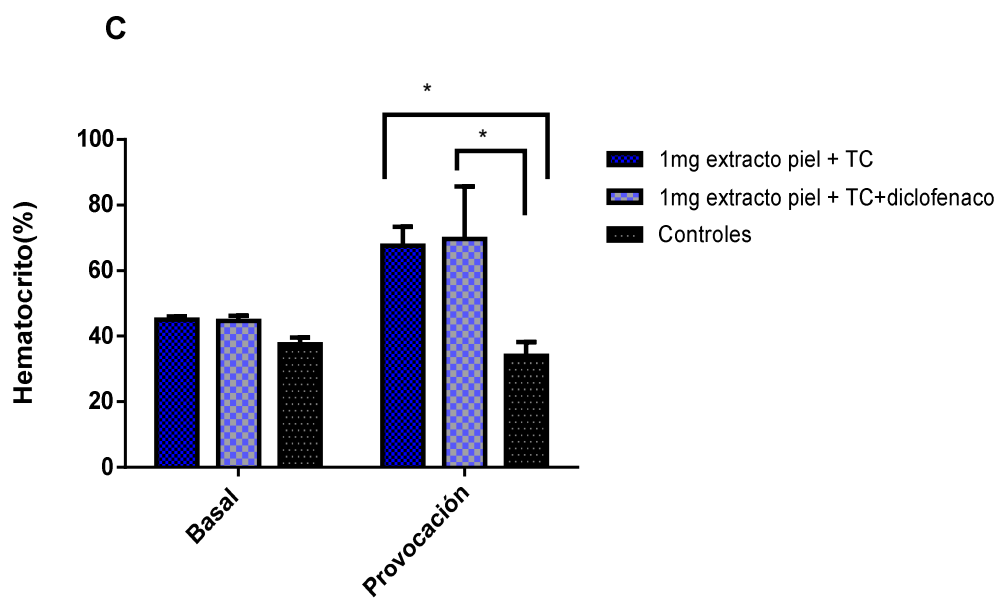
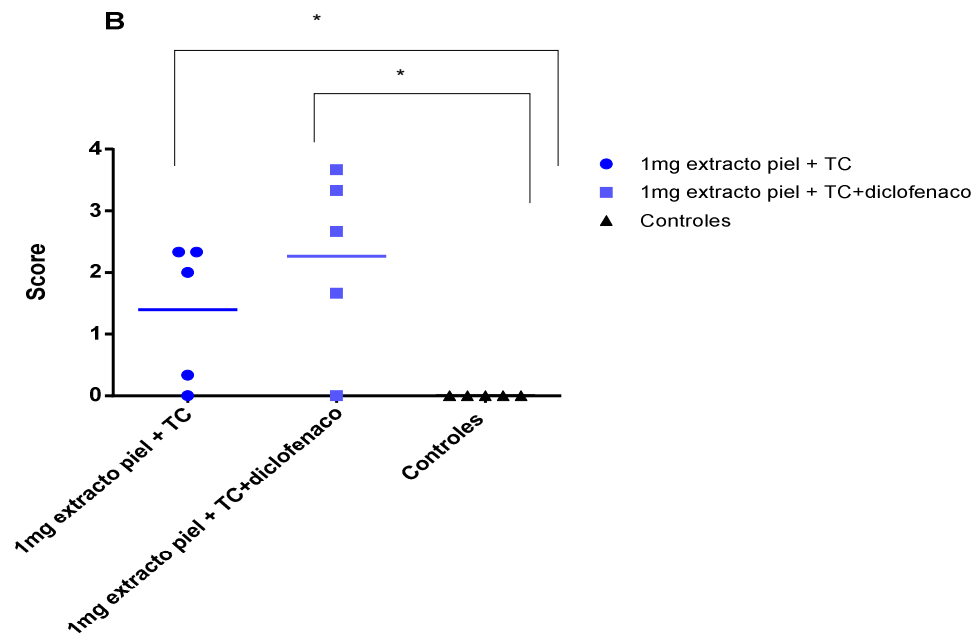


Figura 9. Efecto del diclofenaco en las variables clínicas y en el hematocrito en el modelo de

anafilaxia por extracto de melocotón. A) la temperatura se mide en grados centígrados B) Score se

mide en grados, C) el hematocrito se cuantifica en porcentaje Los datos en A, B, C y D son las medias \pm

SEM * $p < 0,05$ TC: Toxina Cholera.

Los niveles de β -Lactoglobulina (BLG), fueron significativamente superiores en el grupo en que se administró diclofenaco previo a la provocación (**figura 10**) lo que sugiere el papel del diclofenaco, y por ende , los AINE en la anafilaxia mediada por cofactor se deba a l aumento de la permeabilidad intestinal.

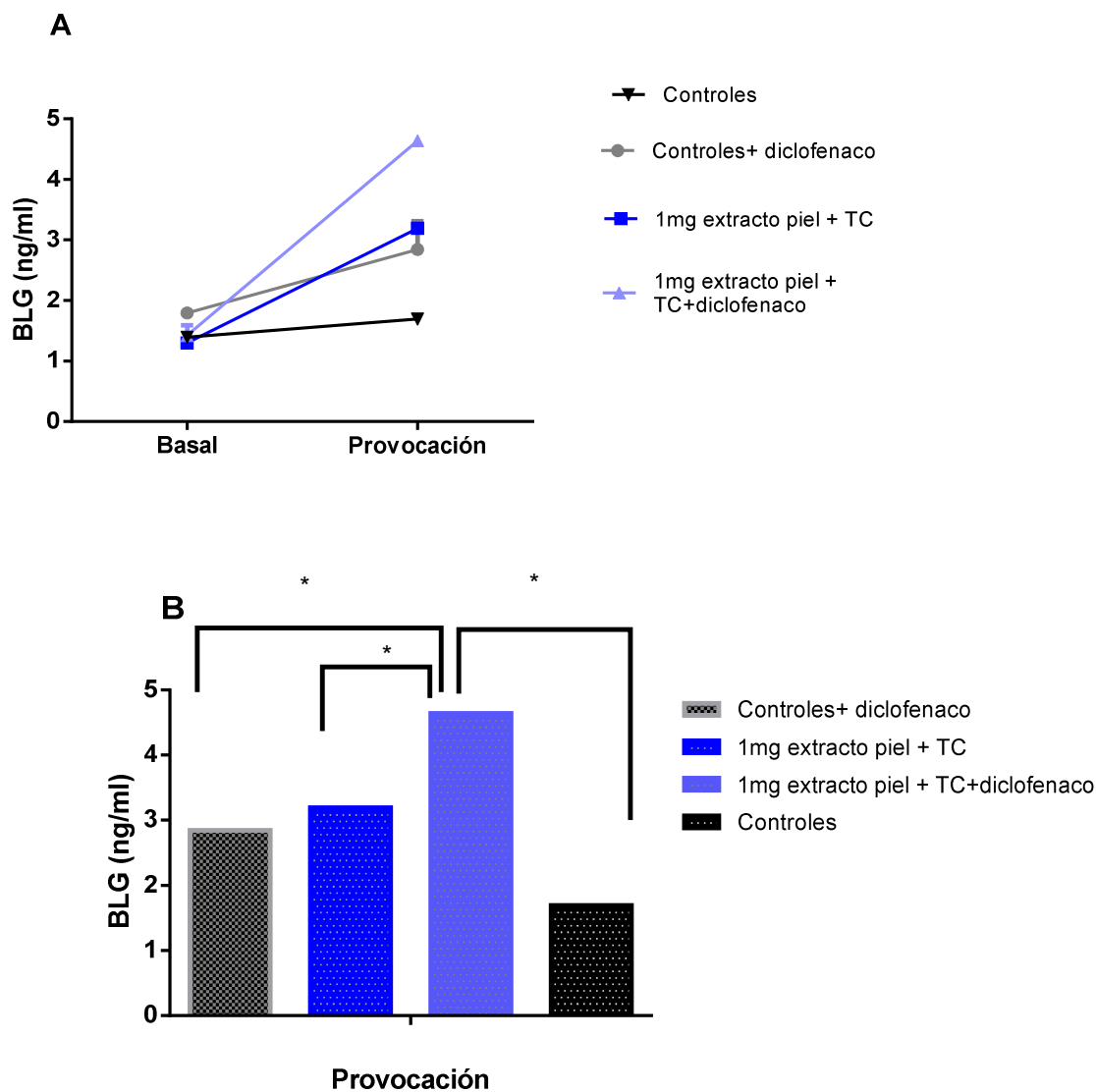


Figura 10. Efecto del diclofenaco en la elevación de la permeabilidad intestinal. Niveles de BLG (betalactoglobulina) (ng/ml). Los datos en A, B son las medias \pm SEM * $p < 0,05$ TC. Toxina Cholera

Finalmente para demostrar que el aumento de la permeabilidad era debido a la activación del mastocito se realizó una correlación entre los niveles de BLG y MMCP-I , observando una correlación positiva entre ambos ($R=0,71$, $p=0,02$, correlación de sperman), .(**figura 11**)

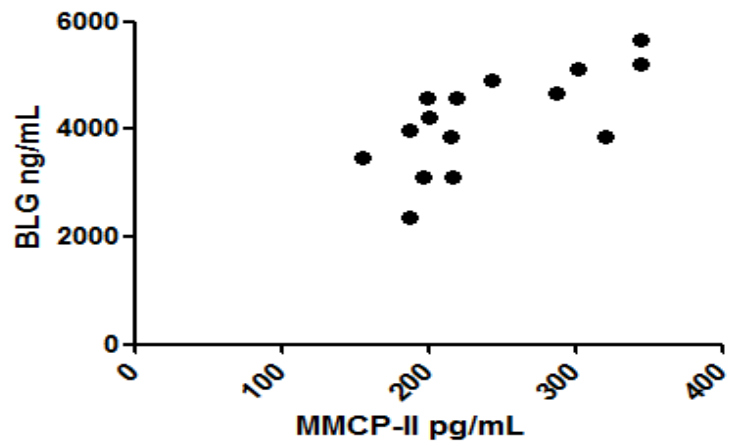


Figura 11. Correlación de niveles de mMCP-1 con β -lactoglobulina (BLG). Correlación de Spearman. $R=0,71$, $p=0,02$

6. DISCUSIÓN:

La estructura de la discusión, se ha dividido en dos partes, correspondientes a cada uno de los estudios realizados.

6.1 TRABAJO 1. CARACTERIZACIÓN DE LA ANAFILAXIA EN URGENCIAS HOSPITALARIAS

La anafilaxia es una reacción potencialmente mortal, con un diagnóstico eminentemente clínico, donde la anamnesis es crucial para no errar ni demorar, su tratamiento específico.

La incidencia global de anafilaxia, en total de visitas a urgencias médicas es del 0,12%, prácticamente la misma descrita en estudio en hospital de tercer nivel, con una población de referencia similar. (Álvarez-Perea et al. 2015) En otros países del sur de Europa la incidencia está entre el 0,03% -0,074% (Álvarez-Perea et al. 2015)

Si se analiza la etiología de la anafilaxia, las dos causas más prevalentes observadas en nuestro análisis son, medicamentos (43,1%) y alimentos (33%), proporciones diferentes a las mencionadas en otros estudios, donde la alimentaria sería la más prevalente, al incluir la población pediátrica en su muestra, que no era objeto de estudio en nuestra investigación. (73)

Si se ajustan los resultados por rangos de edad, es similar al descrito en poblaciones similares.(74)(73). Es interesante destacar, que, en un estudio realizado en población española, entre 1997-2011, el Echinococcus, se describe como un alérgeno causante de anafilaxia grave en edad de más de 50 años, siendo desplazado en estudios posteriores por otro parásito, el anisakis, como alérgeno importante en ese rango de edad. (75).

La sintomatología de la reacción, presenta una tendencia significativa a mayor gravedad, en pacientes de edad avanzada, similar al descrito anteriormente, pero no se puede obviar, que es en dicho grupo, donde las comorbilidades cardiovasculares y respiratorias, asociadas con la gravedad de la anafilaxia están más presentes. (75)

La prueba diagnóstica complementaria al juicio clínico, disponible en los centros de urgencia hospitalaria, es la triptasa. La triptasa es un marcador de degranulación mastocitaria en anafilaxia, pero su determinación no debe demorar la administración del tratamiento específico. En nuestra serie, la triptasa se determinó en un 66,7% de los pacientes, pero si se filtraba por diagnóstico correcto, este porcentaje aumentaba al 78%. El número de pacientes con niveles superiores al punto de corte estimado en $>11\mu\text{g/ml}$, fue del 48%, incrementándose en un 4%, si se ajustaba por diagnóstico correcto. En nuestra serie de pacientes, el punto de corte estimado de triptasa, nos daba una S: 48% y E: 75%, con un VPP85% y VPN: 31%. Posteriormente a nuestro estudio Francis A, determinó que la triptasa, considerando como prueba positiva valores superiores al mismo punto de corte, la S era 58,2% y E: 93,3% para anafilaxias, aumentando a una S: 84,6% y E: 92,2% si era un shock anafiláctico, (76). La evidencia, demuestra que un porcentaje no despreciable de pacientes, la triptasa no se eleva por encima del punto de corte establecido, avalando ulteriormente, el cambio de criterio descrito por Berroa et al, de dar como positivo el doble del nivel basal de triptasa. (77).

La determinación de la triptasa, se realizó entre las 2-4 horas de la reacción en la mayoría de los pacientes, un margen adecuado según lo descrito por A. Sala et al, pero al existir un grupo donde fue tomada la muestra fuera de este rango temporal, un sesgo de resultado no se puede descartar. (78)

Relativo al tratamiento, el objeto de estudio, era el uso de adrenalina, administrada en un 55% de los pacientes, dato ligeramente superior al mencionado en series de otros hospitales del territorio español, que oscila en torno al 40-43% (73)(Álvarez-Perea et al. 2015), aún lejos del uso recomendado. La adrenalina es el tratamiento de primera línea recomendado en todas las guías de diferentes sociedades de anafilaxia (Galaxia, EEAACI, WAO, AAAAI/ ACAAI) (Victoria Cardona and Cabañes 2009)(73). La vía de administración utilizada, es mayoritariamente intramuscular (71%), valor claramente superior al especificado en otros estudios análogos, donde la vía subcutánea es predominante, en detrimento de la

intramuscular (73). La respuesta a la adrenalina disminuye, en pacientes con tratamiento betabloqueante de base, sin embargo, sólo un 6% (3) de los pacientes lo tenían prescrito.

En el intento de dilucidar, que implicación podría tener el infradiagnóstico en el menor uso de adrenalina, se analizó el grado de concordancia entre el diagnóstico del facultativo de urgencias y el alergólogo, reflejando un grado moderado ($k:0,6$). Porcentualmente, un 64,7% de los pacientes eran etiquetados correctamente, apuntalando nuestra hipótesis del infradiagnóstico; probablemente, debido a que el diagnóstico de anafilaxia es eminentemente clínico, y requiere de cierta experiencia, para poder detectar los síntomas en el grado más leve. Aun et al, describen tres factores que pudieran estar implicados en el infradiagnóstico: un menor entrenamiento de los profesionales en su detección y tratamiento respecto otras patologías, el amplio abanico de síntomas sin un signo patognomónico, y ser una entidad poco frecuente en los servicios de urgencias. (80)

El cofactor se introdujo en el análisis, por ser un elemento a tener en cuenta en el diagnóstico de alergia alimentaria, con tendencia al alza su presencia en las anafilaxias alimentarias de nuestra área poblacional. En un 30% pacientes de las anafilaxias por alergia alimentaria estaba implicado un cofactor, siendo el AINE el más frecuente. El cofactor, no era un elemento en consideración anteriormente a Coutinho et al, que introduce el término cofactor, en un estudio retrospectivo de anafilaxia en urgencias, que engloba un periodo de 10 años, su análisis infiere la presencia del cofactor en un 11,6% del total pacientes, y en un 55% de las anafilaxias alimentarias. (81).

Limitaciones del estudio:

La reducida muestra de pacientes, no permite dar datos concluyentes en la S y E de la determinación de triptasa, que pudiera incluso haber aumentado su E, si se hubiera realizado una distinción entre anafilaxia y shock anafiláctico en el análisis.

El análisis de concordancia, al ser una muestra pequeña, el intervalo es sumamente amplio, lo que afecta al resultado, alejándolo de los obtenidos en otros estudios equivalentes , donde la concordancia es pobre (k:0,42) (9)

En la etiología, no existen subcategorías en los diferentes apartados, no pudiéndose dilucidar, a que alérgeno alimentario estaba asociado cada cofactor descrito, sin poder determinar el porcentaje atribuible a proteína de transferencia lipídica.

6.2 TRABAJO 2. MODELO EXPERIMENTAL MÚRIDO DE ANAFILAXIA POR ALIMENTOS MEDIADA POR COFACTOR

En los últimos años, en la zona Mediterránea, la anafilaxia alimentaria asociada a cofactor se ha incrementado significativamente, siendo la proteína de transferencia lipídica (LTP) de melocotón (Pru p 3), un alérgeno frecuentemente implicado. La posible alteración de la permeabilidad intestinal debida al cofactor, y su efecto potenciador en la clínica anafiláctica era la hipótesis del presente estudio, para poder dar respuesta a estas incógnitas nos planteamos dos objetivos.

El primer, era disponer de un modelo murino de alergia alimentaria a Pru p 3, que involucrara el sistema inmunitario intestinal, y rompiera la barrera de la tolerancia. La vía oral de sensibilización, mediante la administración intragástrica del alérgeno, debía estar presente, por ser la que mejor simula la digestión e interacción del alérgeno con el epitelio intestinal, a su vez, se precisaba de un adyuvante, vehículo para romper la tolerancia al alérgeno. El protocolo previamente descrito por Jordana et al ((66), fue el elegido, con las modificaciones pertinentes. El procedimiento precisa de 4 semanas de sensibilización mediante la administración una vez a la semana, de la proteína alergénica asociada al adyuvante, a las dos semanas de finalizar una provocación intraperitoneal.

El modelo inicial se planteó con la cepa C57BL/6J, Bordatella Pertussis (BP) como adyuvante y Pru p 3 como antígeno de sensibilización a diferentes dosis. La elección del adyuvante BP, se basó en su demostrada

capacidad de obtener respuesta proinflamatoria TH2 en modelos murinos (64) y su efecto en la mucosa intestinal en ratas (82). No se obtuvieron los resultados esperados, en las variables de respuesta anafiláctica (score síntomas, temperatura, hematocrito) y atribuimos el fracaso, al adyuvante utilizado, por lo que se decide cambiarlo por Toxina Cholera (TC). Su elección está precedida por estudios publicados, de su eficacia testada a diferentes dosis, asociada a antígenos diversos (63), y utilizada con cepas diferentes de ratones (83).

El modelo previamente publicado de alergia alimentaria a Pru p 3 en modelo murino, utilizaba la vía intraperitoneal para su sensibilización,(60), por lo que incluimos al protocolo, una comparación entre la vía de sensibilización exclusivamente oral, con una alternante oral e intraperitoneal. No se obtuvieron resultados a favor de alguna de las dos vías, en las variables de respuesta anafiláctica.

Respecto a las dosis de alérgeno idónea para la sensibilización, la correspondiente a 1µg Pru p3 fue la única que ofrecía resultados significativos, para los tres parámetros de respuesta anafiláctica, siendo equivalente a la utilizada en el modelo de Pru p 3 descrito por Toda (60).

La prueba "in vitro" que se determinó en muestra sanguínea, como marcador de activación y degranulación mastocitaria fue la proteasa mMCP-1. Lee et al, había descrito también el aumento de expresión de mMCP-1 en epitelio intestinal de ratones sensibilizados a OVA, avalando su importancia para el estudio de alergia alimentaria (34). Los niveles detectados en sangre, fueron significativamente más elevados en los diferentes grupos de sensibilización respecto a controles.

El mecanismo sugerido para el transporte digestivo de las LTP, es el transcelular, (35), lo que nos impulsó a utilizar la determinación de una proteína transeúnte transepitelial denominada Betalactoglobulina (BLG), para valorar la permeabilidad intestinal durante la anafilaxia. El resultado que obtuvimos con el modelo consolidado de Pru p3, fue una diferencia significativa en los niveles BLG; entre el

grupo sensibilizado y el grupo control. La BLG como marcador de cambios en el epitelio intestinal, había sido utilizado con anterioridad, en modelos murinos de alergia alimentaria (84)(34).

El segundo objetivo era estudiar la alergia alimentario asociada a cofactor y su efecto en la permeabilidad intestinal. Se abogó por utilizar un extracto alergénico más cercano a la realidad humana, escogiendo la piel del melocotón. Un extracto de piel de melocotón fue preparado, se detectó la banda proteica correspondiente al peso molecular de Pru p3 por SDS-PAGE, y se cuantificó por BCA las proteínas del extracto, con resultado coincidente con el descrito por Tobajas (72). Se presume una concentración de 1mg/ml de Pru p3 en el extracto, si se cumple la proporción recogida en estudios de cuantificación proteica en piel y pulpa de melocotón (47).

El protocolo escogido de sensibilización, fue una modificación del descrito previamente por Arias et al (66) para extracto de cacahuete. Se adopta la cepa Balb/c como animal de experimentación, por su demostrada capacidad de generar anticuerpos IgE en estudios con extracto cacahuete, claramente superior a C57BL/6J.(27), y con el intento de reproducir la respuesta anafiláctica en una cepa diferente. Después de testar varias dosis diferentes del extracto, se determinó que la de 1mg, era la aportaba cambios significativos en temperatura, score de síntomas y hematocrito. Posteriormente, se comparó la vía de sensibilización oral con una combinada oral e intraperitoneal, sin objetivar diferencias significativas.

El objetivo a alcanzar con el modelo establecido, era comparar la respuesta anafiláctica in vivo, y los efectos en la permeabilidad intestinal, con la presencia o no de cofactor. Entre los cofactores ejercicio, alcohol y AINE, se seleccionó este último, por ser el más frecuentemente implicado en nuestra área (48) y no depender de variables individuales de los sujetos afectados. Entre las opciones de AINE existentes, se optó por el diclofenaco, porque su uso estaba avalado por dos estudios precedentes (69)(70). Los resultados obtenidos, demostraron en todos los casos diferencias significativas de los grupos tratados vs controles, para todos en los parámetros de respuesta anafiláctica, al igual que en la determinación de BLG. Lo más destacado fue, que el grupo sensibilizado que recibió diclofenaco previo a la provocación, presentó a los

diez minutos de esta, una significativa disminución de temperatura y mayor puntuación del score de síntomas, que se mantuvo constante a lo largo del tiempo de observación, y los valores de BLG fueron claramente superiores.

Limitaciones del estudio

En el modelo propuesto, no se demostró la presencia de anticuerpos específicos anti Pru p3, que sí fueron determinados en los dos estudios realizados con modelo murino de Pru p3 (60)(62). El planteamiento de nuestra investigación era intentar crear un modelo, donde la sensibilización a alérgeno, que simulara en lo posible a la humana, pretensión muy diferente a lo publicado con Pru p3.

El extracto de piel melocotón, no se obtuvo una cuantificación exacta de la proteína Pru p3, que, aunque fue detectada su presencia, no se pudo precisar su concentración.

La determinación de la permeabilidad intestinal, se realizó con un único método, sin comparar los resultados con otros métodos complementarios, como la medición de resistencia eléctrica, trazadores no digeribles, o midiendo proteínas de expresión de las tight junctions.

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los trabajos realizados de esta tesis permiten extraer las siguientes conclusiones:

- 1) La anafilaxia es poco reconocida en las Urgencias hospitalarias. Los alimentos son una de las causas frecuentes de anafilaxia en nuestra área. El cofactor es un factor implicado en un porcentaje relevante de las anafilaxias por alimentos. La triptasa como marcador de degranulación mastocitaria, no descarta la anafilaxia en casi la mitad de los pacientes, con una baja sensibilidad y valor predictivo positivo.
- 2) En el modelo de anafilaxia por proteína de transferencia lipídica, mediante la administración del alérgeno Pru p 3 purificado o la administración de un extracto de piel de melocotón semanalmente durante 4 semanas, con posterior provocación intraperitoneal, ofrece una respuesta anafiláctica cuantificada por signos clínicos y biológicos, y se produce una activación del mastocito.
- 3) En el modelo murino de anafilaxia por proteína transferidora de lípidos la respuesta *in vivo* anafiláctica viene condicionada por la dosis del alérgeno, el adyuvante utilizado, pero no por la vía de sensibilización, al no existir diferencias entre una vía exclusivamente oral y una combinada oral e intraperitoneal ni por la cepa de ratón.
- 4) La permeabilidad intestinal aumenta en el modelo murino de anafilaxia por proteína de transferencia lipídica. El cofactor AINE implica un incremento de permeabilidad intestinal en el modelo de anafilaxia alimentaria por proteína de transferencia lipídica. El aumento de permeabilidad intestinal es secundario a la activación del mastocito.

8. LÍNEAS DE FUTURO:

La anafilaxia es una urgencia médica grave que está en aumento, por lo tanto se requiere ampliar la formación de los profesionales sanitarios en su capacidad de reconocimiento de la misma. El desarrollo de marcadores diagnósticos que puedan ser usados en el momento de la atención ("point of care") es una necesidad.

Dentro de las anafilaxias causadas por alimentos, en nuestro entorno destaca la dependiente de LTP, con una característica muy relevante: entre el 30 y el 50% son potenciadas por un co-factor. Sería preciso generar algoritmos diagnósticos para identificar estos casos, a partir de estudios de cohortes amplias, y validarlos de forma prospectiva en otras poblaciones.

El desarrollo de modelos experimentales permite ampliar conocimientos de la fisiopatología de la anafilaxia, ya que debido a su riesgo potencial es difícil realizar estudios en humanos. Con el uso de los modelos murinos estudiados, se podrá ampliar el conocimiento de la fisiopatología de la anafilaxia por alimentos, en concreto por proteínas de transferencia de lípidos y el papel de los cofactores, podrá contribuir al desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas.

9. BIBLIOGRAFIA

1. David B, De H, David PB. Histoire de l' anaphylaxie et de l' allergie To cite this version : HAL Id : pasteur-01348191 Histoire de l' anaphylaxie et de l' allergie. 2016;0–27.
2. Cardona Dahl V, Higuero NC, Rivas MMF, Martín CF, Martínez PG, Caballer BDLH, et al. Guideline for the management of anaphylaxis. *Med Clin (Barc)*. 2011;136(8):349–55.
3. Cardona V, Cabañes N, Tomás C, Hoz B de la, Fernández M, Gangóiti I, et al. Guía Anafilaxia 2016. Vol. 2, Seiac. 2016. 1–68 p.
4. Muraro A, Roberts G, Worm M, Bilò MB, Brockow K, Fernández Rivas M, et al. Anaphylaxis: Guidelines from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2014;69(8):1026–45.
5. Nwaru BI, Hickstein L, Panesar SS, Muraro A, Werfel T, Cardona V, et al. The epidemiology of food allergy in Europe: A systematic review and meta-analysis. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2014;69(1):62–75.
6. Tejedor Alonso MA, Moro Moro M, Múgica García M V., Esteban Hernández J, Rosado Ingelmo A, Vila Albelda C, et al. Incidence of anaphylaxis in the city of Alcorcon (Spain): A population-based study. *Clin Exp Allergy*. 2012;42(4):578–89.
7. Tejedor Alonso MA, Moro MM, Hernández JE, Múgica García M V., Albelda CV, Ingelmo AR, et al. Incidence of anaphylaxis in hospitalized patients. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;156(2):212–20.
8. Moro Moro M, Tejedor Alonso MA, Esteban Hernández J, Múgica García MVM, Rosado Ingelmo A, Vila Albelda C. Incidence of anaphylaxis and subtypes of anaphylaxis in a general hospital emergency department. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2011;21(2):142–9.
9. Alvarez-Perea A, Tomás-Pérez M, Martínez-Lezcano P, Marco G, Pérez D, Zubeldia JM, et al. Anaphylaxis in adolescent/adult patients treated in the emergency department: Differences between initial impressions and the definitive diagnosis. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2015;25(4):288–94.
10. Oropeza AR, Bindslev-Jensen C, Broesby-Olsen S, Kristensen T, Møller MB, Vestergaard H, et al. Patterns of anaphylaxis after diagnostic workup: A follow-up study of 226 patients with suspected anaphylaxis. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2017;72(12):1944–52.
11. Coutinho IA, Ferreira D, Regateiro FS, Pita J, Ferreira M, Martins JF, et al. Anaphylaxis in an emergency department: A retrospective 10-year study in a tertiary hospital. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2020;52(1):23–34.
12. Pourmand A, Robinson C, Syed W, Mazer-Amirshahi M. Biphasic anaphylaxis: A review of the literature and implications for emergency management. *Am J Emerg Med [Internet]*. 2018;36(8):1480–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2018.05.009>
13. Sampson HA, Muñoz-Furlong A, Campbell RL, Adkinson NF, 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(2):391–7.
14. Cardona V, Ansotegui IJ, Ebisawa M, El-Gamal Y, Fernandez Rivas M, Fineman S, et al. World allergy organization anaphylaxis guidance 2020. *World Allergy Organ J [Internet]*. 2020;13(10):100472. Available

from: <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2020.100472>

15. Santos J, Guilarte M, Alonso C, Malagelada JR. Pathogenesis of irritable bowel syndrome: The mast cell connection. *Scand J Gastroenterol*. 2005;40(2):129–40.
16. Roitt. Delves. Martin. Burton. Alergia y otras hipersensibilidades. In: *Fundamentos Immunología 12ª edición*. 2014. p. 394–421.
17. Reber LL, Hernandez JD, Galli SJ. The pathophysiology of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(2):335–48.
18. Finkelman FD, Khodoun M V., Strait R. Human IgE-independent systemic anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol [Internet]*. 2016;137(6):1674–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.02.015>
19. Elieh Ali Komi D, Wöhrl S, Bielory L. Mast Cell Biology at Molecular Level: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2020;58(3):342–65.
20. Dahlin JS, Hallgren J. Mast cell progenitors: Origin, development and migration to tissues. *Mol Immunol [Internet]*. 2015;63(1):9–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2014.01.018>
21. Pemberton AD, Wright SH, Knight PA, Miller HRP. Anaphylactic Release of Mucosal Mast Cell Granule Proteases: Role of Serpins in the Differential Clearance of Mouse Mast Cell Proteases-1 and -2. *J Immunol*. 2006;176(2):899–904.
22. Frossi B, Mion F, Sibilano R, Danelli L, Pucillo CEM. Is it time for a new classification of mast cells? What do we know about mast cell heterogeneity? *Immunol Rev*. 2018;282(1):35–46.
23. Nagashima M, Koyanagi M, Arimura Y. Comparative Analysis of Bone Marrow-derived Mast Cell Differentiation in C57BL/6 and BALB/c Mice. *Immunol Invest [Internet]*. 2019;48(3):303–20. Available from: <https://doi.org/10.1080/08820139.2018.1523924>
24. Mukai K, Tsai M, Saito H, Galli SJ. Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors. *Immunol Rev*. 2018;282(1):121–50.
25. da Silva EZM, Jamur MC, Oliver C. Mast Cell Function: A New Vision of an Old Cell. Vol. 62, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2014. 698–738 p.
26. Smart BA. Platelet-activating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis. *Pediatrics*. 2008;122(SUPPL. 4).
27. Smit JJ, Willemsen K, Hassing I, Fiechter D, Storm G, van Bloois L, et al. Contribution of classic and alternative effector pathways in peanut-induced anaphylactic responses. *PLoS One*. 2011;6(12):1–12.
28. Blank U, Madera-Salcedo IK, Danelli L, Claver J, Tiwari N, Sánchez-Miranda E, et al. Vesicular trafficking and signaling for cytokine and chemokine secretion in mast cells. *Front Immunol*. 2014;5(SEP):1–18.
29. Klein O, Sagi-Eisenberg R. Anaphylactic degranulation of mast cells: Focus on compound exocytosis. *J Immunol Res*. 2019;2019.
30. Kurashima Y, Kiyono H. New era for mucosal mast cells: Their roles in inflammation, allergic immune responses and adjuvant development. *Exp Mol Med [Internet]*. 2014;46(3):e83-6. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1038/emm.2014.7>

31. Tikoo S, Barki N, Jain R, Zulkhernain NS, Buhner S, Schemann M, et al. Imaging of mast cells. *Immunol Rev.* 2018;282(1):58–72.
32. Ménard S, Cerf-Bensussan N HM. Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. 2010;3(3):247–59.
33. González-González M, Díaz-Zepeda C, Eyzaguirre-Velásquez J, González-Arancibia C, Bravo JA, Julio-Pieper M. Investigating gut permeability in animal models of disease. *Front Physiol.* 2019;10(JAN):1–10.
34. Lee EJ, Song MJ, Kwon HS, Ji GE, Sung MK. Oral administration of fermented red ginseng suppressed ovalbumin-induced allergic responses in female BALB/c mice. *Phytomedicine [Internet].* 2012;19(10):896–903. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2012.04.008>
35. Tordesillas L, Gómez-Casado C, Garrido-Arandia M, Murua-García A, Palacín A, Varela J, et al. Transport of Pru p 3 across gastrointestinal epithelium - an essential step towards the induction of food allergy? *Clin Exp Allergy.* 2013;43(12):1374–83.
36. Chen S, Einspanier R, Schoen J. Transepithelial electrical resistance (TEER): a functional parameter to monitor the quality of oviduct epithelial cells cultured on filter supports. *Histochem Cell Biol.* 2015;144(5):509–15.
37. Macchia D, Melioli G, Pravettoni V, Nucera E, Piantanida M, Caminati M, et al. Guidelines for the use and interpretation of diagnostic methods in adult food allergy. *Clin Mol Allergy.* 2015;13(1):1–12.
38. Ojeda PM, Sastre J, Olaguibel JM, Chivato T. Alergológica 2015: A national survey on allergic diseases in the adult Spanish population. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2018;28(3):151–64.
39. Barber D, De La Torre F, Feo F, Florido F, Guardia P, Moreno C, et al. Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: A molecular epidemiological study. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2008;63(11):1550–8.
40. Basagaña Torrentó M, Elduque C, Teniente-Serra A, Casas I, Roger A. Clinical profile of lipid transfer protein syndrome in a mediterranean area. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2018;28(1):58–60.
41. Asero R, Piantanida M, Pinter E, Pravettoni V. The clinical relevance of lipid transfer protein. *Clin Exp Allergy.* 2018;48(1):6–12.
42. Yeats TH, Rose JKC. The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Sci.* 2008;17(2):191–8.
43. Scheurer S, Schülke S. Interaction of non-specific lipid-transfer proteins with plant-derived lipids and its impact on allergic sensitization. *Front Immunol.* 2018;9(JUN):1–9.
44. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Ispano M, Monza M, et al. The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103(3 II):520–6.
45. García-casado G, Pacios LF, Díaz-perales A, Sánchez-monge R, Lombardero M, García-selles FJ, et al. Food and drug reactions and anaphylaxis Identification of IgE-binding epitopes of the major peach allergen Pru p 3. *Clin Immunol.* 2003;

46. Duffort OA, Polo F, Lombardero M, Díaz-Perales A, Sánchez-Monge R, García-Casado G, et al. Immunoassay to quantify the major peach allergen Pru p 3 in foodstuffs. Differential allergen release and stability under physiological conditions. *J Agric Food Chem*. 2002;50(26):7738–41.
47. Carnés J, Fernández-Caldas E, Gallego MT, Ferrer A, Cuesta-Herranz J. Pru p 3 (LTP) content in peach extracts. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2002;57(11):1071–5.
48. Cardona V, Luengo O, Garriga T, Izquierdo A. Co-factor-enhanced food allergy. 2012;39:1316–8.
49. Wölbing F, Fischer J, Köberle M, Kaesler S, Biedermann T. About the role and underlying mechanisms of cofactors in anaphylaxis. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2013;68(9):1085–92.
50. Muñoz-Cano R, Pascal M, Araujo G, Goikoetxea MJ, Valero AL, Picado C, et al. Mechanisms, cofactors, and augmenting factors involved in anaphylaxis. *Front Immunol*. 2017;8(SEP):1–7.
51. Pascal M, Muñoz-Cano R, Reina Z, Palacín A, Vilella R, Picado C, et al. Lipid transfer protein syndrome: Clinical pattern, cofactor effect and profile of molecular sensitization to plant-foods and pollens. *Clin Exp Allergy*. 2012;42(10):1529–39.
52. Niggemann B, Beyer K. Factors augmenting allergic reactions. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2014;69(12):1582–7.
53. Bito T, Kanda E, Tanaka M, Fukunaga A, Horikawa T, Nishigori C. Cows milk-dependent exercise-induced anaphylaxis under the condition of a premenstrual or ovulatory phase following skin sensitization. *Allergol Int [Internet]*. 2008;57(4):437–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.2332/allergolint.C-08-62>
54. Gomułka K, Wolanczyk-Mędrala A, Barg W, Mędrala W. Food-dependent, exercise-induced anaphylaxis triggered by co-occurrence of culprit food, physical effort and a very high dose of ibuprofen or menstruation: A case report. *Postep Dermatologii i Alergol*. 2017;34(1):87–8.
55. J. Fischer, E. Schuck TB. Wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis exclusively during menstruation. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2010;65(10):1345–7.
56. Dearman RJ, Kimber I. Animal models of protein allergenicity: Potential benefits, pitfalls and challenges. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(4):458–68.
57. Schülke S, Albrecht M. Mouse Models for Food Allergies: Where Do We Stand? *Cells*. 2019;8(6):546.
58. Helm RM, Ermel RW, Frick OL. Nonmurine animal models of food allergy. *Environ Health Perspect*. 2003;111(2):239–44.
59. Nauta A, Knippels L, Garssen J, Redegeld F. Animal models of anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007;7(4):355–9.
60. Toda M, Reese G, Gadermaier G, Schulten V, Lauer I, Egger M, et al. Protein unfolding strongly modulates the allergenicity and immunogenicity of Pru p 3, the major peach allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(5).
61. Kanagaratham C, Sallis BF, Fiebiger E. Experimental Models for Studying Food Allergy. *Cmgh [Internet]*. 2018;6(3):356-369.e1. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.05.010>
62. Rodriguez MJ, Aranda A, Fernandez TD, Cubells-Baeza N, Torres MJ, Gomez F, et al. LPS promotes Th2

- dependent sensitisation leading to anaphylaxis in a Pru p 3 mouse model. *Sci Rep*. 2017;7(June 2016):1–8.
63. Kroghsbo S, Christensen HR, Frøkiær H. Experimental parameters differentially affect the humoral response of the cholera-toxin-based murine model of food allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003;131(4):256–63.
 64. Ryan M, McCarthy L, Rappuoli R, Mahon BP, Mills KHG. Pertussis toxin potentiates T(h)1 and T(h)2 responses to co-injected antigen: Adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28. *Int Immunol*. 1998;10(5):651–62.
 65. Ganeshan K, Neilsen C V., Hadsaitong A, Schleimer RP, Luo X, Bryce PJ. Impairing oral tolerance promotes allergy and anaphylaxis: A new murine food allergy model. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(1).
 66. Sun J, Arias K, Alvarez D, Fattouh R, Walker T, Goncharova S, et al. Impact of CD40 Ligand, B Cells, and Mast Cells in Peanut-Induced Anaphylactic Responses. *J Immunol*. 2007;179(10):6696–703.
 67. Finkelman FD. Anaphylaxis: Lessons from mouse models. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(3):506–15.
 68. Bowman CC, Selgrade MK. Differences in allergenic potential of food extracts following oral exposure in mice reflect differences in digestibility: Potential approaches to safety assessment. *Toxicol Sci*. 2008;102(1):100–9.
 69. Bol-Schoenmakers M, Bleumink R, Marcondes Rezende M, Mouser E, Hassing I, Ludwig I, et al. Diclofenac enhances allergic responses in a mouse peanut allergy model. *Clin Exp Allergy*. 2011;41(3):424–33.
 70. Diao L, Mei Q, Xu JM, Liu XC, Hu J, Jin J, et al. Rebamipide suppresses diclofenac-induced intestinal permeability via mitochondrial protection in mice. *World J Gastroenterol*. 2012;18(10):1059–66.
 71. Brown SGA. Clinical features and severity grading of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(2):371–6.
 72. Tobajas P. Trabajo Fin de Grado. ZaganUnizarEs [Internet]. 2014;157. Available from: <http://zagan.unizar.es/TAZ/EUCS/2014/14180/TAZ-TFG-2014-408.pdf>
 73. Ponce Guevara L V., Laffond Yges E, Gracia Bara MT, Moreno Rodilla E, Muñoz Bellido FJ, Lázaro Sastre M, et al. Adherence to anaphylaxis guidelines: Real-world data from the emergency department of a tertiary hospital. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2018;28(4):246–52.
 74. Moro Moro M, Tejedor Alonso MA, Esteban Hernández J, Múgica García MVM, Rosado Ingelmo A, Vila Albelda C. Incidence of anaphylaxis and subtypes of anaphylaxis in a general hospital emergency department. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2011;21(2):142–9.
 75. Nieto-Nieto A, Tejedor-Alonso MA, Farias-Aquino E, Moro-Moro M, Rosado Ingelmo A, Gonzalez-Moreno A, et al. Clinical profile of patients with severe anaphylaxis hospitalized in the Spanish hospital system: 1997-2011. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2017;27(2):111–26.
 76. Francis A, Fatovich DM, Arendts G, Macdonald SPJ, Bosio E, Nagree Y, et al. Serum mast cell tryptase measurements: Sensitivity and specificity for a diagnosis of anaphylaxis in emergency department patients with shock or hypoxaemia. *EMA - Emerg Med Australas*. 2018;30(3):366–74.
 77. Berroa F, Lafuente A, Javaloyes G, Ferrer M, Moncada R, Goikoetxea MJ, et al. The usefulness of plasma histamine and different tryptase cut-off points in the diagnosis of perianaesthetic hypersensitivity reactions. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(2):270–7.

78. Sala-Cunill A, Cardona V, Labrador-Horrillo M, Luengo O, Estes O, Garriga T, et al. Usefulness and limitations of sequential serum tryptase for the diagnosis of anaphylaxis in 102 patients. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;160(2):192–9.
79. Cardona V, Cabañes N. GALAXIA : Guía de Actuación en Anafilaxia. *Galaxy Guia Actuac En Anafilaxia*. 2009;15:1–29.
80. Aun M V., Kalil J, Giavina-Bianchi P. Adults and children with anaphylaxis in the emergency room: why it is not recognized? *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2018;18(5):377–81.
81. Coutinho IA, Ferreira D, Regateiro FS, Pita J, Ferreira M, Martins JF, et al. Anaphylaxis in an emergency department: A retrospective 10-year study in a tertiary hospital. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2020;52(1):23–34.
82. Kosecka U, Berin MC, Perdue MH. Pertussis adjuvant prolongs intestinal hypersensitivity. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999;119(3):205–11.
83. Morafo V, Srivastava K, Huang CK, Kleiner G, Lee SY, Sampson HA, et al. Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential TH2-TH1 responses in C3H/HeJ and BALB/c mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(5):1122–8.
84. Abril-Gil M, Garcia-Just A, Pérez-Cano FJ, Franch Á, Castell M. Development and characterization of an effective food allergy model in Brown Norway rats. *PLoS One*. 2015;10(4):1–20.