UAB
Universitat Autònoma de Barcelona

BIOMARCADORES de ANAFILAXIA
Estudio en individuos que han experimentado una reacción anafiláctica para evaluar la implicación de la coagulación y la fibrinólisis, el sistema de contacto y nuevos mecanismos celulares

Paula Galván Blasco

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Universitat Autònoma de Barcelona

TESIS DOCTORAL

BIOMARCADORES de ANAFILAXIA

Estudio en individuos que han experimentado una reacción anafiláctica para evaluar la implicación de la coagulación y la fibrinólisis, el sistema de contacto y nuevos mecanismos celulares

Doctoranda:

Paula Galván Blasco

Directores:

Anna Sala Cunill

Mar Guilarte Clavero

Tutor:

Albert Selva O'Callaghan

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2024

“No se puede enseñar nada a un ser humano, sólo se le puede ayudar a descubrirse a sí mismo”

Galileo Galilei (1564 – 1642)

AGRADECIMIENTOS

Realizar todos los pasos de una tesis doctoral haya sido probablemente uno de los proyectos más largos y tediosos en los que me enfrentado hasta el momento. Me gustaría empezar por agradecer a aquellas personas que me animaron a empezar este proyecto y cuyo relevo esperaba tomar y continuar sin muchos tropiezos. Ellas han estado a mi lado tomando las decisiones de diseño, la ejecución, la interpretación de los resultados y finalmente la elaboración de este manuscrito. Ellas son unas santas, unas fuera de serie y personas a las que aprecio en todos los sentidos y con todo mi corazón. Me refiero a mis directoras de tesis, Anna Sala y Mar Guilarte.

Una figura habitualmente la sombra en cualquier tesis pero importante como ninguna otra es el tutor de la tesis doctoral. En mi caso, la fortuna me ha permitido tener a Albert Selva, al cual también me gustaría darle las gracias por su comprensión y humanidad en los momentos más complicados de este proyecto.

Fragua una tesis doctoral mientras se está haciendo un trabajo a jornada completa es un desafío y por ello me gustaría agradecer a todos los miembros del Servicio de Alergología, a Victòria Cardona, nuestra jefa, a mis compañeros Moisés Labrador, Johana Gil, Olga Luengo, Javier Pereira y Arnau Salvany por haberme ayudado en todos aquellos momentos en los que les han necesitado que me echaran un capote para tomar un respiro de minutos en momentos claves y por su apoyo incondicional.

Gran parte de lo que soy, bueno, en realidad todo lo que soy, es gracias a mis padres y mi familia. Especialmente mis padres han estado presentes en los momentos más decisivos de mi vida y han sido los mejores compañeros de viaje o “porteadores” en el sinuoso camino que es la vida. Ellos han sido una constante que me ha dado estabilidad y una estructura firme sobre la cual siempre he podido apoyarme cuando me sentido inestable o débil, y nunca dejaré de agradecerles su presencia, su cariño, su amor, su comprensión de mis valores personales (aman el trabajo bien hecho tanto como yo pero lo que es aún mejor, me aman más a mí, cosa de la que a veces yo no puedo presumir) y su búsqueda constante de mi autocuidado. Hablando de cuidarse, también me gustaría dar las gracias aquellas personas que han cuidado de mi salud mental en estos años. A mi primer psicólogo, Francesc Taberner, que ayudo a desarrollarse a la personita que soy hoy y a mí segunda psicóloga, Mati Segura, la que necesité pospandemia y en la peor fase de mi migraña para volver a entenderme, aceptarme y a cuidarme.

Todos tenemos claro de que esta tesis probablemente no hubiera llegado a su destino cuando tocaba si no hubiera sido por la ayuda de la Unidad de Cefaleas del Hospital Vall d'Hebron. Recibir el diagnóstico de una enfermedad crónica, la cual convivió conmigo muchos años pero que hasta el momento no había crecido a ser el monstruo que llegó a ser en su momento más álgido en 2023, no fue fácil, como tampoco lo fue domar a la bestia. Su labor profesional, su implicación y su comprensión, especialmente de la Dra Patricia Pozo, el Dr Edoardo Carona y Lali, han sido fundamentales para poder enfrentar la última fase de mi tesis (y volver a ser yo) y por ello les quiero dar las gracias.

La Paula de día se acompaña de tus amistades en el trabajo y la Paula de las tardes y de los fines de semana de sus amistades más cercanas, una fortuna de segunda familia que han comprendido mis necesidades de enclaustramiento, ventilación emocional, compañía y cuyo apoyo he sentido durante todo el camino. Especialmente gracias a ti, Paco, mi hermano de otra madre, a ti, Kristopher, mi medio corazón, a ti, Carla y Nerea, mis princesas favoritas, a ti, Mª Ángeles, mi oasis. Ojalá me diera tiempo de dar las gracias a todos los que habéis estado allí. Yo sé y vosotros sabéis quien sois, sabéis lo que significáis para mí y os agradezco que forméis parte de mi vida.

Éste ha sido un trabajo colaborativo. Por una parte la estancia que hice en el laboratorio LKCH de la UMC con el equipo liderado por Coen Maas y bajo la tutela se Zonne Hofman me ayudó a conseguir parte de los resultados que se presentan en esta tesis. Descubrí una forma diferente de trabajar y sé que he fraguado amistades a raíz de esa rotación que espero mantener por muchos años. Otra parte importante de este trabajo ha sido la estadística realizada gracias al equipo de estadística del VHIR, gracias Santiago y Berta por dedicar el tiempo necesario a mi proyecto y nuestras reuniones. Interpretar los dados hubiera sido mucho más difícil sin vuestra ayuda y experiencia. Finalmente gracias al laboratorio de inmunología HUVH, a sus técnicos e inmunólogos, por adoptarme por unas semanas para realizar las técnicas de laboratorio que quedaban por completar durante el verano.

Mi último agradecimiento es probablemente el más importante de los mencionados hasta ahora. Como prácticamente siempre en la investigación médica, este trabajo no hubiera sido posible sin la participación altruista de todos los individuos que han dado sus muestras y sus datos. A ellos, a los que están y a los que no están, les quiero dar las gracias de todo corazón por contribuir a la investigación sobre la anafilaxia.

Acabaré con una frase que resume mi filosofía de vida, sin acritud hacía mi persona sino desde la más profunda humildad: gracias por tanto y perdón por tan poco.

ABREVIATURAS

MC - Mastocito(s)

B - Basófilo(s)

E - Eosinófilo(s)

N - Neutrófilo(s)

PLAQ – Plaqueta(s)

NK - Célula(s) Natural Killer

DC - Célula(s) Dendrítica(s)

MF - Macrófago(s)

L - Linfocito(s)

LT - Linfocito(s) T

IgE - Inmunoglobulina E

sIgE – Inmunoglobulina E específica

FcεRI - Receptor de Alta Afinidad para IgE

FcεRII - Receptor de Baja Afinidad para IgE

FcγRI - Receptor de Baja Afinidad para IgG o antígeno CD64

FcγRII - Receptor de Alta Afinidad para IgG o antígeno CD32

FcγRIII - Receptor de Alta Afinidad para IgG o antígeno CD16

MRGPRS - receptor acoplado a proteína G relacionado con Mas

TRK - receptor de tirosina quinasa

SCFR - receptor del factor de células madre

TLR - receptor tipo Toll

HR - receptor de histamina

TNFR - receptor del factor de necrosis tumoral

PAFR - receptor del factor activador de plasmina

GM-CSFR - receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

PAR - receptor activado por proteasa

CysLTR - receptor de cisteinil leucotrienos

EP - receptor de prostanoides E

Chy - Quimasa

CPA - Carboxipeptidasa A

LT – Leucotrieno(s)

LTB4 - Leucotrieno B4

LTC4 - Leucotrieno C4

LTD4 - Leucotrieno D4

LTE4 - Leucotrieno E4

PG - Prostaglandina

PGD2 - Prostaglandina D2

PGE2 - Prostaglandina E2

PAF - Factor Activador de Plaquetas (Platelet-Activating Factor)

TXA2 - Tromboxano A2 (Thromboxane A2)

ET-1 - Endotelina-1 (Endothelin-1)

Ang I - Angiotensina I (Angiotensin I)

Ang II - Angiotensina II (Angiotensin II)

TGF-β - Factor de Crecimiento Transformante Beta (Transforming Growth Factor Beta)

ICAM-1 - Molécula de Adhesión Intercelular 1 (Intercellular Adhesion Molecule 1)

VCAM-1 - Molécula de Adhesión Vascular 1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1)

PECAM-1 - Molécula de Adhesión de Células Endoteliales y Plaquetarias 1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1)

E-Selectin - Selectina E

P-Selectin - Selectina P

ROS - Especies Reactivas de Oxígeno (Reactive Oxygen Species)

SOD - Superóxido Dismutasa (Superoxide Dismutase)

eNOS - Óxido Nítrico Sintasa Endotelial (Endothelial Nitric Oxide Synthase)

MCP-1 - Proteína Quimiotáctica de Monocitos 1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1)

CXCL - Quimiocina (C-X-C Motif) Ligando

CXCL1 - Quimiocina (C-X-C Motif) Ligando 1, también conocida como GROα (Growth-Regulated Oncogene Alpha)

CXCL2 - Quimiocina (C-X-C Motif) Ligando 2, también conocida como proteina inflamatoria de los macrófagos 2-alfa (MIP2-alfa), proteïna beta regulada por el crecimiento (Gro-beta) i Gro oncogen-2 (Gro-2)

CXCL12 - Quimiocina (C-X-C Motif) Ligando 12, también conocida como factor 1 derivado de células del estroma (SDF-1)

IL - Interleucina(s)

TNF-α - Factor de Necrosis Tumoral Alfa

TNF-β - Factor de Necrosis Tumoral Beta

IFN-γ - Interferón Gamma

IL-1 - Interleucina 1

IL-2 - Interleucina 2

IL-3 - Interleucina 3

IL-4 - Interleucina 4

IL-5 - Interleucina 5

IL-6 - Interleucina 6

IL-7 - Interleucina 7

IL-8 - Interleucina 8

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

IL-13 - Interleucina 13

IL-17A - Interleucina 17A

IL-18 - Interleucina 18

IL-22 - Interleucina 22

IL-23 - Interleucina 23

IL-31 - Interleucina 31

IL-33 - Interleucina 33

GM-CSF - Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos

TSLP - Linfopoyetina Estromal Tímica

CCL3 - Quimiocina Ligando de Motivo CC 3 (Chemokine (C-C Motif) Ligand 3) también conocida como MIP-1α (Proteína Inflamatoria de Macrófagos 1 Alfa)

CCL4 - Quimiocina Ligando de Motivo CC 4 (Chemokine (C-C Motif) Ligand 4) también conocida como MIP-1β (Proteína Inflamatoria de Macrófagos 1 Beta)

CCL5 - Quimiocina Ligando de Motivo CC 5 (Chemokine (C-C Motif) Ligand 5) también conocida como RANTES (Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted)

CCL26 - Quimiocina Ligando de Motivo CC 26 (Chemokine (C-C Motif) Ligand 26) también conocida como eotaxina 3

MMPs - Metaloproteinasas de Matriz (Matrix Metalloproteinases)

MPO – Mieloperoxidasa

OSM - Oncostatina M

PLA2 - Fosfolipasa A2 (Phospholipase A2)

NGF - Factor de Crecimiento Nervioso (Nerve Growth Factor)

VEGF - Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (Vascular Endothelial Growth Factor)

B-FGF - Factor de Crecimiento de Fibroblastos Básico (Basic Fibroblast Growth Factor)

PCR - Proteína C Reactiva

MCP-1 - Proteína Quimiotáctica de Monocitos 1

PAF - Factor Activador de Plaquetas

Tryp - Triptasa

H - Histamina

COAG - Coagulación

vWF - Factor de Von Willebrand

TF - Factor Tisular

TM - Trombomodulina

PLG - Plasminógeno

tPA - Activador del Plasminógeno Tisular

uPA - Activador del Plasminógeno Uroquinasa

PAI-1 - Inhibidor del Activador del Plasminógeno 1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1)

PAI-2 - Inhibidor del Activador del Plasminógeno 2 (Plasminogen Activator Inhibitor 2)

TAFI - Inhibidor de la Fibrinólisis Activable por Trombina (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor)

α2-AP - Inhibidor de la Plasmina α2 (Alpha-2 Antiplasmin)

α2-M - Macroglobulina α2 (Alpha-2 Macroglobulin)

FDP - Productos de Degradación de la Fibrina

DD - Dímero D

TP - Tiempo de Protrombina (Prothrombin Time)

INR - Razón Normalizada Internacional (International Normalized Ratio)

TTPA - Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado (Activated Partial Thromboplastin Time)

TT - Tiempo de Trombina (Thrombin Time)

FI - Factor I

FII - Factor II

FIII - Factor III

FIV - Factor IV

FV - Factor V

FVI - Factor VI

FVII - Factor VII

FVIII - Factor VIII

FIX - Factor IX

FX - Factor X

FXI - Factor XI

FXII - Factor XII (Factor de Hageman)

FXIII - Factor XIII

HMWK - Cininógeno de Alto Peso Molecular

PPK – Precalicreína plasmática

PK – Calicreina plasmática

BK – Bradicinina

B1R – Receptor 1 de la bradicina

B2R - Receptor 2 de la bradicina

C1q - Componente 1q del Complemento

C1r - Componente 1r del Complemento

C1s - Componente 1s del Complemento

C2 - Componente 2 del Complemento

C3 - Componente 3 del Complemento

C3a - Anafilatoxina C3a

C3b - Fragmento C3b

C3c - Fragmento C3c

C3d - Fragmento C3d

C4 - Componente 4 del Complemento

C4a - Anafilatoxina C4a

C4b - Fragmento C4b

C5 - Componente 5 del Complemento

C5a - Anafilatoxina C5a

C5b - Fragmento C5b

CR1 - Receptor 1 del Complemento (Complement Receptor 1)

CR2 - Receptor 2 del Complemento (Complement Receptor 2)

CR3 - Receptor 3 del Complemento (Complement Receptor 3)

CR4 - Receptor 4 del Complemento (Complement Receptor 4)

C1-INH - Inhibidor de C1 Esterasa

KIS - Inhibidor de la Calicreína Plasmática (Kallikrein Inhibitor System)

TFPI - Inhibidor de la Vía del Factor Tisular (Tissue Factor Pathway Inhibitor)

SERPING1 - Serpina G1, otro nombre para el inhibidor de C1

DPPI - Dipeptidil-peptidasa I

α2-M - Macroglobulina α2 (Alpha-2 Macroglobulin) - también inhibidor de calicreína

nsLTP: non-specific Lipid Transfer Protein

AINE: antiinflamatorio no esteroideo

IECA: inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina

BB: beta-bloqueantes

WAO: World Allergy Organization

EAACI: European Academy of Allergy and Clinical Immunology

SEAIC: Sociedad Española de Aleroglogía e Inmunología Clínica

SCAIC: Sociedad Catalana de Alergología e Inmunología Clínica

sIgE: Inmunoglobulina E específica

VRS: vía respiratoria superior

VRI: vía respiratoria inferior

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Mecanismos de activación de mastocitos en anafilaxia 30
Figura 2: Principales endotipos y fenotipos descritos para anafilaxia. Adaptado de Jiménez-Rodríguez TW *et al.* [85] 41
Figura 3: Diagrama de la cascada de coagulación clasificada según la visión clásica de las vías de activación 49
Figura 4: Cascada de la fibrinólisis con sus activadores e inhibidores 50
Figura 5: El FXIIa actúa como nexo de unión entre la coagulación y el sistema de contacto. Adaptado de *de Maat 2014*[182]. 52
Figura 6: Vías de interacción entre el sistema de contacto, el sistema calicreína-bradicinina y el sistema renina angiotensina [181] 53
Figura 7: Principales vías de inhibición del sistema de contacto, algunas de ellas comunes con la coagulación y la fibrinólisis. 54
Figura 8: Los diferentes receptores y mediadores de activación del mastocito incluyendo la vía de la coagulación y del sistema de contacto. 56
Figura 9: La participación de los mediadores de los mastocitos en la coagulación y el sistema calicreína-quinina 56
Figura 10: Diseño de la obtención de muestras dentro del estudio 63
Figura 11: Descripción de la técnica de ELISA para la detección del cHK desarrikkada en la UMC de Utrecht, Holanda 72
Figura 12: Distribución de los individuos según endotipo de anafilaxia (n individuos) 77
Figura 13: Aparatos o sistemas afectados según el endotipo de anafilaxia (% individuos) 78
Figura 14: Aparatos o sistemas afectados según la etiología de anafilaxia (% individuos) 79
Figura 15: Gravedad de la anafilaxia según endotipo de anafilaxia (% individuos) 80
Figura 16: Distribución de los grados de gravedad según la etiología (n individuos) 80
Figura 17: Elevación de triptasa sérica igula o superior a 120%+2 de la basal según la etiología de la anafilaxia. 82
Figura 18: diferencia entre la triptasa sérica aguda y su basal (mcg/L) a las 2h (T1) y 6h (T2) según la gravedad de la anafilaxia. 82
Figura 19: elevación de la triptasa sérica (mcg/L) a las 2h-T1 (A) y las 6h-T2 (B) según el endotipo de anafilaxia. 83
Figura 20: Diferencia entre la triptasa sérica aguda y su basal (mcg/L) a las 2h (T1) y 6h (T2) según la presencia o no de síntomas cardiovasculares o digestivos. 83

Figura 21: Elevación de dímero D (ng/ml) y del complejo PAP (nM) a las 2h (T1) y 6h (T2) según la gravedad de la anafilaxia 86
Figura 22: valores basales de fibrinógeno (A) y anti-Xa (B) según el endotipo de la anafilaxia . 87
Figura 23: Elevación de biomarcadores coagulación y fibrinolisis seún el endotipo de anafilaxia. 87
Figura 24: valores basales de complejos FXIa/C1-INH (nM) según la gravedad de la anafilaxia. 89
Figura 25: Elevación de biomarcadores coagulación y fibrinolisis según la presencia de clínica cutánea. 90
Figura 26: Citocinas elevadas en mayor proporción que a triptasa sérica y solapamiento con triptasa sérica elevada 93
Figura 27: Citocinas (pg/mL) que presentaron una elevación estadísticamente significativa en su valor basal según el endotipo 95
Figura 28: Algoritmo de la distribución de individuos del segundo trabajo 96
Figura 29: Elevación de triptasa (mcg/L) a las 6h(T2) entre anafilaxia, angioedema y urticaria (UA) 99
Figura 30: Valores de FXI (%), FXII (%),C3 (mg/dL) y ECA (mg/dL) a las 6h(T2) entre anafilaxia, angioedema y urticaria 100
Figura 31: Valores basales de FXII (%) y TTPA(seg) según endotipo de angioedema 100
Figura 32: Elevación de biomarcadores de la coagulación y firbinolisis según el tipo de urticaria 101
Figura 33: Valores de C3 (mg/dL) y ECA (mg/dL) a las 6h(T2) entre anafilaxia, angioedema y urticaria 102
Figura 34: Valores basales de C4 (mg/dL) y ECA basales (U/L) según endotipo de angioedema 102
Figura 35: Valores de IL13 y IL-22 basales (pg/mL) en individuos con anafilaxia, urticaria, angioedema y controles. 103
Figura 36: Citocinas (pg/mL) que mostraron diferencias estadísticamente significativas para anafilaxia, angioedema y urticaria 105

Tabla 1 Mecanismos celulares de anafilaxia con sus correspondientes células efectoras y receptores de activación 31

Tabla 2 Resumen de los principales mediadores en anafilaxia, sus principales fuentes celulares, el mejor momento de muestreo y la disponibilidad de ensayos comerciales. 38
Tabla 3 Biomarcadores comunes con anafilaxia descritos en urticaria y angioedema 44
Tabla 4: Clasificación de la gravedad de la anafilaxia 64
Tabla 5: Características clínicas e inmunológicas de los distintos endotipos de la anafilaxia 65
Tabla 6: Célula fuente principal de las citocinas analizadas..... 73
Tabla 7: Etiología de anafilaxia..... 76
Tabla 8: % de individuos que presentaron una elevación ≥20% respecto a su valor basal durante la fase aguda de la anafilaxia..... 84
Tabla 9: *Odds ratio* de predicción de anafilaxia para los biomarcadores elevados en individuos sin elevación de triptasa sérica 84
Tabla 10: Porcentaje de individuos que presentaron una elevación de al menos un 20% respecto a su valor basal durante la fase aguda de la anafilaxia 88
Tabla 11: valores basales de las citocinas estudiadas en los pacientes con anafilaxia..... 91
Tabla 12: Características demográficas y clínicas de los individuos incluidos en el segundo trabajo. 97
Tabla 13: Elevación de citocinas en fase aguda según se trate de anafilaxia, angioedema o urticaria 105

Contenido

RESUMEN 20

SUMMARY 21

1. INTRODUCCIÓN 23

1.1. Anafilaxia 23

1.1.1. Definición 23

1.1.2. Epidemiología 23

1.1.3. Etiología 24

1.1.4. Factores de riesgo 25

1.1.5. Mecanismos y endotipos descritos 29

1.1.6. Biomarcadores descritos 32

1.1.7. Fenotipos descritos 39

1.1.8. Gravedad 41

1.1.9. Diagnóstico 42

1.1.10. Diagnóstico diferencial 43

1.1.11. Tratamiento 45

1.1.12. Prevención 46

1.2. Coagulación y fibrinólisis 47

1.2.1. Definición 47

1.2.2. Biomarcadores en anafilaxia 50

1.3. Sistema de contacto y calicreína-cininas 51

1.3.1. Definición 51

1.3.2. Biomarcadores en anafilaxia 54

1.4. Interrelación del sistema de la coagulación, la fibrinólisis y el sistema de contacto 55

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO 58

3. HIPÓTESIS 60

4. OBJETIVOS 61

4.1. Principal 61

4.2. Secundarios 61

5. METODOLOGÍA 62

5.1. Diseño del estudio y selección de individuos 62

5.1.1. Primer trabajo 62

5.1.2. Segundo trabajo 63

5.2. Aspectos éticos y consentimiento informado 64
5.3. Datos demográficos y clínicos 64
5.4. Clasificación de la gravedad de la anafilaxia 64
5.5. Etiología de la anafilaxia 64
5.6. Factores de riesgo para la anafilaxia 64
5.7. Endotipo de anafilaxia y angioedema 65
5.8. Fenotipos de la anafilaxia 65
5.9. Obtención de muestras, procesamiento y almacenamiento 66
5.10. Estudio alergológico: pruebas cutáneas, IgE específica, prueba de exposición 67
5.11. Determinación de triptasa en suero 68
5.12. Estudio de biomarcadores de la coagulación y la fibrinólisis 69
5.13. Estudio del complemento 70
5.14. Estudio de biomarcadores del sistema de contacto 71
5.15. Cuantificación de citocinas 72
5.16. Base de datos y estudio estadístico 74
6. RESULTADOS 75
6.1. PRIMER TRABAJO 75
6.1.1. Características demográficas y clínicas de los individuos 75
6.1.2. Procedencia de los pacientes y tratamiento agudo recibido durante la reacción anafiláctica 75
6.1.3. Estudio alergológico 75
6.1.4. Etiología de la anafilaxia 76
6.1.5. Endotipos de anafilaxia 77
6.1.6. Fenotipos de anafilaxia 77
6.1.7. Gravedad de la anafilaxia 79
6.1.8. Cofactores 81
6.1.9. Valores basales y agudos de la triptasa sérica 81
6.1.9.1. Elevación de la triptasa sérica según la etiología de la anafilaxia 81
6.1.9.2. Elevación de la triptasa sérica según la gravedad de la anafilaxia 82
6.1.9.3. Elevación de la triptasa sérica según el endotipo de la anafilaxia 82
6.1.9.4. Elevación de la triptasa sérica según el fenotipo de la anafilaxia 83
6.1.10. Valores basales y agudos de los biomarcadores de la coagulación y la fibrinólisis 84

6.1.10.1. Biomarcadores de la coagulación y la fibrinólisis según la etiología de la anafilaxia 84

6.1.10.2. Biomarcadores de la coagulación y la fibrinólisis según gravedad de la anafilaxia 85

6.1.10.3. Biomarcadores de la coagulación y la fibrinólisis según endotipo de anafilaxia 86

6.1.10.4. Biomarcadores de la coagulación y la fibrinólisis según fenotipo de anafilaxia 88

6.1.11. Valores basales y agudos de biomarcadores de sistema de contacto 88

6.1.11.1. Biomarcadores de sistema de contacto según la etiología de la anafilaxia .. 89

6.1.11.2. Biomarcadores de sistema de contacto según la gravedad de la anafilaxia . 89

6.1.11.3. Biomarcadores de sistema de contacto según el endotipo 90

6.1.11.4. Biomarcadores de sistema de contacto según el fenotipo 90

6.1.12. Valores basales y agudos de citocinas 91

6.1.12.1. Valores de citocinas según la etiología de la anafilaxia 93

6.1.12.2. Valores de citocinas según la gravedad de la anafilaxia 94

6.1.12.3. Valores de citocinas según el endotipo de anafilaxia 94

6.1.12.4. Valores de citocinas según el fenotipo de anafilaxia 95

6.2. SEGUNDO TABAJO 96

6.2.1. Algoritmo del estudio 96

6.2.2. Características demográficas y clínicas de los sujetos 96

6.2.3. Factores de riesgo 98

6.2.4. Cofactores 98

6.2.5. Comparación de los valores basales y agudos de triptasa basal entre la anafilaxia, la urticaria, el angioedema y los controles 99

6.2.6. Comparación de valores basales y agudos de biomarcadores de la coagulación y la fibrinólisis de forma aguda entre la anafilaxia, la urticaria, el angioedema y los controles 99

6.2.7. Comparación de valores basales y agudos de biomarcadores del sistema de contacto entre anafilaxia, urticaria angioedema y controles 101

6.2.8. Comparación de los valores basales y agudos de citocinas entre anafilaxia, urticaria, angioedema y controles 103

7. DISCUSIÓN 106

8. CONCLUSIONES 115

9. LINEAS DE FUTURO 116

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 117

11. ANEXOS 134

11.1. Técnica de laboratorio del ELISA DE PLASMINA-A2-ANTIPLASMINA 134

11.2. Técnica de laboratorio del ELISA DE CININÓGENO ESCINDIDO (CHK) 135

11.3. Técnica de laboratorio del ELISA DE CAPTURA DE NANOCUERPOS DEL COMPLEJO INHIBIDOR C1 137

11.4. Técnica de laboratorio del INMUNOENSAYO MULTIPLEX LUMINEX® DISCOVERY ... 138

11.5. Tabla suplementaria 140

11.6. Artículo relacionado con la tesis doctoral 141

RESUMEN

La anafilaxia es una reacción alérgica grave y potencialmente mortal que se produce de manera rápida y afecta a múltiples sistemas del cuerpo. Actualmente, no existe una prueba diagnóstica definitiva para la anafilaxia, siendo el diagnóstico principalmente clínico y apoyado por biomarcadores como la triptasa, que no es óptima debido a su falta de elevación en hasta el 35% de las reacciones mediadas por IgE y en reacciones anafilácticas con baja implicación de mastocitos. Otras afecciones como la urticaria y el angioedema complican el diagnóstico diferencial. La hipótesis de esta tesis es que existe un biomarcador de anafilaxia que complementa o supera a la triptasa y éste se haya en la coagulación, fibrinólisis o en sistema de contacto o se trata de una perfil de citocinas y que puede ser útil para poder útil paras apoyar al diagnóstico de la anafilaxia. Se realizó un estudio observacional longitudinal de casos controles unicéntrico con muestras agudas durante brote de anafilaxia, urticaria y angioedema y muestras basales y se determinaron los niveles de Fibrinógeno, TTPA(s), Dímero D, FXII, FXI, anti-Xa, C3, C4, C1INH, ECA, así como se realizaron pruebas in vitro en contexto de investigación con inmunoensayo para determinar del sistema de contacto los valores de complejo C1INH-FXI, complejo C1INH-FXII, complejo C1INH-PK, cHK y un panel de citocinas elegidas por estar relacionadas con grupos celulares más allá de mastocito y basófilo.

Nuestro estudio demostró que la triptasa sérica se eleva en sólo el 74.5% de los individuos con anafilaxia aguda, siendo menos sensible especialmente en casos de alergia alimentaria. La triptasa sérica fue más útil para identificar anafilaxias mediadas por IgE y menos efectiva en las no mediadas por IgE. En contraste, el Dímero D mostró una mayor frecuencia de elevación (85.9%) y se relacionó con la gravedad de la anafilaxia, sugiriendo su potencial como biomarcador complementario. El complejo plasmina-alfa-2-antiplasmina (PAP) también se correlacionó con la gravedad de la anafilaxia, destacándose en el endotipo de liberación de citocinas. Las citocinas IL-6 y CCL5/RANTES se elevaron frecuentemente, incluyendo casos con triptasa negativa, indicando su utilidad complementaria. La IL-13 y PAI-1 también mostraron correlaciones significativas con la gravedad de la anafilaxia. Además, se observó que la anafilaxia de causa alimentaria tiene un perfil inflamatorio distintivo, sugiriendo la participación de otros mecanismos celulares. Los individuos con urticaria y angioedema mostraron un perfil inflamatorio menos intenso y la elevación de algunas citocinas específicas.

Este trabajo demuestra la implicación de los tres sistemas en las reacciones anafilácticas y destaca potenciales biomarcadores dentro de ellos para mejorar el diagnóstico y la evaluación de la gravedad de la anafilaxia.

SUMMARY

Anaphylaxis is a severe and potentially life-threatening allergic reaction that occurs rapidly and affects multiple body systems. Currently, there is no definitive diagnostic test for anaphylaxis, with diagnosis being primarily clinical and supported by biomarkers such as tryptase, which is suboptimal due to its lack of elevation in up to 35% of IgE-mediated reactions and in anaphylactic reactions with low mast cell involvement. Other conditions such as urticaria and angioedema complicate the differential diagnosis. The hypothesis of this thesis is that there is a biomarker of anaphylaxis that complements or surpasses tryptase and that it is found in coagulation, fibrinolysis or in the contact system or is a cytokine profile and that it may be useful to support the diagnosis of anaphylaxis. A longitudinal, single-center, observational case-control study was conducted with acute samples during anaphylaxis, urticaria and angioedema flares and baseline samples. Fibrinogen, TTPA(s), D-Dimer, FXII, FXI, anti-Xa, C3, C4, C1INH, ACE levels were determined, as well as in vitro tests in a research context with immunoassay to determine the values of the C1INH-FXI complex, C1INH-FXII complex, C1INH-PK complex, cHK and a panel of cytokines chosen for being related to cell groups beyond mast cells and basophils.

Our study showed that serum tryptase is elevated in only 74.5% of patients with acute anaphylaxis, being less sensitive especially in cases of food allergy. Serum tryptase was more useful to identify IgE-mediated anaphylaxis and less effective in non-IgE-mediated anaphylaxis. In contrast, D-dimer showed a higher frequency of elevation (85.9%) and was related to the severity of anaphylaxis, suggesting its potential as a complementary biomarker. Plasmin-alpha-2-antiplasmin (PAP) complex also correlated with the severity of anaphylaxis, standing out in the cytokine release endotype. Cytokines IL-6 and CCL5/RANTES were frequently elevated, including tryptase-negative cases, indicating their complementary utility. IL-13 and PAI-1 also showed significant correlations with the severity of anaphylaxis. Furthermore, food-induced anaphylaxis was found to have a distinctive inflammatory profile, suggesting the involvement of other cellular mechanisms. Patients with urticaria and angioedema showed a less intense inflammatory profile and elevation of some specific cytokines.

This work demonstrates the involvement of the three systems in anaphylactic reactions and highlights potential biomarkers within them to improve the diagnosis and assessment of the severity of anaphylaxis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Anafilaxia

1.1.1. Definición

La anafilaxia es definida como una reacción inmunomediada de instauración aguda, rápida y potencialmente mortal. Su definición se basa en criterios clínicos, al igual que su diagnóstico, dado que su gravedad requiere intervención médica inmediata. A pesar de que las nuevas guías clínicas incluyen en su definición la afectación de un sólo sistema con potencial riesgo mortal, como la vía respiratoria o el sistema circulatorio[1,2], en la mayoría de casos la anafilaxia cumple criterios para considerarse un síndrome multisistémico que agrupa una serie de signos clínicos y síntomas que reflejan la afectación de diferentes sistemas de órganos [3]. Estas manifestaciones son por tanto muy variables e incluyen entre otras: eritema, prurito, urticaria, rinitis, conjuntivitis, dolor abdominal, vómitos, diarrea, metrorragia, disnea, tos, ahogo, broncoespasmo, mareo, confusión, somnolencia, hipotensión. Los datos reportados en la literatura muestran que la mayoría de individuos presenta síntomas en piel y mucosas (90%), seguido de síntomas que involucran el sistema respiratorio y cardiovascular (>50%) [1,2].

Por tanto, por definición, toda anafilaxia es una emergencia clínica y todos los profesionales sanitarios deben estar familiarizados con su reconocimiento y tratamiento.

1.1.2. Epidemiología

El conocimiento sobre la epidemiología de la anafilaxia se basa en datos de diversas fuentes: práctica clínica, grandes bases de datos clínicos secundarios y administrativos de individuos de atención primaria u hospitalizados, y encuestas recientes con muestras representativas de la población general. Por ello se considera que los ratios obtenidos hasta el momento pueden tener muchos sesgos y se considera que la anafilaxia sigue siendo a día de hoy una entidad infradiagnosticada. La prevalencia descrita varía según edad, género, raza y localización geográfica a nivel mundial, con tasas más altas en los EE.UU. y Europa. La prevalencia de la anafilaxia a lo largo de la vida se estima actualmente en 0,05-2 % en EE. UU. y ~3 % en Europa [4]. Los datos muestran una prevalencia con tendencia creciente, con un aumento de 5 a 7 veces en las admisiones hospitalarias en los últimos 10 a 15 años [5], particularmente en niños y debido a desencadenantes relacionados con los alimentos [6]. Se han reportado diferencias de prevalencia según la etnia, sobretodo estudiado en cohortes de Reino Unido dónde

evidenciaron que presentaban mayor incidencia poblaciones no blancas, especialmente provenientes del sud-este asiático[7,8].

Las últimas revisiones de tasa de mortalidad en anafilaxia muestran datos relativamente bajos, con una tasa para todas las causas de anafilaxia del 0,002 a 2,51 muertes por millón de personas-año, siendo más significativa y mostrando aumento de prevalencia en el tiempo en el caso de anafilaxia por fármacos y alimentos [2,9,10]. Aunque la fatalidad sea lo más destacable, no son menospreciables los datos de hospitalización por anafilaxia, que han mostrado tendencia al aumento en anafilaxia inducida por alimentos y medicamentos en años recientes [5,11].

1.1.3. Etiología

La prevalencia de las diversas causas de anafilaxia depende de la edad, la raza y varía en diferentes regiones geográficas. Los alimentos, los medicamentos y el veneno de himenópteros son los desencadenantes principales de las reacciones anafilácticas [12,13]. La comida es el desencadenante más común tanto en la población pediátrica como adolescente. En Europa, los desencadenantes típicos de anafilaxia inducida por alimentos en niños incluyen frutos secos, leche y huevo, mientras que en adultos predominan cereales como el trigo, vegetales y frutas y mariscos [2,14]. En niños menores de 3 años, los huevos y la leche de vaca fueron los alimentos desencadenantes más comunes de la anafilaxia, seguidos de los frutos secos en niños de 3 a 6 años y causas más variadas en niños de 6-17 años, ganando importancia el marisco y los vegetales[15,16]. El veneno de avispa y abeja es la causa habitual de la anafilaxia inducida por veneno sin diferencias entre población pediátrica o adulta [17,18]. En adultos la primera causa de anafilaxia son los fármacos, seguido por los alimentos[5,19]. La anafilaxia inducida por medicamentos suele ser causada por antibióticos y antiinflamatorios no esteroides. Entre los antibióticos, los beta-lactámicos son los alérgenos principales implicados [20,21].

En algunos casos no se descubre la causa de la anafilaxia y estas quedan etiquetadas de anafilaxia idiopática, lo que requiere investigaciones sobre alérgenos ocultos o infrecuentes o diagnósticos diferenciales [22].

1.1.4. Factores de riesgo

Nos referimos como factores de riesgo a cualquier condición o evento que incremente la posibilidad de desarrollar una anafilaxia. En el campo de la anafilaxia también se han definido los llamados cofactores, cualquier factor o condición temporal o persistente que pueda aumentar la gravedad de la anafilaxia, como el uso concomitante de fármacos, el tipo de alérgeno y la cantidad y vía de administración[23,24]. En la literatura nos encontramos que la colocación de los factores en un grupo u otro es inconsistente puesto que no siempre existe una diferenciación clara entre ellos y los factores de riesgo y cofactores frecuentemente se superponen[25]. El conocimiento de los factores de riesgo y los factores agravantes o cofactores, al igual que en otras patologías, es importante para tomar medidas preventivas específicas y diseñar planes de acción para cada perfil de paciente.

- Factores de riesgo :

La **edad** es el factor de riesgo dominante para la anafilaxia grave. El registro europeo de anafilaxia mostro que cada año de más edad se asoció con un aumento del 1,6% (IC: 1,4% - 1,9%) en las probabilidades de experimentar un evento anafiláctico grave [13]. En estudios previos, los individuos mayores (65 años) y aquellos con enfermedades cardíacas y pulmonares tenían más probabilidades de ser admitidos en la UCI, de ser intubados o de tener resultados casi fatales [26]. Esto se puede explicar por qué implica mecanismos compensatorios fisiológicos alterados y una incapacidad para tolerar complicaciones relacionadas con la anafilaxia, como hipotensión e hipoxia. Ampliamente conocido si nos centramos específicamente en la alergia alimentaria, los adolescentes suponen una población de riesgo para padecer más anafilaxias y reacciones más graves por conductas de riesgo, entre ellas unas normas de evitación del alérgeno más laxas, más situaciones de descontrol como el abuso de sustancias psicoactivas y mal cumplimiento al no llevar siempre consigo el autoinyector de adrenalina[27–29].

En un estudio previo de Ruëff *et al.* 2009 [30], investigaron a individuos alérgicos al veneno de insectos e indicaron el **sexo masculino** como un factor de riesgo de anafilaxia grave. Los autores explican esto por un patrón de exposición diferente a los insectos en hombres y mujeres, pero el análisis del registro europeo de anafilaxia [13] sugiere que el sexo masculino es un factor de riesgo de anafilaxia grave independiente del desencadenante.

La **mastocitosis,** enfermedad clonal de los mastocitos que incrementa el número de estas células y su activación, se asocia con un aumento de número de anafilaxias superior a otros

individuos sanos o alérgicos [31] . Los individuos con mastocitosis tienen un riesgo relativo 1,59 veces mayor de desarrollar una respuesta de anafilaxia más grave que los individuos sin mastocitosis y este riego aumenta si la causa de la anafilaxia es provocada por veneno de himenóptero [13].

Los individuos con antecedentes de **patología psiquiátrica activa** antes de la reacción tenían 1,40 (IC: 1,19 - 1,61) veces más probabilidades de desarrollar una anafilaxia más grave que sus homólogos [13]. Existe evidencia de que el sistema nervioso central puede regular la secreción de mediadores de mastocitos en ratones [32].

Las **enfermedades cardiovasculares** concomitantes son un predictor importante de anafilaxia grave. La miocardiopatía está asociada con un mayor número de mastocitos, al igual que la coronariopatía en la que a combinación con una estenosis subyacente lleva a un mayor riesgo de hipoxia miocárdica y las probabilidades de anafilaxia grave pueden ser mayores [33] . La enfermedad cardíaca no se relacionó con la anafilaxia grave en la edad pediátrica. Esto puede explicarse por el hecho de que las enfermedades cardíacas en la infancia son sustancialmente diferentes a las de los adultos [34] .

Los estudios retrospectivos, particularmente los estudios observacionales de anafilaxia fatal inducida por alimentos [35,36] reportaron una asociación entre **asma** y muerte por anafilaxia, pero la literatura reciente sugiere que el asma en sí no es un fuerte predictor de anafilaxia más grave [13,26]. Los estudios de reacciones fatales y casi fatales a la inmunoterapia con alérgenos sugieren que un control subóptimo del asma, en lugar de simplemente la presencia de asma, puede aumentar la probabilidad de que un paciente sufra anafilaxia grave [37,38] .

Los **medicamentos para reducir el colesterol (estatinas)** podrían suponer un factor de riesgo en la anafilaxia y algunos grupos encontraron una asociación con gravedad [39]. Estos fármacos aumentan la concentración plasmática de PAF al reducir la actividad de PAF-AH [40] , y este aumento se ha correlacionado con la gravedad de la anafilaxia [41] .

Los fármacos como **etiología** de anafilaxia, aunque sean un grupo muy heterogéneo, han demostrado en análisis multivariables que aumentan la gravedad de la reacción y la fatalidad[13]. Los fármacos más comunes implicados en la anafilaxia mortal fueron los antibióticos, seguidos de los agentes de radiocontraste y otros agentes de diagnóstico y los antineoplásicos[9]. La anestesia general y los bloqueadores neuromusculares también se asocian con anafilaxia farmacológica mortal [42] . La vía de administración está relacionada con este aumento del

riesgo puesto que se ha demostrado que las reacciones alérgicas son más graves cuando el fármaco se administra por vía parenteral [43,44] .

- Factores agravantes de las reacciones alérgicas: cofactores

Los **antiinflamatorios no esteroides (AINE)** están presentes en hasta el 22% de los casos de anafilaxia grave inducida por alimentos, constituyendo un agravante y factor de riesgo para anafilaxia con un odds ratio >11 [45]. En el área mediterránea, los AINE están implicados hasta en el 58% de los episodios de anafilaxia relacionada con los alimentos inducidos por cofactores, siendo el principal alérgeno alimentario implicado (hasta en el 33% de los casos) la proteína transferidora de lípidos no específica (nsLTP) [46,47]. Se sugiere que el aumento de la permeabilidad gastrointestinal, la absorción de alérgenos y la inhibición de síntesis de prostaglandinas pueden explicar el efecto de aumento de gravedad de síntomas de los AINE [48,49] .

El **alcohol** es uno de los cofactores más frecuentes, descrito hasta en el 15% de las reacciones anafilácticas [50]. Se ha descrito su efecto potenciador en alergia alimentaria como nsLTP, leche, huevo [46,51]. Aunque los mecanismos subyacentes no están bien establecidos, el alcohol puede aumentar la absorción de alérgenos aumentando la permeabilidad intestinal[52] y podría aumentar la activación de mastocitos (MC) y basófilos (B) inducida por FcεRI[53].

El **ejercicio** está implicado en el 10% de las reacciones anafilácticas [24,50] . Según el registro europeo de anafilaxia los individuos que informaron ejercicio vigoroso durante (o antes) de una reacción determinada tuvieron un mayor riesgo de desarrollar anafilaxia grave [13]. El trigo es el alimento que más frecuentemente se implica en anafilaxias potenciadas por ejercicio [54], seguido por la alergia alimentaria a vegetales por nsLTP, marisco, leche y huevo [55]. El conocimiento de su mecanismo patogénico aún no se comprende bien, aunque se ha postulado el incremento en la absorción de alérgenos por lesión en mucosa[56] o situación de isquemia por la desviación del flujo sanguíneo[57,58] . Por otro lado existe un efecto directo del ejercicio sobre la activación del mastocito, descrito en urticaria colinérgica [59].

La anafilaxia es más frecuente en mujeres que en hombres, pero sólo durante los años reproductivos, lo que sugiere que las **hormonas sexuales** podrían desempeñar un papel [24]. Al igual que los episodios de asma o urticaria asociados al ciclo menstrual, se han descrito episodios recurrentes de reacciones anafilácticas alrededor de la menstruación, señalando a

los estrógenos o la progesterona como factores potenciadores implicados [60]. La relevancia del estrógeno en la gravedad de la anafilaxia se ha podido confirmar en modelos murinos [61].

Los datos de estudios de inmunoterapia oral con alimentos han destacado que algunos individuos experimentan una caída en el umbral de reacción si presentan **infecciones virales**, y esto puede aumentar la gravedad de cualquier síntoma experimentado [62,63] . Sin embargo, las enfermedades intercurrentes no se asociaron con la gravedad de la reacción en un estudio prospectivo con adultos alérgicos al cacahuete [64] o en el Registro Europeo de Anafilaxia [13] .

Los **fármacos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA)** y los **β bloqueantes (BB)** se han descrito y reafirmado desde hace años como factores potenciadores de las reacciones anafilácticas [45,65] . La revisión del registro de anafilaxia europeo [13] mostró que aumentaban el riesgo de desarrollar anafilaxia grave independientemente del desencadenante. El odds ratio establecido para los BB fue de 6,8 y de 13 para los IECA. Mientras que se sabe que los fármacos BB atenúan el efecto de la adrenalina sobre sus receptores, el efecto agravante de la ECA se había tan sólo teorizado por su importante papel en la degradación de la bradicinina, un péptido que regula la permeabilidad vascular y que podría favorecer o dificultar la reversibilidad del shock[66].

Nuevos estudios han encontrado que el **ritmo circadiano** es un potente regulador de la activación de los mastocitos, tanto dependiente como independiente de IgE[67,68]. Los mastocitos tienen un umbral de activación más bajo durante la fase de reposo (durante la noche en humanos) que durante la fase activa (diurna en humanos) bajo el control de la actividad del reloj circadiano[68].

La **falta de sueño** también se ha descrito como un factor agravante independiente en anafilaxia[69] . En el estudio de Dua *et al.*.[70] la falta de sueño redujo significativamente el umbral (dosis necesaria para desencadenar una reacción objetiva) e impactó en la gravedad en personas con alergia al cacahuete, lo que las pone en mayor riesgo de sufrir una reacción anafiláctica. El mecanismo por el cual esto podría ocurrir no está claro. Algunos autores sugieren que la privación de sueño aumenta el estrés, lo que podría afectar la permeabilidad del intestino delgado[71].

A pesar de que ya se han múltiples factores de riesgo y agravantes, los registros de anafilaxia muestran reacciones graves en individuos que no los cumplen, por lo que es asumible que todavía hay factores de riesgo identificables y potencialmente controlables.

1.1.5. Mecanismos y endotipos descritos

El principal mecanismo molecular subyacente a la anafilaxia es la clásica reacción alérgica **mediada por IgE** que involucra la activación y liberación de mediadores por mastocitos y basófilos [72]. Ambos tipos de células expresan en su superficie el receptor de alta afinidad de la IgE (FcεRI) y se consideran las principales células efectoras en este evento patológico [73]. Otro mecanismo descrito que conduce a anafilaxia es la unión de **anticuerpos IgG** a sus receptores de superficie (FcγR) en mastocitos, basófilos, neutrófilos, monocitos y macrófagos [74]. Este mecanismo se ha demostrado sobretodo en modelos murinos pero también hay estudios en neutrófilos humanos que han mostrado su activación mediante IgG específica a fármacos[75]. La cantidad de anticuerpos y antígenos parece ser crucial para determinar la anafilaxia dependiente de IgG o IgE. Para inducir una respuesta similar en la anafilaxia dependiente de IgG, se requiere una dosis más alta de antígeno en comparación con la dependiente de IgE [76].

El **complemento** también puede desencadenar una reacción anafiláctica en condiciones determinadas. C3a y C5a, conocidas como anafilotoxinas, son potentes mediadores inflamatorios generados tras la activación de las cascadas del complemento [77]. Se ha descrito que algunas sustancias, como el cacahuete o determinados fármacos, tienen la capacidad de activar rápidamente el complemento, con producción de grandes cantidades de anafilotoxinas que estimulan los macrófagos, basófilos y MC que contribuyen a la inducción de anafilaxia [78–80].

En la anafilaxia se han descrito diferentes vías de **activación no inmunológica**. Una variedad de sustancias catiónicas, llamadas secretagogos básicos, pueden inducir una activación del MC independiente de los anticuerpos. Entre esos secretagogos, se encuentran péptidos con efectos proinflamatorios y varios fármacos (p. ej., opioides, bloqueadores neuromusculares, quinolonas), desencadenan la degranulación a través del miembro X2 del receptor acoplado a proteína G relacionado con Mas (MRGPRX2) [81,82]. Otros fármacos han mostrado que pueden activar el mastocito mediante la activación inespecífica del complemento (contrastes yodados, fármacos liposomales o con solventes como cremóforo), la liberación de fosfolipasas (vancomicina) que se unen a su receptor específico o la formación de leucotrienos (AINE)[83]. En este último caso, la reactividad cruzada a AINE antes denominada intolerancia a AINE, se define por reacciones con AINE de diferente grupo estructural debido a la propiedad farmacológica común de la aspirina y otros AINE potentes inhibidores de la ciclooxigenasa

(COX)-1, que inhiben la vía de la ciclooxigenasa y, por ende, la sobreproducción de cisteinil-leucotrienos, que son capaces de activar predominantemente el mastocito y el basófilo mediante sus receptores espcíficos[84]. También factores externos como el ejercicio físico, la exposición al frío o la radiación ultravioleta han sido definidos de per se cómo activadores potentes del mastocito y causa de reacciones anafilácticas [83]

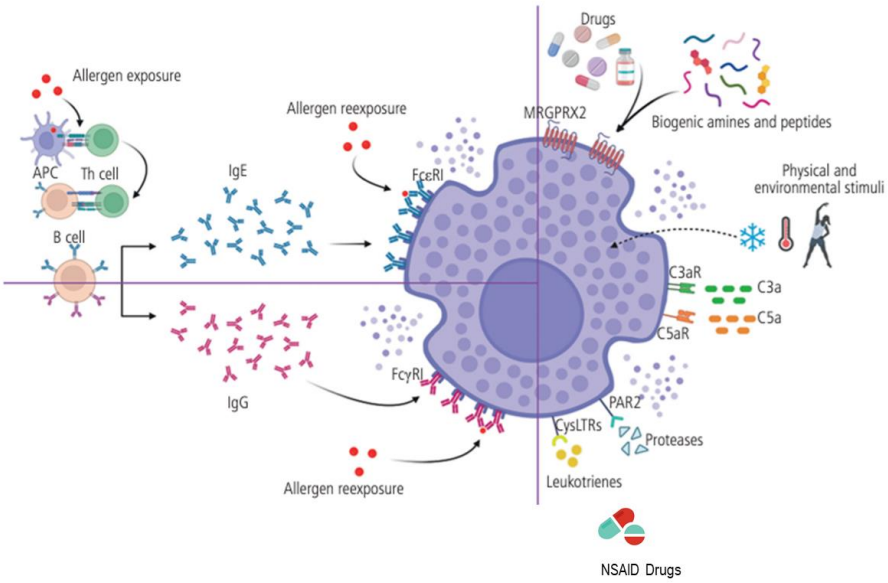


Figura 1: Mecanismos de activación de mastocitos en anafilaxia

Los MC se activan a través de múltiples mecanismos moleculares en la anafilaxia. Clásicamente, los MC se pueden activar por la presencia de un alérgeno mediante FcεRI (panel superior izquierdo). También pueden responder a complejos inmunes IgG (panel inferior izquierdo). Otros ligandos y/o señales activan los MC a través de receptores como MRGPRX2, receptores del complemento y muchos otros receptores. APC indica célula presentadora de antígeno; células TH, linfocitos T auxiliares; células B, linfocitos B; FcεRI, receptor I de Fc épsilon; FcγRI, receptor I de Fc gamma; MRGPRX2, miembro X2 del receptor acoplado a proteína G relacionado con Mas; C3a, componente 3a del complemento; C5a, componente del complemento 5a; C3aR, receptor del componente 3a del complemento; C5aR, receptor del componente 5a del complemento; PAR2, receptor 2 activado por proteasa; CysLTR, receptores de cisteinil leucotrienos, NSAID: fármacos antiinflamatorios no esteroideos. Adaptada de Fernández-Bravo S, *et al.* 2022

Otro endotipo descubierto debido al uso cada vez más común de anticuerpos monoclonales y agentes quimioterapéuticos es la reacción de **liberación de citocinas**. Se ha demostrado que en estas reacciones hay una hiperrespuesta inmune de células del sistema inmune innato, incluido el mastocito, probablemente en relación a destrucción de células tumorales, dónde se aumentan citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα), IL-1β e IL-6 y su origen sea probablemente la activación inespecífica de MC, monocitos y células T[85,86].

Teniendo en cuenta todo lo anterior, los endotipos de anafilaxia se pueden dividir principalmente en dos grupos diferentes, la anafilaxia mediada por el sistema inmunológico (dependientes y no dependientes de IgE, como las dependientes de IgG, el sistema del

complemento) y las no inmunológicas, como las reacciones de liberación de citocinas se describen en la **Tabla 1** donde también se recogen las células efectoras descritas para cada endotipo así como sus receptores de activación en anafilaxia

Tabla 1 Mecanismos celulares de anafilaxia con sus correspondientes células efectoras y receptores de activación

Causa	Mecanismo	Célula efectora/Receptor
Inmunológica	IgE dependiente	Mastocito (FcεRI, FcεRII, HR1-2-3-4, PAFR)
		Basófilo (FcεRI, HR1-2-3-4, PAFR)
		Eosinófilo (FcεRI, FcεRII, PAFR)
		Neutrófilo (FcεRI, HR1-2-4, PAFR)
		Monocito/Macrófago (FcεRI, HR 1-2, PAFR)
		Plaqueta (FcεRI, PAFR)
		Endotelio (HR 1-2, PAFR, PAR2, CysLTR 1-2, EP1-2-4)
	IgG dependiente	Mastocito (FcγRIIa, HR1-2-3-4, PARF)
		Basófilo (FcγRIIa, HR1-2-3-4, PAFR)
		Eosinófilo (FcγRIIa, HR1-2-3-4, PAFR)
		Neutrófilo (FcγRI-IIa- III-IV, GM-CSFR, HR1-2-4, PAFR)
		Monocito/Macrófago (FcγRI-IIa-III, HR 1-2, PAFR)
		Plaqueta (FcγRIIa, PAFR)
		Endotelio (HR 1-2, PAFR, PAR2, CysLTR 1-2, EP1-2-4)
	Complemento	Mastocito (C3aR, C5aR)
		Basófilo (C3aR, C5aR, C3bR, C3b-C4bCD11b, CD11c)
		Eosinófilo (C3aR, C5aR, C3bR, CD11b)
		Neutrófilo (C3aR, C5aR,C3b-C4b, CD11b)
		Monocito/Macrófago (C3aR, C5aR,C3b-C4b, CD11b)
		Plaqueta (C3b, C1qR)
		Endotelio (C3aR, C5aR)
No-inmunológica	Liberación citocinas	Mastocito (IL1R, IL6R soluble)
		Eosinófilo (IL1R, IL6R soluble, TNFR)
		Neutrófilo (IL1R, IL6R soluble, TNFR)
		Monocito/Macrófago (IL6R soluble, TNFR)
		Plaqueta (IL1R, IL6R soluble, TNFR)
		Endotelio (IL1R, IL6R soluble, TNFR)
	Otros	Mastocito (MRGPRX2, Trk, CysLTR1-2, Fosfolipasa C, A2R, Kit/CD117 (SCFR), Rec opioide u y d, CD200 R1, Nurikinin-1R)
		Basófilo (MRGPRX2, Trk, CysLTR1)
		Eosinófilo (Trk, CysLTR1-2)
		Neutrófilo (Trk, FcεRII, GM-CSFR, CysLT1)
		Monocito/Macrófago (MRGPRX2, Trk, CysLT1-2)
		Plaqueta (FcεRII)
		Endotelio (HR 1-2, PAFR, PAR2, CysLTR 1-2, EP1-2-4)

FcεRI: receptor de IgE de alta afinidad; FcεRII (CD23): receptor de IgE de baja afinidad; FcγRIIa: receptor de IgG; Mrgprs: receptor acoplado a proteína G relacionado con Mas; Trk: receptor de tirosina quinasa; SCFR: receptor del factor de células madre; TLR: receptor tipo Toll; HR: receptor de histamina; TNFR: receptor del factor de necrosis tumoral; PAFR: receptor del factor activador de plasmina; GM-CSFR, receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; PAR, receptor activado por proteasa; CysLTR, receptor de cisteinil leucotrienos; EP: receptor de prostanoides E.

A pesar de que hemos descrito por separado estos mecanismos, en algunos individuos pueden coexistir diferentes mecanismo de activación o endotipos , como se ha descrito ampliamente en reacciones por agentes biológicos [73].

1.1.6. Biomarcadores descritos

Durante la anafilaxia hay una liberación rápida de mediadores de diferentes fuentes, pero la más importante es la de mastocitos y los basófilos. Estos mediadores son proteasas, polisacáridos sulfatados, citocinas, quimiocinas, agentes vasoactivos (histamina, bradicinina) y mediadores lipídicos proinflamatorios, entre otros. Por lo general, se dividen en tres clases: mediadores preformados (que se almacenan en gránulos citoplasmáticos), recién generados en minutos (mediadores lipídicos proinflamatorios) y recién generados en horas (factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas).

- Mediadores preformados:

Histamina: La histamina plasmática es una amina secretada por MC y basófilos con funciones vasoactivas y proinflamatorias[87]. Existe evidencia de que los neutrófilos también pueden sintetizar y liberar histamina en circunstancias específicas[88]. La histamina liberada actúa a través de sus receptores de proteína G (H1, H2, H3 y H4), provocando vasodilatación arteriolar, aumento de la permeabilidad capilar, broncoconstricción, picazón, hinchazón, rinorrea, urticaria y rinitis , entre otros[89]. La histamina tiene una efecto potencial en la coagulación extrínseca, y se ha demostrado que induce la expresión de factor tisular (FT) en células vasculares activando el receptor H1 [90,91] . El pico de histamina se produce entre 5 y 10 minutos desde el inicio de la reacción y se metaboliza rápidamente en metil-histamina por la N-metiltransferasa o en imidazol acetaldehído por la diamino oxidasa, y luego se secreta en la orina[92]. En la práctica diaria, la histamina no es un buen biomarcador de diagnóstico de anafilaxia debido a su corta vida media[73,93].

Metabolitos de histamina: La metilhistamina y el imidazol acetaldehído tienen una vida media más larga en comparación con la histamina y pueden medirse en orina o plasma después de 30 a 60 minutos del inicio de la reacción[92]. Los niveles normales no excluyen una reacción de hipersensibilidad y los falsos positivos pueden ocurrir debido a la ingestión de alimentos con altas concentraciones de histamina (por ejemplo, en la intoxicación por histamina en pescados), la producción endógena por otro tipo de células como neuronas o células similares a enterocromafines en el estómago, o por ciertas bacterias [94]. En la práctica no se disponen de técnicas en la mayoría de laboratorios para su determinación.

Triptasa: es una serina proteasa neutra altamente específica de mastocitos, almacenada en grandes cantidades en gránulos citoplasmáticos. Los basófilos producen triptasa pero en

cantidades mucho menores. La triptasa actúa uniéndose al receptor activado por proteasa tipo 2 (PAR-2, presente en neuronas gastrointestinales, cardiovasculares, entre otros)[94]. Tiene un efecto quimiotáctico sobre los neutrófilos y eosinófilos a través de la IL-8 [95]. Durante la anafilaxia, la triptasa es responsable de la vasodilatación vascular (activando el sistema de contacto para generar bradicinina) y la hiperreactividad bronquial[93]. Actualmente es el biomarcador diagnóstico de anafilaxia más extendido y de mayor sensibilidad y especificidad. La triptasa basal en individuos sanos oscila entre 0 y 11,4 ng/ml [96]. En los trastornos de mastocitos, una triptasa basal > 20 ng/ml se considera un criterio menor de mastocitosis [97]. Los niveles de triptasa aumentan de 15 min a 3 h después del inicio de la anafilaxia[96,98]. La medición secuencial de la triptasa sérica durante la anafilaxia y los niveles séricos basales aumenta la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico[98]. Actualmente, se acepta que los niveles del 120% del valor basal más 2 ng/mL (1,2 × triptasa basal + 2 ng/mL) es un aumento significativo, lo que indica activación de mastocitos [96,99]. Un ratio de triptasa máximo/basal más alto se correlaciona con síntomas más graves[100]. No obstante, la triptasa puede no estar elevada hasta en el 30% de las anafilaxias, sobre todo si son de causa alimentaria o por un endotipo que implique menos al mastocitos y basófilos[98,101].

Quimasa: es una serina endopeptidasa que también se encuentra en mastocitos y basófilos. Generalmente se libera durante la activación de mastocitos/basófilos y se ha observado que su concentración en suero es estable. La actividad de la quimasa mastocitaria depende de la heparina y es responsable de la degradación e inactivación tanto de la trombina como de la **plasmina**, lo que sugiere que los complejos de quimasa-heparina de los mastocitos tienen una función potencial en la regulación de los procesos de coagulación extravascular, así como en el sistema activador del plasminógeno/plasmina [102,103] . Tanto la quimasa humana como su homólogo de ratón, la proteasa-4 de mastocitos, tenían la capacidad de reducir los niveles y la función del **FXIIIa**, el factor estabilizador de fibrina, mediante degradación proteolítica. Además, los incrementos **FXIIa** en condiciones de deficiencia de quimasa provocó una reducción de los tiempos de sangrado en condiciones homeostáticas y durante la sepsis [104]. No existen kits comercializados para medir la quimasa, por lo que no se utiliza de forma rutinaria en reacciones anafilácticas[105].

Carboxipeptidasa A3: es otra metaloproteinasa contenida en los gránulos de mastocitos y basófilos. Zhou *et al.* [106] midieron los niveles de carboxipeptidasa A3 en casos de anafilaxia, mastocitosis sistémica y grupos de control. Se encontraron niveles significativamente elevados

8 h después del inicio de una reacción alérgica en comparación con la cohorte de control. No existen métodos comerciales disponibles para su cuantificación en la práctica diaria.

Basogranulina: es una proteína granular de basófilos que se libera en paralelo con la histamina. Comparte receptores y vías con la histamina[107]. Hoy en día, no existen métodos disponibles para su medición[108].

Heparina: la heparina sulfatada se preforma en mastocitos (predominantemente) y también en gránulos de basófilos y se almacena en su forma activa con carga negativa. Se ha reportado que la heparina tiene un papel importante en la activación del sistema de contacto del plasma ya que debido a su carga negativa es capaz de activar la vía dependiente de FXII y escindir el cininógeno de alto peso molecular (HK) y liberar bradicinina, lo que aumenta la permeabilidad vascular[109,110] . La heparina no se puede medir directamente, tan sólo a través del anti-Xa y por el momento no se han estandarizado niveles que ayuden al diagnóstico de anafilaxia.

Dipeptidil-peptidasa I (DPPI)/catepsina C: es un miembro de las proteasas de la familia de la papaína que se expresa en numerosos tipos de células, incluidos mastocitos y basófilos. Se ha demostrado que los niveles de quimasa y DDPI aumentan y se correlacionan durante la anafilaxia, pero no se correlacionan con la triptasa[111,112]. Su actividad fuera de las células es limitada. Actualmente no existen métodos de medición disponibles para su cuantificación.

Catepsina G: es una proteasa relacionada con la quimasa y tiene funciones similares (escisión de angiotensina I en angiotensina II)[112]. Se encuentra en los gránulos de mastocitos. No existen técnicas disponibles para medirlo.

- Generados *de novo* en minutos

Mediadores lipídicos: derivan del ácido araquidónico y tienen funciones vasoactivas y proinflamatorias. Los leucotrienos son productos de la lipoxigenasa, y el leucotrieno más estudiado en anafilaxia es el **leucotrieno E4 (LTE4),** el metabolito más estable de la lipoxigenasa[113,114]. Es producido por mastocitos activados, neutrófilos, eosinófilos y macrófagos y se une a tres receptores diferentes (CysLTR1, CysLTR2, CysLTR3). Su activación provoca constricción de las vías respiratorias, contracción del músculo liso y aumento de la permeabilidad vascular [94]. El LTE4 se puede medir en orina pero su detección por técnica de laboratorio no está extendida y tan sólo se ha usado en investigación[115]. Las prostaglandinas y tromboxanos son productos de la ciclooxigenasa. En varios estudios en animales y humanos se han detectado la generación de **tromboxano A2 y B2**, prostaglandina (PG) D2, E2 y F2 [116,117]. La

PGD2 es el principal producto de la ciclooxigenasa formado en los mastocitos activados, también producido por neutrófilos, monocitos, macrófagos y plaquetas, pero no por basófilos. PGD2 se une a sus receptores DP1 y/o DP2 y aumenta la permeabilidad vascular e induce broncoconstricción[118]. PGD2 tiene una rápida degradación a metabolitos más estables como **D-prostaglandina (PGD), F-prostaglandina (PGF) y J-prostaglandina (PGJ**), que se excretan en la orina[119]. Nassiri y *et al.*[120] sugieren que los niveles séricos de 9α,11β-PGF2 podrían ser biomarcadores útiles de anafilaxia. El metabolito urinario 2,3-dinor-11β-PGF2α se puede medir en la orina[119], pero su método de detección no está extendido.

Factor activador de plaquetas (PAF): es un derivado de fosfolípidos producido por mastocitos activados, células endoteliales, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, monocitos y plaquetas. Se metaboliza rápidamente en su metabolito inactivo liso-PAF (mediante la enzima PAF acetilhidrolasa—**PAF-AH**)[121,122]. Durante la anafilaxia, el PAF se une a su receptor e induce una potente broncoconstricción y vasodilatación con edema, participa en la agregación plaquetaria y también en la activación de eosinófilos y neutrófilos. Los niveles elevados de PAF se correlacionan con la gravedad de la anafilaxia[41,123] y existe una correlación inversa entre la actividad de PAF y PAF-AH. Se ha observado que la actividad plasmática del PAF-AH fue significativamente menor en individuos con antecedentes de anafilaxia en comparación con el grupo control con antecedentes atópicos negativos [124] y que fue un marcador de gravedad en alergia alimentaria en cacahuete en niños [123]. No obstante, este biomarcador parece no modificarse durante la fase aguda de la anafilaxia [123]. Vadas *et al.*. [125] demostraron que el PAF se correlaciona mejor con la gravedad de la anafilaxia en comparación con la histamina y la triptasa. Uno de los desafíos de medir PAF y PAF-AH en la práctica diaria es su corta vida media y las precauciones de transporte que requiere.

C3a y C5a: las anafilotoxinas resultantes de la activación de la cascada del complemento pueden unirse a los receptores en células efectoras y provocar vasodilatación y la contracción de los músculos lisos[77]. Los basófilos y los mastocitos reaccionan ante esta estimulación con la liberación de histamina[77]. En macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, C3a y C5a pueden desencadenar un estallido oxidativo[78]. Estos componentes se pueden medir en laboratorio pero se desconoce su valor diagnóstico puesto dependerá del endotipo.

Bradicinina (BK): Es un nonapéptido de la familia de las quininas con funciones vasoactivas que se ha demostrado que se libera durante la anafilaxia mediante la activación del sistema de

contacto[109,110]. La BK tiene una vida media muy corta, menos de 1 minuto, debido a su rápido metabolismo por enzimas específicas[126]. La BK actúa a través de sus receptores específicos, B1 (B1R) y B2 (B2R), induciendo un aumento de la permeabilidad vascular y extravasación de plasma[127]. Actualmente, no se realiza la determinación de BK en la práctica diaria debido a su poca estabilidad por su corta vida media. No obstante, existe un kit comercial de ELISA para medirla, aunque en el ambiente de investigación lo más extendido son métodos indirectos para evaluarla, como la cuantificación de la escisión de su proteína de origen, el HK[128].

- Generados *de novo* a las horas

Factores de crecimiento:

El **factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)** es un factor de crecimiento hematopoyético que aumenta en individuos con anafilaxia. El GM-CSF modula la maduración de varias células inmunes e inflamatorias, incluidas las principales células efectoras de la reacción[129]. Además, desempeña un papel en la inflamación al mediar en la comunicación entre los tejidos y las células inmunitarias[130]. El **factor plaquetario 4 (PF4) / CXCL4** es liberado por las plaquetas después de la activación del sistema de coagulación, y se ha descubierto que sus niveles aumentan en modelos anafilácticos en conejos[131]. El **factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)** es una molécula liberada por células como EC, células musculares lisas vasculares y mastocitos y Takashi *et al.*[132] demostraron que sus niveles estaban elevados en el suero de un paciente con shock anafiláctico. El **factor de crecimiento tumoral β (TGF-β)** se produce principalmente por mastocitos activados y tiene un efecto inhibidor de la reacción anafiláctica al bloquear la liberación de TNF-α[133]. El TGF-β aumenta en el suero de individuos con anafilaxia[134].

Citocinas:

Stone *et al.*.[129] analizaron las concentraciones máximas de diferentes mediadores, incluyendo histamina, triptasa, citocinas **IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, interferón (IFN)-gamma y factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa y TNFRI** en un estudio prospectivo en individuos que sufrieron anafilaxia. Todos estos mediadores fueron mayores en individuos anafilácticos en comparación con el grupo de control. En este estudio, sólo la triptasa, la histamina, la IL-2, la IL-6, la IL-10 y el TNFRI se correlacionaron con la hipotensión, un hallazgo similar al encontrado por Brown *et al.*[135]. Además, la IL-6 y otras citocinas inflamatorias como la **IL-8, el TNF-α, el interferón**

gamma (IFN-γ) y la IL-1β inducen la inactivación de la **cadherina**, que media la adhesión celular, lo que provoca fuga vascular por aumento de la permeabilidad capilar[136]. Se ha postulado que la IL-1 liberada por monocitos y macrófagos activa la expresión endotelial de ON, lo que conduce a esta permeabilidad capilar[137]. Por otro lado, se ha descrito el papel de la IL-6 como un excelente biomarcador de reacciones de liberación de citocinas debido a su correlación con la gravedad de las reacciones y su longevidad en el suero sanguíneo[138]. Además, se ha demostrado el papel de la IL-6 en el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS)[139]. Se ha descrito que la IL-6 puede amplificar la activación de la coagulación mediante la regulación positiva del Factor Tisular (TF) [140] . Existen datos prometedores sobre el factor quimiotáctico de los basófilos principales, **el ligando 2 de quimiocina (motivo C-C) o CCL-2, también llamado MCP-1**. Se ha descubierto que la concentración de CCL-2 es significativamente mayor en individuos con anafilaxia en comparación con la cohorte de control sana, y se han identificado casos potencialmente graves de anafilaxia[107]. La **mieloperoxidasa (MPO)** es una enzima liberada por neutrófilos tras su activación. En el estudio de Francis A *et al.*.[141] se vio que las concentraciones de MPO fueron significativamente elevadas en individuos con anafilaxia en comparación con controles sanos, independientemente de la gravedad de la reacción y que fue mayor en individuos graves que en individuos moderados durante el transcurso de su reacción.

Otras:

La **elastasa** es una serina proteasa liberada principalmente por los neutrófilos, aunque también puede estar presente en los gránulos de los basófilos y los mastocitos[142]. Esta proteína puede escindir la cadena ligera de quinina activando el sistema de contacto[143] . Se ha descrito que las trampas extracelulares de neutrófilos, que se detectan como complejos de ADN-mieloperoxidasa junto con elastasa, aumentan durante la anafilaxia humana de acuerdo con la gravedad de los episodios[141,144].

Debido al conocimiento cada vez más extensos de los receptores y las células efectoras implicadas en anafilaxia, se han postulado múltiples citocinas como posibles biomarcadores cuya utilidad aún está por demostrar. En la **Tabla 2** se muestran todos los biomarcadores mencionados, sus células productoras, su vida media, si disponen de métodos para su determinación de rutina y si se han relacionado con grado de gravedad de la anafilaxia.

La revisión de todos los biomarcadores descritos hasta el momento se adjunta en el artículo ya publicado titulado “New biomarkers in anaphylaxis (beyond tryptase)”que se encuentra en el apartado **11.6. del Anexo**. Después de esta revisión exhaustiva de todos los biomarcadores mencionados es importante señalar que, hasta el momento, estos biomarcadores han sido investigados y estudiados de forma aislada, sin considerar su interacción o combinación en un contexto integral. La fisiopatología de la anafilaxia implica la activación de múltiples vías más allá de la IgE, diferentes tipos de células y una amplia gama de mediadores. Por lo tanto, medir sólo un mediador puede no ser suficiente para diagnosticar la anafilaxia. Esto podría explicar en parte la falta actual de biomarcadores óptimos para confirmar el diagnóstico.

Tabla 2 Resumen de los principales mediadores en anafilaxia, sus principales fuentes celulares, el mejor momento de muestreo y la disponibilidad de ensayos comerciales.

Mediador	Célula fuente	Tiempo de muestreo recomendado	Métodos disponibles para análisis de rutina	Correlación con gravedad	Vida media
Preformados					
Histamina (plasma, orina)	MC, B NT	0-30 min	Sí	Sí	<15 min
Histamina (24-h orina)	MC, B, NT	0-24 h	Sí	Sí	NC (0-24 h)
N-m-histamina (plasma, 24-h orina)	MC, B, NT	0-24 h	Sí	Sí	NC (0-24 h)
N-m-imidazol ácido acético (24-h orina)	MC, B, NT	0-24 h	Sí	NC	NC (0-24 h)
Triptasa (suero/plasma)	MC, B	15 min-3 h	Sí	Sí	~2h
Quimasa (suero)	MC, B	0-24 h	No	Sí	>24
Carboxipeptidasa A3 (suero/ plasma)	MC, B	0-8 h	No	NC	triptasa (2-8 h)
Basogranulina (suero)	B	NC	No	No	NC
Heparina (plasma)	MC, B	NC	No	Sí	NC
DPPI/catepsina C (suero)	MC, B	NC	No	NC	NC (similar a histamina)
Catepsina G (suero)	MC, B, EOS, NT	NC	No	NC	NC
Generados “de novo” en minutos					
Bradicinina (plasma)	Plasma	NC	No	Sí	<1 min
FXII, PK, HK, Trombina (plasma)	Plasma	NC	FXII, trombina	NC	NC
LTE4 (24-h orina, plasma)	MC, B, EOS, NT, MAC	0-24 h	No	Sí	7 min
LTB4, LTC4, LTD4 (24-h orina)	MC, B, NT	0-24 h	No	NC	<7 min
PGD2 (suero)	MC, EOS, NT, MN, PT	0-24 h	No	Sí	30 min
9a,116-PGF2 (suero)	MC, PT	NC (5-15 min)	No	NC	NC
2,3-dinor-116-PGF2a (24-h orina)	MC, PT	NC (0-24 h)	No	NC	NC
TXA2 (suero/plasma, orina)	MC, EOS, PT	NC	No	NC	30 S
TXB2 (suero/plasma, orina)	MC	NC	No	NC	60 min
PAF* (plasma)	MC, B, EOS, NT, MAC, MN, PT, EC	NC	No	Sí	<5 min
PAF-AH (suero)	MC, MAC, PT plasma	NC	No	Sí	30 min
Óxido nítrico	EC	NC	No	NC	NC

C3a, C5a (plasma)	Plasma	NC	No	No	NC
TNF-α* (suero/plasma)	MC, MAS, NT, MAC	NC	Sí	NC	30 min
Generados “de novo” en horas					
Factor de células madre (suero/plasma)	MC	NC	No	Sí**	NC
TGF-β (suero/plasma)	MC, EOS	NC	Sí	NC, potencial**	2-3 min activo 90 min latente**
CXCL4/PF4, PDGF	PT	NC	No	NC	<3 min
IL-1b (suero/plasma)	MC, NT	0-15 min	No	NC	19 min**
IL-2, IL-22 (suero/plasma)	MC	0-10 h	No	IL-2 Sí	NC
IL-4/IL-13 (suero/plasma)	MC, B, EOS	NC (0-24 h)	No	IL-4 Sí**	35-90 min
IL-10 (suero/plasma)	MC, EOS	NC (0-24 h)	Sí	Sí	1-3.5 h
IL-6 (suero/plasma)	MC, B, NT, MAC	NC (0-24 h)	Sí	Sí	2-6 h
IL-8 (suero/plasma)	MC, EOS, NT	NC (<3 t h)	No	No	<4 h
CCL2/MCP-1 (suero/plasma)	MC, NT, MAC, MN, EC	NC (0-30 min)	No	NC, potencial	30 min
CCL5/RANTES (suero/plasma)	MC, EOS, MN	NC	No	NC	14-18 h
MPO (suero/plasma)	NT, MN	NC (<5 h	No	Sí	NC 4-5 h**
Otros posibles biomarcadores (células fuente)	Condritin sulfato (MC, BS), elastasa* (NT), TSLP (MC, EC, SMC), IL-31 (MC, B, EOS, MAC, LT), IL-33 (MC, B), IL-3 /IL-5/IL-16/IL-18 (MC, EOS), IL-17 (NT), IL-23/IL-27/FGF (MAC), G-CSF (MC, NT, MAC, MN, EC), GM-CSF γ (MC, B, EC), M-CSF (MC, MN, EC), VEGF (MC, MAC, PT), S1P (MC, PT, EC, ERY), IFN- (NT , LT, NK), endotelina-1 (MC, MAC, MN, EC, SMC), prostaciclina (MC, PT, EC, SMC), activador del plasminógeno (MC), MBP (EOS)				

MC, mastocitos; B, basófilo; NT, neutrófilos; PT, plaquetas; EOS, eosinófilos; MAC, macrófagos; MN, monocitos; CE, célula endotelial; SMC, célula de músculo liso; ERY, eritrocitos; LT, linfocitos T; NK, célula asesina natural; N-m, N-metilo: DPPI, dipeptidil peptidasa I; FXII, factor de coagulación XII; PK: precalicreína; HK, cininógeno de alto peso molecular; PAF, factor activador de plasmina; PAF-AH, acetilhidrolasa; LTE4, leucotrieno E4; LT84, leucotrieno B4; LTC4, leucotrieno C4; LTD4, leucotrieno D4; PGD2, prostaglandina D2; TXA2, A2 tromboxano; TX82, B2 tromboxano; TGF-β, factor beta de crecimiento tumoral; TNF-α, factor de necrosis tumoral alfa; CXCL4/PF4, factor plaquetario 4; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; TSLP: linfopoyetina del estroma tímico; FGF, factor de crecimiento de fibroblastos; G-CSFR, receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos; GM-CSFR, receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos; M-CSF, factor estimulante de colonias de macrófagos; VEGF, factor de crecimiento vascular endotelial; CCL2/MCP-1, ligando (motivo C-C) 2/ proteína quimioatrayente-1; CCL5/RANTES, ligando (motivo C-C) 5; S1P, esfingosina-1-fosfato; MPO, mieloperoxidasa; MBP, proteína básica principal; IFN-γ, interferón gamma

*También preformado, pero principalmente de nueva generación

**Estudios realizados en mamíferos, no en humanos

1.1.7. Fenotipos descritos

La anafilaxia puede manifestarse con signos y síntomas en múltiples órganos y, para un mismo alérgeno y/o un mismo paciente, no se reproduce siempre de la misma forma. Por ello se cree que los mecanismos de activación y los mediadores tienen mucho que decir sobre cómo se va a manifestar la anafilaxia. Probablemente, factores de riesgo o agravantes del paciente pueden afectar a los órganos implicados.

De forma clásica, la anafilaxia mediada por IgE, IgG o por activación directa de los receptores de mastocitos y basófilos se manifestará con síntomas resultantes de la liberación de mediadores mastocitarios y basófilos, manifestándose en forma de vasodilatación (a nivel cutáneo manifestándose como edema, a nivel de circulación periférica pudiendo provocar

hipotensión por shock distributivo), eritema y prurito (localizado o generalizado con la aparición de eritrodermia o urticaria), contracción de musculo liso (a nivel respiratorio broncoconstricción, a nivel gastrointestinal vómitos o diarrea, a nivel ginecológico dismenorrea o metrorragia) y con clínica neurológica en forma de obnubilación o somnolencia (mayormente por la histamina)[135].

Aunque, desde un punto de vista clínico, las reacciones debidas a la activación del complemento no pueden diferenciarse de las reacciones mediadas por IgE, sí tienen características específicas: pueden presentarse en el primer tratamiento y las reexposiciones se relacionan con reacciones más leves o sin reacciones[74].

Las reacciones no-inmunológicas por AINE o reactividad cruzada a AINE por inhibición de COX-1 tienen fenotipos clínicos distintivos que se dividen en diferentes categorías basadas en las características de las reacciones y la cronicidad de la enfermedad subyacente. Los principales fenotipos clínicos incluyen: 1) la Exacerbación Respiratoria Inducida por AINE (EREA) que sucede en individuos con asma y/o poliposis nasal y sinusitis crónica en los que hay un estado basal de inhibición COX-2 y potenciación de la 5-lipoxigenasa (5-LO)[145]. Clínicamente estos individuos presentan habitualmente a los 60-120min clínica de sibilancias, dificultad respiratoria, congestión nasal o rinorrea. Hasta en un 20% de los casos se pueden asociar síntomas en otros sistemas[146]. 2) La Exacerbación de Urticaria Crónica Inducida por AINE (NECD) en individuos que presentan agravamiento de urticaria crónica existente a los 60-120min de la ingesta de AINE. 3) La Urticaria/Angioedema Inducida por AINE (NIUA) en los que aparece urticaria o angioedema a los 60-120min de la toma de AINE sin el antecedente de urticaria crónica de base.

Las reacciones provocadas por liberación de citocinas, si no se acompañan de activación de mastocito o basófilo, se pueden diferenciar fácilmente puesto que sus síntomas se producen mayormente por la liberación de IL-1, IL-6 y TNF. En la clínica presentada predominará el dolor lumbar o la opresión torácica, el temblor distal y la aparición de febrícula o fiebre. La afectación cutánea tiende a ser sin prurito ni urticaria y suele aparecer tan solo un eritema de hemicuerpo superior. Puede aparecer la disnea baja y la hipoxemia pero muchas veces sin presencia de broncoespasmo, clínica gastrointestinal de náusea y vómitos y es más habitual la hipertensión arterial que la hipotensión [85].

En la **Figura 2** se muestran los fenotipos clínicos descritos para cada mecanismo y los biomarcadores recomendados en el momento actual de práctica habitual para ayudar a establecer el endotipo subyacente de las mismas.

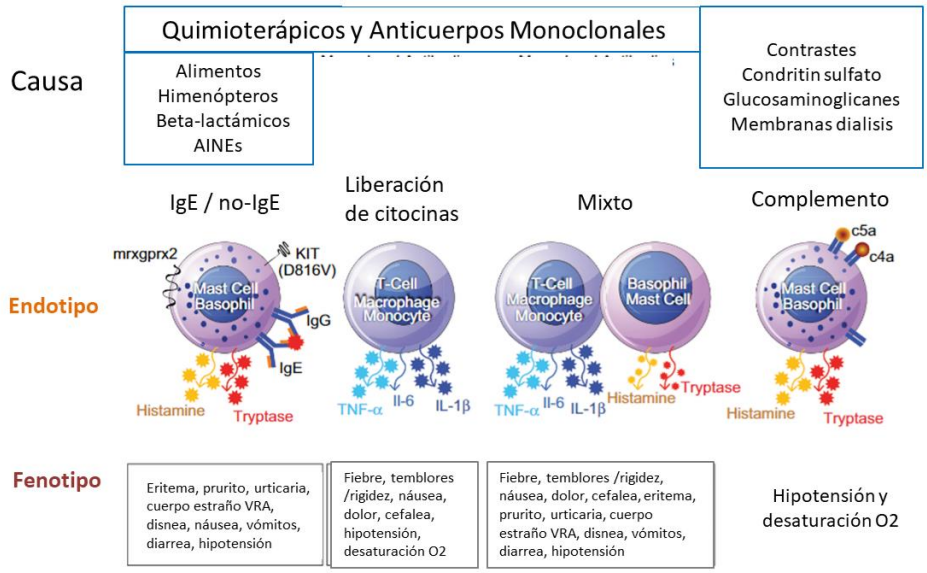


Figura 2: Principales endotipos y fenotipos descritos para anafilaxia. Adaptado de Jiménez-Rodríguez TW *et al.* [85]

1.1.8. Gravedad

La gravedad de la anafilaxia sigue siendo difícil de cuantificar, ya que los síntomas se evalúan principalmente de forma cualitativa. Actualmente no se han establecido pruebas de laboratorio cuantitativas objetivas y, por lo tanto, se ha optado por desarrollar sistemas de clasificación para evaluar la gravedad de los eventos anafilácticos, como es el caso de Brown [147], Muraro [148], Mehl [149], Mueller [150] , National Institute of Allergy and Infectious Diseases/Food Allergy and Anaphylaxis Network (NIAID/FAAN)[151] y Ring and Messmer grading system [152]. Estas clasificaciones se distribuyen en grados que oscilan entre el I y el V según el compromiso vital sea mayor. No en todas ellas se recoge todo el abanico de síntomas que puede presentar los individuos, y algunas de ellas fueron creadas específicamente para un desencadenante concreto (fármacos, himenópteros o alimentos).

La gravedad de la anafilaxia debería describirse y cuantificarse siempre dado que tiene un valor clínico y pronóstico importante para el manejo del paciente. Por un lado, puede influir en la selección de las pruebas diagnósticas alergológicas futuras, puesto que no todas comportan el mismo riesgo con la exposición. Por otro lado, se aplicarán medidas de evitación más

estrictas y se identificarán los factores de riesgo del paciente con más detenimiento para prevenir reacciones anafilácticas fatales en el futuro.

1.1.9. Diagnóstico

El diagnóstico de la anafilaxia sigue siendo a día de hoy exclusivamente clínico. Se basa en la presencia de signos y síntomas clínicos después de la exposición a un potencial alérgeno o evento. Tanto la guía española de manejo de la anafilaxia GALAXIA [27] como la guía de la World Allergy Organization (WAO)[1] como la guía de la European Academy of Alllergy and Clinical Immunology [2] coinciden que se puede establecer el diagnóstico de anafilaxia si se cumplen uno de los siguientes:

1. Inicio agudo de una enfermedad (de minutos a varias horas) con afectación de la piel, el tejido mucoso o ambos (por ejemplo, urticaria generalizada, prurito o enrojecimiento, labios, lengua y úvula hinchados) y al menos uno de los siguientes:

a. Compromiso respiratorio (por ejemplo, disnea, sibilancias, broncoespasmo, estridor, flujo espiratorio máximo (PEF) reducido e hipoxemia)

b. Tensión arterial (TA) reducida o síntomas asociados de disfunción de órganos terminales (por ejemplo, hipotonía (colapso), síncope, incontinencia)

2. Dos o más de los siguientes síntomas que ocurren rápidamente después de la exposición a un alérgeno probable para ese paciente (de minutos a varias horas):

a. Afectación de la piel-tejido mucoso (p. ej., urticaria generalizada, picazón-enrojecimiento, hinchazón de labios-lengua-úvula

b. Compromiso respiratorio (p. ej., disnea, sibilancias-broncoespasmo, estridor, PEF reducido, hipoxemia)

c. TA reducida o síntomas asociados (por ejemplo, hipotonía (colapso), síncope, incontinencia)

d. Síntomas gastrointestinales persistentes (por ejemplo, dolor abdominal tipo cólico, vómitos)

3. TA reducida después de la exposición a un alérgeno conocido para ese paciente (minutos a varias horas) incluso en ausencia de clínica cutánea:

a. Lactantes y niños: PA sistólica baja (específica por edad) o disminución >30 % de la TA sistólica

b. Adultos: presión arterial sistólica <90 mmHg o >30 % de disminución con respecto al valor inicial de esa persona

4. Broncoespasmo o afectación laríngea después de la exposición a un alérgeno conocido para ese paciente (minutos a varias horas) incluso en ausencia de clínica cutánea.

* Este 4º punto tan sólo es descrito en guías de la WAO y se justifica por el riesgo vital que supone el órgano involucrado que justifica el uso de adrenalina como tratamiento al ser identificado como anafilaxia.

Respecto pruebas diagnósticas, la que hoy en día aporta más rentabilidad y apoya el diagnóstico de anafilaxia es la extracción de suero en los primeros 30min-2h de la reacción para determinar la triptasa sérica aguda seguida de una medición basal al menos 24 h después de la reacción [1,2]. Sin embargo, incluso cuando el muestreo de triptasa es oportuno, no es detectable un aumento en todos los casos, especialmente en la alergia alimentaria en los casos en que la anafilaxia se produzca por un mecanismo que no implique el MC, como la liberación de citocinas [96,98,101].

Hoy en día ninguna prueba diagnóstica permite un diagnóstico inequívoco de anafilaxia. Por lo tanto, la anafilaxia sigue siendo poco reconocida, diagnosticada, tratada y comprendida.

1.1.10. Diagnóstico diferencial

La anafilaxia puede presentarse con una gran variedad de síntomas, lo que dificulta su diagnóstico [1].

Puesto que la **urticaria** y el **angioedema** son una manifestación clínica muy habitual de la anafilaxia, forman parte del diagnóstico diferencial más habitual. Característicamente se presentan de forma aislada, sin afectación de otros sistemas, y pueden producirse de forma idiopática o posterior a un estímulo alergénico. El por qué una persona desarrolla una activación mastocitaria únicamente en la piel y otra se produce de forma sistémica después de la exposición a aun alérgeno queda por dilucidar. La urticaria se caracteriza por inflamación de la epidermis y dermis superficial de corta duración (<24h) con la lesión típica de habón y acompañada de prurito. Se clasifica en aguda o crónica dependiendo de si la recurrencia del habón se produce durante menos o más de seis semanas. El angioedema en cambio afecta a la dermis profunda y la hipodermis, y por ello no veremos la típica lesión de habón, sino una placa eritematosa, edematosa y pruriginosa. Existe un mecanismo de angioedema distinto al

de la activación mastocitaria, el angioedema mediado por bradicinina. En este caso de produce el aumento de la permeabilidad vascular por la presencia de bradicinina, y no por la histamina. El angioedema por bradicinina requiere más tiempo para su resolución y típicamente no es pruriginoso ni eritematoso. Puesto que comparten la activación de MC y basófilo, la urticaria y el angioedema mediado por mastocito comparten con la anafilaxia mediadores como la histamina, leucotrienos, prostaglandinas, factor activador de plaquetas y algunas citocinas[153–155]. También se han visto biomarcadores comunes en el sistema de la coagulación, fibrinolisis[156–158] y sistema de contacto[159]. En la **Tabla 3** se resumen los biomarcadores descritos en urticaria y angioedema que se han descrito en anafilaxia también.

Tabla 3 Biomarcadores comunes con anafilaxia descritos en urticaria y angioedema

	URTICARIA	ANGIOEDEMA
BIOMARCADORES	IL-6, IL-18, TNF-α, IL-31, cHK, VEGF, MMP-9, dímero D	IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17, TNF-α, cHK, BK, dímero D, PAI-1, VEGF, endotelina-1, PAF-AH, elastasa, MPO, G-CSF, GM-CS, FGF-β

IL, interleucina; cHK, cininógeno de alto peso molecular escindido; BK, bradicinina; PAF-AH, factor activador de plasmina acetilhidrolasa; TNF-a, factor de necrosis tumoral alfa; MMP-9, metaloproteinasa de matriz-9; PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno-1; G-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos; GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos; VEGF, factor de crecimiento vascular endotelial; MPO, mieloperoxidasa; MBP, proteína básica principal; IFN-y, interferón gamma; FGF-β, factor de crecimiento de fibroblastos beta

Una de las afecciones más comunes que se confunden con anafilaxia porqué se presentan durante la administración de tratamientos o pruebas diagnósticas son las **reacciones vasovagales**, que se caracterizan por hipotensión, palidez, bradicardia, debilidad, náuseas, vómitos y diaforesis que se resuelven en minutos sin necesidad de ningún tratamiento. La urticaria, el prurito, el angioedema, la taquicardia y el broncoespasmo no forman parte de esta entidad. La **descompensación respiratoria aguda** por ataques de asma graves, aspiración de cuerpo extraño y embolia pulmonar puede presentar síntomas respiratorios que sugieren anafilaxia, pero faltan otras características (p. ej., prurito, urticaria, angioedema). Afecciones neurológicas como algunas formas de **epilepsia**, enfermedades cardiacas como infarto de miocardio y/o arritmias o la insuficiencia cardiaca se pueden manifestar con disnea que ocasione rubicundez, pero se distinguen fácilmente clínicamente. En un paciente con afectación circulatoria es importante descartar **otras causas de shock**, sobre todo si no se evidencia afectación cutánea clásica. El shock cardiogénico o el shock séptico son ocasionalmente confundidos inicialmente con anafilaxia pero la historia y otros datos clínicos como la fiebre o electrocardiograma alterado nos ayuda a orientar el cuadro [160]. Existen entidades con menos involucración orgánica que también pueden ser difíciles de diferenciar, como es la **disfunción de cuerdas vocales**, una **crisis de pánico** o el **síndrome de**

hiperventilación, que se pueden manifestar con sensación de muerte inminente, dificultad para respirar, enrojecimiento, sudoración, temblores, palpitaciones, sensación de globo (sensación de un nudo en la garganta), aturdimiento, dolor en el pecho y entumecimiento u hormigueo en las extremidades[27].

Existen las llamadas **pseudoanafilaxias o reacciones anafilactoides** que se pueden producir por algunos fármacos o intoxicaciones alimentarias y que clínicamente pueden simular una anafilaxia. La intoxicación alimentaria por histamina o escombroidosis, la anisakiasis, la intoxicación alimentaria por glutamato o el síndrome del restaurante chino o la intolerancia a sulfitos, sobretodo en asmáticos, presenta clínica cutánea con afectación de aparato respiratorio o digestivo y de *per se* cumpliría criterios de anafilaxia (responden al mismo tratamiento, así que eso no sería un problema) [161,162].

1.1.11. Tratamiento

La anafilaxia es una emergencia médica que requiere una rápida identificación y tratamiento. La detección temprana de anafilaxia, tanto por parte de los individuos como de los profesionales de la salud, basada en la aparición de síntomas alérgicos que afectan a varios sistemas orgánicos simultáneamente, es crucial para iniciar un tratamiento inmediato.

Una vez se establece la sospecha diagnóstica los primeros pasos serán marcados por el ABCDE clásico de las emergencias médicas, dando ímpetu en la importancia de eliminar la exposición al desencadenante si es posible, seguido de evaluar la vía aérea, la respiración, la circulación, el estado mental y la piel, y colocar al paciente en posición supina durante la anafilaxia (a menos que haya dificultad respiratoria)[1,2,27,163]. A pesar de no haber un claro consenso aún, colocar al paciente en posición de Trendelenburg puede favorecer al sistema circulatorio en caso de shock. El primer fármaco de elección en todas las anafilaxias es la adrenalina intramuscular. La dosis recomendada en el paciente pediátrico y adulto es de 0,01 mg/kg de peso corporal, hasta una dosis total máxima de 0,5 mg, administrada por vía intramuscular en el vasto externo de la pierna, pudiendo repetir la dosis cada 5 a 15 minutos si los síntomas no mejoran [1,2,27]. En caso de que sea necesaria la vía intravenosa, debido a la posibilidad de aparición de arritmias fatales en su uso en bolus, debe realizarse preferiblemente por infusión intravenosa mediante una bomba de infusión a velocidades lentas y lentamente progresivas [164,165]. En casos de anafilaxia sin respuesta óptima a la adrenalina, especialmente en individuos

que toman betabloqueantes, se puede considerar la administración de glucagón, aunque la evidencia es limitada [166].

Una vez administrada la adrenalina, se procederá al resto de terapias complementarias: administración de oxigenoterapia preferiblemente al 100%, conseguir acceso intravenoso para la administración de líquidos intravenosos a individuos con inestabilidad cardiovascular y/o antihistamínicos H1 y/o glucocorticoides sistémicos [1,2,27]. La administración de glucocorticoides puede ser útil para prevenir síntomas prolongados y reacciones bifásicas, aunque su uso rutinario está siendo cuestionado debido a evidencia contradictoria [167,168].

Los algoritmos de tratamiento actuales para las reacciones por liberación de citocinas se basan en la opinión de expertos y representan una unión perfecta de la experiencia de los pioneros en el campo de las inmunoterapias que involucran células T y los alergólogos. El esquema de clasificación más utilizado para la gravedad de las reacciones adversas a fármacos que producen reacción por liberación de citocinas (anticuerpos monoclonales y terapia T-CAR) fue desarrollado por el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) [169]. Las de bajo grado se tratan sintomáticamente con antihistamínicos, antipiréticos y reposición de líquidos endovenosos. En el paciente inmunodeprimido, si no se puede descartar una infección con certeza, se debe considerar el hemocultivo seriado y el inicio de una terapia antibiótica empírica [170]. En caso de presentar criterios de anafilaxia, a pesar de que el fenotipo sea de liberación de citocinas, si se produce durante la administración de un fármaco, se administrará adrenalina IM según protocolo de anafilaxia.

Los individuos con anafilaxia deben observarse unas 12h al menos, especialmente aquellos con reacciones graves o que requieren múltiples dosis de adrenalina, ya que aproximadamente la mitad de las reacciones bifásicas ocurren dentro de las primeras 6 a 12 horas después de la reacción inicial [171,172].

1.1.12. Prevención

Las medidas preventivas a largo plazo incluyen el reconocimiento y el manejo de los factores de riesgo de anafilaxia en general, así como medidas dirigidas a los desencadenantes específicos en particular. Todo paciente que haya sufrido un episodio de anafilaxia debe ser remitido de forma preferente a un especialista en alergología con la finalidad de establecer el diagnóstico etiológico, establecer el riesgo futuro y asegurar que el paciente y los cuidadores, en caso de niños, reciben las instrucciones para establecer las medidas de evitación

adecuadas. El especialista indicará la prescripción de adrenalina y entrenará al paciente y/o cuidadores en su administración, así como en el manejo de futuras reacciones. Es importante identificar y controlar las condiciones comórbidas que aumentan el riesgo de una reacción anafiláctica grave: asma, enfermedades cardiovasculares y mastocitosis, etc. [27,173]. Además, la administración de ciertos medicamentos, como los betabloqueantes y los IECAs, puede interferir en la gravedad o con la respuesta terapéutica a la adrenalina, como se mencionó anteriormente, y por ello en algunos individuos se podría valorar su cambio por otra alternativa terapéutica.

1.2. Coagulación y fibrinólisis

1.2.1. Definición

La coagulación y la fibrinólisis son dos sistemas biológicos estrechamente conectados para regularse mutuamente y mantener un equilibrio entre la hemostasia (la formación de coágulos sanguíneos para detener el sangrado) y la fibrinólisis (la disolución de estos coágulos una vez que la lesión está reparada).

La **coagulación** se divide para su estudio molecular en primaria y secundaria [174].

La **hemostasia primaria** se caracteriza por el reclutamiento y activación de las plaquetas para formar el tapón plaquetario y tiene 3 fases: 1) adhesión: ante una lesión vascular, las plaquetas se unen al subendotelio o al tejido perivascular expuesto a la sangre mediante receptores específicos para cada proteína adhesiva (colágeno - el factor de von Willebrand (FvW) - GPIb/IX). 2) activación y secreción: una vez unidas al colágeno las plaquetas se activan y secretan sustancias procoagulantes y proinflamatorias (adenosina trifosfato, factor plaquetario 4, calcio serotonina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, tromboxano A2, factor V (FV), fibrinógeno). 3) agregación: Algunas de estas sustancias consideradas agonistas (adrenalina, trombina, adenosín-trifosfato, colágeno, tromboxano A2) estimulan la unión de unas plaquetas con otras, mediante fibrinógeno y GPIIb/III, y el reclutamiento de más plaquetas y el crecimiento del coágulo.

La **hemostasia secundaria** comprende la activación de las cascadas de coagulación y se divide en tres fases: 1) Iniciación: El factor tisular (FT), también conocido como tromboplastina o factor III, es sintetizado por diferentes tipos celulares y expresado en las membranas celulares cuando hay lesión endotelial. El factor VII (FVII) se une estrechamente al factor tisular

activando rápidamente a proteasas procoagulantes y anticoagulantes como el factor X (FX) y IX (FIX). El FX activa al FV y puede combinarse con el FVa para producir pequeñas cantidades de trombina. 2) Amplificación: Las pequeñas cantidades de trombina son un potente activador plaquetario a través de la vía de los receptores activados por proteasas (PAR), que libera FV procoagulante. La trombina también activa al factor XI (FXI) y activa el factor VIII (FVIII). 3) Propagación: el FIXa junto con el FVIIIa, se unen a la membrana de las plaquetas, formando en complejo de "Xasa". El complejo de «Xasa» activa al FX, resultando en una rápida formación de FXa y FIXa, FVIIIa, FX y calcio. El FVa, FXa y calcio transforma la protrombina a trombina (factor II), la cual actúa sobre el fibrinógeno (factor I) transformándolo en monómeros de fibrina (factor Ia) que se polimerizan y se estabilizan por acción del factor XIIIa (FXIIIa), formando el tapón hemostático o coágulo.

Vías de la coagulación

La cascada de coagulación se divide para su estudio, clásicamente en tres vías: la *vía de activación por contacto* (vía intrínseca), la *vía del factor tisular* (vía extrínseca) y la *vía común* [175]. Tanto la vía intrínseca como la vía extrínseca son vías de iniciación de la cascada que desembocan en la conversión del FX en FXa, punto en el que se inicia la vía común (**Figura 3**).

La vía extrínseca es la vía primaria para la iniciación de la coagulación y se inicia con la formación del complejo conformado por el FT, el FVIIa circulante, iones de Ca++ y fosfolípidos, el cual activa tanto al FX, como al FIX.

La vía intrínseca sirve como mecanismo de amplificación de la coagulación y red de seguridad de la hemostasia. Se inicia tras un daño vascular, con la exposición de superficies cargadas negativamente que interaccionan con los factores de contacto (FXII, FXI, precalicreina plasmática (PPK) y HK) e inician el proceso de activación secuencial, donde el FXII funciona como verdadero iniciador, puesto que si bien es una proenzima, posee una pequeña actividad catalítica que alcanza para activar a la PPK, convirtiéndola en calicreína plasmática (PK). En segunda instancia la PK actúa sobre el FXII para convertirlo en FXIIa, una enzima mucho más eficiente que actúa activando el FXI, que en presencia de iones de Ca++ activará al FIX. Se forma el complejo "Xasa", el cual activa el FX.
Finalmente, en **la vía común**, convergen las dos vías a nivel del factor Xa.

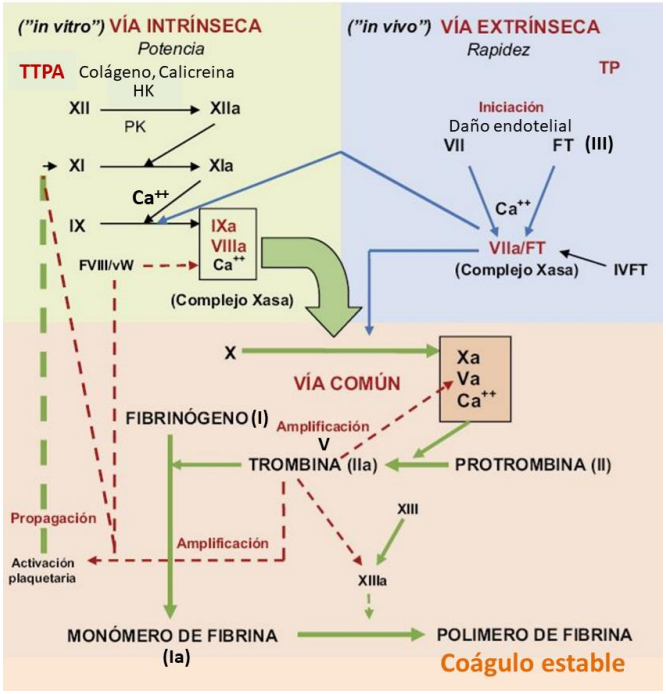


Figura 3: Diagrama de la cascada de coagulación clasificada según la visión clásica de las vías de activación

En negro los factores de la coagulación con su numeración clásica. En rojo los inhibidores de la coagulación. El tiempo parcial de tromboplastina activada (TTPa) es el tiempo requerido para la aparición de fibrina tras mezclar plasma con sustitutos de los fosfolípidos plaquetarios y se usa como screening de alteración en las vías intrínseca y común de la coagulación. El tiempo de protrombina (TP) es la medida de actividad de los factores plasmáticos de la vía extrínseca de la coagulación. FT: Factor Tisular, HK: cininógeno de alto peso molecular, PK: calicreína plasmática, vW: Factor de von Willebrand, CA++: calcio iónico.

La mayoría de los inhibidores de la coagulación se asocian a una superfamilia de proteínas denominada serpinas o inhibidores de proteasas de serina, siendo uno de sus principales representantes la antitrombina III (ATIII), que actúa junto al heparán sulfato para inhibir a la trombina, así como a los factores VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa y la PK. El inhibidor del componente C1 del complemento (C1INH), es una serpina que inhibe a la trombina, la PK, los factores XIa y XIIa. Adicionalmente, otros inhibidores no serpinas son el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), que inhibe al FXa en presencia de la Proteína S y al complejo FXa/FT/FVIIa, así como el sistema formado por la Proteína C/Trombomodulina/Trombina, que inhibe por proteólisis a los factores Va y VIIIa.

Tras la curación del vaso sanguíneo lesionado, el trombo ha se der destruido para reinstaurar la correcta circulación. En este momento se pone en marcha el **sistema de la fibrinólisis.** La plasmina, encargada de la lisis del coágulo, se genera a partir del zimógeno plasminógeno en la superficie del coágulo de fibrina, o en las superficies celulares, mediante el activador tisular del plasminógeno (tPA) o la uroquinasa (uPA). Ambos activadores tienen vidas medias en circulación extremadamente cortas (4-8 minutos), el tPA es sintetizado y liberado por células endoteliales y el uPA es producido por monocitos y macrófagos. Otros activadores descritos

del plasminógeno son el factor XIa, XIIa y la PK. La proteólisis de la fibrina da lugar a productos de degradación de fibrina solubles (FDP). Cuando la plasmina escinde los polímeros de fibrina en el sitio del fragmento D, el fragmento resultante se llama dímero D y refleja el grado de trombosis y actividad de la plasmina [176].

Los inhibidores de la fibrinólisis la controlan estrechamente mediante tres serpinas: el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), el inhibidor del activador del plasminógeno-2 (PAI-2) y la α2-antiplasmina (A2AP). Otros inhibidores de la plasmina distintos de las serpinas incluyen la α2-macroglobulina (A2M), el inhibidor de la esterasa C1 y el inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina (TAFI) que se activa mediante la trombina asociada a trombomodulina[176]. En la **Figura 4** se pueden ver los activadores e inhibidores de la fibrinólisis.

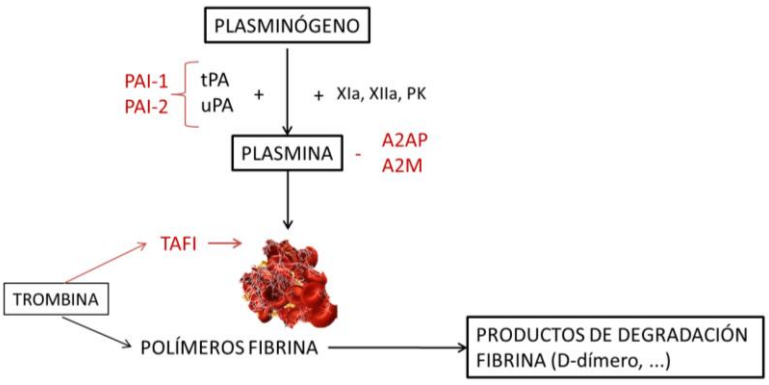


Figura 4: Cascada de la fibrinólisis con sus activadores e inhibidores

tPA: activador tisular del plasminógeno, uPA: activador tisular de la uroquinasa, PAI: inhibidor del activador de plasminógeno, A2AP: α2-antiplasmina, A2M: α2-macroglobulina, TAFI: inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina.

1.2.2. Biomarcadores en anafilaxia

En relación con la anafilaxia, se han investigado diversos biomarcadores de la coagulación con el objetivo de ayudar en su diagnóstico y evaluación. Sin embargo, hasta la fecha los estudios son escasos y no se ha identificado un biomarcador específico de la coagulación que pueda utilizarse de manera confiable y exclusiva para diagnosticar la anafilaxia. En un caso de anafilaxia por picadura de avispa, se observó un tiempo de tromboplastina parcial activada (**TTPa**) prolongado y una actividad **anti-Xa** significativamente elevada, con un nivel de **fibrinógeno** extremadamente bajo con sólo un ligero aumento del **dímero D** [177] . El anti-Xa se basa en la medición de la actividad residual del factor Xa y evalúa la actividad de los inhibidores del factor Xa en el plasma de los individuos[178]. Se hipotetizó que estos efectos

fueron causados por tetrámeros de triptasa estabilizados y por la heparina liberada por los mastocitos. Por un lado, la heparina actúa como anticoagulante uniéndose a la antitrombina y es responsable de la actividad anti-Xa y del TTPa. Por otro lado, los tetrámeros de triptasa actúan directamente sobre la vía fibrinolítica activando la uroquinasa y posteriormente degradando el fibrinógeno, aumentando la presencia de dímero D. Truong HT *et al.*.[179] describieron un estado hiperfibrinolítico (elevación dímero D y productos de degradación de la fibrina) en shock anafiláctico por suxametonio. Nuestro grupo también evaluó el sistema de coagulación en anafilaxia midiendo anti-Xa y TTPa, presentando sólo el 20% de los individuos un TTPa prolongado, y casi todos mostraron un anti-Xa elevado [109]. Como se ha comentado en el apartado de biomarcadores mastocitarios, la quimasa mastocitaria reduce los niveles y función del **FXIIa** y **FXIIIa**. También se ha demostrado que los exosomas derivados de mastocitos activan las células endoteliales para secretar el **PAI-1** [180].

1.3. Sistema de contacto y calicreína-cininas

1.3.1. Definición

El sistema de contacto, también conocido como sistema del cininógeno-calicreína, es una vía proteolítica en el plasma sanguíneo que desencadena respuestas inflamatorias y participa en la regulación de la coagulación y la permeabilidad vascular. Está formado por tres serin proteasas: el FXIIa, la PK y el HK. Estas proteínas plasmáticas se agruparon como sistema de contacto, porque requerían contacto con superficies artificiales cargadas negativamente para la activación del zimógeno in vitro. Tras la activación de este sistema, puede desencadenar la coagulación sanguínea (por vía intrínseca mediante factor XI y XII) y es responsable de la generación de productos proinflamatorios como la BK. Este sistema se denomina sistema calicreína-cinina plasmática [181].

En plasma, alrededor del 75% de la PPK circula unida de forma no covalente a HK, mientras que el resto de la PPK circula libremente [110]. Además de PPK, HK forma un heterodímero con FXI; tanto PK como FXI están unidos a la superficie a través de HK y comparten un sitio de unión de HK conservado [182].

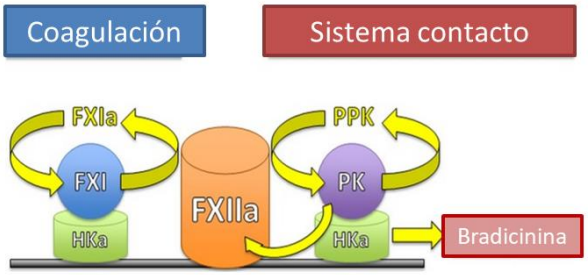


Figura 5: El FXIIa actúa como nexo de unión entre la coagulación y el sistema de contacto. Adaptado de *de Maat 2014*[182].

FXI, factor XI; FXIa, factor XI activado ; HKa, cininógeno de bajo peso molecular ; FXIIa, factor XII activado; PPK, precalicreina plasmática; PK, calicreina plasmática

Una vez que el FXII se une a las superficies, sufre cambios conformacionales para autoactivarse (XIIa) y dejar expuesta su porción con actividad enzimática. El FXIIa cataliza la activación de PPK con la liberación de PK. Mientras tanto, el FXII es cada vez más susceptible a la escisión por la PK y el propio FXIIa, formando así un circuito de retroalimentación de activación, que supera la inactivación de PK y FXII por sus inhibidores homólogos, como el C1INH. Una vez que se activan PK y FXII, el HK de cadena simple se puede escindir en HKa de dos cadenas y liberar BK. La BK se puede unir a 2 tipos de receptores: 1) B2R se expresa constitutivamente en diversas células vasculares y no vasculares y se desensibiliza rápidamente, 2) B1R es inducido por citocinas inflamatorias y resistente a la desensibilización. Cuando se activa la cinina B2R, aumenta la permeabilidad vascular, entre otras cosas a través de la relajación inducida por el óxido nítrico de las células del músculo liso perivascular [183]. La BK es un péptido de vida corta y la principal enzima de degradación es la quininasa II, que también se conoce como enzima convertidora de angiotensina (ECA). Además de la ECA, la BK también es degradada por otras enzimas como la quininasa I, la aminopeptidasa P, la dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV) y la catepsina K. La ECA y la quininasa II son las mismas enzimas que convierten la Angiotensina I inactiva en Angiotensina II. La inhibición de la ECA por fármacos como los IECAs, no sólo disminuye la Angiotensina II, sino que también retrasa la degradación de la BK. El sistema Renina-angiotensina y el sistema calicreína-cinina también interactúan a nivel de receptor mediante dimerización heteróloga entre el receptor de angiotensina tipo 1 (AT1) y el receptor de angiotensina tipo 2 (AT2), que modula las vías de señalización del receptor (**Figura 6**).

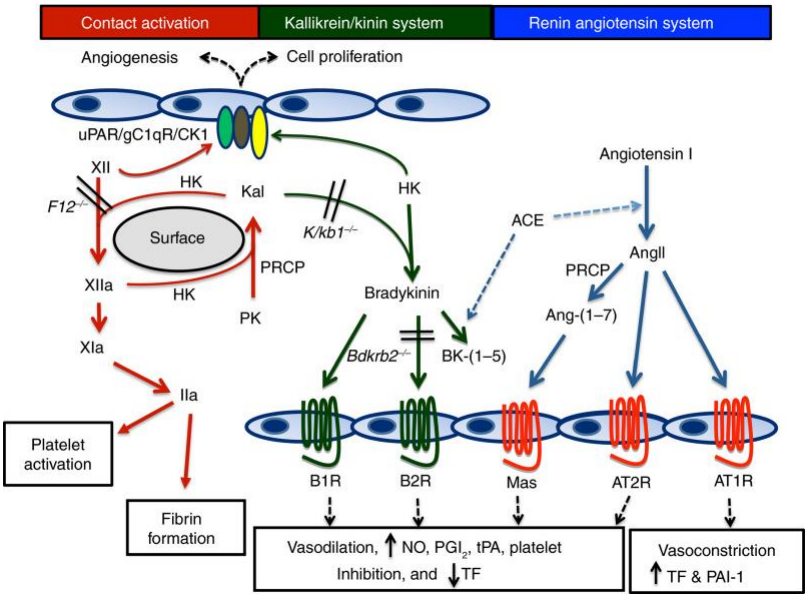


Figura 6: Vías de interacción entre el sistema de contacto, el sistema calicreína-bradicinina y el sistema renina angiotensina [181]

La activación del sistema de contacto conduce a la generación de trombina con formación de coágulo de fibrina y activación plaquetaria. La eliminación del factor XII (FXII) (p. ej., ratones F12/) o FXI (p. ej., ratones F11/) reduce la formación de trombina y la trombosis por activación por contacto. La activación del sistema calicreina/cinina con estimulación del B2R y del B1R da como resultado vasodilatación con formación de óxido nítrico (NO), liberación de PGI2 (prostaciclina) y liberación del activador tisular del plasminógeno (tPA), lo que conduce a la inhibición plaquetaria y a la reducción del factor tisular (TF) de la pared vascular. La bradicinina es metabolizada por la enzima convertidora de angiotensina (ACE) para producir bradicinina-(1-5). La actividad de la ACE también produce angiotensina II (AngII) a partir de angiotensina I. Normalmente, el receptor de angiotensina 1 (AT1R) es dominante en la expresión en el compartimento intravascular y la AngII da como resultado vasoconstricción con TF elevado e inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1). AngII se une al AT1R y al AT2R con igual afinidad. AngII es degradada por la prolicarboxipeptidasa (PRCP) en angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)). Ang-(1-7) se une a un receptor Mas. El agonismo combinado de AT2R y Mas, da como resultado una mayor liberación de PGI2 que reduce el TF de la pared vascular e inhibe la activación plaquetaria. IIa, factor II activado; XIa, factor XI activado; XII - factor XII; XIIa - factor XII activado; HK, cininógeno de alto peso molecular, PK, precalicreína plasmática; Kal, calicreina plasmática, BK, bradicinina; B1R, receptor 1 de la bradicina; B2R, receptor 2 de la bradicina; AngII, angiotensina II; ACE, enzima convertidora de angiotensina; AT1R, receptor 1 de la angiotensina; AT2R, receptor 2 de la angiotensina.

Debido a que actúan sobre las vías que regulan la biodisponibilidad de bradicinina, muchos fármacos cardiovasculares y diabéticos han sido foco de sospecha como causa de angioedema mediado por BK. Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y los inhibidores de neprilisina alteran el catabolismo de BK. Los inhibidores de la dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV) reducen la degradación de BK y la sustancia P (SP). Además, los bloqueadores de los receptores de angiotensina, los agentes trombolíticos y las estatinas también podrían incrementar la presencia de BK en plasma y potencialmente causar angioedema [66].

Se han descubierto varios inhibidores endógenos de las proteasas del sistema de contacto en el plasma humano, dirigidos a diferentes miembros de la cascada proteolítica[110] (**Figura 7**). El más importante es el **C1INH**, una glicoproteína de 105 kDa codificada por el gen producida principalmente en el hígado y también en monocitos activados[184]. El C1INH es capaz de inhibir

el sistema de contacto por su acción sobre el XIIa, el PK, la PPK y también inhibe la activación de XIIa a través de la inhibición de la plasmina de la vía fibrinolítica. La **antitrombina (AT)** es una glicoproteína de 52 kDa codificada por el gen *SERPING1* también producida principalmente por hepatocitos. Sus dianas inhibitorias dentro del sistema de contacto incluyen FXIa, FXIIa y PK. La actividad inhibidora de AT aumenta en gran medida mediante la unión a la heparina. La **alfa-2-antiplasmina (α2AP)** es un inhibidor de la serina proteasa de 70 kDa codificado por el gen SERPINF2 producido principalmente en el hígado. Es el principal inhibidor de la plasmina e inhibe también el FXII y la actividad del tPA. La **alfa-2-macroglobulina (α2M)** es una glicoproteína de 180 kDa codificada por el gen A2M producida principalmente en el hígado y, en menor medida, en macrófagos y fibroblastos. α2M se dirige a PK y FXIIa, pero también a otras proteasas plasmáticas, incluidas la plasmina o la trombina.

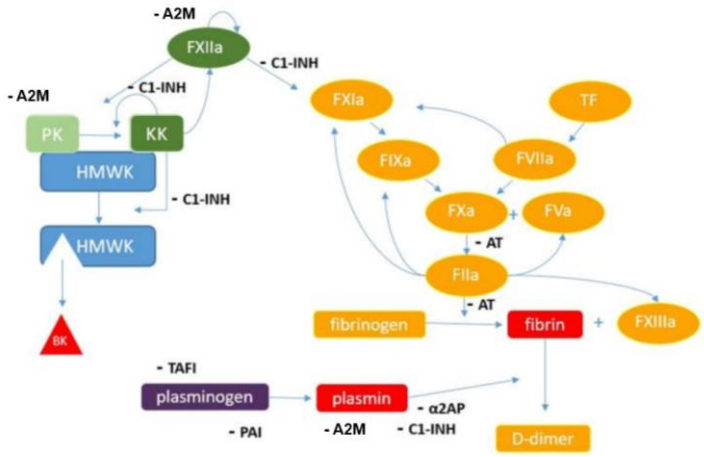


Figura 7: Principales vías de inhibición del sistema de contacto, algunas de ellas comunes con la coagulación y la fibrinólisis.

C1-INH es el inhibidor más importante de la activación por contacto y un inhibidor débil de la plasmina. La antitrombina (AT) inhibe la coagulación y la α-2-antiplasmina inhibe la plasmina; Los complejos entre enzimas y estos inhibidores se pueden medir en plasma como biomarcadores de activación por contacto, coagulación y fibrinólisis. PAI-1 inhibe la activación del plasminógeno mediante la inhibición de tPA y uPA. TAFI modula el plasminógeno para evitar la activación. Abreviaturas: factor tisular TF, factor XII activador FXIIa, precalicreína plasmática PK, calicreína KK, cininógeno de alto peso molecular HMWK, bradicinina BK, inhibidor C1-INH C1, antitrombina AT, antiplasmina α2APα2, inhibidor de fibrinólisis activable por trombina TAFI , inhibidor del activador del plasminógeno PAI, activador del plasminógeno tisular tPA, uroquinasa del activador del plasminógeno uPA. Adaptado de Hofman 2016[128]

1.3.2. Biomarcadores en anafilaxia

Durante una reacción anafiláctica el angioedema puede ser una de las manifestaciones clínicas y puesto que se ha relacionado la liberación de BK en procesos en los que hay vasodilatación masiva, el interés en buscar biomarcadores dentro del sistema de contacto es indudable. La **BK** sólo está presente en la circulación durante unos segundos después de ser liberada por el HK, y los productos de activación del sistema de contacto en plasma tienden a sufrir activación

preanalítica in vitro, por lo que las mediciones precisas han demostrado ser desafiantes y relativamente laboriosas. Se ha observado un fuerte consumo de factores del sistema de contacto en modelos de anafilaxia en ratones mediados por IgE[185]y en individuos con anafilaxia[109] . La deficiencia o inhibición farmacológica de FXII, calicreína plasmática, HK o el receptor de bradicinina B2 (BK2R), atenuó en gran medida la hiperreactividad de los mastocitos mediada por alérgenos/IgE en ratones[109]. En este estudio, tanto los ratones con deficiencia de FXII como de BK2R, resistentes a la señalización de BK, estuvieron protegidos de la hipotensión sistémica durante las reacciones anafilácticas, lo que indica que el sistema de contacto está activo y contribuye a la anafilaxia sistémica. En individuos con shock anafiláctico a la inmunoterapia con veneno de abeja, se ha visto activación de la coagulación intravascular y disminución de la HMWK plasmática[186] y se ha descrito que la prueba de provocación en individuos con anafilaxia inducida por picadura promueve la generación de complejos de XIIa-C1INH y calicreína-C1INH, así como escisión de HK[159]. Sala-Cunill *et al.*[109] demostraron la activación del FXII y la calicreína plasmática en individuos con anafilaxia inducida por alimentos o fármacos, así como una escisión del HK asociada a degranulación de los mastocitos y liberación de heparina al plasma. En este estudio, incluso los individuos con una reacción moderada A (síntomas gastrointestinales) mostraron una degradación del 60 % de su reserva de HK. La evidencia de la relevancia clínica de la bradicinina durante la anafilaxia con hipotensión se demostró aún más en modelos animales. En particular, la activación del sistema de contacto impulsada por mastocitos no está asociada con la activación del FXI sino que es la heparina la que desencadena la cascada de coagulación intrínseca[143]. En conjunto, estos hallazgos indican que la degranulación de los mastocitos durante la anafilaxia puede desencadenar la activación de factor XII y la generación de BK a través de la liberación de heparina, triptasa y posiblemente poliP, elastasa u otros mediadores. Sin embargo, es necesario explorar más a fondo el papel de otros mediadores de mastocitos en la activación del sistema de contacto.

1.4. Interrelación del sistema de la coagulación, la fibrinólisis y el sistema de contacto

Como se ha desarrollado en los puntos anteriores, los tres sistemas de coagulación, fibrinólisis y sistema de contacto, se interrelacionan en múltiples puntos y por tanto pueden retroalimentarse en su activación y modular su inhibición. En la **Figura 8** se resumen las vías de activación del mastocito y su interacción con los tres sistemas.

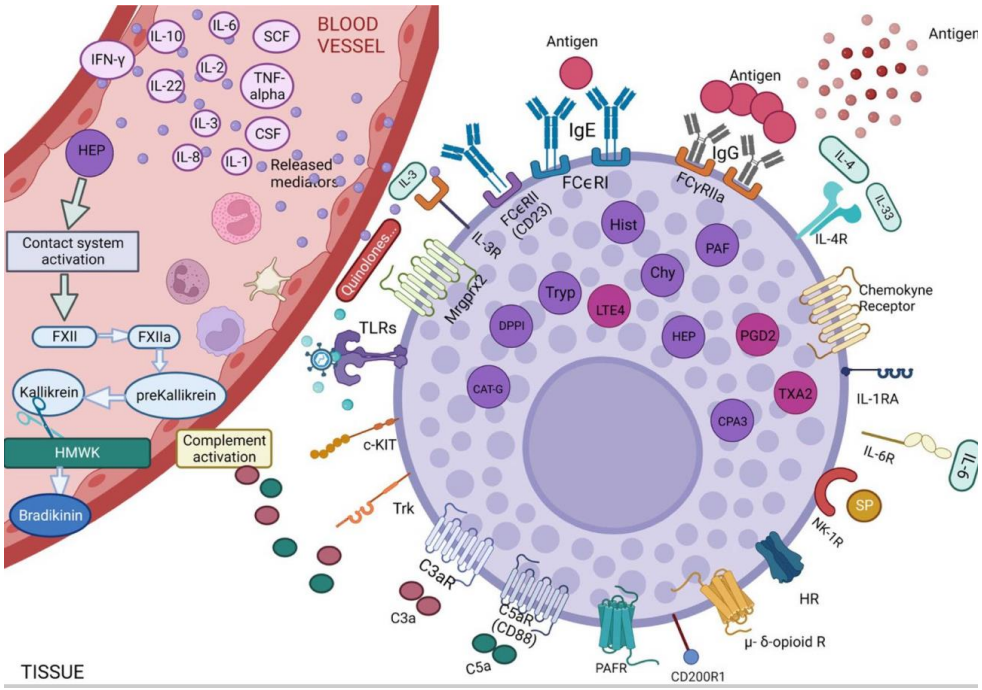


Figura 8: Los diferentes receptores y mediadores de activación del mastocito incluyendo la vía de la coagulación y del sistema de contacto.

FcεRI, receptor de IgE de alta afinidad; FcεRII (CD23), receptor de IgE de baja afinidad; FcγRIIa, receptor de IgG; Mrgprs, receptor acoplado a proteína G relacionado con Mas; Trk, receptor de tirosina quinasa; TLR, receptor tipo Toll; HR, receptor de histamina; PAFR, receptor del factor activador de plasmina; NK-1R, receptor 1 de neuroquinina; Tryp, triptasa; Hist, histamina; PAF, factor activador plaquetario; Chy, quimasa; CPA3, carboxipeptidasa A3; DPPI, dipeptidil peptidasa I/catepsina C; CAT-G, catepsina G; LTE4, producto de lipoxigenasa E4; PGD2, prostaglandina D2; TXA2, tromboxano A2; HEP, heparina; FXII, factor XII; FXIIa, factor XII activado; LCR, factor de células madre; HMWK, cininógeno de alto peso molecular; TNF-alfa, factor de necrosis tumoral alfa. Adaptada de Galván-Blasco P *et al.*. 2022[187]

La activación de los 3 sistemas secundaria a la activación de célula mastocitaria, como se ha comentado anteriormente, también ha sido extensamente descrita. En la **Figura 9** se muestran los puntos de unión entre los 3 sistemas.

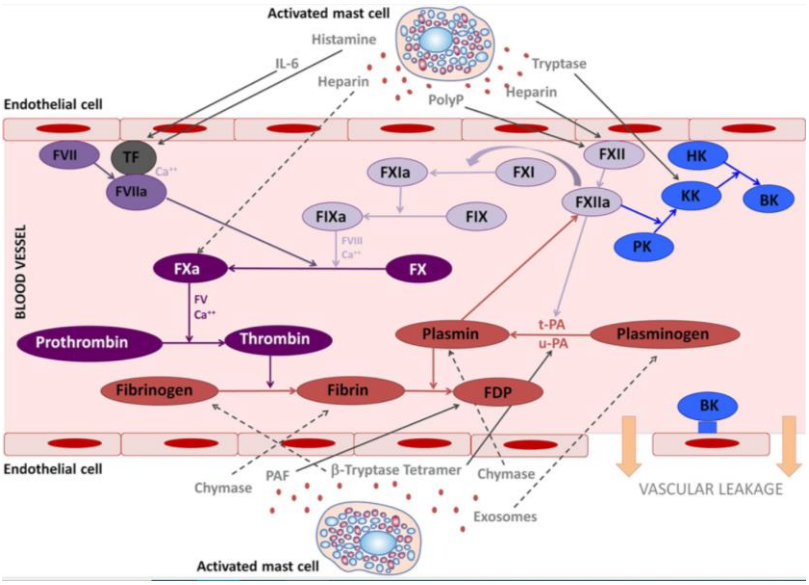


Figura 9: La participación de los mediadores de los mastocitos en la coagulación y el sistema calicreína-quinina

La figura ilustra los efectos que los mediadores de los mastocitos liberados tras la activación durante la anafilaxia ejercen en los sistemas calicreína-cinina, coagulación y fibrinolítico. Las líneas continuas representan vías activadas. Las líneas discontinuas son vías inhibidoras. Los factores del sistema formador de quininas están representados en azul; el sistema fibrinolítico está representado en rojo; la vía común de coagulación en violeta oscuro; la vía de coagulación extrínseca en violeta medio; la vía de coagulación intrínseca en violeta claro. PolyP, polifosfatos; TF, factor tisular; PK: precalicreína; KK, calicreína; BK, bradicinina; HK, cininógeno de alto peso molecular; tPA, activador del plasminógeno tisular; uPA, activador del plasminógeno uroquinasa; FDP, productos de degradación de fibrina; PAF, factor activador de plaquetas. Adaptado de Guilarte 2017 [143]

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

En la actualidad no existe aún una prueba diagnóstica que confirme el diagnóstico de anafilaxia. El diagnóstico sigue siendo clínico con biomarcadores que ayudan a apoyar el diagnóstico con mayor o menor precisión, y sabiendo que estos biomarcadores se pueden ver alterados por la interacción de múltiples vías. La triptasa es el biomarcador con uso más extendido, no obstante, no es un biomarcador óptimo para anafilaxia puesto que hasta en el 35% de las reacciones no se objetiva su elevación.

Existen otras entidades en las que está implicado el mastocito que pueden hacer difícil el diagnóstico diferencial de la anafilaxia, como la urticaria y el angioedema. Se desconoce por qué mecanismos algunas personas sólo presentan urticaria o angioedema, algunas presentan las dos entidades juntas y otras presentan reacciones sistémicas con afectación de otros sistemas además o sin la afectación cutánea.

La triptasa no nos permite endotipar los mecanismos de activación celular detrás de un fenotipo concreto que cumpla los criterios de anafilaxia. Las reacciones en las que el mastocito no está especialmente implicado (como por ejemplo en las reacciones con fármacos biológicos o quimioterápicos) aún no disponen de biomarcadores óptimos de técnica rutinaria. En las reacciones infusionales por liberación de citocinas se han descrito algunas citocinas que resultan elevadas respecto su determinación basal y esto apunta a que un panel de estos biomarcadores podría ser útil para endotipar las reacciones. Hoy en día no hay suficiente conocimiento sobre los grupos celulares implicados en estas reacciones ni si estos grupos celulares o sus citocinas se liberan en la anafilaxia mediada por mastocito y especialmente la IgE mediada. Además, no existe hoy en día una explicación fisiopatológica que justifique por qué durante la anafilaxia algunos individuos presentan clínica cutánea, respiratoria, digestiva, circulatoria o neurológica. El mejor conocimiento de los mecanismos que determinan los distintos fenotipos ayudaría a comprender mejor la fisiopatología de la anafilaxia y qué células y tejidos interactúan entre ellos cuando ésta se desencadena.

Hay que encontrar nuevos biomarcadores que ayuden a endotipar las reacciones anafilácticas y ahondar en los factores intrínsecos y extrínsecos del paciente y la reacción para entender mejor los diferentes fenotipos que nos encontramos. Entender adecuadamente el mecanismo de la anafilaxia y sus factores de riesgo permitirá hacer un mejor diagnóstico, un mejor tratamiento y una mejor prevención en el futuro.

Nuestro grupo ha demostrado la activación del sistema de contacto en la anafilaxia[109]. En otras enfermedades mediadas por mastocitos y el sistema de contacto se ha demostrado que parámetros de la coagulación y la fibrinólisis se ven alterados y se han postulado como biomarcadores prometedores. Los datos apuntan que éstos podrían aportar valor en el diagnóstico, endotipado y fenotipado de las anafilaxias.

3. HIPÓTESIS

Existe un biomarcador de anafilaxia que complementa o supera a la triptasa para apoyar al diagnóstico de la anafilaxia y éste se haya en el sistema de la coagulación, en el sistema de la fibrinólisis, en el sistema de contacto o en un conjunto de citocinas.

4. OBJETIVOS

4.1. Principal

Investigar nuevos biomarcadores del sistema de la coagulación y de la fibrinólisis, del sistema de contacto y citocinas implicados en la fisiopatología de la anafilaxia.

4.2. Secundarios

1. Determinar si existen diferencias demográficas entre la anafilaxia y la urticaria y el angioedema y así como entre los controles e identificar factores de riesgo y de gravedad.

2. Determinar si hay diferencias en los valores de triptasa sérica, de los biomarcadores del sistema de la coagulación, de la fibrinólisis y del sistema de contacto y citocinas en individuos con anafilaxia según la etiología de ésta.

3. Identificar si hay un biomarcador de la coagulación, la fibrinólisis, el sistema de contacto o citocinas que complemente, iguale o mejore a la triptasa sérica y que ayude a diferenciar entre anafilaxia, urticaria y angioedema.

4. Identificar si hay un biomarcador del sistema de la coagulación, de la fibrinólisis, o del sistema de contacto o citocinas que ayude a endotipar y a fenotipar la anafilaxia, la urticaria y el angioedema.

5. METODOLOGÍA

5.1. Diseño del estudio y selección de individuos

Para alcanzar los objetivos, esta tesis se divide en dos trabajos. En el primer trabajo se incluyeron pacientes con anafilaxia y se determinaron biomarcadores dels sistema de contacto, de la coagulación, de la fibrinólisis, así como un perfil de citosina stanto durante el episodio de anafilaxia como basalmente. En el segundo trabajo se incluyeron pacientes con urticaria, angioedema y controles para comparra si existían diferencias con la anafilaxia en los biomarcadores estudiados.

5.1.1. Primer trabajo

Se realizó un estudio observacional transversal unicéntrico en el que se incluyeron individuos mayores de 18 años que acudían a urgencias, hospital de día o consultas externas de Alergología del Hospital Universitario Vall d'Hebron con diagnóstico de anafilaxia según los criterios de la EAACI y GALAXIA y corroborado por un especialista de alergología, desde enero de 2017 hasta abril de 2019. A estos individuos, previa firma de un consentimiento informado, se les realizó una o dos extracciones de sangre durante el momento agudo de la anafilaxia (30min-2h y/o 6-12h) y una extracción basal días más tarde (> 48 horas del episodio) en la visita en consultas externas de Alergología según los intérvalos del protocolo habitual de determinación de triptasa sérica[96] (**Figura 10**). La sanre obtenida, tanto plasma como suero, se centrifugó, se alicutotó y se conservó a -80ºC hasta su análisis. En la visita posterior en consultas externas de Alergología se realizó una anamnesis detallada para obtener todos los datos demográficos y clínicos (edad, sexo, etnia, zona de residencia, hábitos tóxicos, antecedentes familiares, antecedentes personales, antecedentes patológicos, medicación habitual) y las circunstancias relacionadas con la reacción anafiláctica (etiología, cofactores, manifestaciones clínicas, tratamiento recibidoy repuesta al mismo, tiempo de ingreso). También se realizaron cuando fue necesario pruebas cutáneas intraepidérmicas y/o intradérmicas, determinación de IgE específica por ImmunoCAP y/o prueba de provocación. Con los datos obtenidos se realizó la orientación diagnóstica final para clasificar la gravedad de la anafilaxia y establecer el endotipo y fenotipo de ésta.

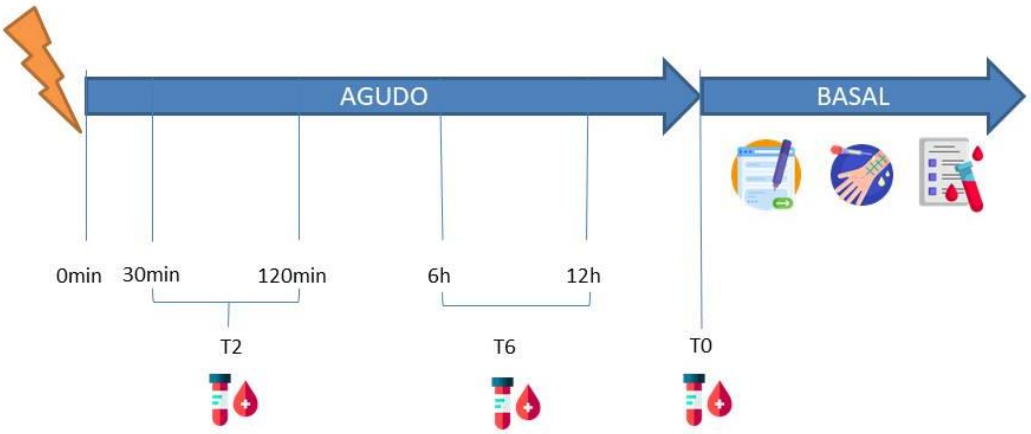


Figura 10: Diseño de la obtención de muestras dentro del estudio

5.1.2. Segundo trabajo

Se realizó un estudio observacional longitudinal de casos controles unicéntrico para comparar individuos anafilaxia con individuos con urticaria o angioedema y controles. Por tanto, se incluyendo los individuos del primer trabajo (individuos adultos > 18 años que acudían a urgencias, hospital de día o consultas externas de Alergología del Hospital Universitario Vall d'Hebron con diagnóstico de anafilaxia según los criterios de la EAACI y GALAXIA y corroborado por un especialista de alergología), así como también individuos que acudían a urgencias o consultas externas con episodio agudo de urticaria o angioedema. Los controles se seleccionaron de individuos adultos de > 18 años que consultaron en consultas externas de alergología atópicos y no atópicos sin antecedente de anafilaxia, urticaria o angioedema y que dieron su consentimiento para participar en el estudio. La inclusión de individuos se realizó desde enero de 2017 hasta abril de 2019. A estos individuos se les realizó con su consentimiento una o dos extracciones de sangre durante el momento agudo del brote de urticaria y angioedema (30min-2h y/o 6-12h) y una extracción basal días más tarde (> 48 horas del episodio) en la visita en consultas externas de Alergología. A los controles sólo se les realizó una única extracción basal. En la visita en consultas externas se realizó además una anamnesis detallada para obtener todos los datos demográficos y clínicos y las circunstancias relacionadas con el episodio de urticaria y angioedema (etiología, cofactores, clínica, tratamiento, repuesta al tratamiento, tiempo de ingreso). También se recogieron las pruebas de alergología realizadas posteriormente (pruebas cutáneas, IgE específica ImmunoCAP) y la orientación diagnóstica final para catalogar el endotipo de la urticaria y el angioedema.

5.2. Aspectos éticos y consentimiento informado

Todos los individuos dieron su consentimiento por escrito para participar en el estudio, que fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario Vall d'Hebron (PR…..). La colaboración en este estudio no supuso pruebas diagnósticas adicionales para el paciente a las que se realizan en la práctica habitual.

5.3. Datos demográficos y clínicos

Se recogieron los siguientes datos demográficos: sexo, edad, tabaquismo, enolismo, otras drogas, zona de residencia (urbana o rural), etnia, antecedentes familiares de atopia, antecedentes personales de atopia (rinitis, asma, alergia alimentaria, urticaria, angioedema, anafilaxia, alergias a medicamentos, dermatitis atópica, dermatitis de contacto).

5.4. Clasificación de la gravedad de la anafilaxia

La gravedad de la anafilaxia se clasificó en función del sistema de gradación publicado por Sala-Cunill *et al.*[188] basada en síntomas clínicos (**Tabla 4**).

Tabla 4: Clasificación de la gravedad de la anafilaxia

Grado	Clínica
1 - Leve	Piel + mucosas
2 – Moderado A	Dolor abdominal, vómitos, diarrea
3 – Moderado B	Disnea baja, broncoespasmo, afectación laríngea, opresión torácica
4- Grave	Cianosis o SatO2 < 92% aa, hipotensión (TAS < 90mmHg), mareo intenso, síncope o incontinencia
5- Fatal	Parada cardiorrespiratoria

5.5. Etiología de la anafilaxia

Se clasifico la etiología de la anafilaxia en los siguientes grupos: alimento, fármaco (no biológico), fármaco biológico, quimioterápico, veneno de himenóptero, látex, anisakis, medio de contraste iodado, medio de contraste paramagnético, suero/plasma y causa desconocida.

5.6. Factores de riesgo para la anafilaxia

Se recogieron datos relacionados a factores implicados en la gravedad de la anafilaxia descritos y también datos exploratorios de posibles: edad, factores de riesgo cardiovascular, enfermedad pulmonar, otras enfermedades atópicas, mastocitosis, hábitos tóxicos, enfermedades metabólicas, enfermedades del tracto digestivo, insuficiencia renal o hepática, enfermedades psiquiátricas, espina bífida, enfermedades del sistema inmune, uso habitual de

fármacos (IECA, β-bloqueantes, β2-agonsitas, corticoides inhalados, corticoides sistémicos, antihistamínicos H1 o H2, antileucotrienos, AINE, inmunosupresores, cromoglicato disódico, opiáceos y anticoagulantes).

Se preguntó a los individuos tanto en el momento agudo y/o en la visita de control sobre la presencia de los siguientes cofactores durante el episodio: alcohol, AINE, ejercicio, estrés, menstruación, falta de sueño, infecciones.

5.7. Endotipo de anafilaxia y angioedema

El mecanismo fisiopatológico de la anafilaxia se clasificó en cinco tipos: "endotipo IgE-mediado", "endotipo no IgE mediado/inhibición COX-1", "endotipo liberación de citocinas", "endotipo mixto", y "endotipo desconocido". El "endotipo desconocido" corresponde a aqueloos casos en los que tras el estudio alergológico no pudo determinar el mecanismo subyacente.

En la **Tabla 5** se muestran las características de cada endotipo.

Tabla 5: Características clínicas e inmunológicas de los distintos endotipos de la anafilaxia

IgE mediado	Alérgeno conocido, prueba cutánea positiva. Clínica en los primeros 60min de su contacto sugestiva de liberación de mediadores mastocitarios.
No IgE mediado / inhibición COX-1	Alérgeno AINE, prueba cutánea negativa, clínica con más de un AINE sin similitud estructural. Clínica más allá de los 60min de su contacto sugestiva de mecanismo inhibición COX-1 (angioedema palpebral o broncoespasmo)
Liberación de citocinas	Alérgeno fármaco biológico o quimioterápico, prueba cutánea negativa. Clínica en los primeros 30min de su contacto sugestiva de liberación de citocinas.
Mixto	Alérgeno fármaco biológico o quimioterápico, prueba cutánea negativa, elevación de triptasa. Clínica en los primeros 30min de su contacto sugestiva de liberación de mediadores mastocitarios y citocinas.
Desconocido	No cumple ninguno de los anteriores endotipos

COX-1: ciclooxigenasa 1

El mecanismo fisiopatológico del angioedema se clasificó según trabajos previos de la literatura en los siguientes tipos: "endotipo mediado por mastocito", "endotipo mediado por bradicinina" y "endotipo por IECA".

Como el mecanismo patogénico de la urticaria tanto aguda como crónica incluye un solo endotipo, mediado por mastocitos, esta entidad se clasificó en aguda o crónica según si su duración era inferior o superior a 6 semanas.

5.8. Fenotipos de la anafilaxia

Para fenotipar la anafilaxia se agruparon los síntomas clínicos de la anafilaxia según los distintos aparatos o sistemas implicados. Se establecieron siete fenotipos: circulatorio o

cardiovascular, respiratorio, vía respiratoria superior (VRS), vía respiratoria inferior (VRI), digestivo, cutáneo y neurológico.

5.9. Obtención de muestras, procesamiento y almacenamiento

Tal y como muestra la **Figura 10**, las muestras se obtuvieron en el momento agudo de la reacción o el brote en 1 o 2 intervalos de tiempo: entre los 30min y las 2h del inicio de la clínica (T1) y entre las 6 y las 12h del inicio de la clínica (T2). Posteriormente se obtuvo una muestra basal (T0) más de 48h después del episodio agudo del paciente, en estado basal (T0), indiscriminadamente en ayunas o no.

Muestras de suero

La extracción de sangre se realizó utilizando tubos Vacutainer SST® con gelosa (BD S.A., Madrid, España). A cada paciente se le extrajeron tres tubos de 5mL en cada intervalo de tiempo. Tras la extracción se dejó coagular la sangre a temperatura ambiente durante 1 hora y posteriormente se centrifugó a 3000 G durante 5 minutos. El suero sobrenadante se recogío con una pipeta Pasteur y se alícuoto 500 microlitros en tubos Eppendorf® (Eppendorf Ibérica. Madrid. España) de 1,5 ml. Los tubos fueron debidamente etiquetados con el número del paciente y almacenados a menos 20ºC hasta su análisis.

Muestras de plasma

La extracción de sangre se realizó utilizando tubo con citrato trisódico 0,129M 3,8% Vacutainer SST® (BD S.A., Madrid, España). Inmediatamente tras la extracción se invirtió suavemente el tubo para favorecer que la sangre se mezclará bien con el anticoagulante. A cada paciente se le extrajeron 4 tubos de 5 ml por intérvalo de tiempo. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 2500 g durante 15 minutos. El plasma sobrenadante se recogió en una pipeta Pasteur y se procedió a alicuotar 500 microlitos en tubos de Eppendorf® (Eppendorf Ibérica, Madrid, España) de 1,5 ml. Los tubos fueron debidamente etiquetados con número del paciente y almacenados a menos 80ºC para optimizar la preservación del plasma. Su manipulación posterior se hizo con hielo seco para prevenir la descongelación del plasma.

5.10. Estudio alergológico: pruebas cutáneas, IgE específica, prueba de exposición

Pruebas cutáneas

Se realizaron pruebas cutáneas intraepidérmicas (prick test) y pruebas intradérmicas para determinar el alérgeno responsable de la anafilaxia. Para llevar a cabo estas pruebas, el paciente debía suspender la toma de antihistamínicos y corticoides una semana antes de su realización. Se utilizó una batería estándar de alérgenos ambientales y de alimentos Leti (Leti unipersonal SL, Madrid, España) de nuestro centro, que incluyen: *Dermatophagoides pteronyssinus, Dermatophagoides farinae*, epitelio de perro, epitelio de gato, *Aspergillus spp., Alternaria alternata, Penicillium spp.,* látex, *Cupressus sempervirens, Olea europea, Platanus acerifolia, Parietaria judaica, Artemisia vulgaris, Plantago lanceolata, Phleum pratense*, anisakis, nuez, avellana, melocotón (piel y pulpa), lentejas, garbanzos, gluten mezcla de harinas, pescado, gamba, huevo y leche. Cuando el causante de la reacción fue un fármaco, se realizaron las pruebas cutáneas (prick test e intradérmicas) al fármaco implicado a la concentración específica según el Tratado de Alergología de la SEAIC (Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica)[189]. Se utilizó a a concentración de 10 miligramos mililito y como control negativo suero fisiológico estéril 0,9%. Las pruebas cutáneas se realizarán mediante el procedimiento estándar en la cara a volar del antebrazo utilizando lancetas de punta de 1 mm estériles de la casa comercial ALK (ALK-Abelló, S.A., Madrid, España). Se utilizó una lanceta para cada alérgeno para evitar contaminaciones. Transcurrido 15 minutos de la prueba prick test se consideraron positivas pápulas cuyo diámetro mayor era igual o superior a 3 mm, siendo el control con suero fisiológico negativo[190]. En el caso de las pruebas intradérmicas, se inyectó una concentración de entre 0.02-0.04 ml del fármaco a la concentración indicada y se esperó unos 20 minutos a hacer la lectura. Se consideran positivas pruebas cutáneas en la cual la pápula había crecido más de 1,5 mm y presentaban eritema acompañante[190].

Determinación de la Inmunoglobulina E específica

Las concentraciones de Inmunoglogulina E específica (sIgE) frente a los alérgenos potencialmente implicados se cuantificaron con InmunoCAP™ (Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Suecia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se expresan en kilo-

unidades por litro (KU/L) como indica el fabricante, se consideran resultados positivos si la sIgE era superior a 0,35 KU/L.

Prueba de exposición controlada con o sin placebo (PEC)

En caso de prueba cutánea negativa al alimento o al fármaco implicado o búsqueda de un AINE alternativo se realizó en el Hospital de Dïa de Alergología una prueba de exposición controlada parenteral u oral graduada en todos los individuos que accedieron, incluidos los individuos con prick test positivo y/o sIgE positiva si había dudas sobre su implicación en la reacción. Tanto un médico como una enfermera estuvieron presentes en todo momento y la PEC se realizó siguiendo las recomendaciones de ENDA[191] y PRACTALL[192] y siguiendo las recomendaciones del documento RESCAL de la SEAIC[193]. La primera dosis se administró con 1/10 parte de dosis del alimento o, en caso de tratarse de un fármaco, administrando una capsula preparada de farmacia con lactosa (placebo). Antes de cada dosis, el paciente se sometía a un examen clínico que incluya inspección de la piel, auscultación pulmonar, auscultación abdominal y medición de la presión arterial, frecuencia cardíaca y saturación de oxígeno. Además, se preguntó al paciente si presentaba prurito (en la mucosa bucal, la piel o ambas), síntomas laríngeos, dolor abdominal, mareos y cualquier otra molestia nueva. Si no se observó reacción, se administró una segunda dosis correspondiente ¼ parte de dosis 30 minutos después de la primera dosis. Si tampoco se observaba reacción, se administró una tercera dosis correspondiente al resto de la dosis del alimento o fármaco. Los individuos fueron observados durante 120min antes de abandonar el hospital. La PEC se detuvo si se producía una reacción clínica significativa sgún las guias ENDA[191] y PRACTALL[192] y el criterio del alergólogo que ese día estaba de responsable en Hospital de día.

5.11. Determinación de triptasa en suero

Los niveles de triptasa sérica se midieron mediante la técnica comercial de fluoroinmunoensayo ImmunoCAP™ (Thermo Fisher, Scientific Uppsala, Suecia) de forma rutinaria y siguiendo las instrucciones del fabricante. La sensibilidad de la prueba es de 1 microgramo por litro (mcg/L). La concentración sérica de triptasa superior a 11,4 mcg/L se consideró elevada en muestras basales según recomendación de fabricante. La elevación de la triptasa aguda respecto la basal de 120% +2 se consideró significativa (curva de triptasa positiva)[194].

5.12. Estudio de biomarcadores de la coagulación y la fibrinólisis

Cuantificación del tiempo parcial de protrombina

Para medir la actividad de la vía extrínseca de la coagulación se cuantifico el tiempo parcial de protrombina (TTPA). La determinación se realizó en las muestras de plasma en el momento de su procesamiento con la técnica de rutina del laboratorio clínico de nuestro hospital mediante estudio coagulométrico, siendo el rango de referencia de la prueba 15,8-23,8 segundos como intervalo dentro de la normalidad[195].

Cuantificación del Factor XI y Factor XII de la coagulación

La determinación del Factor XI y del Factor XII de la coagulación se utilizaron como marcadores de la actividad de la vía intrínseca de la coagulación. Mediante estudio coagulométrico se determinaron los valores en las muestras de plasma en el laboratorio clínico de nuestro hospital, siendo 65-150% el rango de referencia de la normalidad para e Factor XI y 50-150% para el Factor XII[195].

Cuantificación de la enzima convertidora de angiotensina

La determinación de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) se realizó mediante espectrofotometría en las muestras de plasma en el momento de su procesamiento con la técnica de rutina del laboratorio clínico de nuestro hospital, siendo el rango de referencia de la prueba 13-63 U/L como intervalo dentro de la normalidad[195].

Cuantificación del anti-Xa

Para determinar de forma indirecta a los niveles de heparina se estudiaron los niveles de anti-Xa (UI/ml). Se utilizó el sistema automático de coagulación sanguínea según técnica rutinaria del laboratorio del Hospital, siendo siendo el rango de referencia de la prueba 0,20 i 0,50 UI/ml[195] en pacientes no heparinizados.

Cuantificación del fibrinógeno

La determinación se realizó en las muestras de plasma en el momento de su procesamiento con la técnica de rutina del laboratorio clínico de nuestro hospital por el método Von Clauss. Se calcula directamente a partir del tiempo de coagulación obtenido con un reactivo específico de trombina. El rango de referencia de la prueba 2,38-2,98 g/L como intervalo dentro de la normalidad[195].

Cuantificación del dímero D

Los niveles de dimero D se utilizaron como biomarcador de la firbinolisis. Se estudiaron mediante inmunoensayo de partículas de látex en las muestras de plasma según la técnica de rutina del laboratorio clínico de nuestro hospital. El rango de referencia de la prueba es de 0-243 ng/ml como intervalo dentro de la normalidad[195].

Cuantificación del complejo plasmina-alfa-2-antiplasmina (PAP)

Esta técnica se realizó en el Laboratorium voor Klinische Chemie en Hematologie (LKCH) de la University Medical Center (UMC) de Utrecht en las muestras de plasma, que fueron enviadas en condiciones de congelación a -20ºC mediante correo aéreo. El complejo plasmina-alfa-2-antiplasmina (PAP) es un marcador de actividad fibrinolítica, existiendo una correlación entre el nivel de productos de división de fibrina y el nivel de complejos PAP[196]. Se utilizó un kit comercial Kit ELISA complejo PAP TECHNOZYM®. Estel kit se basa en un anticuerpo de captura monoclonal que se dirige contra el sitio neoantigénico del complejo, un epítopo que solo se expresa en los propios complejos. Por lo tanto, este anticuerpo es específico sólo para complejos y no reconoce la α2-antiplasmina ni el plasminógeno libres. La detección de complejos unidos se realiza con un segundo anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa que reconoce un epítopo diferente en el complejo.

El protocolo detallado del procedimiento se encuentra en el **Anexo 11.1**.

5.13. Estudio del complemento

C3 y C4

La determinación de C3 y C4 se realizaron en las muestras de suero mediante nfelometría en el laboratorio clínico de nuestro hospital, siendo el rango de referencia 85-180 mg/dL y 10-40 mg/dL, respectivamente, como intervalo dentro de la normalidad[195].

C1 inhibidor funcional y cuantitativo

La determinación funcional de C1INH se realizó en las muestras de plasma conservadas mediante inmunoensayo ELISA en el laboratorio clínico de nuestro hospital, siendo el rango de referencia >65% para ser normal[195].

La determinación cuantitativa de C1INH se realizó en las muestras de plasma conservadas mediante nefelometría también en el laboratorio clínico de nuestro hospital, siendo el rango de referencia 15-35 mg/dL como intervalo dentro de la normalidad[195].

C1q

La determinación se realizó mediante turbidimetría en las muestras de suero en el laboratorio clínico de nuestro hospita, siendo el rango de referencia 15,7-30,6 mg/dL como intervalo dentro de la normalidad[195].

5.14. Estudio de biomarcadores del sistema de contacto

Este estudio de los biomarcadores del sistema de contafcto se realizó en el Laboratorium voor Klinische Chemie en Hematologie (LKCH) de la University Medical Center (UMC) de Utrecht (Holanda) enviando las muestras de plasma en condiciones de congelación a -20ºC mediante correo aéreo.

Cuantificación del cininógeno de alto peso molecular escindido

El cininógeno de alto peso molecular (HK) es una proteína plasmática que, tras la escisión por la enzima calicreína, libera el péptido vasoactivo bradicinina. La bradicinina se degrada rápidamente mientras que el cininógeno escindido (cHK) permanece durante varias horas en el torrente sanguíneo por lo que puede utilizarse como biomarcador de la liberación de bradicinina. Se realizó la identificación de cHK con una técnica de inmunoensayo ELISA consistente en un nanocuerpo (VHH-D1) para detectar específicamente el cHK desarrollada en el LKCH de la UMC de Utrecht[197]. El contenido capturado por VHH-D1 en una placa de microtitulación se detecta mediante el nanocuerpo VHH-H4 biotinilado que detecta cininógeno. En el plasma, es necesaria la adición de un compuesto polianiónico para amplificar la cantidad total de cininógeno capturado y aumentar la avidez de unión (**Figura 11**).

El protocolo detallado del procedimiento se encuentra en el **Anexo 11.2**.

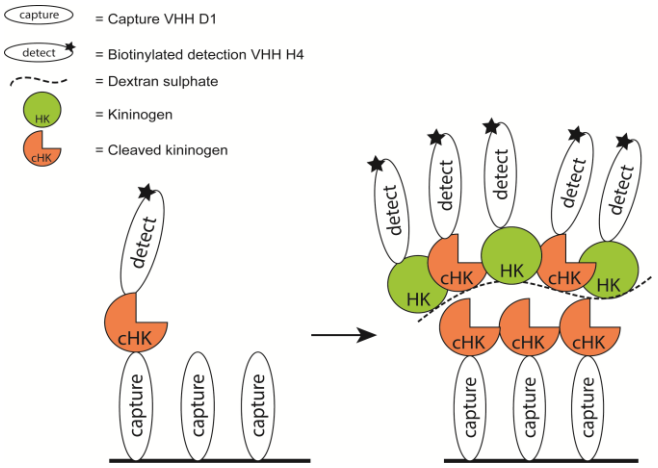


Figura 11: Descripción de la técnica de ELISA para la detección del cHK desarrikkada en la UMC de Utrecht, Holanda

Cuantificación de complejos C1INH-FXI, C1INH-FXII y C1INH-PK

El inhibidor del C1 (C1INH), además de su efecto inhibidor sobre la vía clásica del sistema del complemento, desempeña un papel en la inhibición de varias proteasas plasmáticas adicionales, siendo un inhibidor dominante de la calicreína plasmática, el FXIa y el FXIIa. Tras la activación de estas proteasas de la coagulación y el sistema de contacto se consume C1INH durante el proceso inhibidor. C1INH forma complejos covalentes estables proteasa/C1INH que se pueden medir en el plasma y reflejan la activación de sistemas regulados por el C1INH. El laboratorio de LKCH dispone de reactivos y protocolo para realizar un ensayo ELISA sensible, donde los niveles de los complejos FXIA/C1-INH, FXIIA/C1-INH, PK/C1-INH se pueden expresar de forma estandarizada, como concentraciones molares[198]. Esta técnica de inmunoensayo ELISA consiste en un nanocuerpo (1B12) para detectar reconoce inhibidor de la esterasa C1 escindido y complejado. El contenido capturado por 1B12 en una placa de microtitulación se detecta, para cada proteasa, mediante el nanocuerpo policlonal biotinilado anti-FXII, anti-PK policlonal de oveja/cabra y IgG policlonal anti-FXI de oveja/cabra.

Los protocolos detallados de los tres ensayos realizados se encuentran en el **Anexo 11.3**.

5.15. Cuantificación de citocinas

La determinación de IL-6 y IL-10 se realizaró mediante fluoroinmunoensayo (ELLA), técnica de rutina del laboratorio clínico de nuestro hospital mediante fluoroinmunoensayo (ELLA), siendo el rango de referencia para la IL-6 desconocido y para la IL-10 de 0 – 7,8 pg/mL [195].

Para la determinación de resto de citocinas incluidas en estat tesis se utilizó un kit comercial de inmunoensayo magnético Luminex® (Biotechne R&D Systems, Inc.. Minneapolis, USA). Se trata de un ensayo multiplex basado en *coating* magnético que permite realizar un perfil personalizado para analizar simultáneamente hasta 50 analitos utilizando muestras de sobrenadante de cultivo celular, suero o plasma. Requiere un pequeño volumen de muestra (<50 µL) y se ejecuta en un tiempo medio de 3-4 horas. Los estándares están calibrados en masa para obtener resultados consistentes con cada nuevo lote de material. Este análisis de citocinas se realizó en un subgrupo de pacientes dadas las limitaciones económicas y técnicas.

Basándonos en la búsqueda bibliográfica sobre citocinas y grupos celulares potencialmente implicados en anafilaxia se diseño un kit que incluía las citocinas que se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6: Célula fuente principal de las citocinas analizadas

CÉLULA	CITOCINAS
 **Mastocito**	IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-16, IL-18, IL-33, CCL26 (eotaxina 3), TSLP, CCL5/RANTES
 **Basófilo**	IL-4, IL-6, IL-13, IL-33, CCL26 (eotaxina 3), CCL5/RANTES
 **Eosinófilo**	IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-13, IL-16, IL-18, CCL5/RANTES
 **Neutrófilo**	IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8/CXCL8, IL-17A, MPO, OSM, MMP (1,2,3,7,8,9,10,12,13), VEGF-D, VEGF-A
 **Monocito/Macrófago**	IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8/CXCL8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, Osteopontina, CXCL2, CCL4/MIP-1β, VEGF-D, VEGF-A, TNF-α, MPO, CCL5/RANTES
 **Plaquetas**	CXCL12, MMP (1,2,3,7,8,9,10,12,13), P-selectina, VEGF-D, VEGF-A, MPO,
 **Natural Killer**	IL-2, IL-12, IL-13,IL-15, IL-17A, IL-22, FAS, FAS-ligand, granzima B, TNF-α, TNF-β, CCL5/RANTES
 **Célula Dendrítica**	IL-12, IL-23, Osteopontina
 **Endotelio**	TSLP, IL-25, IL-33, VCAM-1, PAI-1, CCL11 (eotaxina 1)

IL, interleucina; TGF-β, factor beta de crecimiento tumoral; TNF-α, factor de necrosis tumoral alfa; CXCL, ligando de quimiocina con motivo CXC; TSLP: linfopoyetina del estroma tímico; VEGF, factor de crecimiento vascular endotelial; CCL, ligando (motivo C-C); S1P, esfingosina-1-fosfato; MPO, mieloperoxidasa; MBP, proteína básica principal; IFN-γ, interferón gamma, VCAM, molécula de adhesión vascular; MMP, metaloproteinasas de matriz; MPO, mieloperoxidasa; OSM, oncostatina M; PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno.

Se seleccionaron 26 pacientes y se realizó la técnica en dos días consecutivos para asegurar la reproducibilidad de la técnica. Se analizaron en muestras se suero, realizando un duplicado en una pequeña selección con muestra de plasma para ver si había diferencias entre los 2 tipos de muestras.

El protocolo detallado de la técnica realizada se encuentra en el **Anexo 11.4**.

5.16. Base de datos y estudio estadístico

Los datos demográficos y clínicos se recuperaron de la historia clínica electrónica SAP® Netweaver 740 (SAP Germany, EU) y mediante la anamnesis dirigida durante la visita en consultas externas. Se realizó la base de datos en el programa IBM® SPSS® stadistics versión 26 (SPSS Inc, Chicago IL, USA) con pseudoanonimización de los individuos para mantener la confidencialidad de los datos.

El análisis estadístico se realizó con la ayuda del departamento de estadística del instituto de recerca del Hospital Vall d'Hebron (VHIR) con financiación de 2 becas otorgadas a la investigación de las Sociedades Española (SEAIC) y Catalana (SCAIC) de Alergología e Inmunología Clínica. Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico "R" (R versión 4.3.0 (2023-04-21 ucrt), Copyright (C) 2015 The R Foundation for Statistical Computing). Los datos se expresan como mediana (rango intercuartílico - IQR) [IC 95%] a no ser que se especifique lo contrario. Para comparar variables no paramétricas entre dos o más grupos, se usó el test no-paramétrico Mann-Whitney U. Para comparar la distribución de frecuencias de variables categóricas entre dos grupos se usó el test no-paramétrico de Chi-Cuadrado (χ^2). Se usó el test ANOVA para la comparación de datos paramétricos de los biomarcadores en el análisis multivariable. Para aquellas comparaciones de variables categóricas con muestras pequeñas donde la frecuencia esperada es baja, como fue el caso del análisis de citocinas, se usó el test exacto de Fisher. Para hacer en análisis de clúster según endotipo o fenotipo se utilizó el test paramétrico Kruskal-Wallis.

6. RESULTADOS

6.1. PRIMER TRABAJO

6.1.1. Características demográficas y clínicas de los individuos

En el primer estudio se incluyeron un total de 98 pacientes con anafilaxia. El 48% (n=47) de los individuos eran hombres y su mediana de edad fue de 55,5 años (IQR 43-66). La mayoría (91%, 89/98) eran de etnia blanca no hispana. El 41,8% (41/98) tenían antecedentes personales de atopia, siendo el antecedente previo de anafilaxia el más prevalente (35,7%), seguido de la rinitis alérgica (27,6%) y la reacción adversa a medicamentos (RAM) (26,5%). El 12,2% de los sujetos eran asmñaticos y el 15% tenía alergia a alimentos. El 72,4% (71/98) tenían antecedentes patológicos, siendo el más prevalente la neoplasia (37,8%), seguido de la enfermedad cardiovascular (35,7%) y neumológica (30,6%). El 56,1% (55/98) de los individuos recibían por ello tratamiento crónico con uno varios fármacos, siendo el más habitual un AINE (15,3%), seguido de corticoides sistémicos o inhalados (13,3%) y los β-2-agonistas (12.2%). Dos individuos tenían diagnóstico de mastocitosis sistémica. El 71,9% estaban sensbilizados a neumoalérgenos, el 43,8% a alimentos, el 22,9% a anisakis y ninguno al látex. La información completa sobre estos pacientes se encuentra en la **Tabla 12** (pag. 96).

6.1.2. Procedencia de los pacientes y tratamiento agudo recibido durante la reacción anafiláctica

La mayoría de los pacientes con anafilaxia (49%, 48/98) procedían de hospitalización, el 38,8% (38/98) de urgencias, el 10,2% (10/98) de consultas externas de Alergología y dos pacientes sufrieron una anaflaxia en quirófano.

De todos ellos, sólo el 62,2% recibió tratamiento con adrenalina intramuscular, mientras que el 88% recibió antihistamínico y/p corticoide parenteral. No se observó ninguna reacción adversa a la adrenalina. Dos pacientes beta-bloqueado recibieron glucagón intramuscular para el tratamiento de la anafilaxia, observándose una adecuada respuesta y tolerancia.

6.1.3. Estudio alergológico

Se realizaron pruebas cutáneas a los fármacos en el 90% (88/98) de los sujetos con anafilaxia de etiología farmacológica, siendo positivos en el 40% (35/88) y confirmando así la causalidad.

Al 60,5% (32/53) de los individuos con prueba cutánea negativa se les realizó una prueba de exposición controlada, siendo la provocación positiva en el 89,7% (29/32) de los individuos.

El resumen de las pruebas cutáneas realizadas, su resultado y las pruebas de exposición realizadas se encuentra en la **Tabla suplementaria del Anexo 11.5.**

6.1.4. Etiología de la anafilaxia

La causa más habitual de anafilaxia fueron los fármacos no biológicos (35,7%, 35/98) seguido de quimioterápicos (25,5%, 25/98), alimentos (12,2%, 12/98) y fármacos biológicos (11,2%, 11/98), contrastes paramagnéticos (4,1%, 4/98), anisakis (2%, 2/98), contraste iodado (1%, 1/98), veneno de himenóptero (1%, 1/98), reacción por suero/plasma (1%, 1/98). No se identificó la causa tras el estudio alergológico en seis individuos (6,1%). Las causas de la anafilaxia se resumen en la **Tabla 7.**

El metamizol fue el principal AINE implicado en las reacciones anafilácticas (en 8 pacientes), mientras que la amoxicilina fue el antibiótico que causó más anafilaxia (en 6 pacientes).

De los pacientes que sufrieron una anafilaxia por fármaco quimioterápico, los taxanos fueron los mayoritariamente implicados (en 6 pacientes), en concreto el paclitaxel, seguido por los platinos (en 8 pacientes), sobretodo carboplatino.

El rituximab fue el principal fármaco biológico causante de anafilaxia (en 6 pacientes) en nuestra corte de pacientes.

Dentro de los alimentos, los vegetales con proteína nsLTP fueron la principal causa de anafilaxia (en 6 pacientes), seguido por el marisco (en 3 pacientes).

Tabla 7: Etiología de anafilaxia

CAUSA		N (%)
ALIMENTOS		12 (12.2%)
ANISAKIS		2 (2%)
FÁRMACO BIOLOGICO		11 (11.2%)
QUIMIOTERÁPICO	TAXOL	9 (9,2%)
	PLATINO	8 (8,2%)
	OTRO	8 (8,2%)
FÁRMACO NO BIOLÓGICO	ANTIBIÓTICO BETA-LACTÁMICO	9 (9,2%)
	OTRO ANTIBIÓTICO	3 (3,1%)
	AINE	19 (19,4%)
	OTRO FÁRMACO	4(4,1%)
CONTRASTE YODADO		1 (1%)
CONTRASTE PARAMAGNETICO		4 (4.1%)
VENENO HIMENÓPTERO		1 (1%)
SUERO/PLASMA		1 (1%)]

DESCONOCIDO	6 (6.1%)

6.1.5. Endotipos de anafilaxia

El 47% (n=46) de las anafilaxias fueron mediadas por “endotipo IgE”)y el 19,4% (n=19) fueron por “endotipo liberación de citocinas”. En un 10% (n=10) de los casos el endotipo implicadofu el “endotipo no IgE / inhibición de COX-1”, y en el 11,2% (n=11) fue “endotipo mixto” (mastocito + liberación de citocinas). En el 12,2% (n=12) de los casos no se pudo dilucidar el mecanismo subyacente y se catalogaron como “endotipo desconocido” (**Figura 12**)

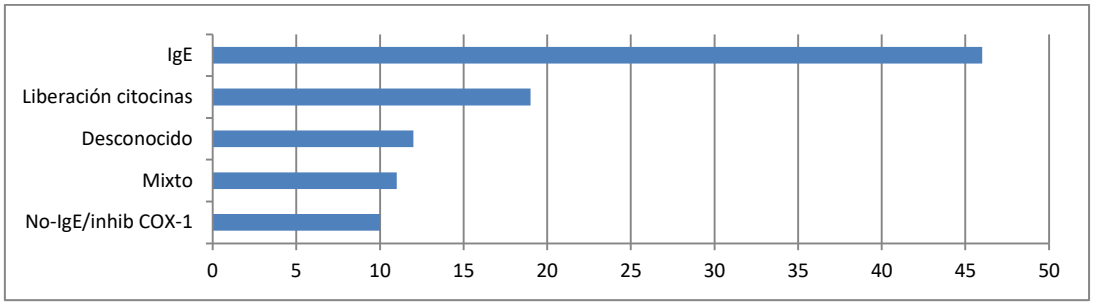


Figura 12: Distribución de los individuos según endotipo de anafilaxia (n individuos)

6.1.6. Fenotipos de anafilaxia

De forma global, la manifestación clínica más común fue la clínica cutánea (84,7%, 83/98), seguida de la digestiva 40,8%, 40/98), respiratoria (38,8%, 38/98) y la circulatoria (31,6, 31/98). La afectación neurológica fue la menos prevalente, tan sólo presente en el 25,5% (25/98) de los sujetos.

Si separábamos los aparatos o sistemas afectados en la anafilaxia según endotipos se encontraron resultados interesantes.

Los individuos con endotipos mediado por mastocito (“endotipo IgE mediado”, “endotipo no IgE emdiadio /inhibición COX-1” y “endotipo mixto”) presentaron con más frecuencia síntomas cutáneos que los individuos con “endotipo liberación de citocinas”.

Los individuos con “endotipo no IgE mediado / inhibición COX-1” presentaron mayor afectación respiratoria (especialmente vía respiratoria alta) y circulatoria que los otros grupos.

En el “endotipo liberación de citocinas” se observó con menor frecuencia la presencia de clínica digestiva durante la anafilaxia.

Los individuos con “endotipo desconocido” presentaron con menor frecuencia que otros grupos afectación de la vía respiratoria baja.

La afectación de clínica neurológica fue similar en todos los endotipos, siendo un poco menos frecuente en el “endotipo mixto”.

El resumen de los resultados se encuentra en la **Figura 13**.

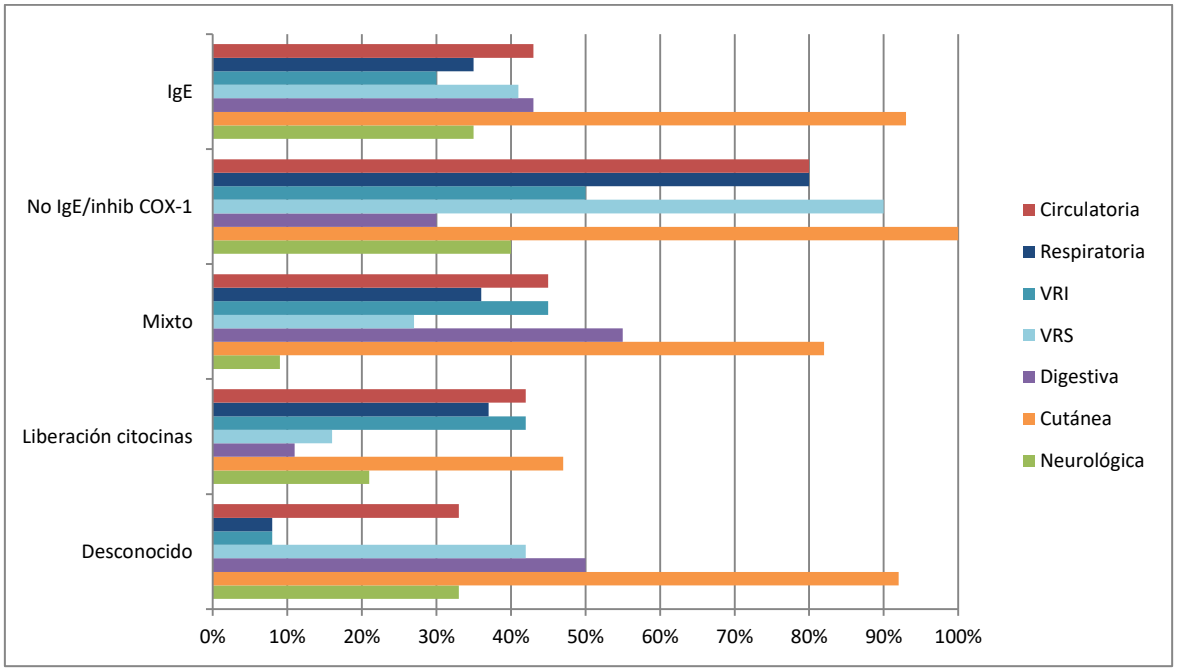


Figura 13: Aparatos o sistemas afectados según el endotipo de anafilaxia (% individuos)
VRI, vía respiratoria inferior; VRS, vía respiratoria superior

Cuando analizábamos las manifestaciones clínicas según la causa de la anafilaxia, observamos patrones. Como se puede apreciar en la **Figura 14**, la afectación cutánea era la más prevalente independientemente de la causa de la anafilaxia, a excepción de la causa fármaco quimioterápico y la causa desconocida. La afectación de vía respiratoria alta (Afectación de la rinofaringe o la hipofaringe) fue más frecuente en la causa de alergia alimentaria y en tratamientos biológicos. La afectación digestiva fue similar en todos los grupos, a excepción de la causa contraste paramagnético, dónde estuvo presente en todos los individuos, y en la causa desconocida, presente en el 66% de los individuos. La afectación neurológica estuvo repartida en casi todos los grupos de forma parecida, al igual que la afectación respiratoria

baja. Respecto a la afectación circulatoria, fue más prevalente en la anafilaxia por contraste yodado y por veneno de himenóptero.

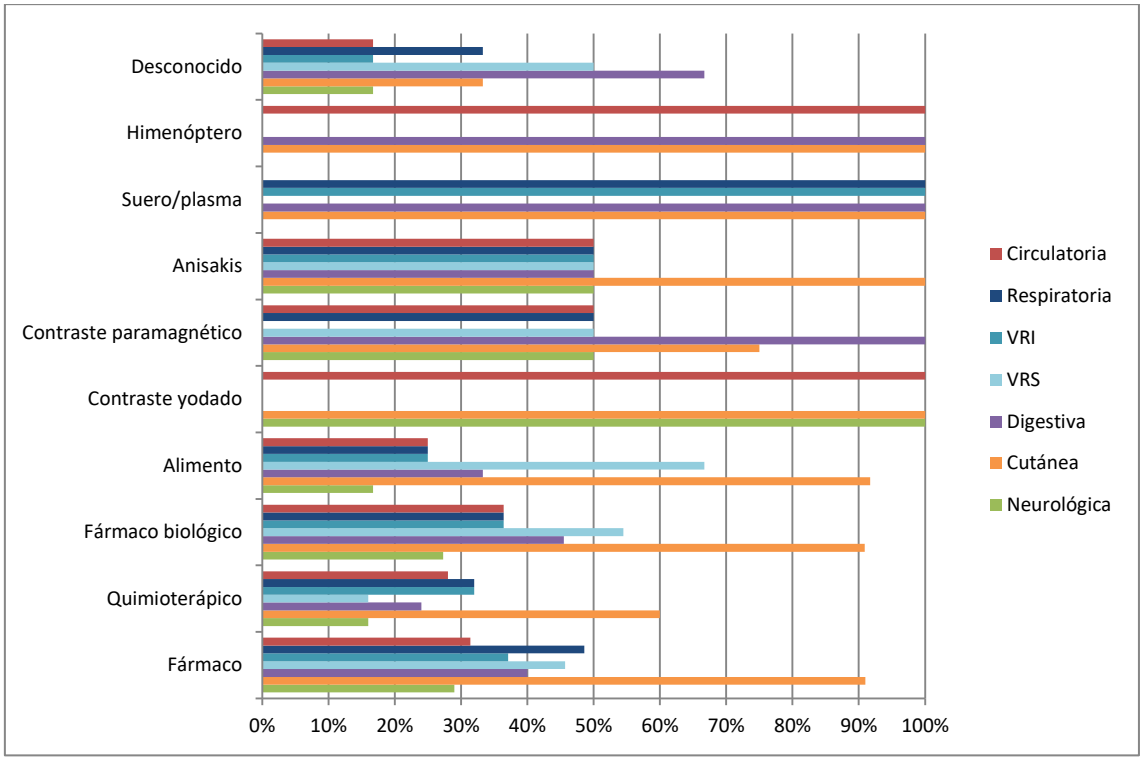


Figura 14: Aparatos o sistemas afectados según la etiología de anafilaxia (% individuos)
VRI, vía respiratoria inferior; VRS, vía respiratoria superior

6.1.7. Gravedad de la anafilaxia

De las 98 anafilaxias incluidas, el 31% (30/98) fueron leves, el 11% (11/98) moderadas A, el 13% (12/98) moderadas B y el 45% (44/98) fueron graves. No hubo ninguna anafilaxia fatal.

En la **Figura 15** se resume la distribución de la gravedad según los diferentes endotipos. En general hubo una distribución homogénea excepto por una excepción. Los individuos con "endotipo IgE mediado" presentaron anafilaxias de grado moderada A a diferencia de los otros tres endotipos ("endotipo liberación de citocinas", "endotipo no IgE / inhibición COX-1" y "endotipo mixto"). Los individuos de "endotipo desconocido" presentaban una distribución de gravedad similar a los individuos de "endotipo IgE-mediado" y ninguno presentó anafilaxias de grado moderada B.

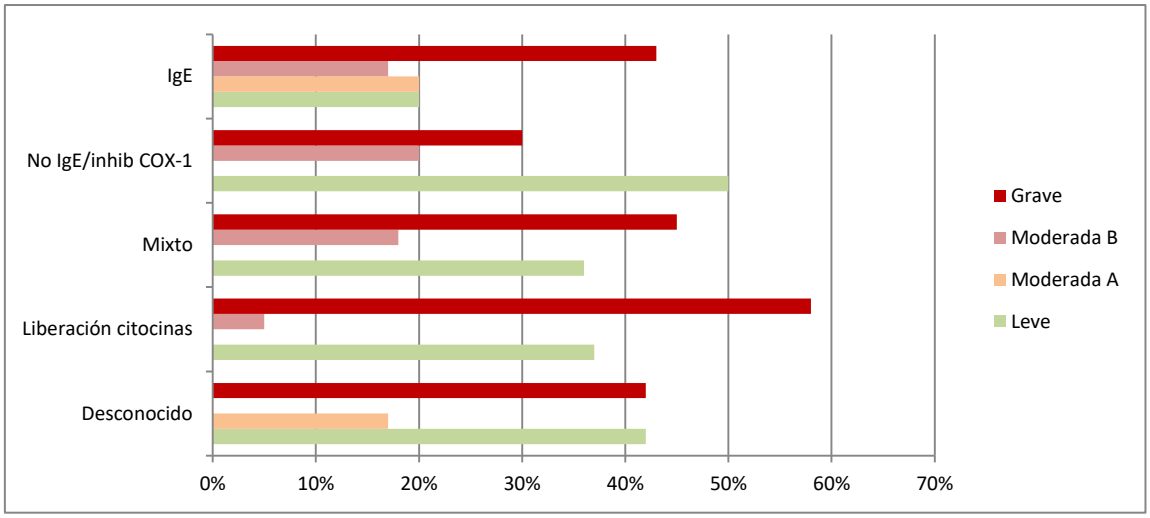


Figura 15: Gravedad de la anafilaxia según endotipo de anafilaxia (% individuos)

También se analixó la distribución de la gravedad según la etiología de la anafilaxia (**Figura 16**). Los fármacos no biológicos y los fármacos quimioterápicos fueron los principales causantes de anafilaxias graves. Todas las reacciones por contraste yodado, suero/plasma, anisakis y veneno de himenóptero fueron graves. Ninguna de las reacciones por contraste fue leve. Ninguna de las anafilaxias por fármacos biológicos presentaron criterio de Moderada A.

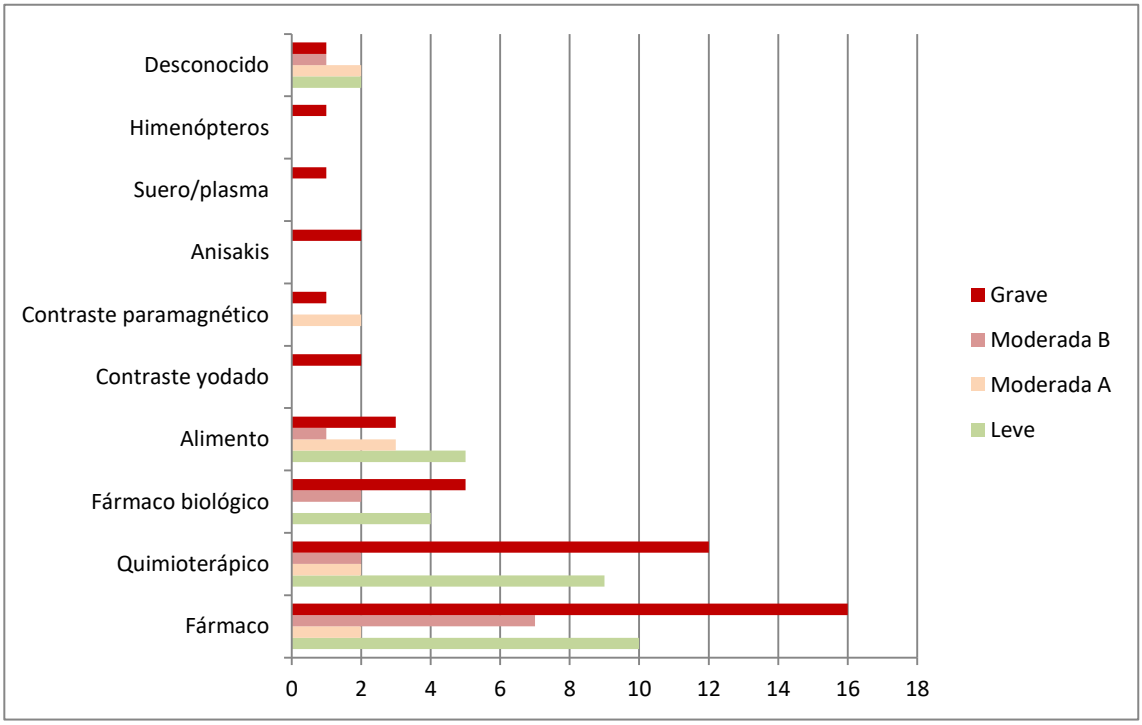


Figura 16: Distribución de los grados de gravedad según la etiología (n individuos)

6.1.8. Cofactores

Sólo un 8,1% (n= 7) de los individuos del grupo anafilaxia asoció cofactores, siendo los más frecuentes el alcohol (n=2, el ejercicio (n=2) y el AINE (n=2).

Cuando el cofactor estaba presente, el 57% de las anafilaxias fueron graves, 28,6% moderadas y el 24,4% leves.

6.1.9. Valores basales y agudos de la triptasa sérica

La media de triptasa sérica basal fue de 6 ± 8 mcg/L, siendo ≥ a 11,4 mcg/L en los dos pacientes con mastocitosis. Si se comparaban las tritpasas séricas basales según gravedad de la reacción, etiología, endotipo o fenotipo no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

El 74.5% (73/98) de pacientes elevaron la triptasa durante la anafilaxia. Se consideró elevación significatvia de la triptasa cuando era igual o superior al 120% + 2 del valor basal a las 2h o a las 6h de la reacción anafiláctica.

6.1.9.1. Elevación de la triptasa sérica según la etiología de la anafilaxia

La elevación de triptasa fue mayor cuando la causa de la anafilaxia fue por suero/plasma, anisakis y contraste yodado, destacando que los individuos incluidos en estos grupos fueron pocos y también que la graduación de anafilaxia por estas causas fue grave. Más del 60% de los individuos elevaron la triptasa sérica en el grupo de fármacos biológicos y quimioterápicos. En cambio, sólo el 50% de los individuos con reacción por fármacos no biológicos y alimentos elevó la triptasa. En los casos de causa desconocida, tan sólo un 33,3% elevaron triptasa y el paciente con anafilaxia por himenóptero no elevó triptasa. En la **Figura 17** se resumen estos resultados.

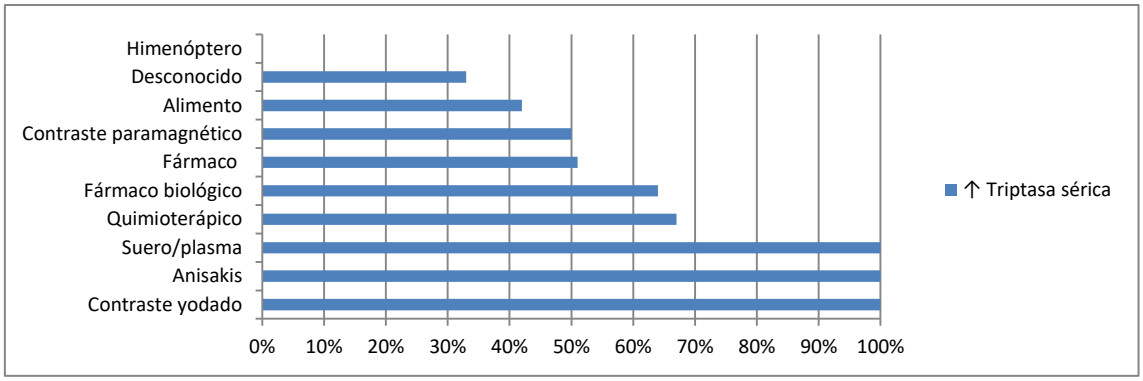


Figura 17: Elevación de triptasa sérica igula o superior a 120%+2 de la basal según la etiología de la anafilaxia

6.1.9.2. Elevación de la triptasa sérica según la gravedad de la anafilaxia

La elevación de triptasa fue superior a mayor gravedad de la reacción de forma estadísticamente significativa tanto para la determinación en T1 (p=0,009) como en T2 (p=0,024). **Figura 18.**

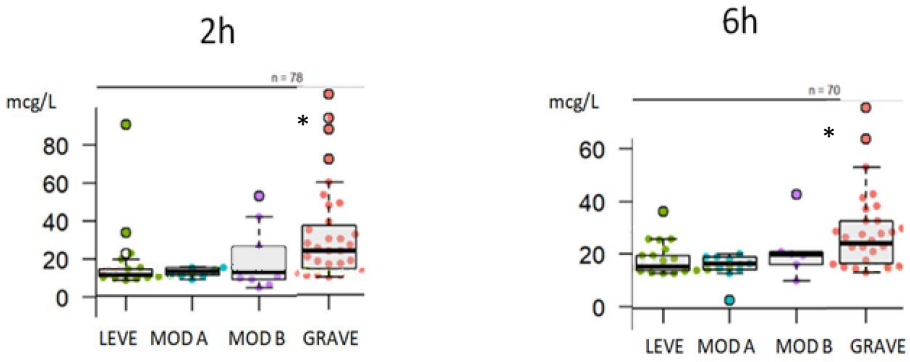


Figura 18: diferencia entre la triptasa sérica aguda y su basal (mcg/L) a las 2h (T1) y 6h (T2) según la gravedad de la anafilaxia.
Diagrama de caja que muestra el valor mínimo, el primer cuartil (inferior), la mediana, el tercer cuartil (superior) y el valor máximo.
Mod A, moderada A; Mod B, moderada B

6.1.9.3. Elevación de la triptasa sérica según el endotipo de la anafilaxia

La triptasa en T1 y T2 de la reacción se elevó más en el "endotipo IgE mediado" (22.6 ± 28.8 y 14,3±12,2) y "endotipo mixto" (27,3±30,7 y 19,7±11,5) respecto al "endotipo liberación de citocinas" (10,7±13,9 y 9,8±11,7) y al "endotipo no IgE / inhib COX-1" (8,2±4 y 8,3±5,6) de forma estadísticamente significativa (p=0,022 y p=0,007 respectivamente). **Figura 19.**

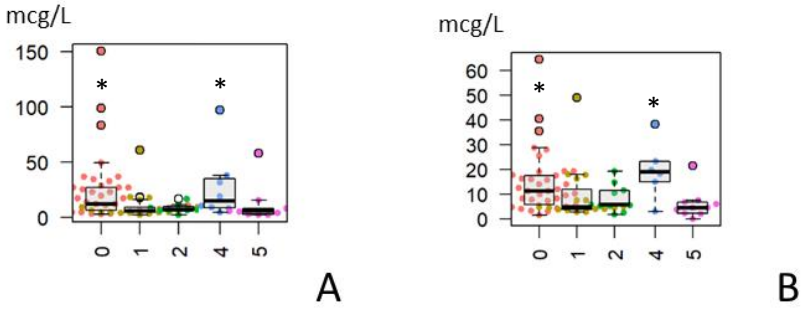


Figura 19: elevación de la triptasa sérica (mcg/L) a las 2h-T1 (A) y las 6h-T2 (B) según el endotipo de anafilaxia.
Diagrama de caja que muestra el valor mínimo, el primer cuartil (inferior), la mediana, el tercer cuartil (superior) y el valor máximo.
0= IgE mediado, 1= Infusional, 2= no IgE/inhibición COX-1, 4 = Mixto, 5= Desconocido.

6.1.9.4. Elevación de la triptasa sérica según el fenotipo de la anafilaxia

La afectación circulatoria y digestiva se asoció a mayor elevación de la triptasa sérica en T1 (p=0,001 y p=0,014 respectivamente) y T2 (p=0,003 y p=0,036). **Figura 20.**

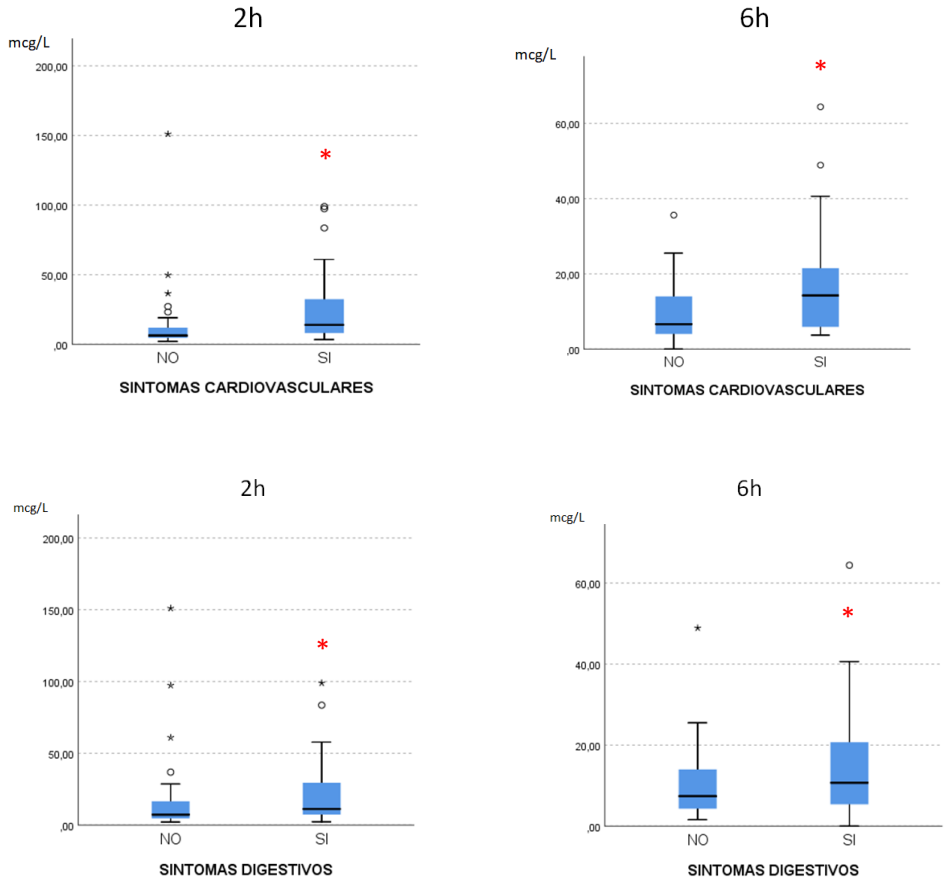


Figura 20: Diferencia entre la triptasa sérica aguda y su basal (mcg/L) a las 2h (T1) y 6h (T2) según la presencia o no de síntomas cardiovasculares o digestivos.
Diagrama de caja que muestra el valor mínimo, el primer cuartil (inferior), la mediana, el tercer cuartil (superior) y el valor máximo.

No hubo diferencias estadísticamente significativas (p>0,05) en los valores de la triptasa aguda respecto el basal para el resto de fenotipos de la anafilaxia.

6.1.10. Valores basales y agudos de los biomarcadores de la coagulación y la fibrinólisis

A nivel global, todos los pacientes presentaron valores basales de TTPA, FXI y FXII, anti-Xa, fibrinógeno, dímero D dentro de los rangos de la normalidad. Los valores basales de complejo PAP fueron de 0,22 ± 10,2.

En la **Tabla 8** se representan el porcentaje de sujetos que presentaron una elevación de al menos un 20% respecto a su valor basal de los biomarcadores analizados durante la fase aguda de la anafilaxia. Los biomarcadores que se elevaron en la mayoría de las reacciones anafilácticas fueron el dímero D (85,9%), en anti-Xa (66,2%) i el complejo PAP (65,5%). El dímero D se elevó con más frecuencia que la triptasa sérica (85,9% vs 74,%) en la fase aguda de la anafilaxia.

Tabla 8: % de individuos que presentaron una elevación ≥20% respecto a su valor basal durante la fase aguda de la anafilaxia

Dímero D	Anti-Xa	Complejo PAP	Fibrinógeno	FXI	FXII	TTPA (seg)
85,9%	66,2%	65,5%	31%	31,2%	24,7%	11,5%

La **Tabla 9** muestra el resultado del análisis multivariante por la variable no elevación de triptasa sérica ≥120%+2 de la triptasa sérica basal. Se seleccionaron aquellos biomarcadores que tenían más de 5 individuos con un aumento ≥20% en T1 y T2 de la anafilaxia respecto a T0. El dímero D y el anti-Xa son aquellos que muestran mayor fuerza de asociación.

Tabla 9: *Odds ratio* de predicción de anafilaxia para los biomarcadores elevados en individuos sin elevación de triptasa sérica

	Odds Ratio	CI (lower)	CI (upper)	Pr(>|z|)	N
Dímero D	**2.39**	0.66	7.91	0.16	96
FXI	1.09	0.36	3.73	0.887	94
FXII	1.06	0.33	4.13	0.921	94
Anti-Xa	**1.70**	0.08	18.97	0.674	69

6.1.10.1. Biomarcadores de la coagulación y la fibrinólisis según la etiología de la anafilaxia

Si estratificábamos los valores basales de los biomarcadores de coagulación y fibrinolisis por etiología de la reacción anafiláctica no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p>0,05).

En cambio, cuando comparabamos la determinación basal con la aguda durante la reacción anafiláctica se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el dímero D en T1 y T2h, que estaba menos elevado de forma significativa en la causa por anisakis respecto al resto de causas ($p<0,005$). No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) para el resto de biomarcadores (TTPA, FXI, FXII, anti-Xa, fibrinógeno y complejo PAP).

6.1.10.2. Biomarcadores de la coagulación y la fibrinólisis según gravedad de la anafilaxia

Si estratificábamos los valores basales de los biomarcadores de coagulación y fibrinolisis por gravedad de la reacción anafiláctica no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$), pero se observaban tendencias a niveles de dímero D, FXI, FXII y anti-Xa más elevados a mayor gravedad.

Si comparábamos la determinación basal con la aguda durante la reacción anafiláctica se encontraron diferencias estadísticamente significativas para valores de **dímero D** en T1 entre leve y grave ($p=0.003$) y comparativo en todos los grupos en T2 ($p=0,001$), y el **complejo PAP** en T2 ($p=0,017$), estando más aumentado en la fase aguda de los individuos con anafilaxias graves (**Figura 21**).

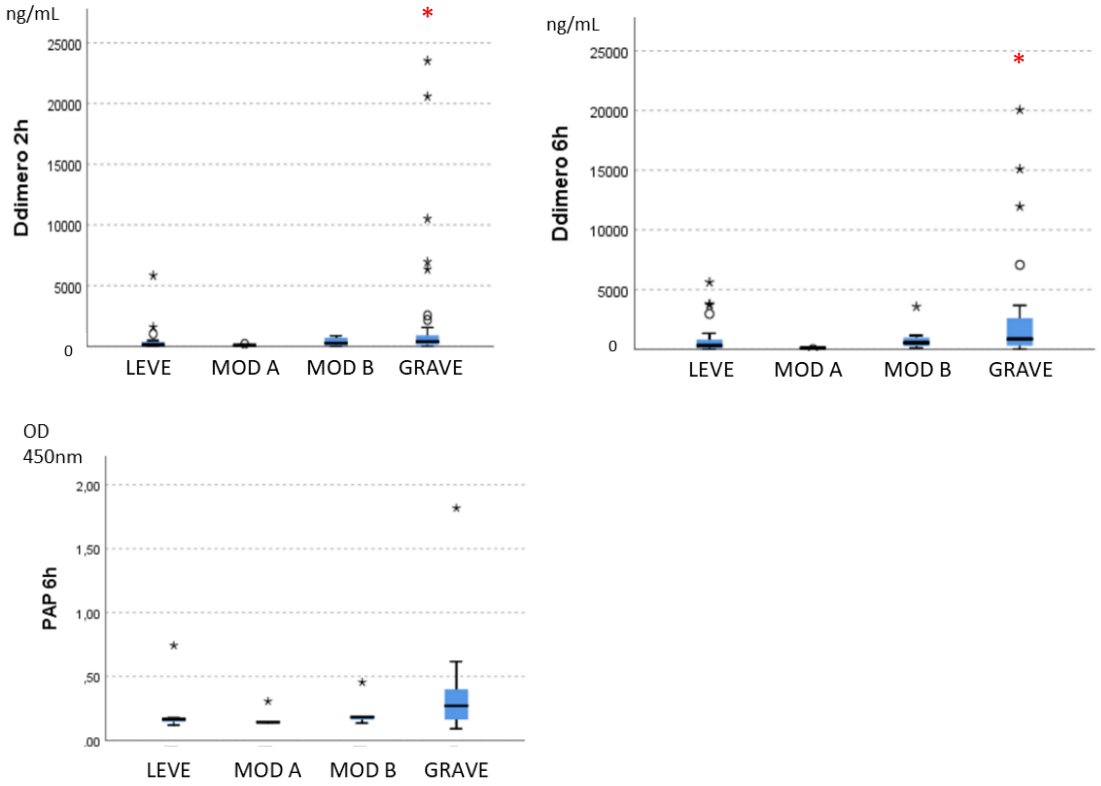


Figura 21: Elevación de dímero D (ng/ml) y del complejo PAP (nM) a las 2h (T1) y 6h (T2) según la gravedad de la anafilaxia

Diagrama de caja que muestra el valor mínimo, el primer cuartil (inferior), la mediana, el tercer cuartil (superior) y el valor máximo.

MOD A, moderada A; MOD B, moderada B

No hubo diferencias estadísticamente significativas (p>0,05) para el resto de biomarcadores (TTPA, FXI, FXII, anti-Xa y fibrinógeno).

6.1.10.3. Biomarcadores de la coagulación y la fibrinólisis según endotipo de anafilaxia

Se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los valores basales de anti-Xa (p=0,039) y fibrinógeno basales (p=0,026) según el endotipo de anafilaxia, mostrándose más elevado en el "endotipo liberación de citocinas" y "endotipo mixto" (**Figura 22**).

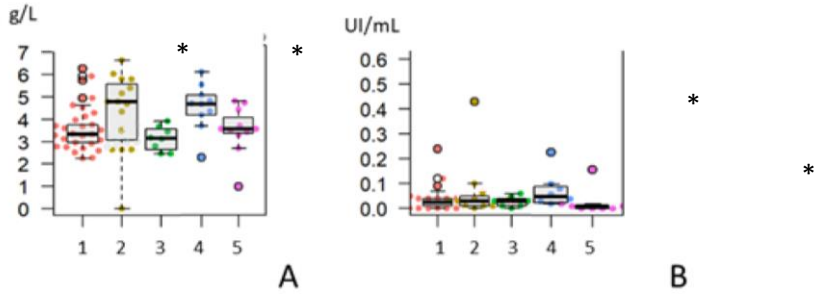


Figura 22: valores basales de fibrinógeno (A) y anti-Xa (B) según el endotipo de la anafilaxia
Diagrama de caja que muestra el valor mínimo, el primer cuartil (inferior), la mediana, el tercer cuartil (superior) y el valor máximo.
1= IgE mediado, 2= Liberación citocinas, 3= No IgE/inhibición COX-1, 4 = Mixto, 5= Desconocido.

Si comparábamos la determinación basal con la aguda durante la reacción anafiláctica, el Factor XII de la coagulación disminuyó de forma significativa (p=0,03) en T1 en el "endotipo liberación de citocinas" y "endotipo mixto" respecto los otros endotipos. El dímero D en T1 se elevó de forma significativa en el "endotipo liberación de citocinas" y casi no se elevó en el "endotipo no IgE / inhibición COX-1" (p= 0,004). En T2 se elevó en los endotipos "liberación de citocinas" y "mixto" y, de nuevo, casi no se elevó en el "endotipo no IgE / inhibición COX-1" (p=0,035) (**Figura 23**).

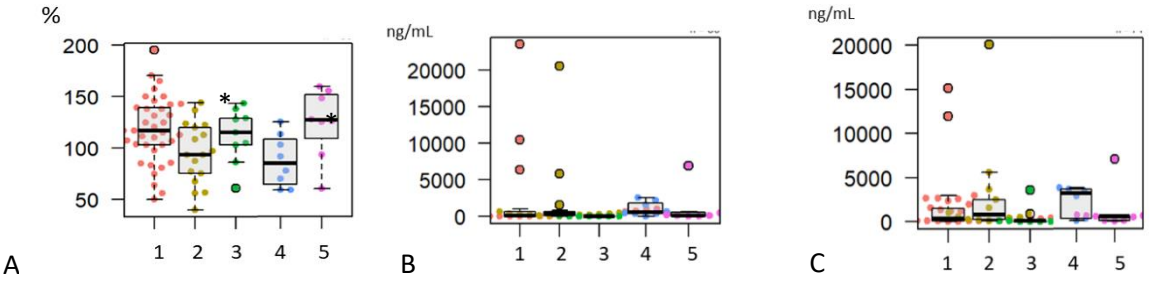


Figura 23: Elevación de biomarcadores coagulación y fibrinolisis seún el endotipo de anafilaxia.
A) Valores de Factor XII (%) a las 2h(T1); B) Valores de dímero (ng/mL) a las 2h(T1); C) Valores de dímero (ng/mL) a las 6h (T2). Representados en diagrama de caja que muestra el valor mínimo, el primer cuartil (inferior), la mediana, el tercer cuartil (superior) y el valor máximo.
1= IgE mediado, 2= Liberación citocinas, 3= No IgE/inhibición COX-1, 4 = Mixto, 5= Desconocido.

El fibrinógeno, TTPA(seg), factor XI y complejo PAP no mostraron cambios estadísticamente significativos durante la fase aguda.

6.1.10.4. Biomarcadores de la coagulación y la fibrinólisis según fenotipo de anafilaxia

No hubo diferencias estadísticamente significativas (p>0,05) en los valores basales de TTPA, FXI, FXII, anti-Xa, fibrinógeno, dímero D y complejo PAP si se comparaban los pacientes según el fenotipo de anafilaxia.

Los individuos con **sintomatología cutánea** mostraron niveles de dímero D en T1 (p=0,021) y complejo PAP (p=0,014) en T2 más bajos que los que no.

Los individuos con **afectación circulatoria** mostraron niveles de dímero D en T1 y T2 (p=0,001) y complejos PAP en T1 (p=0,002) y T2 (p=0,005) más elevados que los que no.

Los individuos con **clínica digestiva** disminuyeron más los niveles de fibrinógeno en T1 (p=0,018) que los que no.

Los individuos con **clínica respiratòria** consumían menos factor XI y XII que los que no la presentaban, siendo estadísticamente significativo solo para FXI en T1 (p=0,023) y T2 (p=0,026).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p>0,05) para síntomas neurológicos.

6.1.11. Valores basales y agudos de biomarcadores de sistema de contacto

A nivel global, todos los pacientes presentaron valores basales de C3, C4 y ECA, dentro de los rangos de la normalidad.

Los valores basales (nM) de cHK fueron de 1,68 ± 1,42, los del complejo FXIa/C1-INH fueron de 0,54 ± 0,46, los del complejo FXIIa/C1-INH fueron de 0,11 ± 0,07 y los del complejo PK/C1-INH fueron de 0,095 ± 0,25.

En la **Tabla 10** se representan el porcentaje de individuos que presentaron una elevación de al menos un 20% respecto a su valor basal del biomarcador durante la fase aguda de la anafilaxia. Ninguno de los biomarcadores del sistema de contacto superó a la triptasa en proporción de individuos con elevación en la fase aguda.

Tabla 10: Porcentaje de individuos que presentaron una elevación de al menos un 20% respecto a su valor basal durante la fase aguda de la anafilaxia

Complejos PK/C1-INH	Complejos FXIIA/C1-INH	cHK	ECA	C3	C4	Complejos FXIA/C1-INH

67,9% N=19	59,3% N=16	54,8% N=17	51,3% N=40	48,5% N=16	39,4% N=13	25,9% (N=7)

Se realizó un análisis multivariante por la variable no elevación de triptasa sérica ≥120%+2 de la triptasa sérica basal. Se seleccionaron aquellos biomarcadores que tenían más de 5 individuos con un aumento ≥20% en T1 y T2 de la anafilaxia respecto a T0. La **ECA** fue el parámetro que mostró más fuerza de asociación con anafilaxia cuando la triptasa no se elevaba, con un Odds ratio de 0,62, seguido del C3 (OR 2,20) y C4 (OR 1,73).

6.1.11.1. Biomarcadores de sistema de contacto según la etiología de la anafilaxia

Ninguna biomarcador del sistema de contacto dio resultados estadísticamente significativos (p>0,05) si comparabamos sus valores basales y agudos según la etiología de la anafilaxia.

6.1.11.2. Biomarcadores de sistema de contacto según la gravedad de la anafilaxia

Si estratificábamos el grupo anafilaxia según gravedad, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para valores basales de complejo FXIa/C1-INH (p=0,032), como se puede observar en la **Figura 24**, estando más disminuido en las anafilaxias moderadas y graves. No fueron estadísticamente significativos (p>0,05) para complejo FXIIa/C1-INH, complejo PK/C1-INH, ECA, C3 y C4 pero mostraron tendencia a estar más disminuidos, y el cHK a estar más aumentado, en las anafilaxias más graves.

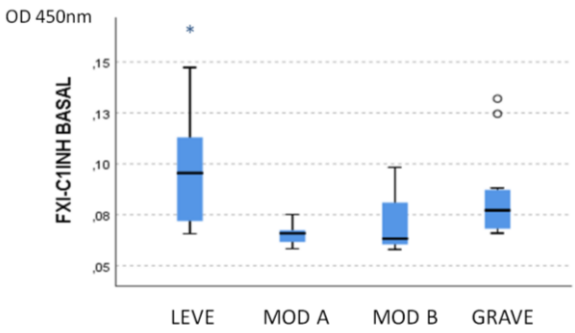


Figura 24: valores basales de complejos FXIa/C1-INH (nM) según la gravedad de la anafilaxia.
Diagrama de caja que muestra el valor mínimo, el primer cuartil (inferior), la mediana, el tercer cuartil (superior) y el valor máximo.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p>0,05) en la fase aguda para los valores de C3, C4, ECA, cHK, complejo FXIa/C1-INH, complejo FXIIa/C1-INH y complejo PK/C1-INH.

6.1.11.3. Biomarcadores de sistema de contacto según el endotipo

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p>0,05) en los valores basales y agudos de C3, C4, ECA, cHK, complejo FXIa/C1-INH, complejo FXIIa/C1-INH y complejo PK/C1-INH si estratificábamos por endotipo de anafilaxia.

6.1.11.4. Biomarcadores de sistema de contacto según el fenotipo

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p>0,05) en los valores basales de C3, C4, ECA, cHK, complejo FXIA/C1-INH, complejo FXIIA/C1-INH y complejo PK/C1-INH si estratificábamos por fenotipo de anafilaxia

En la determinación aguda durante la reacción anafiláctica, los individuos con **síntomas cutáneos** mostraron valores de cHK a las 6h (p=0,007), complejos FXIA/C1-INH en T1 (p=0,005) y T2 (p=0,048) y complejos PK/C1-INH en T1 (p=0,05) más elevados que los que no la presentaron (**Figura 25**)

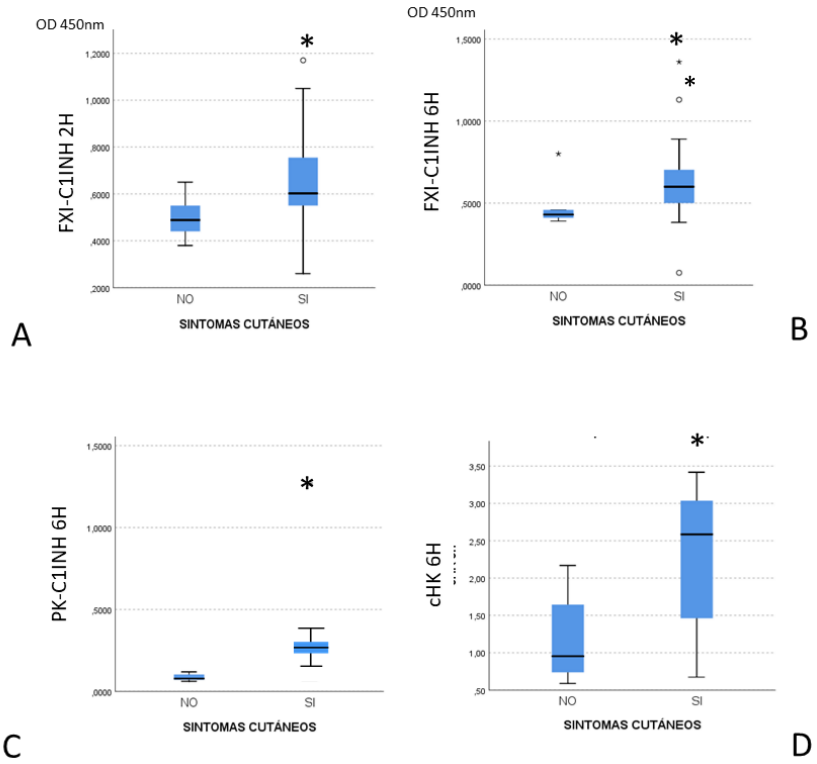


Figura 25: Elevación de biomarcadores coagulación y fibrinolisis según la presencia de clínica cutánea.

A) Valores de complejo FXIa/C1-INH a las 2h (T1); B) Valores de complejo FXIa/C1-INH a las 6h(T2); C) Valores de complejos PK/C1-INH a las 2h (t1); D) Valores de cHK a las 6h(T2). Representados en diagrama de caja que muestra el valor mínimo, el primer cuartil (inferior), la mediana, el tercer cuartil (superior) y el valor máximo.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) para síntomas respiratorios, digestivos, neurológicos o circulatorios.

6.1.12. Valores basales y agudos de citocinas

Se recogieron los resultados de IL-6 y IL-10 realizados de forma rutinaria en nuestro hospital y se analizaron en un subgrupo de 26 pacientes con anafilaxia mediante inmunoensayo magnético el resto de citocinas. Este subgrupo estuvo formado por anafilaxias de diferentes endotipos, etiologías y gravedad, quedando distribuidas de la siguiente forma: diez con anafilaxia por quimioterapia (cinco con "endotipo IgE mediado" y cinco con "endotipo liberación de citocinas"), ocho con anafilaxia por AINE (cuatro con endoipo IgE mediado y cuatro con endotipo no IgE / intolerancia COX-1), cuatro con anafilaxia por alimentos ("endotipo IgE mediado") y cuatro anafilaxias graves con afectación circulatoria (choque anafiláctico). Durante la realización del análisis se perdieron parte de los resultados de una de las placas de inmunoensayo magnético realizadas, motivo por el que las citocinas TNFα, TNFβ, IL23, IL4, VEGFA, MMP-3, MMP-8, TSLP, VCAM-1 tan sólo se realizaron en 19 individuos. La comparación entre muestras de plasma y suero mostraron que las citocinas daban resultados comparables a excepción de MMP-1, MMP-8, MMP-9, RANTES, MPO, PAI-1, IL-33, IL-8, , P-selectina, y osteopontina que daban valores más altos en suero y VEGF-A que daba valores más altos en plasma.

La **Tabla 11** muestra los valores basales en mediana y rango intercuartílico (IQR) de las citocinas estudiadas.

Tabla 11: valores basales de las citocinas estudiadas en los pacientes con anafilaxia

	MMP9	MMP2	RANTES	MPO	TNFa	MMP3	VEGFA	MMP8	IL4	TNFb	P-SELEC
Mediana (pg/mL)	2445,91	5285,81	327,505	1784,44	22,59	14672	99,61	6602	235	2,435	62248
IQR	1696,23	1023,9375	465,405	2899,305	12,39	10642	104,45	8875	59	1,8025	46692

	PAI-1	IL6	IL33	IL3	IL8	MMP1	MMP7	IL-10	CXCL2	IL1b	IL25
Mediana (pg/mL)	54331,5	4,05	69,39	39,79	33,54	1518,5	1501	10,89	403,5	21,62	618
IQR	188815,75	6,56	37,48	16,48	65,698	2965	2003,25	6,96	586,25	7,87	301,25

	MMP12	IL22	CCL4	IL1b	FAS-L	FAS	IL17 A	IL2	CCL26	IL13

Mediana (pg/mL)	24,205	5,865	1103,5	23,38	28,35	7602,5	11,9	10,95	30,67	662,5
IQR	4,84	10,53	334,25	6,49	15,57	8665,5	4,17	5,35	16,10	740,31

	GRANZ B	**OSM**	**IL15**	**VEGFD**	**MMP10**	**IL23**	**CCL11**	**IL18**	**TSLP**	**MMP13**	**IL5**
Mediana (pg/mL)	92,66	8470	30,65	676	596	115	192,5	373	7,69	610	5,12
IQR	28,77	3216	12,69	195,25	534,5	174,995	79,00	431	3,88	219,25	23,45

Debido al tamaño de la muestra inferior de los individuos incluidos en el estudio de citocinas respecto el total de pacientes con determinación de triptasa sérica (26 vs 98), no se pudieron obtener resultados estadísticamente significativos al comparar estos biomarcadores con la triptasa sérica. Tampoco tenemos puntos de cortes a partir de los cuales se pueda indicar que una citocina está elevada o disminuida, puesto que los valores normales en la población no están claramente definidos y hay mucha variabilidad interindividual. Por ello se realizó una valoración de incrementos y descensos del 20% de cada citocina, asumiendo que esta diferencia podría no estar tan ligada al azar y puesto que para la triptasa se aceptó durante un tiempo un incremento del 20% respecto al valor basal. También se comparó si cuando se observaban incrementos o disminuciones >20% de la citocina en un número significativos de individuos (>40%), esto se correlacionaba con una elevación significativa de la triptasa sérica, para comparar este posible biomarcador con la triptasa sérica.

La **IL-10** se incrementó un 20% en >50% de los individuos con mayor frecuencia que la triptasa sérica (19/26 vs 17/26) y se correlacionaba con la elevación de triptasa sérica. **MMP-8** se elevó un 20% en igual proporción que la triptasa sérica (11/19 vs 11/19) y **P-selectina** en menor proporción que la triptasa sérica (13/26 vs 17/26).

PAI-1 disminuyó un 20% en >50% de los individuos, en mayor proporción que la triptasa sérica (19/26 vs 17/26) y la **IL-22** y la **Osteopontina** en menor proporción que la triptasa sérica (15/26 y 13/26 vs 17/26). No se correlacionaba con la elevación de triptasa sérica, por lo que la complementaban.

La **IL-6** y **CCL5/RANTES** se incrementaron un 20% en >50% de los individuos con la misma frecuencia que la triptasa sérica (17/26 vs 17/26) y **MMP-10** por debajo de la triptasa sérica (14/26 vs 17/26). Tampoco se correlacionaban con la elevación de triptasa sérica, por lo que la complementaban.

Las siguientes citocinas no se elevaron o disminuyeron más de un 20% respecto a su valor basal con más frecuencia que la triptasa sérica: TNF alfa y TNF beta, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4,

IL-5, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-18, IL-23, IL-25, IL-33, CXCL2/MIP-2 alfa, CCL4, VEGF-A, VEGF-D, MPO, OSM, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-12, MMP-13, FAS, FAS-L, Granzima B, TSLP, CCL-26, CXCL11/Eotaxina-1

En la **Figura 26** se representa representa el porcentaje de pacientes que presentaban elevación de IL-6, IL-10, CCL5/RANTES y disminución de PAI-1 en relación con la elevación de triptasa sérica en el subgrupo analizado para citocinas.

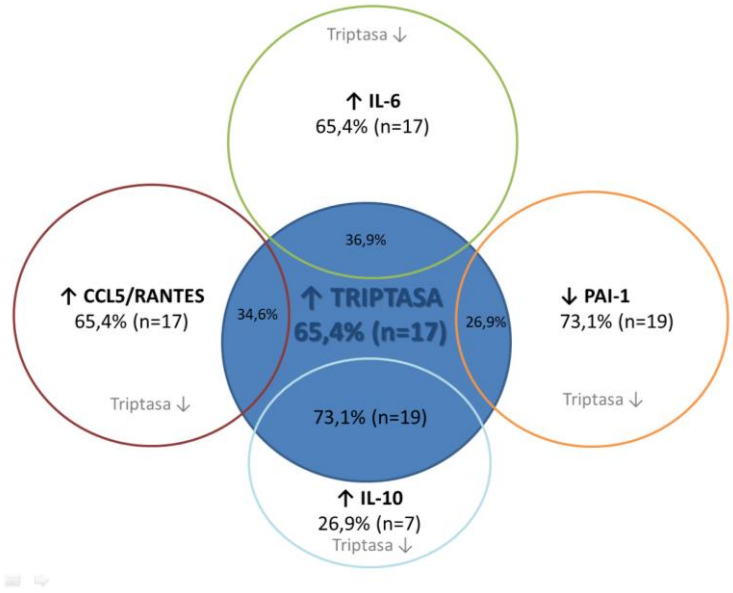


Figura 26: Citocinas elevadas en mayor proporción que a triptasa sérica y solapamiento con triptasa sérica elevada

6.1.12.1. Valores de citocinas según la etiología de la anafilaxia

Ninguna citocina dio resultados estadísticamente significativos (p>0,05) si comparabamos sus valores basales y agudos según la etiología de la anafilaxia.

En los pacientes con **anafilaxia por alimentos** se observó una disminución de la IL-2, IL-3, IL-8/CXCL8, IL-13, IL-22, osteopontina, MMP-1, MMP-7, CCL-26 en la fase aguda de >20% de su valor basal. CCL11 presentó tendencia a la disminuciónen este grupo. La IL-10 aumentó en todos los isujetos >20% respecto su valor basal, superando a la triptasa sérica en este grupo (100% vs 60%).

En el grupo de **anafilaxia por AINE** todos los individuos a excepción de 1 (7/8) presentaron una disminución >20% de la MPO y 6/8 un incremento >20% de la MMP-8. CCL5/RANTES aumento >20% respecto su valor basal en todos los individuos con reacción IgE mediada a AINE, a diferencia de los otros grupos que no fue tan frecuente su elevación.

6.1.12.2. Valores de citocinas según la gravedad de la anafilaxia

Ninguna citocina dio resultados estadísticamente significativos (p>0,05) si comparabamos sus valores basales y agudos según la etiología de la anafilaxia.

La IL-10 y el MMP-9 aumentaron en la fase aguda >20% y el MMP-2 disminuyó >20% de su valor basal en todos los individuos con anafilaxia grave con afectación circulatoria. Además, todos estos individuos presentaban valores indetectables de MMP-13 tanto a nivel basal como agudo. El 60% de los individuos con anafilaxia grave con afectación circulatoria presentaron un incremento de >20% del PAI-1, y el otro 40% presentó un incremento que no llegó al 20% respecto el valor basal, cosa que no se objetivó en el resto de grupos.

6.1.12.3. Valores de citocinas según el endotipo de anafilaxia

MMP-9, RANTES, MPO presentaron una elevación estadísticamente significativa en su valor basal (p=0,022, p=0,046 y p=0,006 respectivamente) para los endotipos de predominio activación MC, el "endotipo IgE mediado" y el "endotipo no IgE / inhibición COX-1".

La IL-13 estaba basalmente elevada (p=0,035) para en el "endotipo no IgE / inhibición COX-1". El MMP-8 y el MMP-10 presentaron una elevación estadísticamente significativa respecto su valor basal para el "endotipo liberación de citocinas" y el "endotipo mixto" (p=0,047 y p= 0,032 respectivamente).

Todos los individuos del "endotipo liberación de citocinas" presentban una IL-6 basal superior a el resto de endotipos de forma estadísticamente significativa (p=0,042). **Figura 27.**

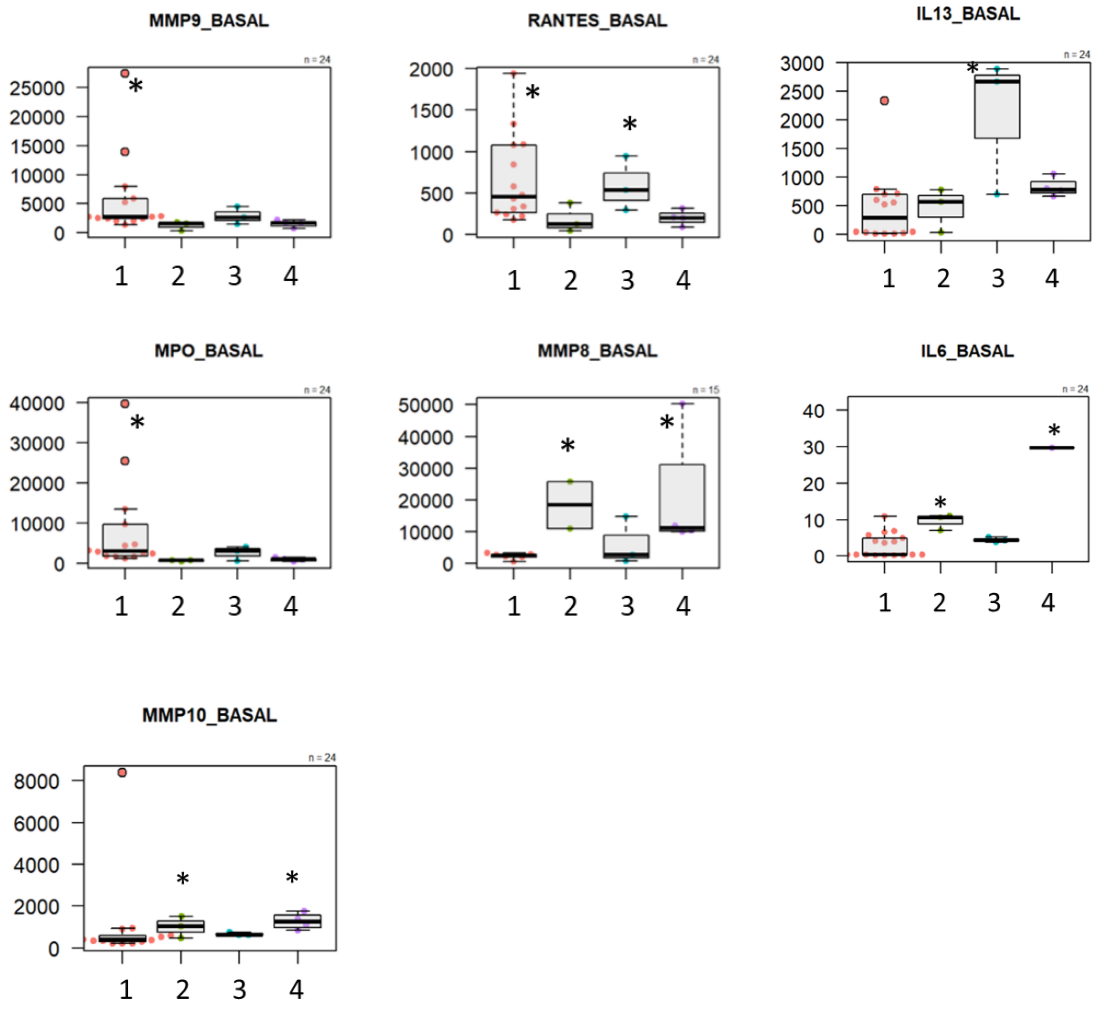


Figura 27: Citocinas (pg/mL) que presentaron una elevación estadísticamente significativa en su valor basal según el endotipo

Diagrama de caja que muestra el valor mínimo, el primer cuartil (inferior), la mediana, el tercer cuartil (superior) y el valor máximo.

1= IgE mediado, 2= Liberación citocinas, 3= no IgE/inhibición COX-1, 4 = Mixto

6.1.12.4. Valores de citocinas según el fenotipo de anafilaxia

Ninguna citocina dio resultados estadísticamente significativos (p>0,05) o tendencias para sus valores basales o agudos según el aparato o sistema afectado durante el episodio de anafilaxia.

6.2. SEGUNDO TABAJO

6.2.1. Algoritmo del estudio

En el segundo estudio se incluyeron los 98 pacientes con anafilaxia del primer trabajo, 59 pacientes con angioedema, 12 pacientes con urticaria y 12 controles (**Figura 28**). Este grupo control estuvo compuesto un 50% por individuos con antecedentes atópicos y un 50% por individuos no atópicos para de esta forma valorar si había diferencias en los valores basales entre los dos grupos.

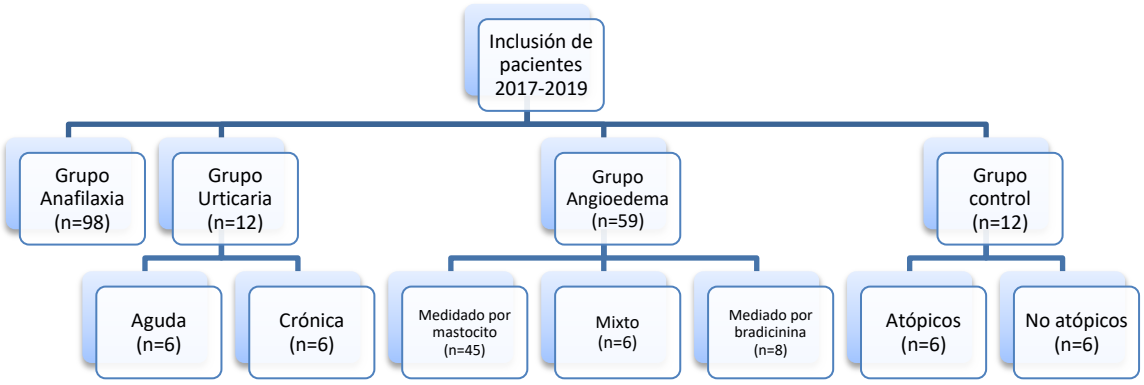


Figura 28: Algoritmo de la distribución de individuos del segundo trabajo

6.2.2. Características demográficas y clínicas de los sujetos

La distribución por sexo fue similar en los 4 grupos (aproximadamente itad y mitad mujeres) y el rango de edades fue similar en los grupos anafilaxia, urticaria y angioedema (medianas entre 54 y 60 años), mientras que en el grupo control eran más jóvenes, con mediana de 35,5 años. La mayoría de individuos eran de etnia blanca no hispana en todos los grupos. Entre el 40 y el 50% de los individuos tenían antecedentes personales de atopia, excepto en el grupo angioedema, donde solo eran un 25,4%. La anafilaxia previa y el asma fueron más prevalentes en el grupo anafilaxia, la reacción adversa a medicamentos (RAM) en el grupo urticaria y la rinitis alérgica en el angioedema. En todos los grupos al menos el 50% de los individuos tenían antecedentes patológicos y recibían por ello tratamiento crónico con algún o varios fármacos. Había más asmáticos con uso habitual de β-2-agonista en el grupo control que en el grupo anafilaxia (25% vs 12,2%).

Los individuos del grupo anafilaxia estaban más sensibilizados a alérgenos cutáneos (p<0,001) que el grupo urticaria y angioedema.

La **Tabla 12** resume las características demográficas y clínicas de los 4 grupos.

Tabla 12: Características demográficas y clínicas de los individuos incluidos en el segundo trabajo.

	CONTROL 12 (6.63%)	ANAFILAXIA 98 (54.14%)	URTICARIA 12 (6.63%)	ANGIOEDEMA 59 (32.6%)	p.value
SEXO MASCULINO n(%)	5 (41.7%)	47 (48%)	5 (41.7%)	32 (54.2%)	0.752
EDAD mediana años [IQR]	35.5 [31, 57.5]	55.5 [43, 66]	54 [47.5, 63.5]	60 [44, 71]	0.159
FUMADOR n(%)	3 (25%)	35 (35.7%)	4 (33.3%)	14 (23.7%)	0.443
ENOLISMO n(%)	1 (8.3%)	9 (9.2%)	1 (8.3%)	4 (6.8%)	0.965
OTROS TÓXICOS n(%)	0 (0%)	3 (3.1%)	1 (8.3%)	0 (0%)	0.194
RESIDENCIA URBANA n(%)	11 (91.7%)	96 (98%)	12 (100%)	59 (100%)	0.373
RAZA CAUCÁSICA n(%)	10 (83.3%)	89 (90.8%)	10 (83.3%)	54 (91.5%)	0.223
ANTEC. FAMILIARES ATOPIA	3 (25%)	9 (9.2%)	1 (8.3%)	2 (3.4%)	0.087
ANTEC. PERSONALES ATOPIA	4 (33,3%)	41 (41.8%)	5 (41.7%)	15 (25.4%)	0.134
rinitis n(%)	5 (41.7%)	27 (27.6%)	0 (0%)	6 (10.2%)	**0.002**
asma n(%)	3 (25%)	12 (12.2%)	0 (0%)	2 (3.4%)	**0.044**
alergia alimentos n(%)	1 (8.3%)	15 (15.3%)	0 (0%)	4 (6.8%)	0.275
ram n(%)	2 (16.7%)	26 (26.5%)	4 (33.3%)	4 (6.8%)	**0.008**
dermatits atópica n(%)	0 (0%)	2 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	0.637
dermatitis contacto n(%)	1 (8.3%)	0 (0%)	1 (8.3%)	0 (0%)	0.166
urticaria n(%)	0 (0%)	22 (22,5%)	0 (0%)	6 (10,2%)	**0.038**
anafilaxia n(%)	0 (0%)	35 (35,7%)	0 (0%)	0 (0%)	**0.006**
MASTOCITOSIS n(%)	0 (0%)	2 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	0.646
ANTEC. PATOLÓGICOS n(%)	6 (50%)	71 (72.4%)	11 (91.7%)	40 (67.8%)	0.15
enf. cardiovascular n(%)	2 (16.7%)	35 (35.7%)	1 (8.3%)	26 (44.1%)	0.055
enf. neumologica n(%)	2 (16.7%)	30 (30.6%)	2 (16.7%)	11 (18.6%)	0.35
enf. autoinmune n(%)	1 (8.3%)	16 (16.3%)	3 (25%)	5 (8.5%)	0.29
inmundeficiencia n(%)	0 (0%)	2 (2%)	0 (0%)	4 (6.8%)	0.406
neoplasia n(%)	0 (0%)	37 (37.8%)	3 (25%)	4 (6.8%)	**<0.001**
enf. digestiva n(%)	1 (8.3%)	5 (5.1%)	2 (16.7%)	2 (3.4%)	0.18
insuf. renal crónica n(%)	0 (0%)	2 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	0.669
insuf hepática crónica n(%)	0 (0%)	2 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	0.644
enf. psiquiátrica n(%)	1 (8.3%)	7 (7.1%)	4 (33.3%)	4 (6.8%)	0.053
enf. endocrina n(%)	4 (33.3%)	19 (19.4%)	3 (25%)	18 (30.5%)	0.331
enf. neurológica n(%)	2 (16.7%)	10 (10.2%)	1 (8.3%)	7 (11.9%)	0.857
TRATAMIENTO CRÓNICO n(%)	6 (50%)	55 (56.1%)	8 (66.7%)	36 (61%)	0.79
inmunosupresores n(%)	1 (8.3%)	10 (10.2%)	2 (16.7%)	3 (5.2%)	0.424
ieca n(%)	2 (16.7%)	11 (11.2%)	0 (0%)	9 (15.5%)	0.488
aine n(%)	0 (0%)	15 (15.3%)	3 (25%)	4 (6.9%)	0.121
corticoide n(%)	1 (8.3%)	13 (13.3%)	2 (16.7%)	2 (3.4%)	0.127
antileucotrieno n(%)	0 (0%)	4 (4.1%)	0 (0%)	0 (0%)	0.616
antidepresivo n(%)	1 (8.3%)	10 (10.2%)	3 (25%)	3 (5.2%)	0.165

cromoglicato n(%)	0 (0%)	1 (1%)	0 (0%)	0 (0%)	13
anti-h1 n(%)	0 (0%)	4 (4.1%)	1 (8.3%)	4 (6.9%)	0.595
anti-h2 n(%)	0 (0%)	1 (1%)	0 (0%)	0 (0%)	13
opiaceo n(%)	0 (0%)	7 (7.1%)	0 (0%)	1 (1.7%)	0.509
β-2-agonista n(%)	3 (25%)	12 (12.2%)	0 (0%)	6 (10.3%)	0.297
β-bloqueante n(%)	1 (8.3%)	9 (9.2%)	0 (0%)	4 (6.9%)	0.846
anticoagulante oral n(%)	1 (8.3%)	10 (10.2%)	0 (0%)	2 (3.4%)	0.891
COFACTOR n(%)	0 (0%)	7 (8.1%)	1 (25%)	4 (57.1%)	**0.002**
PC INHALNTES + n(%)	**4 (66.7%)**	**23 (71.9%)**	**2 (33.3%)**	**8 (30.8%)**	**<0.001**
PC ALIMENTOS + n(%)	1 (20%)	14 (43.8%)	2 (28.6%)	2 (8%)	0.014
PC LATEX + n(%)	1 (14.3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0.173
PC ANISAKIS + n(%)	0 (0%)	8 (22.9%)	0 (0%)	6 (20%)	0.441

ANTEC, antecedente; ENF. Enfermedad; IECA, inhibidor del enzima convertidos de angiotensina; AINE, antiinflamatorio no esteroideo; TC, pruebas cutáneas, ds, disódico.

6.2.3. Factores de riesgo

El grupo anafilaxia tenía significativamente más antecedentes de anafilaxia previa (p=0,006) y urticaria (0,038) que el resto de grupos. La reacción adversa a medicamentos (RAM) fue significativamente más prevalente en el grupo urticaria (p=0.008).

Respecto antecedentes patológicos, tener el antecedente de neoplasia era significativamente mayor en el grupo anafilaxia que en el grupo control (p<0.01). Los dos individuos con diagnóstico de mastocitosis presentaron reacciones anafilácticas graves.

A pesar de que la distribución de edad entre grupos no mostró diferencias estadísticamente significativas, si se estratificaba por gravedad de la anafilaxia, la una edad más elevada se asoció de forma estadísticamente significativa (p<0,05) a reacciones más graves.

6.2.4. Cofactores

Los cofactores fueron significativamente (p=0,002) más prevalentes en el grupo angioedema, estando presentes en el 57,1% de los individuos y en el 25% de los del grupo urticaria (ver **Tabla 14** del apartado 6.2.1.) El cofactor en estos 2 grupos de individuos fue siempre el AINE.

6.2.5. Comparación de los valores basales y agudos de triptasa basal entre la anafilaxia, la urticaria, el angioedema y los controles

No se observaron diferencias estadísticamente significativas (p>0,05) en los valores basales de triptasa sérica entre anafilaxia (6,7±8 mcg/l), urticaria (4,8 ± 6.1 mcg/L), angioedema (5,5 ± 2.8) y controles (5.8 ± 3.2 mcg/L).

Como ya se ha comentado en el Primer Trabajo, el 74.5% (n=73) de pacientes del grupo anafilaxia elevaron la triptasa igual o más de 120%+2 del valor basal en T1 o T2. El 33,3% (n=4) de los pacientes con urticaria elevó la triptasa sérica en T1 o T2 mientras que ningún paciente con angioedema mostró elevación de la misma.

La triptasa aguda en T2 fue estadísticamente significativa (p<0,001) para diferenciar la anafilaxia y la urticaria del angioedema (**Figura 29**).

*

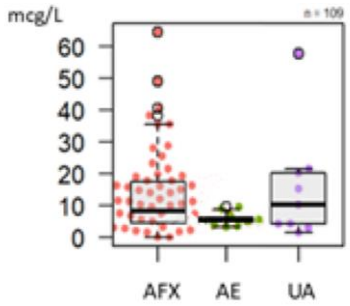


Figura 29: Elevación de triptasa (mcg/L) a las 6h(T2) entre anafilaxia, angioedema y urticaria (UA)
Representado en diagrama de caja que muestra el valor mínimo, el primer cuartil (inferior), la mediana, el tercer cuartil (superior) y el valor máximo.
AFX, anafilaxia; AE, angioedema; UA, urticaria

No se observaron diferencias significativas en los valores de triptasa basal o aguda según los distintos endotipos de angioedema o si la urticaria era aguda o crónica.

6.2.6. Comparación de valores basales y agudos de biomarcadores de la coagulación y la fibrinólisis de forma aguda entre la anafilaxia, la urticaria, el angioedema y los controles

A nivel global, no hubieron diferencias estadísticamente significativas (p>0,05) en los valores basales de TTPA, FXI y FXII, anti-Xa, fibrinógeno, dímero D y complejo PAP, entre los distintos grupos.

Sin embargo, los valores agudos de FXI y FXII fueron estadísticamente significativas (p=0,001 y p=0,003 respectivamente) para diferenciar la anafilaxia de la urticaria y el angioedema. EL FXI y FXII estaban más disminuidos en anafilaxia respecto la urticaria y el angioedema (**Figura 30**).

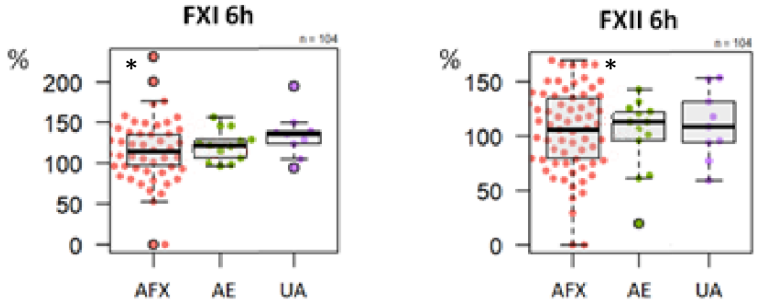


Figura 30: Valores de FXI (%), FXII (%),C3 (mg/dL) y ECA (mg/dL) a las 6h(T2) entre anafilaxia, angioedema y urticaria
Diagrama de caja que muestra el valor mínimo, el primer cuartil (inferior), la mediana, el tercer cuartil (superior) y el valor máximo.
AFX, anafilaxia; AE, angioedema; UA, urticaria

- <u>Según endotipo de angioedema y en urticaria</u>

Respecto a endotipo de angioedema, se encontraron resultados estadísticamente significativos para los niveles basales de FXII que estaban más disminuidos y el TTPA más elevado de forma basal en el "endotipo mediado por mastocito" (p=0,027 y p= 0,028) (**Figura 31**).

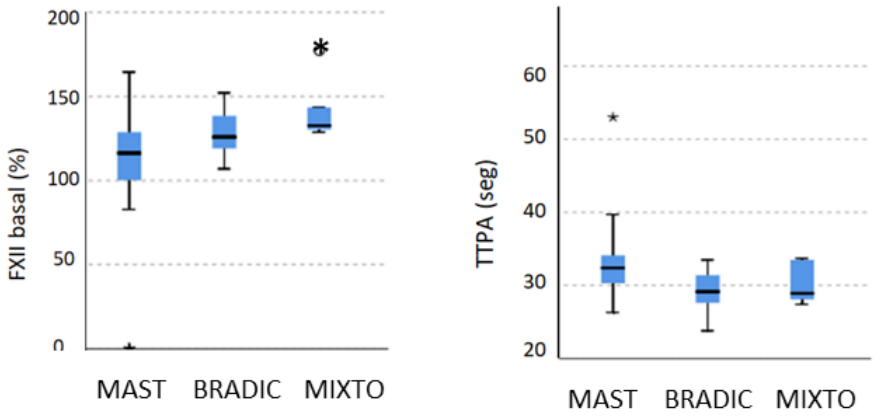


Figura 31: Valores basales de FXII (%) y TTPA(seg) según endotipo de angioedema
Diagrama de caja que muestra el valor mínimo, el primer cuartil (inferior), la mediana, el tercer cuartil (superior) y el valor máximo.
MAST, mediado por mastocito; BRADIC, mediado por bradicinina

Respecto a la urticaria, en los valores basales, encontramos que los individuos con urticaria crónica tenían niveles de dímero D más bajos que las urticarias agudas, aunque los resultados

no resultan estadísticamente significativos. Sin embrago, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las determinaciones agudas a las 6h de complejos PAP (p=0,046) que estaban más aumentados en urticaria aguda y FXII que estaba más disminuida (p=0,05) en urticaria aguda, datos que son congruentes con una activación del sistema de contacto (**Figura 32**).

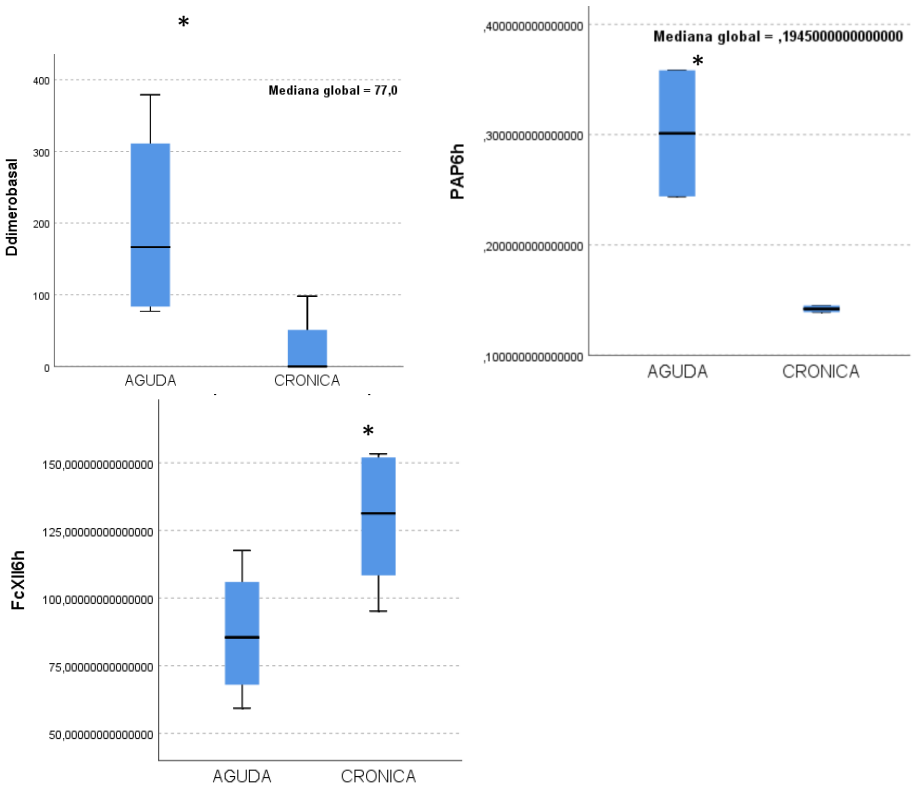


Figura 32: Elevación de biomarcadores de la coagulación y firbinolisis según el tipo de urticaria
A) Valores de D-dímero basal (ng/dL); B) Valores agudos de complejos PAP (nM) a las 6h(T2); C) Valores agudos de FXII (%) a las 6h(T2). Representados en diagrama de caja que muestra el valor mínimo, el primer cuartil (inferior), la mediana, el tercer cuartil (superior) y el valor máximo.

No se observaron diferencias significativas en el resto de biomarcadores estudiados (TTPA, anti-Xa, fibrinógeno y FXI).

6.2.7. Comparación de valores basales y agudos de biomarcadores del sistema de contacto entre anafilaxia, urticaria angioedema y controles

De forma global, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (p>0,05) en los valores basales y agudos de C3, C4, cHK, ECA, complejo FXIa/C1-INH, complejo FXIIa/C1-INH o complejo PK/C1-INH entre grupo anafilaxia, urticaria, angioedema y control.

Sin embargo, los valores agudos de ECA y C3 en T2 fueron estadísticamente significativas (p=0,019 y p=0,049 respectivamente) para diferenciar la anafilaxia de la urticaria y el angioedema. El C3 estaba más disminuidos en anafilaxia y la ECA más disminuida en angioedema (**Figura 33**).

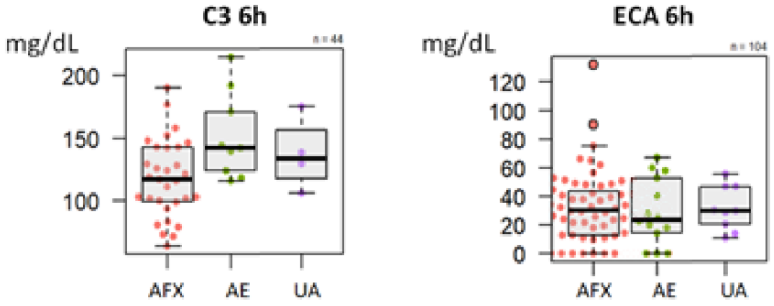


Figura 33: Valores de C3 (mg/dL) y ECA (mg/dL) a las 6h(T2) entre anafilaxia, angioedema y urticaria
Diagrama de caja que muestra el valor mínimo, el primer cuartil (inferior), la mediana, el tercer cuartil (superior) y el valor máximo.
AFX, anafilaxia; AE, angioedema; UA, urticaria

- Según endotipo de angioedema y en urticaria

Respecto a endotipo de angioedema, se encontraron resultados estadísticamente significativos para los niveles basales de C4, que estaba disminuido de forma basal en el "endotipo mediado por bradicinina" (p=0,002)y la ECA basal estaba más disminuida en el "endotipo mixto", puesto que la mayoría de estos individuos recibían tratamiento con IECA de forma basal (**Figura 34**).

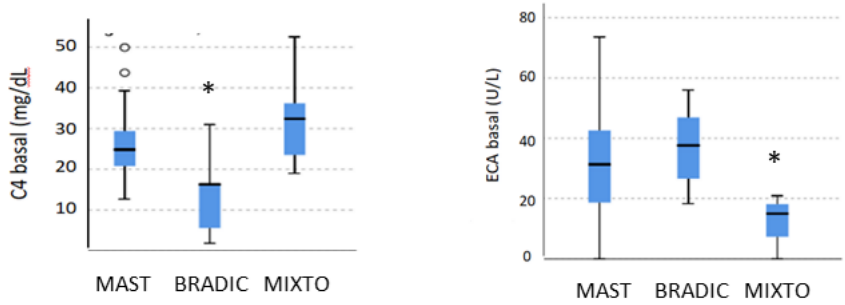


Figura 34: Valores basales de C4 (mg/dL) y ECA basales (U/L) según endotipo de angioedema
Diagrama de caja que muestra el valor mínimo, el primer cuartil (inferior), la mediana, el tercer cuartil (superior) y el valor máximo.
MAST, mediado por mastocito; BRADIC, mediado por bradicinina

Respecto al tipo de urticaria, no hubo diferencias estadísticamente significativas en los valores basales, pero sí en las determinaciones agudas en T1 de complejos FXIIa/C1-INH (p=0,046) que estaban más aumentados en urticaria aguda.

No se observaron diferencias significativas en el resto de biomarcadores estudiados (C3, C4, cHK, complejos FXIa/C1-INH y PK/C1-INH).

6.2.8. Comparación de los valores basales y agudos de citocinas entre anafilaxia, urticaria, angioedema y controles

Se recogieron los resultados de IL-6 y IL-10 realizados de forma rutinaria en nuestro hospital y se analizaron los resultados del análisis de subgrupo del resto de citocinas realizadas mediante inmunoensayo magnético. Este subgrupo estuvo formado por los 26 pacientes con anafilaxia del Primer Tabajo, 6 pacientes con urticarias, 6 pacientes con angieodemas y 4 controles sanos. Para valorar los diferentes endotipos se incluyeron en el análisis a tres individuos con urticaria aguda y tres con urticaria crónica, y tres pacientes con angioedema "endotipo mediado por mastocito" y tres por "endotipo mediado por bradicinina".

La IL-22 y la IL-13 se observa elevada de forma estadísticamente significativa (p=0,011 y p=0,042) de forma basal en los individuos con anafilaxia respecto urticaria y angioedema y controles sanos (**Figura 35**)

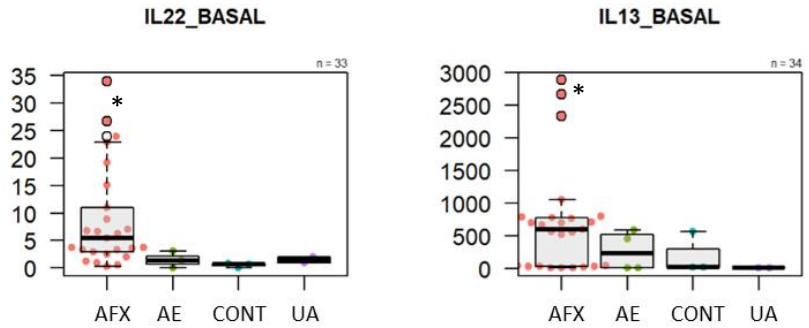


Figura 35: Valores de IL13 y IL-22 basales (pg/mL) en individuos con anafilaxia, urticaria, angioedema y controles.
Diagrama de caja que muestra el valor mínimo, el primer cuartil (inferior), la mediana, el tercer cuartil (superior) y el valor máximo.
AFX, anafilaxia; AE, angioedema; CONT, control; UA, urticaria

Las citocinas MMP-2 (p=0,05), MMP-9 (p=0,022), MMP-10 (p=0,006), MMP-13 (p=0,027), RANTES (p=0,003), MPO (p=0,009), IL-6 (p=0,002), IL-8 (p=0,01), IL-13 (p=0,03), CCL4 (p=0,027), CCL11 (p=0,028), CCL26 (p=0,042) y OSM (p=0,032) mostraron diferencias estadísticamente

significativas comparando sus determinaciones agudas (T1 o T2) respecto su basal (T0) para los 3 grupos.

En la **Figuras 36** y en la **Tabla 13** se muestran las gráficas de cada citocina para los 3 grupos y la representación gráfica de cómo se comportaban estas citocinas para cada uno de los grupos.

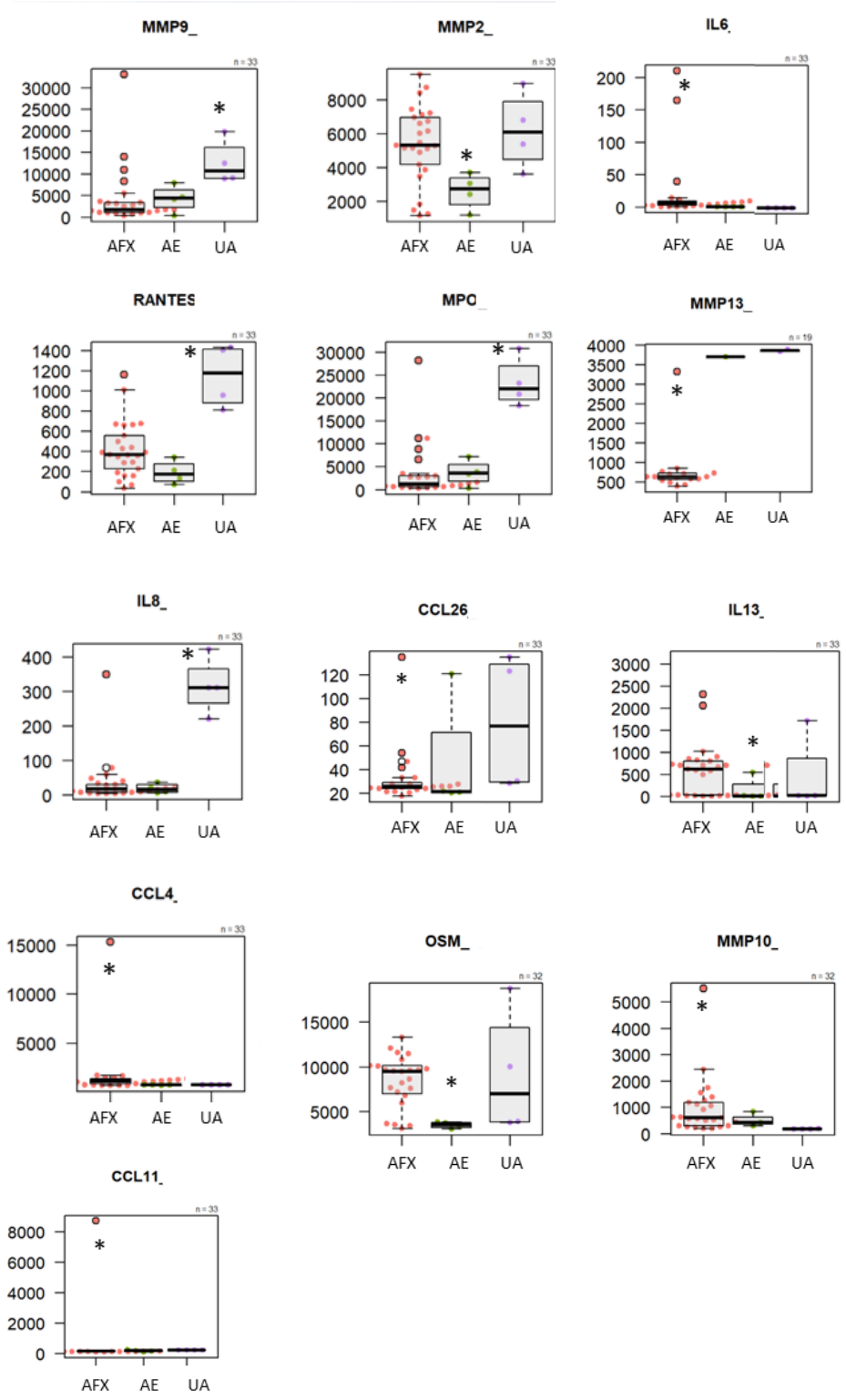


Figura 36: Citocinas (pg/mL) que mostraron diferencias estadísticamente significativas para anafilaxia, angioedema y urticaria

Diagrama de caja que muestra el valor mínimo, el primer cuartil (inferior), la mediana, el tercer cuartil (superior) y el valor máximo.

AFX, anafilaxia; AE, angioedema; CONT, control; UA, urticaria

Tabla 13: Elevación de citocinas en fase aguda según se trate de anafilaxia, angioedema o urticaria

	Anafilaxia	Urticaria	Angioedema
IL-6	↑	=	=
IL-8	↑	↑↑	=
IL-13	↑	=	=
CCL4	↑	=	=
CCL11	↑↑	↑	=
CCL26	↑	↑↑	=
MMP2	↑	↑↑	=
MMP-9	=	↑↑	↑
MMP-10	↑↑	=	↑
MMP-13	=	↑↑	↑
RANTES	=	↑↑	↑
MPO	=	↑↑	↑
OSM	↑↑	↑	=

MPO, mieloperoxidasa; OSM, oncostatina M

- <u>Según endotipo de angioedema y urticaria</u>

Ninguna citocina dio resultados estadísticamente significativos según el endotipo de urticaria y angioedema.

7. DISCUSIÓN

Este trabajo evalúa por primera vez de forma simultánea tres sistemas interrelacionados en la fisiopatología de la anafilaxia, buscando grupos de biomarcadores que ayuden a su diagnóstico. En la población estudiada la elevación de la triptasa sérica en fase aguda de la anafilaxia se produce en la mayoría de pacientes que han sufrido una anafilaxia (74,5% de los individuos), similar a las publicaciones previas de Buka RJ *et al.*[199] y Dua S *et al.*[100] y por nuestro propio grupo en 2013[98]. No obstante, hay un porcentaje elevado de pacientes en el cual este biomarcador no apoya el diagnóstico de anafilaxia. En nuestro trabajo también confirmamos que la elevación de la tritpasa sérica se corelaciona con la gravedad de la anafilaxia[199].

Nuestro grupo evaluó con anterioridad el sistema de coagulación en anafilaxia midiendo el anti-Xa y TTPA, presentando sólo el 20% de los pacientes con anafilaxia un TTPA prolongado, pero casi todos un anti-Xa elevado [109]. En este trabajo no hemos sido capaces de repoducir estos resultados con estos dos biomarcadores ni con el resto de uso rutinario del sistema de la coagulación. En nuestro estudio evaluamos de nuevo biomarcadores del sistema de la fibrinólisis, la mayoría de uso rutinario, y encontramos que el dímero D se elevó >20% respecto su valor basal en el 85,9% de los pacientes que habían sufrido una anafilaxia, superando en frecuencia a la triptasa sérica e incluyendo el 76% (19/25) de los individuos en los que la triptasa no se elevó. Su elevación se relacionó de forma proporcional a la gravedad de la anafilaxia de forma significativa a las 2h y las 6h. El dímero D, producto de la degradación de la fibrina a expensas de la activación de la plasmina producia por los activadores tisulares del plasminógeno activados por la triptasa mastocitaria, había sido descrito como un potencial biomarcador de anafilaxia en los trabajos anteriores de Truong HT *et al.*.[179], Lombardini *et al.*.[177] e incluso nuestro propio grupo en trabajos previos de de Sala-Cunill[109], pero no hasta ahora no se había demostrado con un número tan elevado de pacientes ni tampoco se había relacionado con la gravedad de la anafilaxia. Por primera vez observamos el potencial como biomarcador del complejo plasmina-anti-plasmina (PAP), producto también de la activación de la plasmina y por tanto de la fibrinolisis, que aunque se elevó con menor frecuencia que la triptasa (65,5% de las anafilaxias), mostró estar también correlacionado con la gravedad de forma significativa a las 6h. A pesar de que como biomarcadores tienen sus limitaciones porqué marcan activación de la fibrinólisis y por tanto podrían verse elevados en otras patologías que activen esta vía, algunas de las cuales pueden estar en el diagnóstico diferencial

de anafilaxia (Ej.: TEP)[200,201], como hemos podido demostrar pueden complementar a la triptasa sérica para mejorar el diagnóstico y graduación de la anafilaxia.

Respecto el sistema de contacto, decidimos incluir aquí el complemento pensando en que el consumo de C4 se relacionaría con la activación del complemento y consumo de C1INH, pero no conseguimos número suficiente de muestra para analizar los biomarcadores del complemento. El estudio de otros biomarcadores del sistema de contacto como el producto de degradación de la bradicinina, cHK, que ya fue publicado por nuestro propio grupo por Sala-Cunill et al. como un biomarcador de gravedad en anafilaxia y relacionado a la activación de la coagulación que producía la heparina liberada por la degranulación de mastocitos, en nuestro trabajo no se ha podido reproducir. El estudio de los complejos resultantes de la inhibición del C1INH sobre proteasas, que sería una mediad indirecta de la activación del sistema de ocntacto, tampoco nos dio los resutlados esperados, que sería que estuvieran más elevados en enafialxias más graves. Consideramos que esta falta de resultados significativos pueda ser debida a la dificultad de la técnica y al traslado de las muestras en transporte aéreo donde la cadena del frío podría haber fallado y haberse producido una activación del plasma y por tanto consumo de los mediadores del complemento. A pesar de que no fueron estadísticamente significativos los valores de cHK, C3 y C4 eran más bajos a mayor gravedad de la reacción. Puesto que la ECA se realizó a nivel local, sus valores eran fiables. Se observó que los niveles basales de ECA estaban de forma basal más disminuidos en las anafilaxias graves, independientemente del consumo de IECAs. Esto nos induce a pensar que uno de los factores que puede afectar a la gravedad de las reacciones es tener una activación basal del sistema de contacto y menor enzima degradadora de la bradicinina.

En este trabajo se realiza un estudio exploratorio de citocinas para valorar si una o un conjunto podrían mejorar el diagnóstico de anafilaxia. Lo primero que demostramos es que todas las citcinas se pudieron medir correctamente en suero, no siendo tan estables ne plasma, por lo que su uso de forma rutinària en suero sería una posibilidad. Al no disponer de puntos de corte a partir de los cuales se pueda indicar que una citocina está elevada o disminuida, puesto que los valores normales en la población no están claramente definidos y hay mucha variabilidad interindividual, decidimos tener en cuenta aquellas citocinas con cambios de >20% respecto su valor basal durante la fase aguda de la anafilaxia. Aquellas que mostraron resultados más prometedores como biomarcadores generales de anafilaxia fueron la IL-10, el PAI-1 la IL-6 y el CCL5/RANTES. La IL-10 se incrementó y el PAI-1 disminuyó con mayor frecuencia que la triptasa sérica correlacionándose con la misma. La IL-10 además se correlacionó con gravedad,

como ya había sido descrito por Brown *et al.*[135], y el PAI-1 estaba elevado en todos los pacientes con anafilaxia grave, siendo >20% respecto al valor basal en el 60% ellos, apuntando como marcador de gravedad también. El PAI-1, un inhibidor del activador del plasminógeno producido por células endoteliales, entre otros estímulos por la degranulación mastocitaria[180] o la presencia de IL-6[139], no tiene por ahora trabajos publicados previos que destaquen su papel como biomarcador de anafilaxia. La IL-6 y CCL5/RANTES se incrementaron con la misma frecuencia que la triptasa sérica, pero detectaban el 65,4% de los individuos con triptasa sérica no elevada. La quimiocina proinflamatoria CCL5/RANTES es producida por varias células, incluidas las células epiteliales, eosinófilos, basófilos y mastocitos, que la pueden producir y responder a ella como potente quimioatrayente[202]. La MMP-9 aumento y el MMP-2 disminuyó >20% respecto su valor basal en todos los pacientes con anafilaxia grave analizados. Las MMP son liberadas predominantemente por neutrófilos y estarían marcando una activación de los mismos durante la anafilaxia, fenómeno que ya ha sido descrito en modelos murinos[144]. A diferencia de los trabajos previos revisados extensamente por Nguyen *et al.*[118], no se encontraron cambios significativos en las citocinas TNFα, IL-1β, IL-4, CCL-2 ni tampoco relación con gravedad para IL-2 o IL-4.

En nuestro trabajo revisamos los factores de riesgo descritos para anafilaxia y los agravantes y lso comparamos con nuestra serie de pacientes incluidos. Ser hombre, los antecedentes de patología psiquiátrica, enfermedad cardiovascular o asma, y la toma habitual de estatinas, beta-bloqueantes o IECAs no se encontraron asociados a anafilaxia. En el grupo de anafilaxia destaco el antecedente de neoplasia como factor de riesgo, pero esto se trata de un sesgo de selección puesto que muchos pacientes provenían de hospitales de día de oncología o hematología. Al igual que en revisiones previas, la edad resultó ser un factor asociado a gravedad de anafilaxia, y también cuando la causa fue el veneno de himenóptero, un contraste yodado, la administración de suero/plasma o el antecedente de mastocitosis sistémica. Es importante señalar que el número de pacientes incluidos para estas causas de anafilaxia fue pequeño, por lo que estos resultados deben interpretarse con cuidado.

Las causas de anafilaxia más frecuentes en nuestro trabajo fueron los fármacos (77%): AINE y antibióticos 36%, quimioterápicos un 25%, biológicos 11%. Esto coincide con las series europeas y españolas que definen que los fármacos son la 1ª causa de anafilaxia en adultos[5,19]. La segunda causa más frecuente fue la alimentaria (12%), la mayoría provocada por la nsLTP de vegetales. Nuestro trabajo coincide con trabajos previos en que la causa alimentaria fue la que menos elevó la triptasa sérica de forma aguda, como ya se había descrito por nuestro

grupo en 2013[98] y por el trabajo e Dua S *et al.*[100]. En este grupo fue donde, en nuestro estudio, la elevación de la L-10 mostró que podría superar a la triptasa claramente, detectando al 100% de los pacientes con anafilaxia. Otras citocinas mostraron un papel distintivo con la causa alimentaria. Hubieron incrementos de >20 % de citocinas de producción mayoritariamente mastocitarias (IL-2 IL-3, IL-8, IL-13, CCL26/Eotaxina-3), neutrofílicas (IL-8, MMP-1, MMP-7), osteopontina producida por macrófagos y IL-22 producida por cels. NK. Estos hallazgos confirman la activación mastocitaria y de basófilos en la anafilaxia por alimentos y además sugieren que se pueden estar activando más células del sistema inmune innato, lo que justificaría porqué hay un 35% de las anafilaxias por alimentos que no elevan la triptasa sérica. Puesto que el grupo de individuos de anafilaxia por alimentos en el panel de citocinas es demasiado pequeño para extrapolar resultados, no podemos proponer un panel de citocinas fiable en el momento actual.

Destaca en nuestro trabajo que tan sólo el 50% de las anafilaxias por fármacos no biológicos elevaron la triptasa sérica de forma aguda, a diferencia de otras series descritas en que este porcentaje era muy superior[199]. Esto podría estar justificado porqué > 50% de las anafilaxias en este grupo no fueron graves. En cuanto al grupo de anafilaxia por AINE, independientemente del mecanismo, todos los individuos a excepción de uno presentan una disminución de la MPO y el 75 % un incremento de la MMP-8. Ambas citocinas son producidas por neutrófilos, el papel de los cuales se ha abordado en humanos sobre todo en las reacciones no IgE mediadas por inhibición COX-1, donde se ha visto que al tener una actividad más alta de 5-LO y producen sobretodo LTA4 [203].

Cuando evaluamos los biomarcadores de anafilaxia según el endotipo, observamos que la triptasa fue más útil en aquellas anafilaxias con endotipos de activación mastocitaria predominante (IgE mediado, mixto y no IgE mediado / inhibición COX-1). Destacamos que la elevación de la triptasa se produjo más tarde (a partir de las 6h) en el grupo de endotipo no IgE mediado / inhibición COX-1, que se explica por la activación más tardía del mastocito secunadaria a la producción de leucotrienos, ya descrito con anterioridad por diversos grupos que han estudiado mediadores de este tipo de reacciones[204], entre ellos el trabajo de Bosso *et al.*[205]. Por el contrario, el D-dímero estaban más elevado en el endotipo liberación de citocinas, detectándose también un consumo de FXII estadísticamente significativo respecto el resto de endotipos, evidenciando que esta fibrinólisis era probablemente una consecuencia de una activación de la coagulación. La activación de la fibrinólisis causada por la activación mastocitaria ha estado más que bien descrita, pero por primera vez demostramos que la

fibrinólisis es un sistema que se activa significativamente en las anafilaxias de endotipo diferente. Curiosamente el endotipo liberación de citocinas tenía niveles basales de fibrinógeno y anti-Xa más aumentados que el resto. No podemos descartar que esto sea debido a que los pacientes que presentaron este tipo de reacciones tenían enfermedad neoplásica activa. Como yo se ha descrito en los trabajos anteriores de Stone *et al.*[129] y Brown et[135] el endotipo liberación de citocinas muestra un incremento de IL-6 de forma aguda y esto se confirma en nuestro trabajo donde todos los individuos de este endotipo presentaron un incremento de la IL-6, aunque no encontramos datos significativos para marcar gravedad a diferencia de los trabajos previos. Este endotipo mostró en nuestro grupo tener valores basales de MMP-8 y MMP-10 más elevados que el resto. En todos los individuos con endotipo IgE mediado hubo un incremento del CCL5/RANTES, como ya se describió por el grupo *et al.* Gawlik *et al.*[206], sin poder determinar si se relaciona con la gravedad. Como se ha comentado anteriormente el CCL5/RANTES es producido por basófilos, eosinófilos, macrófagos y cels. NK, destacando la probable implicación de estos grupos celulares en las reacciones IgE mediadas. CCL5/RANTES, al igual que la MMP-9 y MPO mostraron tener valores basales elevados en el endotipo de predominio activación MC (IgE medidado y no IgE / inhibición COX-1. EL endotipo no IgE/inhibición COX-1 presentaba valores basales de IL-13 más elevados que el resto.

El análisis de fenotipos de anafilaxia mostró que la triptasa sérica estaba más elevada en aquellos pacientes que presentaban manifestaciones clínicas cardiovasculares y digestivas. Pocos trabajos han evaluado la utilidad de la tritpasa para fenotipar las anafilaxias, pero los trabajos publicados sobre el tema destacan que la tritpasa y a histamina mastocitaria presentan correlación moderada con síntomas cutáneos que eritema y urticaria[207]. Respecto a clínica cutánea nosotros encontramos asociación de los biomarcadores de fibrinolisis dímero D y complejo PAP, estando menos elevados en los pacientes que los presentan. Sin embargo, estos pacientes presentaron biomarcadores de sistema de contacto más elevados, en concreto el cHK y los complejos FXIa/C1-INH y PK/C1-INH. Parece lógco concluir que esta activación del sistema de contacto se produce en mayor proporción que la activación secudnaria de la coagualción por la heparina mastocitaria, puesto que la fibrinòlisis no se activa en tal grado. Lo que de nuevo volvia a salir asociado con la activación del sistema de la fibrinòlisis era la gravedad en forma de afectación del sistema circulatorio, presentando estos pacientes mayores niveles de dímero D y complejos PAP de forma aguda. Los individuos con clínica digestiva disminuyeron más los niveles de fibrinógeno de forma aguda y los de clínica respiratòria consumían menos factor XI y XII.

En nuestro trbajo nos propusimos comparar los biomarcadores estudiados con otras dos patologías con mencanismos y expresión clínica cutáena similar, la urticaria y el angioedema, puesto que estas dos entidades frecuentemente se confuden con reacciones sistémicas y nos interesaba un biomarcador específico de anafilaxia. La triptasa sérica a las 6h demostró ser un biomarcador que nos ayudaba a diferenciar entre angioedema y urticaria y anafilaxia, ya que los individuos con brote agudo de angioedema no elevaron la triptasa sérica, independientemente del endotipo. La urticaria elevó la triptasa sérica en un 33,3% de los individuos, sobre todo a las 6h y más en el grupo de UCE, y aunque sus valores son inferiores a la media del grupo anafilaxia, hay individuos del grupo anafilaxia que la elevaron menos o no la elevaron y por tanto es importante destacar que la triptasa únicamente no nos va a diferenciar una urticaria aguda de una anafilaxia en los casos dudosos. La elevación de la tryptase sérica en la urticaria sin criterios de anafilaxia ya se describió por Siles R *et al.*[208], con un 8.8% de individuos con urticaria crónica con triptasa ≥13.5 mcg/L y Aberer E *et al.*[209] demostrando que un 30% de los individuos con urticaria tenían elevación aguda de la triptasa sérica. Incluso el grupo de Ferrer M *et al.* ha postulado su utilidad como biomarcador de actividad de UCE[154].

Los niveles dímero D fueron mayores y los niveles de fibrinógeno fueron menores a las 6h en los individuos con anafilaxia, seguido del grupo urticaria y finalmente más bajos en el grupo angioedema de forma estadísticamente significativa. Estos resultados nos demuestran que la fibrinólisis se activa en los 3 procesos, sobre todo cuanto más "sistémico" es el proceso. La elevación del Dímero D en urticaria ya se describió por Baek *et al.*[210] y en angioedema, sobretodo mediado por bradicinina[211]. Los trabajos previos de Kolkhir *et al.*.[212] mostraban fibrinógeno aumentado en urticarias comparados con controles sanos y se correlacionaba significativamente con la gravedad de la enfermedad.

El FXI, FXII estaban más consumidos en los pacientes con anafilaxia que en las urticarias y angieodemas, lo que nos relaciona la activaciónde la firbinolisis como secundria a la activación de la coagulación en la anafilaxia.

De los biomarcador del sistema del sistema de contacto, tan sólo dio resultados estadísticamente significativos los valores agudos de ECA, la principal enzima de la degradación de la bradicinina, estando más disminuida a las 6h en el grupo de angioedema, Se descartó que esto fuera debido al consumo de fármacos IECA, por lo que este consumo se debe atribuir a una inhibición del sistema del contacto que sólo sería necesaria por su activación en fase aguda.

Respecto a endotipo de angioedema, en endotipo mediado por mastocito mostró niveles basales de FXII más disminuidos y el TTPA más elevado, miesntras que el endotipo medaido por bradicinina msotró niveles basales de C4 más disminuidos. La ECA basal estaba más disminuida en el "endotipo mixto", puesto que la mayoría de estos individuos recibían tratamiento con IECA de forma basal. Ningún biomarcador agudo ayudó a diferenciar los endotipos de angioedema. En múltiples trabajos previos, resumidos en la revisión de Hofman *et al.*[128] se demostró que en los brotes agudos de angioedema bradicininérgico se elevaban los complejos de PAP y los complejos FXII-C1INH y FXI-C1INH. Creemos que no hemos obtenido resultados estadísticamente significativos en más parámetros del sistema de contacto por una muestra de determinaciones agudas y basales insuficientes de individuos con angioedema mediado por bradicinina. Respecto a la urticaria, en los valores basales, encontramos que los individuos con urticaria crónica tenían niveles de dímero D más bajos que las urticarias agudas, aunque los resultados no resultan estadísticamente significativos. Las urticàries agudes presentan mayor elevación de complejos PAP y complejo FXIIa/C1-INH y mayor consumo de FXII datos que son congruentes con una activación del sistema de la coagulación, de la fibrinòlisis y del sistema de contacto que parece que es más notable en los brotes agudos que en la presentación crònica de la enfermedad. En el trabajo de van der Linden *et al.*[159] los individuos que sólo desarrollaron erupción urticaria como reacción al veneno mostraron un aumento no significativo en los complejos C1-INH.

Respecto a las citocinas analizadas, si se comparaba anafilaxia con urticaria y angioedema, IL-6, CCL-4, IL-13 tan sólo se elevaron de forma aguda en la anafilaxia, diferenciando por tanto ésta de la urticaria y el angioedema. Otras citocinas mostraron patrones de mayor elevación en urticaria y angioedema, como CCL-5/RANTES, MPO, MMP-9, MMP-13. MMP-2, IL-8 i CCL-26/Eotaxina-3 estaban más elevadas en urticaria que en anafilaxia y angioedema. OSM, CCL-11 no se elevaba en angioedema y MMP-10 en urticaria. MPO, IL-13 y IL-8 ya habían sido descritas como biomarcador de angioedema por Veszeli *et al.*[213], y MMP-9 de urticaria por Tedeschi A *et al.*[214] y Dilek F *et al.*. [215] IL-6 se había descrito en ambas patologías por Puxxedu *et al.* [153]. CCL-4, CCL-5/RANTES, CCL-26/Eotaxina-3, MMP-2 y MMP-13 no habían sido estudiadas en angioedema y urticaria con anterioridad. La elevación de OSM y CCL-11 en urticaria y de MMP-10 en angioedema tampoco había sido descrita hasta el momento.

Los individuos con anafilaxia tiene un nivel basal de IL-22 elevado, sin embargo el grupo urticaria tenia los mismos niveles que los controles sanos y el grupo angioedema era levemente inferior a controles sanos. La IL-22 es una citocina de la familia IL-10 producida por

células de estirpe linfoide: células T colaboradoras (Th) 17, células T γδ, células NKT y células linfoides innatas (ILC). No obstante, también se ha descrito que macrófagos, neutrófilos y fibroblastos y células epiteliales de múltiples órganos son capaces de producir IL-22[216]. Se ha descrito una expresión de IL-22 elevada de forma basal en individuos con afecciones inflamatorias, incluidas enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide y tumores malignos[217,218]. Por tanto, esta IL podría estar elevada de base en este grupo de individuos o bien porqué teníamos una proporción elevada con enfermedad neoplásica o bien por un estado basal de inflamación. La IL-13 se encontraba elevada en los 3 grupos respecto el grupo control, haciendo pensar que una respuesta de T2 puede estar presente de base en estos individuos. Las fuentes celulares de la IL-13 son basófilos, eosinófilos, mastocitos, células T NK e ILC2. Una expresión elevada de IL-13 se ha descrito en individuos con dermatitis atópica, rinitis, asma y esofagitis eosinofílica[219,220]. La Il-13 se ha descrito ya como biomarcador de angioedema, pero sólo su elevación en fase aguda.

Ninguna citocina dio resultados estadísticamente significativos según el endotipo de urticaria y angioedema.

Las limitaciones más importantes de este estudio fue un sesgo de selección, puesto el 49% de los individuos provenían de hospitalización y se seleccionaron muchas reacciones a fármacos quimioterápicos y biológicos por este motivo. La comorbilidad asociada a la enfermedad neoplásica y su situación proinflamatoria de base podría influir en parte en los resultados obtenidos. Otra limitación es la n pequeña de los individuos del panel de citocinas debido al coste de la técnica que nos hizo seleccionas individuos concretos de cada grupo para hacer el estudio exploratorio. Los resultados con n tan pequeñas son de interpretación más dudosa y requerimos estudios con mayo n de individuos para validar los resultados obtenidos. La fenotipicación clínica de los individuos se hizo de acuerdo a trabajos previos publicados y realizados por un único observador, pero consideramos que esta clasificación es poco concisa comparada con el endotipado y por tanto los resultados de este fenotipado deben ser interpretados con cautela. Tuvimos en nuestro grupo pocos individuos de algunas causas (himenópteros y contrastes yodados por ejemplo) y esta infrarrepresentación hace que no saquemos resultados para estos probables endotipos concretos. A nivel técnico ya se ha destacado que el estudio del sistema de contacto es delicado y muy sensible a la manipulación de la muestra, por lo que sus resultados en caso de negativos pueden ser debidos a problemas en la conservación o la realización de la técnica.

Una de las mayores fortalezas del estudio es el estudio conjunto y comparativo del biomarcador de referencia, la triptasa sérica con los otros 3 sistemas y el panel de citocinas en un grupo de individuos con anafilaxia considerable. También es de los pocos trabajos que se han detenido en endotipar con precisión las reacciones y a detalladamente fenotipar por sistemas afectados de cara a encontrar diferencias en sus mecanismos celulares.

8. CONCLUSIONES

- El dímero D, los complejos plasmina-α-antiplasmina y el inhibidor del activador del plasminógeno 1 , generados tras la activación de la fibrinólisis, están elevados en la anafilaxia y se relacionan con la gravedad de ésta.

- El Factor XI y XII, la enzima convertidora de angiotensina y el C3 del complemento apuntan como biomarcadores diferenciales entre anafilaxia y urticaria y angioedema del sistema de la coagulación y del sistema de contacto.

- Las citocinas IL-6, IL-10, CCL-4/MIP1β y la IL-13 están elevadas en la anafilaxia, pero no en la urticaria ni en el angioedema.

- Valores elevados de IL 6 y de CCL4/RANTES y valores disminuidos de PAI 1 permiten el diagnóstico de anafilaxia en aquellos individuos en los que no se observa una elevación de triptasa sérica.

- La elevación de triptasa y de la CCL5/RANTES es de mayor utilidad para diagnosticar anafilaxia en el endotipo “IgE mediado”, endotipo “mixto” y en el endotipo “no IgE mediado” por inhibición de COX-1, respecto al endotipo “liberación de citocinas”, donde la IL-6 es de más utilidad

- La elevación de el dímero D y los complejos plasmina-α-antiplasmina es superior en los individuos con anafilaxia con afectación circulatoria y el sistema de contacto se activa en individuos con clínica cutánea.

9. LINEAS DE FUTURO

Nuestros siguientes pasos serán ampliar el estudio de citocinas con un mayor número de individuos y realizar un nuevo análisis sobre el sistema de contacto en anafilaxia directamente en nuestro laboratorio para evitar el transporte de muestras y así conseguir resultados más fiables. Para ello, se planea reclutar una cohorte ampliada que incluya un mayor número de individuos, especialmente aquellos con anafilaxia de causa alimentaria y reacciones no IgE mediadas, y una mayor diversidad de casos de anafilaxia, así como individuos con urticaria y angioedema para un análisis comparativo más robusto. Se realizarán análisis longitudinales para hacer un seguimiento de los niveles de citocinas en los individuos durante y después de un episodio anafiláctico, comparándolos con sus niveles basales, y se diversificarán las citocinas estudiadas para demostrar que algunas concretas son más indicativas de anafilaxia y su severidad. Por otro lado nos gustaría seguir explorando los mecanismos celulares y mediadores de las diferentes manifestaciones fenotípicas de anafilaxias, no utilizando la clasificación clásica que ha demostrado ser de poca utilidad, sino clasificando por signos y síntomas clínicos por aparatos. Consideramos que se puede incorporar los biomarcadores Dímero D, ECA, IL-6 e IL-10 en un perfil preconfigurado analítico de anafilaxia en nuestro centro puesto que los resultados de este estudio han demostrado que nos puede ayudar a diagnosticas anafilaxia y estratificar la gravedad y se trata de técnicas disponibles en la actualidad. Se plantea informar y colaborar con el resto de profesionales de la salud para incorporar estos nuevos biomarcadores y métodos de análisis en la práctica clínica, mejorando así el diagnóstico y tratamiento de la anafilaxia. Este enfoque permitirá obtener una comprensión más detallada de los mecanismos subyacentes de la anafilaxia, mejorando la identificación y el manejo de los diferentes endotipos y posteriormente valorando si en su manejo existirán diferencias.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cardona V, Ansotegui IJ, Ebisawa M, et al. World Allergy Organization Anaphylaxis Guidance 2020. *World Allergy Organ J*. 2020;13(10):100472. doi:10.1016/j.waojou.2020.100472

2. Muraro A, Worm M, Alviani C, et al. EAACI guidelines: Anaphylaxis (2021 update). *Allergy*. 2022;77(2):357-377. doi:10.1111/all.15032

3. Loscalzo J, & Fauci A, & Kasper D, & Hauser S, & Longo D & JJ. *Harrison's® Principles of Internal Medicine, 21st Edition*. McGraw Hill LLC; 2022. ttps://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=3095&sectionid=259856983

4. Tejedor Alonso MA, Moro Moro M, Múgica García MV. Epidemiology of anaphylaxis. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(6):1027-1039. doi:10.1111/cea.12418

5. Tejedor-Alonso MA, Moro-Moro M, Mosquera González M, et al. Increased incidence of admissions for anaphylaxis in Spain 1998–2011. *Allergy*. 2015;70(7):880-883. doi:10.1111/all.12613

6. Wang Y, Allen KJ, Suaini NHA, McWilliam V, Peters RL, Koplin JJ. The global incidence and prevalence of anaphylaxis in children in the general population: A systematic review. *Allergy*. 2019;74(6):1063-1080. doi:10.1111/all.13732

7. Buka RJ, Crossman RJ, Melchior CL, et al. Anaphylaxis and ethnicity: higher incidence in British South Asians. *Allergy*. 2015;70(12):1580-1587. doi:10.1111/all.12702

8. Buka RJ, Crossman RJ, Derbridge C, et al. Characterisation Of Anaphylaxis In a Large UK City With An Ethnically Diverse Population. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(2):AB23. doi:10.1016/j.jaci.2013.12.109

9. Perez-Codesido S, Rosado-Ingelmo A, Privitera-Torres M, et al. Incidence of Fatal Anaphylaxis: A Systematic Review of Observational Studies. *J Investig Allergy Clin Immunol*. 2022;32:245-260. doi:10.18176/jiaci.0693

10. Turner PJ, Jerschow E, Umasunthar T, Lin R, Campbell DE, Boyle RJ. Fatal Anaphylaxis: Mortality Rate and Risk Factors. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2017;5(5):1169-1178. doi:10.1016/j.jaip.2017.06.031

11. Turner PJ, Gowland MH, Sharma V, et al. Increase in anaphylaxis-related hospitalizations but no increase in fatalities: An analysis of United Kingdom national anaphylaxis data, 1992-2012. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(4):956-963.e1. doi:10.1016/j.jaci.2014.10.021

12. Worm M, Eckermann O, Dölle S, et al. Triggers and Treatment of Anaphylaxis. *Dtsch Ärztebl Int*. Published online May 2014. doi:10.3238/arztebl.2014.0367

13. Worm M, Francuzik W, Renaudin J -M., et al. Factors increasing the risk for a severe reaction in anaphylaxis: An analysis of data from The European Anaphylaxis Registry. *Allergy*. 2018;73(6):1322-1330. doi:10.1111/all.13380

14. Grabenhenrich LB, Dölle S, Moneret-Vautrin A, et al. Anaphylaxis in children and adolescents: The European Anaphylaxis Registry. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(4):1128-1137.e1. doi:10.1016/j.jaci.2015.11.015

15. Castillo MJ, Viñas M, Hernández N, Ibero M. P33 - Causes of anaphylaxis in pediatric population. *Clin Transl Allergy*. 2014;4(1):P88. doi:10.1186/2045-7022-4-S1-P88

16. Panesar SS, Javad S, de Silva D, et al. The epidemiology of anaphylaxis in Europe: a systematic review. *Allergy*. 2013;68(11):1353-1361. doi:10.1111/all.12272

17. Francuzik W, Ruëff F, Bauer A, et al. Phenotype and risk factors of venom-induced anaphylaxis: A case-control study of the European Anaphylaxis Registry. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;147(2):653-662.e9. doi:10.1016/j.jaci.2020.06.008

18. Dölle-Bierke S, Höfer V, Francuzik W, et al. Food-Induced Anaphylaxis: Data From the European Anaphylaxis Registry. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2023;11(7):2069-2079.e7. doi:10.1016/j.jaip.2023.03.026

19. Ojeda P, Sastre J, Olaguibel J, Chivato T. Alergólogica 2015: A National Survey on Allergic Diseases in the Adult Spanish Population. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2018;28(3):151-164. doi:10.18176/jiaci.0264

20. Drug Allergy: An Updated Practice Parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2010;105(4):259-273.e78. doi:10.1016/j.anai.2010.08.002

21. Gomes ER, Demoly P. Epidemiology of hypersensitivity drug reactions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005;5(4):309-316. doi:10.1097/01.all.0000173785.81024.33

22. Carter MC, Akin C, Castells MC, Scott EP, Lieberman P. Idiopathic anaphylaxis yardstick. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2020;124(1):16-27. doi:10.1016/j.anai.2019.08.024

23. De Feo G, Parente R, Cardamone C, Bucci T, Guerritore L, Triggiani M. Risk Factors and Cofactors for Severe Anaphylaxis. *Curr Treat Options Allergy*. 2018;5(2):204-211. doi:10.1007/s40521-018-0168-2

24. Muñoz-Cano R, Pascal M, Araujo G, et al. Mechanisms, cofactors, and augmenting factors involved in anaphylaxis. *Front Immunol*. 2017;8(SEP):1-7. doi:10.3389/fimmu.2017.01193

25. Carter MC, Park J, Vadas P, Worm M. Extrinsic and Intrinsic Modulators of Anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2023;11(7):1998-2006. doi:10.1016/j.jaip.2023.05.015

26. Motosue MS, Bellolio MF, Van Houten HK, Shah ND, Campbell RL. Risk factors for severe anaphylaxis in the United States. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2017;119(4):356-361.e2. doi:10.1016/j.anai.2017.07.014

27. Cardona V. Guía de actuación en ANAFILAXIA. *SEAIC*. Published online 2022. Accessed March 2, 2024. https://www.guiagalaxia.com/

28. Sampson MA, Muñoz-Furlong A, Sicherer SH. Risk-taking and coping strategies of adolescents and young adults with food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(6):1440-1445. doi:10.1016/j.jaci.2006.03.009

29. Conroy ME. Food Allergy: Review of Epidemiology, Risk Factors, and Future Treatments. *Am J Lifestyle Med*. 2015;9(4):280-287. doi:10.1177/1559827613510865

30. Ruëff F, Przybilla B, Biló MB, et al. Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with Hymenoptera venom allergy: Importance of baseline serum tryptase—a study of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(5):1047-1054. doi:10.1016/j.jaci.2009.08.027

31. Gülen T, Akin C. Anaphylaxis and Mast Cell Disorders. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2022;42(1):45-63. doi:10.1016/j.iac.2021.09.007

32. MacQueen G, Marshall J, Perdue M, Siegel S, Bienenstock J. Pavlovian Conditioning of Rat Mucosal Mast Cells to Secrete Rat Mast Cell Protease II. *Science*. 1989;243(4887):83-85. doi:10.1126/science.2911721

33. Kovanen PT, Kaartinen M, Paavonen T. Infiltrates of Activated Mast Cells at the Site of Coronary Atheromatous Erosion or Rupture in Myocardial Infarction. *Circulation*. 1995;92(5):1084-1088. doi:10.1161/01.CIR.92.5.1084

34. Olabarri M, Vazquez P, Gonzalez-Posada A, et al. Risk Factors for Severe Anaphylaxis in Children. *J Pediatr*. 2020;225:193-197.e5. doi:10.1016/j.jpeds.2020.06.021

35. Cheng BT, Fishbein AB. Patterns of hospital readmission in children with food-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020;8(4):1420-1422.e1. doi:10.1016/j.jaip.2020.01.044

36. O'Keefe A, Clarke A, St Pierre Y, et al. The Risk of Recurrent Anaphylaxis. *J Pediatr*. 2017;180:217-221. doi:10.1016/j.jpeds.2016.09.028

37. Amin HS, Liss GM, Bernstein DI. Evaluation of near-fatal reactions to allergen immunotherapy injections. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(1):169-175. doi:10.1016/j.jaci.2005.10.010

38. Lieberman P. The risk and management of anaphylaxis in the setting of immunotherapy. *Am J Rhinol Allergy*. 2012;26(6):469-474. doi:10.2500/ajra.2012.26.3811

39. Marks B. Effect of Statin Drugs on Hymenoptera Venom Anaphylaxis Severity. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(2):AB213. doi:10.1016/j.jaci.2014.12.1631

40. Caslake MJ, Packard CJ. Lipoprotein-associated phospholipase A2 (platelet-activating factor acetylhydrolase) and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 2003;14(4):347-352. doi:10.1097/00041433-200308000-00002

41. Vadas P, Gold M, Perelman B, et al. Platelet-Activating Factor, PAF Acetylhydrolase, and Severe Anaphylaxis. *N Engl J Med*. 2008;358(1):28-35. doi:10.1056/NEJMoa070030

42. Regateiro FS, Marques ML, Gomes ER. Drug-Induced Anaphylaxis: An Update on Epidemiology and Risk Factors. *Int Arch Allergy Immunol*. 2020;181(7):481-487. doi:10.1159/000507445

43. Doña I, Blanca-López N, Torres MJ, et al. Drug hypersensitivity reactions: response patterns, drug involved, and temporal variations in a large series of patients. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012;22(5):363-371.

44. Demir S, Erdenen F, Gelincik A, et al. Evaluation of the Potential Risk Factors for Drug-Induced Anaphylaxis in Adult Patients. *Int Arch Allergy Immunol*. 2019;178(2):167-176. doi:10.1159/000494130

45. Moneret-Vautrin DA, Latarche C. [Drugs as risk factors of food anaphylaxis in adults: a case-control study]. *Bull Acad Natl Med*. 2009;193(2):351-362; discussion 362-363.

46. Co-factor-enhanced food allergy - Cardona - 2012 - Allergy - Wiley Online Library. Accessed March 5, 2024. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1398-9995.2012.02877.x.

47. Pascal M, Muñoz-Cano R, Reina Z, 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):1529-1539. doi:10.1111/j.1365-2222.2012.04071.x

48. Mechanisms of Damage to the Gastrointestinal Tract From Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs - ScienceDirect. Accessed March 5, 2024. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508517366660?casa_token=qhxkkDXNLEsAAAAA:61iOuavljb21w6PAH3Nv7BmzSSSk6XwbLzn4Ru7iaTUMs6qjsbOHpi-NLiUJ_6R4OAXvN6YVHzs

49. Bjarnason I, Takeuchi K. Intestinal permeability in the pathogenesis of NSAID-induced enteropathy. *J Gastroenterol*. 2009;44(S19):23-29. doi:10.1007/s00535-008-2266-6

50. Versluis A, Van Os-Medendorp H, Kruizinga AG, Blom WM, Houben GF, Knulst AC. Cofactors in allergic reactions to food: physical exercise and alcohol are the most important. *Immun Inflamm Dis*. 2016;4(4):392-400. doi:10.1002/iid3.120

51. Wölbing F, Fischer J, Köberle M, Kaesler S, Biedermann T. About the role and underlying mechanisms of cofactors in anaphylaxis. *Allergy*. 2013;68(9):1085-1092. doi:10.1111/all.12193

52. Elamin EE, Masclee AA, Dekker J, Jonkers DM. Ethanol metabolism and its effects on the intestinal epithelial barrier. *Nutr Rev*. 2013;71(7):483-499. doi:10.1111/nure.12027

53. Nagy LE, Diamond I, Casso DJ, Franklin C, Gordon AS. Ethanol increases extracellular adenosine by inhibiting adenosine uptake via the nucleoside transporter. *J Biol Chem*. 1990;265(4):1946-1951.

54. Morita E, Kunie K, Matsuo H. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Dermatol Sci*. 2007;47(2):109-117. doi:10.1016/j.jdermsci.2007.03.004

55. Benito-Garcia F, Ansotegui IJ, Morais-Almeida M. Diagnosis and prevention of food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2019;15(8):849-856. doi:10.1080/1744666X.2019.1642747

56. Sakamoto Y, Ohtsuka T, Yoshida H, et al. Time course of changes in the intestinal permeability of food-sensitized rats after oral allergen challenge. *Pediatr Allergy Immunol*. 1998;9(1):20-24. doi:10.1111/j.1399-3038.1998.tb00295.x

57. Phillips ThomasE, Phillips TeresaL, Neutra MarianR. Macromolecules can pass through occluding junctions of rat ileal epithelium during cholinergic stimulation. *Cell Tissue Res*. 1987;247(3):547-554. doi:10.1007/BF00215748

58. Zuhl M, Schneider S, Lanphere K, Conn C, Dokladny K, Moseley P. Exercise regulation of intestinal tight junction proteins. *Br J Sports Med*. 2014;48(12):980-986. doi:10.1136/bjsports-2012-091585

59. Exercise-induced urticaria, cholinergic urticaria, and Kounis syndrome - PMC. Accessed March 4, 2024. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4831493/

60. Bauer CS, Kampitak T, Messieh ML, Kelly KJ, Vadas P. Heterogeneity in presentation and treatment of catamenial anaphylaxis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2013;111(2):107-111. doi:10.1016/j.anai.2013.06.001

61. Hox V, Desai A, Bandara G, Gilfillan AM, Metcalfe DD, Olivera A. Estrogen increases the severity of anaphylaxis in female mice through enhanced endothelial nitric oxide synthase expression and nitric oxide production. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(3):729-736.e5. doi:10.1016/j.jaci.2014.11.003

62. Varshney P, Steele PH, Vickery BP, et al. Adverse reactions during peanut oral immunotherapy home dosing. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(6):1351-1352. doi:10.1016/j.jaci.2009.09.042

63. Anagnostou K, Clark A, King Y, Islam S, Deighton J, Ewan P. Efficacy and safety of high-dose peanut oral immunotherapy with factors predicting outcome. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2011;41(9):1273-1281. doi:10.1111/j.1365-2222.2011.03699.x

64. Versluis A, van Os-Medendorp H, Blom WM, et al. Potential cofactors in accidental food allergic reactions are frequently present but may not influence severity and occurrence. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2019;49(2):207-215. doi:10.1111/cea.13282

65. Potentiated anaphylaxis in patients with drug-induced beta-adrenergic blockade - PubMed. Accessed March 4, 2024. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6114116/

66. Smolinska S, Antolín-Amérigo D, Popescu FD. Bradykinin Metabolism and Drug-Induced Angioedema. *Int J Mol Sci*. 2023;24(14):11649. doi:10.3390/ijms241411649

67. Nakao A, Nakamura Y, Shibata S. The circadian clock functions as a potent regulator of allergic reaction. *Allergy*. 2015;70(5):467-473. doi:10.1111/all.12596

68. Nakao A, Nakamura Y. Time will tell about mast cells: Circadian control of mast cell activation. *Allergol Int*. 2022;71(4):425-431. doi:10.1016/j.alit.2022.06.008

69. Bartra J, Turner PJ, Muñoz-Cano RM. Cofactors in food anaphylaxis in adults. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2023;130(6):733-740. doi:10.1016/j.anai.2023.03.017

70. Dua S, Ruiz-Garcia M, Bond S, et al. Effect of sleep deprivation and exercise on reaction threshold in adults with peanut allergy: A randomized controlled study. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;144(6):1584-1594.e2. doi:10.1016/j.jaci.2019.06.038

71. Vanuytsel T, Van Wanrooy S, Vanheel H, et al. Psychological stress and corticotropin-releasing hormone increase intestinal permeability in humans by a mast cell-dependent mechanism. *Gut*. 2014;63(8):1293-1299. doi:10.1136/gutjnl-2013-305690

72. Reber LL, Hernandez JD, Galli SJ. The pathophysiology of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(2):335-348. doi:10.1016/j.jaci.2017.06.003

73. Jimenez-Rodriguez TW, Garcia-Neuer M, Alenazy LA, Castells M. Anaphylaxis in the 21st century: phenotypes, endotypes, and biomarkers. *J Asthma Allergy*. 2018;11:121-142. doi:10.2147/JAA.S159411

74. Cianferoni A. Non–IgE-mediated anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;147(4):1123-1131. doi:10.1016/j.jaci.2021.02.012

75. Jönsson F, de Chaisemartin L, Granger V, et al. An IgG-induced neutrophil activation pathway contributes to human drug-induced anaphylaxis. *Sci Transl Med*. 2019;11(500). doi:10.1126/scitranslmed.aat1479

76. Finkelman FD, Khodoun MV, Strait R. Human IgE-independent systemic anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(6):1674-1680. doi:10.1016/j.jaci.2016.02.015

77. Peng Q, Li K, Sacks SH, Zhou W. The role of anaphylatoxins C3a and C5a in regulating innate and adaptive immune responses. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2009;8(3):236-246. doi:10.2174/187152809788681038

78. Schäfer B, Piliponsky AM, Oka T, et al. Mast cell anaphylatoxin receptor expression can enhance IgE-dependent skin inflammation in mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(2):541-548.e1-9. doi:10.1016/j.jaci.2012.05.009

79. Kodama T, Sekine H, Takahashi M, et al. Role of complement in a murine model of peanut-induced anaphylaxis. *Immunobiology*. 2013;218(6):844-850. doi:10.1016/j.imbio.2012.10.003

80. Khodoun M, Strait R, Orekov T, et al. Peanuts can contribute to anaphylactic shock by activating complement. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(2):342-351. doi:10.1016/j.jaci.2008.11.004

81. Subramanian H, Gupta K, Ali H. Roles of Mas-related G protein-coupled receptor X2 on mast cell-mediated host defense, pseudoallergic drug reactions, and chronic inflammatory diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(3):700-710. doi:10.1016/j.jaci.2016.04.051

82. Novel insights on MRGPRX2-mediated hypersensitivity to neuromuscular blocking agents and fluoroquinolones - Google Search. Accessed March 5, 2024. https://www.google.com/search?q=Novel+insights+on+MRGPRX2-mediated+hypersensitivity+to+neuromuscular+blocking+agents+and+fluoroquinolones&rlz=1C1CHBD_esES747ES747&oq=Novel+insights+on+MRGPRX2-mediated+hypersensitivity+to+neuromuscular+blocking+agents+and+fluoroquinolones&gs_lcrp=EgZjaHJvbWUyBggAEEUYOdIBBzczOWowajSoAgCwAgA&sourceid=chrome&ie=UTF-8

83. Muñoz-Cano R, Picado C, Valero A, Bartra J. Mechanisms of Anaphylaxis Beyond IgE. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2016;26(2):73-82; quiz 2p following 83. doi:10.18176/jiaci.0046

84. Lee Y, Shin YS, Park HS. New phenotypes in hypersensitivity reactions to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2019;19(4):302-307. doi:10.1097/ACI.0000000000000541

85. Labella M, Garcia-Neuer M, Castells M. Application of precision medicine to the treatment of anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2018;18(3):190-197. doi:10.1097/ACI.0000000000000435

86. Özdemir Ö, Göksu Erol AY, Dikici Ü. Mast Cell's Role in Cytokine Release Syndrome and Related Manifestations ofCOVID-19 Disease. *Curr Pharm Des*. 2022;28(40):3261-3268. doi:10.2174/1381612829666221027114123

87. Butterfield JH, Ravi A, Pongdee T. Mast Cell Mediators of Significance in Clinical Practice in Mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2018;38(3):397-410. doi:10.1016/j.iac.2018.04.011

88. Alcañiz L, Vega A, Chacón P, et al. Histamine production by human neutrophils. *FASEB J*. 2013;27(7):2902-2910. doi:10.1096/fj.12-223867

89. Pucillo C, Lorentz A, Sharma M, et al. The Role of Histamine and Histamine Receptors in Mast Cell-Mediated Allergy and inflammation: The Hunt for new Therapeutic Targets. 2018;9:1873. doi:10.3389/fimmu.2018.01873

90. Steffel J, Akhmedov A, Greutert H, Lüscher TF, Tanner FC. Histamine Induces Tissue Factor Expression: Implications for Acute Coronary Syndromes. *Circulation*. 2005;112(3):341-349. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.553735

91. Steffel J, Arnet C, Akhmedov A, Iseli SM, Lüscher TF, Tanner FC. Histamine differentially interacts with tumor necrosis factor-α and thrombin in endothelial tissue factor induction: the role of c-Jun NH2-terminal kinase. *J Thromb Haemost*. 2006;4(11):2452-2460. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.02175.x

92. Takeda J, Ueda E, Takahashi J, Fukushima K. Plasma N-Methylhistamine Concentration as an Indicator of Histamine Release by Intravenous d-Tubocurarine in Humans: Preliminary Study in Five Patients by Radioimmunoassay Kits. *Anesth Analg*. 1995;80(5):1015-1017. doi:10.1097/00000539-199505000-00028

93. Sala-Cunill A, Guilarte M, Cardona V. Phenotypes, endotypes and biomarkers in anaphylaxis: current insights. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2018;18(5):370-376. doi:10.1097/ACI.0000000000000472

94. Kabashima K, Nakashima C, Nonomura Y, et al. Biomarkers for evaluation of mast cell and basophil activation. *Immunol Rev*. 2018;282(1):114-120. doi:10.1111/imr.12639

95. Mukai K, Tsai M, Saito H, Galli SJ. Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors. *Immunol Rev*. 2018;282(1):121-150. doi:10.1111/imr.12634

96. Passia E, Jandus P. Using Baseline and Peak Serum Tryptase Levels to Diagnose Anaphylaxis: a Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2020;58(3):366-376. doi:10.1007/s12016-020-08777-7

97. Valent P, Akin C, Metcalfe DD. Mastocytosis: 2016 updated WHO classification and novel emerging treatment concepts. *Blood*. 2017;129(11):1420-1427. doi:10.1182/blood-2016-09-731893

98. Sala-Cunill A, Cardona V, Labrador-Horrillo M, et al. Usefulness and limitations of sequential serum tryptase for the diagnosis of anaphylaxis in 102 patients. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;160(2):192-199. doi:10.1159/000339749

99. Valent P, Akin C, Arock M, et al. Definitions, criteria and global classification of mast cell disorders with special reference to mast cell activation syndromes: a consensus proposal. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;157(3):215-225. doi:10.1159/000328760

100. Dua S, Dowey J, Foley L, et al. Diagnostic Value of Tryptase in Food Allergic Reactions: A Prospective Study of 160 Adult Peanut Challenges. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 6(5):1692-1698.e1. doi:10.1016/j.jaip.2018.01.006

101. Wongkaewpothong P, Pacharn P, Sripramong C, et al. The utility of serum tryptase in the diagnosis of food-induced anaphylaxis. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2014;6(4):304-309. doi:10.4168/aair.2014.6.4.304

102. Tchougounova E, Pejler G. Regulation of extravascular coagulation and fibrinolysis by heparin-dependent mast cell chymase. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2001;15(14):2763-2765. doi:10.1096/fj.01-0486fje

103. Pejler G, Karlström A. Thrombin is inactivated by mast cell secretory granule chymase. *J Biol Chem*. 1993;268(16):11817-11822.

104. Shubin NJ, Glukhova VA, Clauson M, et al. Proteome analysis of mast cell releasates reveals a role for chymase in the regulation of coagulation factor XIIIA levels via proteolytic degradation. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(1):323-334. doi:10.1016/j.jaci.2016.03.051

105. Zhou X, Buckley MG, Lau LC, Summers C, Pumphrey RSH, Walls AF. Mast Cell Carboxypeptidase as a New Clinical Marker for Anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(2):S85. doi:10.1016/j.jaci.2005.12.342

106. Hellman L, Akula S, Fu Z, Wernersson S. Mast Cell and Basophil Granule Proteases - In Vivo Targets and Function. *Front Immunol*. 2022;13:918305. doi:10.3389/fimmu.2022.918305

107. Beck SC, Wilding T, Buka RJ, Baretto RL, Huissoon AP, Krishna MT. Biomarkers in human anaphylaxis: A critical appraisal of current evidence and perspectives. *Front Immunol*. 2019;10(APR). doi:10.3389/fimmu.2019.00494

108. Mochizuki A, McEuen AR, Buckley MG, Walls AF. The release of basogranulin in response to IgE-dependent and IgE-independent stimuli: Validity of basogranulin measurement as an indicator of basophil activation. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112(1):102-108. doi:10.1067/mai.2003.1511

109. Sala-Cunill A, Björkqvist J, Senter R, et al. Plasma contact system activation drives anaphylaxis in severe mast cell-mediated allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(4):1031-1043.e6. doi:10.1016/j.jaci.2014.07.057

110. Weidmann H, Heikaus L, Long AT, Naudin C, Schlüter H, Renné T. The plasma contact system, a protease cascade at the nexus of inflammation, coagulation and immunity. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2017;1864(11 Pt B):2118-2127. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.07.009

111. Wolters PJ, Pham CTN, Muilenburg DJ, Ley TJ, Caughey GH. Dipeptidyl Peptidase I Is Essential for Activation of Mast Cell Chymases, but Not Tryptases, in Mice. *J Biol Chem*. 2001;276(21):18551-18556. doi:10.1074/jbc.M100223200

112. Caughey GH. Mast cell proteases as pharmacological targets. *Eur J Pharmacol*. 2016;778:44-55. doi:10.1016/j.ejphar.2015.04.045

113. Liu M, Yokomizo T. The role of leukotrienes in allergic diseases. *Allergol Int*. 2015;64(1):17-26. doi:10.1016/j.alit.2014.09.001

114. Ono E, Taniguchi M, Mita H, et al. Increased production of cysteinyl leukotrienes and prostaglandin D2 during human anaphylaxis. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(1):72-80. doi:10.1111/j.1365-2222.2008.03104.x

115. Raithel M, Zopf Y, Kimpel S, et al. The measurement of leukotrienes in urine as diagnostic option in systemic mastocytosis. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc*. 2011;62(4):469-472.

116. Schulman ES, Newball HH, Demers LM, Fitzpatrick FA, Adkinson NF. Anaphylactic release of thromboxane A2, prostaglandin D2, and prostacyclin from human lung parenchyma. *Am Rev Respir Dis*. 1981;124(4):402-406. doi:10.1164/arrd.1981.124.4.402

117. Morel DR, Skoskiewicz M, Robinson DR, Bloch KJ, Hoaglin DC, Zapol WM. Leukotrienes, thromboxane A2, and prostaglandins during systemic anaphylaxis in sheep. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 1991;261(3):H782-H792. doi:10.1152/ajpheart.1991.261.3.H782

118. Nguyen SMT, Rupprecht CP, Haque A, Pattanaik D, Yusin J, Krishnaswamy G. Mechanisms Governing Anaphylaxis: Inflammatory Cells, Mediators, Endothelial Gap Junctions and Beyond. *Int J Mol Sci*. 2021;22(15):7785. doi:10.3390/ijms22157785

119. Idborg H, Pawelzik SC. Prostanoid Metabolites as Biomarkers in Human Disease. *Metabolites*. 2022;12(8):721. doi:10.3390/metabo12080721

120. Nassiri M, Eckermann O, Babina M, Edenharter G, Worm M. Serum levels of 9α,11β-PGF 2 and cysteinyl leukotrienes are useful biomarkers of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(1):312-314.e7. doi:10.1016/j.jaci.2015.07.001

121. Betz SJ, Henson PM. Production and release of platelet-activating factor (PAF); dissociation from degranulation and superoxide production in the human neutrophil. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1980;125(6):2756-2763.

122. Karasawa K, Harada A, Satoh N, Inoue K, Setaka M. Plasma platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH). *Prog Lipid Res*. 2003;42(2):93-114. doi:10.1016/S0163-7827(02)00049-8

123. Upton JEM, Hoang JA, Leon-Ponte M, et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase is a biomarker of severe anaphylaxis in children. *Allergy*. Published online April 2022. doi:10.1111/all.15308

124. Piwowarek KŁ, Rzeszotarska A, Korsak JŁ, Juszkiewicz A, Chciałowski A, Kruszewski J. Clinical significance of plasma PAF acetylhydrolase activity measurements as a biomarker of anaphylaxis: Cross-sectional study. Taylor WR, ed. *PLOS ONE*. 2021;16(8):e0256168. doi:10.1371/journal.pone.0256168

125. Vadas P, Perelman B, Liss G. Platelet-activating factor, histamine, and tryptase levels in human anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(1):144-149. doi:10.1016/j.jaci.2012.08.016

126. Cyr M, Lepage Y, Blais C, et al. Bradykinin and des-Arg(9)-bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281(1):H275-83. doi:10.1152/ajpheart.2001.281.1.H275

127. Cicardi M, Zuraw BL. Angioedema Due to Bradykinin Dysregulation. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 6(4):1132-1141. doi:10.1016/j.jaip.2018.04.022

128. Hofman Z, de Maat S, Hack C, Maas C. Bradykinin: Inflammatory Product of the Coagulation System. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016;51. doi:10.1007/s12016-016-8540-0

129. Stone SF, Cotterell C, Isbister GK, Holdgate A, Brown SGA. Elevated serum cytokines during human anaphylaxis: Identification of potential mediators of acute allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(4):786-792.e4. doi:10.1016/j.jaci.2009.07.055

130. Becher B, Tugues S, Greter M. GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity*. 2016;45(5):963-973. doi:10.1016/j.immuni.2016.10.026

131. McManus LM, Morley CA, Levine SP, Pinckard RN. Platelet activating factor (PAF) induced release of platelet factor 4 (PF4) in vitro and during IgE anaphylaxis in the rabbit. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1979;123(6):2835-2841.

132. Takahashi T, Ono S ichi, Ogawa K, Tamura M, Mizutani T. [A case of anaphylactoid shock occurring immediately after the initiation of second intravenous administration of high-dose immunoglobulin (IVIg) in a patient with Crow-Fukase syndrome]. *Rinsho Shinkeigaku*. 2003;43(6):350-355.

133. Kim HM, Lee YM. Role of TGF-beta 1 on the IgE-dependent anaphylaxis reaction. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999;162(8):4960-4965.

134. Ma S, Yin J. Imbalance of serum IL-10 and TGF-β in patients with pollen food syndrome. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2014;42(3):198-205. doi:10.1016/j.aller.2013.01.004

135. Brown SGA, Stone SF, Fatovich DM, et al. Anaphylaxis: Clinical patterns, mediator release, and severity. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(5):1141-1149.e5. doi:10.1016/j.jaci.2013.06.015

136. Cromer WE, Zawieja SD, Tharakan B, Childs EW, Newell MK, Zawieja DC. The effects of inflammatory cytokines on lymphatic endothelial barrier function. *Angiogenesis*. 2014;17(2):395-406. doi:10.1007/s10456-013-9393-2

137. MacMicking J, Xie Q wen, Nathan C. NITRIC OXIDE AND MACROPHAGE FUNCTION. *Annu Rev Immunol*. 1997;15(1):323-350. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.323

138. Villarreal-González RV, González-Díaz S, Vidal-Gutiérrez O, De La Cruz-de La Cruz C, Pérez-Ibave DC, Garza-Rodríguez ML. Interleukin-6 as a biomarker of hypersensitivity reactions in chemotherapeutics and monoclonal antibodies. *J Oncol Pharm Pract*. Published online October 10, 2023:10781552231204367. doi:10.1177/10781552231204367

139. Kang S, Tanaka T, Inoue H, et al. IL-6 trans-signaling induces plasminogen activator inhibitor-1 from vascular endothelial cells in cytokine release syndrome. *Proc Natl Acad Sci*. 2020;117(36):22351-22356. doi:10.1073/pnas.2010229117

140. Foley JH, Conway EM. Cross Talk Pathways Between Coagulation and Inflammation. *Circ Res*. 2016;118(9):1392-1408. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.306853

141. Francis A, Bosio E, Stone SF, et al. Neutrophil activation during acute human anaphylaxis: analysis of MPO and sCD62L. *Clin Exp Allergy*. 2017;47(3):361-370. doi:10.1111/cea.12868

142. Meier HL, Heck LW, Schulman ES, MacGlashan, Jr. DW. Purified Human Mast Cells and Basophils Release Human Elastase and Cathepsin G by an IgE-Mediated Mechanism. *Int Arch Allergy Immunol*. 1985;77(1-2):179-183. doi:10.1159/000233779

143. Guilarte M, Sala-Cunill A, Luengo O, Labrador-Horrillo M, Cardona V. The Mast Cell, Contact, and Coagulation System Connection in Anaphylaxis. *Front Immunol*. 2017;8. doi:10.3389/fimmu.2017.00846

144. Jönsson F, Mancardi DA, Kita Y, et al. Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *J Clin Invest*. 2011;121(4):1484-1496. doi:10.1172/JCI45232

145. White AA, Stevenson DD. Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. Longo DL, ed. *N Engl J Med*. 2018;379(11):1060-1070. doi:10.1056/NEJMra1712125

146. Haque R, White AA, Jackson DJ, Hopkins C. Clinical evaluation and diagnosis of aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;148(2):283-291. doi:10.1016/j.jaci.2021.06.018

147. Brown SGA. Clinical features and severity grading of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(2):371-376. doi:10.1016/j.jaci.2004.04.029

148. Muraro A, Roberts G, Clark A, et al. The management of anaphylaxis in childhood: position paper of the European academy of allergology and clinical immunology. *Allergy*. 2007;62(8):857-871. doi:10.1111/j.1398-9995.2007.01421.x

149. Mehl A, Wahn U, Niggemann B. Anaphylactic reactions in children--a questionnaire-based survey in Germany. *Allergy*. 2005;60(11):1440-1445. doi:10.1111/j.1398-9995.2005.00909.x

150. Mueller HL. Diagnosis and treatment of insect sensitivity. *J Asthma Res*. 1966;3(4):331-333. doi:10.3109/02770906609106941

151. Sampson HA, Muñoz-Furlong A, Campbell RL, 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):391-397. doi:10.1016/j.jaci.2005.12.1303

152. Ring J, Messmer K. Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes. *Lancet Lond Engl*. 1977;1(8009):466-469. doi:10.1016/s0140-6736(77)91953-5

153. Puxeddu I, Petrelli F, Angelotti F, Croia C, Migliorini P. Biomarkers In Chronic Spontaneous Urticaria: Current Targets And Clinical Implications. *J Asthma Allergy*. 2019;12:285-295. doi:10.2147/JAA.S184986

154. Ferrer M, Brescó MS, Rodriguez-Garijo N, et al. Histaminergic angioedema: similarities and differences between isolated angioedema and chronic urticaria with angioedema. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;145(2):AB200. doi:10.1016/j.jaci.2019.12.297

155. Farkas H, Balla Z, Riedl MA. Differentiating histaminergic and nonhistaminergic angioedema with or without urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 2022;150(6):1405-1409. doi:10.1016/j.jaci.2022.10.016

156. Wang D, Tang H, Shen Y, Wang F, Lin J, Xu J. Activation of the Blood Coagulation System in Patients with Chronic Spontaneous Urticaria. *Clin Lab*. 2015;61(09/2015). doi:10.7754/Clin.Lab.2015.150226

157. Kaplan AP, Maas C. The Search for Biomarkers in Hereditary Angioedema. *Front Med*. 2017;4:206. doi:10.3389/fmed.2017.00206

158. Joseph K, Tholanikunnel TE, Kaplan AP. Treatment of episodes of hereditary angioedema with C1 inhibitor: serial assessment of observed abnormalities of the plasma bradykinin-forming pathway and fibrinolysis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2010;104(1):50-54. doi:10.1016/j.anai.2009.11.014

159. van der Linden PW, Hack CE, Eerenberg AJ, Struyvenberg A, van der Zwan JK. Activation of the contact system in insect-sting anaphylaxis: association with the development of angioedema and shock. *Blood*. 1993;82(6):1732-1739.

160. Triggiani M, Montagni M, Parente R, Ridolo E. Anaphylaxis and cardiovascular diseases: a dangerous liaison. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2014;14(4):309-315. doi:10.1097/ACI.0000000000000071

161. Bawaskar H, Bawaskar P, Bawaskar P. Chinese restaurant syndrome. *Indian J Crit Care Med*. 2017;21(1):49-50. doi:10.4103/0972-5229.198327

162. Tortorella V, Masciari P, Pezzi M, et al. Histamine Poisoning from Ingestion of Fish or Scombroid Syndrome. *Case Rep Emerg Med*. 2014;2014:1-4. doi:10.1155/2014/482531

163. Shaker MS, Wallace DV, Golden DBK, et al. Anaphylaxis—a 2020 practice parameter update, systematic review, and Grading of Recommendations, Assessment, Development

and Evaluation (GRADE) analysis. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;145(4):1082-1123. doi:10.1016/j.jaci.2020.01.017

164. Cardona V, Ferré-Ybarz L, Guilarte M, et al. Safety of Adrenaline Use in Anaphylaxis: A Multicentre Register. *Int Arch Allergy Immunol*. 2017;173(3):171-177. doi:10.1159/000477566

165. Campbell RL, Bellolio MF, Knutson BD, et al. Epinephrine in Anaphylaxis: Higher Risk of Cardiovascular Complications and Overdose After Administration of Intravenous Bolus Epinephrine Compared with Intramuscular Epinephrine. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2015;3(1):76-80. doi:10.1016/j.jaip.2014.06.007

166. Thomas M, Crawford I. Glucagon infusion in refractory anaphylactic shock in patients on beta-blockers. *Emerg Med J*. 2005;22(4):272-273. doi:10.1136/emj.2005.023507

167. Campbell DE. Anaphylaxis Management: Time to Re-Evaluate the Role of Corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2019;7(7):2239-2240. doi:10.1016/j.jaip.2019.07.005

168. Liyanage CK, Galappatthy P, Seneviratne SL. Corticosteroids in management of anaphylaxis; a systematic review of evidence. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2017;49(05):196. doi:10.23822/EurAnnACI.1764-1489.15

169. National Cancer Institute. Common terminology criteria for adverse events (CTCAE). Version 5.0. Accessed March 4, 2024. https://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/docs/CTCAE_v5_Quick_Reference_8.5x11.pdf.

170. Shimabukuro-Vornhagen A, Gödel P, Subklewe M, et al. Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer*. 2018;6(1):56. doi:10.1186/s40425-018-0343-9

171. 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*. 2018;36(8):1480-1485. doi:10.1016/j.ajem.2018.05.009

172. Lee S, Bellolio MF, Hess EP, Erwin P, Murad MH, Campbell RL. Time of Onset and Predictors of Biphasic Anaphylactic Reactions: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2015;3(3):408-416.e2. doi:10.1016/j.jaip.2014.12.010

173. Irani AM, Akl EG. Management and Prevention of Anaphylaxis. *F1000Research*. Published online December 2015. doi:10.12688/f1000research.7181.1

174. Flores-Rivera OI, Ramírez-Morales K, Meza-Márquez JM, Nava-López JA. Fisiología de la coagulación. Published online 2014.

175. Lillicrap D, Key N, Makris M, O'Shaughnessy D. Practical Hemostasis and Thrombosis. In: *Practical Hemostasis and Thrombosis.* Wiley-Blackwell; 2009:1-5.

176. Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev*. 2015;29(1):17-24. doi:10.1016/j.blre.2014.09.003

177. Lombardini C, Helia RE, Boehlen F, Merlani P. “Heparinization” and hyperfibrinogenolysis by wasp sting. *Am J Emerg Med*. 2009;27(9):1176.e1-1176.e3. doi:10.1016/j.ajem.2009.02.005

178. Manresa Ramón N, Nájera Pérez MD, Page del Pozo MÁ, Sánchez Martínez I, Sánchez Catalicio M del M, Roldán Schilling V. Establecimiento de un protocolo para el uso de la heparina en pacientes con características especiales. *Farm Hosp*. 2014;38(2):135-144. doi:10.7399/FH.2014.38.2.1081

179. Truong HT, Browning RM. Anaphylaxis-induced hyperfibrinolysis in pregnancy. *Int J Obstet Anesth*. 2015;24(2):180-184. doi:10.1016/j.ijoa.2014.12.009

180. Al-Nedawi K, Szemraj J, Cierniewski CS. Mast Cell–Derived Exosomes Activate Endothelial Cells to Secrete Plasminogen Activator Inhibitor Type 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(8):1744-1749. doi:10.1161/01.ATV.0000172007.86541.76

181. Schmaier AH. The contact activation and kallikrein/kinin systems: pathophysiologic and physiologic activities. *J Thromb Haemost*. 2016;14(1):28-39. doi:10.1111/jth.13194

182. De Maat S, Tersteeg C, Herczenik E, Maas C. Tracking down contact activation – from coagulation *in vitro* to inflammation *in vivo*. *Int J Lab Hematol*. 2014;36(3):374-381. doi:10.1111/ijlh.12222

183. Marceau F, Bachelard H, Bouthillier J, et al. Bradykinin receptors: Agonists, antagonists, expression, signaling, and adaptation to sustained stimulation. *Int Immunopharmacol*. 2020;82:106305. doi:10.1016/j.intimp.2020.106305

184. Farrell C, Hayes S, Relan A, Amersfoort E, Pijpstra R, Hack C. Population pharmacokinetics of recombinant human C1 inhibitor in patients with hereditary angioedema. *Br J Clin Pharmacol*. 2013;76. doi:10.1111/bcp.12132

185. Oschatz C, Maas C, Lecher B, et al. Mast Cells Increase Vascular Permeability by Heparin-Initiated Bradykinin Formation In Vivo. *Immunity*. 2011;34(2):258-268. doi:10.1016/j.immuni.2011.02.008

186. Smith PL, Kagey-Sobotka A, Bleecker ER, et al. Physiologic manifestations of human anaphylaxis. *J Clin Invest*. 1980;66(5):1072-1080. doi:10.1172/JCI109936

187. Galvan-Blasco P, Gil-Serrano J, Sala-Cunill A. New Biomarkers in Anaphylaxis (Beyond Tryptase). *Curr Treat Options Allergy*. 2022;9(4):303-322. doi:10.1007/s40521-022-00326-1

188. Sala-Cunill A, Björkqvist J, Senter R, et al. Plasma contact system activation drives anaphylaxis in severe mast cell–mediated allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(4):1031-1043.e6. doi:10.1016/j.jaci.2014.07.057

189. T. Lobera Labairu, M.A. Padial Vílchez, M.A. Guerrero García MTAB, Abujeta JLG. Capítulo 24: Concentraciones de principios activos y excipientes empleados para la realización de pruebas cutáneas y epicutáneas. In: SEAIC, ed. *Tomo IV. Tratado de Alergología SEAIC*. 2ª Edición. Ergon; 2016:1657-1695.

190. García-Avilés C, Gómez Torrijos E, Lobera Labairu T, Torres Jaén M. Capítulo 14: Diagnóstico de las reacciones de hipersensibilidad inducidas por fármacos. In: *Tratado de Alergología SEAIC*. Vol Tomo IV. 2ª Edición. Ergon; 2016:1452-1463.

191. Aberer W, Bircher A, Romano A, et al. Drug provocation testing in the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: general considerations. *Allergy*. 2003;58(9):854-863. doi:10.1034/j.1398-9995.2003.00279.x

192. Sampson HA, Gerth Van Wijk R, Bindslev-Jensen C, et al. Standardizing double-blind, placebo-controlled oral food challenges: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology–European Academy of Allergy and Clinical Immunology PRACTALL consensus report. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(6):1260-1274. doi:10.1016/j.jaci.2012.10.017

193. Vidal C, Antolín-Amérigo D, Reaño M, Valero AL, Sastre J. Documento Recomendaciones de Seguridad y Calidad en Alergología (RESCAL) de la SEAIC. Published online 2018. Accessed February 22, 2024. https://www.seaic.org/inicio/noticias-general/documento-rescal.html

194. Akin C, Valent P, Metcalfe DD. Mast cell activation syndrome: Proposed diagnostic criteria. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(6):1099-1104.e4. doi:10.1016/j.jaci.2010.08.035

195. HUVH - CATALEG DE LABORATORI. Accessed May 18, 2024. https://w3.vhebron.net/cataleglab/cataleg.php

196. Mutch NJ, Thomas L, Moore NR, Lisiak KM, Booth NA. TAFIa, PAI-1 and α2-antiplasmin: complementary roles in regulating lysis of thrombi and plasma clots. *J Thromb Haemost*. 2007;5(4):812-817. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02430.x

197. Hofman ZLM, De Maat S, Suffritti C, et al. Cleaved kininogen as a biomarker for bradykinin release in hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(6):1700-1703.e8. doi:10.1016/j.jaci.2017.07.012

198. Kajdácsi E, Jandrasics Z, Veszeli N, et al. Patterns of C1-Inhibitor/Plasma Serine Protease Complexes in Healthy Humans and in Hereditary Angioedema Patients. *Front Immunol*. 2020;11:794. doi:10.3389/fimmu.2020.00794

199. Buka RJ, Knibb RC, Crossman RJ, et al. Anaphylaxis and Clinical Utility of Real-World Measurement of Acute Serum Tryptase in UK Emergency Departments. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2017;5(5):1280-1287.e2. doi:10.1016/j.jaip.2017.06.021

200. Grabarczyk E, Wodyńska T, Kotschy M. [Fibrinolysis parameters: plasmin-alpha2 antiplasmin complexes (PAP) and D-dimers in acute coronary syndromes without ST segment elevation]. *Pol Merkur Lek Organ Pol Tow Lek*. 2004;17(102):555-557.

201. Palareti G, Legnani C, Cosmi B, et al. Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study. *Int J Lab Hematol*. 2016;38(1):42-49. doi:10.1111/ijlh.12426

202. Mattoli S, Ackerman V, Vittori E, Marini M. Mast Cell Chemotactic Activity of RANTES. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;209(1):316-321. doi:10.1006/bbrc.1995.1505

203. Doña I, Pérez-Sánchez N, Eguiluz-Gracia I, et al. Progress in understanding hypersensitivity reactions to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Allergy*. 2020;75(3):561-575. doi:10.1111/all.14032

204. Abud EM, White AA. Mast Cells in Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. *Curr Allergy Asthma Rep*. Published online January 13, 2024. doi:10.1007/s11882-024-01125-1

205. Bosso JV, Schwartz LB, Stevenson DD. Tryptase and histamine release during aspirin-induced respiratory reactions. *J Allergy Clin Immunol*. 1991;88(6):830-837. doi:10.1016/0091-6749(91)90238-J

206. Gawlik R, Glück J, Jawor B, Rogala B. Effects of venom immunotherapy on serum level of CCL5/RANTES in patients with *Hymenoptera* venom allergy. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2015;37(4):375-379. doi:10.3109/08923973.2015.1063645

207. Lin RY, Schwartz LB, Curry A, et al. Histamine and tryptase levels in patients with acute allergic reactions: An emergency department–based study. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(1):65-71. doi:10.1067/mai.2000.107600

208. Siles R, Xu M, Hsieh F. The Utility of Serum Tryptase as a Marker in Chronic Spontaneous Urticaria. *Acta Derm Venereol*. 2013;93(3):354-355. doi:10.2340/00015555-1486

209. Aberer E, Savic S, Bretterklieber A, Reiter H, Berghold A, Aberer W. Disease spectrum in patients with elevated serum tryptase levels. *Australas J Dermatol*. 2015;56(1):7-13. doi:10.1111/ajd.12146

210. Baek YS, Jeon J, Kim JH, Oh CH. Severity of acute and chronic urticaria correlates with D-dimer level, but not C-reactive protein or total IgE. *Clin Exp Dermatol*. 2014;39(7):795-800. doi:10.1111/ced.12413

211. Reshef A, Zanichelli A, Longhurst H, Relan A, Hack CE. Elevated D -dimers in attacks of hereditary angioedema are not associated with increased thrombotic risk. *Allergy*. 2015;70(5):506-513. doi:10.1111/all.12587

212. Kolkhir P, Pogorelov D, Olisova O. CRP, D-dimer, fibrinogen and ESR as predictive markers of response to standard doses of levocetirizine in patients with chronic spontaneous urticaria. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2017;49(04):189. doi:10.23822/EurAnnACI.1764-1489.05

213. Veszeli N, Csuka D, Zotter Z, et al. Neutrophil activation during attacks in patients with hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Orphanet J Rare Dis*. 2015;10(1):156. doi:10.1186/s13023-015-0374-y

214. Tedeschi A, Asero R, Lorini M, Marzano AV, Cugno M. Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 in chronic urticaria patients correlate with disease severity and C-reactive protein but not with circulating histamine-releasing factors. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(6):875-881. doi:10.1111/j.1365-2222.2010.03473.x

215. Dilek F, Ozceker D, Ozkaya E, et al. Plasma Levels of Matrix Metalloproteinase-9 in Children With Chronic Spontaneous Urticaria. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2016;8(6):522. doi:10.4168/aair.2016.8.6.522

216. Dudakov JA, Hanash AM, Van Den Brink MRM. Interleukin-22: Immunobiology and Pathology. *Annu Rev Immunol*. 2015;33(1):747-785. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112123

217. Wolk K, Witte E, Hoffmann U, et al. IL-22 Induces Lipopolysaccharide-Binding Protein in Hepatocytes: A Potential Systemic Role of IL-22 in Crohn's Disease. *J Immunol*. 2007;178(9):5973-5981. doi:10.4049/jimmunol.178.9.5973

218. Souza JM, Matias BF, Rodrigues CM, Murta EFC, Michelin MA. IL-17 and IL-22 serum cytokine levels in patients with squamous intraepithelial lesion and invasive cervical carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2013;34(5):466-468.

219. Mentink-Kane MM, Wynn TA. Opposing roles for IL-13 and IL-13 receptor α2 in health and disease. *Immunol Rev*. 2004;202(1):191-202. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00210.x

220. Hamid Q, Naseer T, Minshall E, Song Y, Boguniewicz M, Leung D. In vivo expression of IL-12 and IL-13 in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;98(1):225-231. doi:10.1016/S0091-6749(96)70246-4

11. ANEXOS

11.1. Técnica de laboratorio del ELISA DE PLASMINA-A2-ANTIPLASMINA

Reactivos:

- Tampón de recubrimiento (stock en refrigerador pH 9,4)
- anticuerpo monoclonal MAB1939 R&D (concentración 0,5 mg/mL)
- BSA
- PBS-Tween 20
- Plasma lisado
- Plasma control citratado de Sanquin 2014
- anticuerpo anti-PAP biotina, policlonal de cabra BAF1470 R&D
- anticuerpo estreptavidina poli HRP, 1,0 mg/mL, sanquin #M2051
- anticuerpo estreptavidina HRP, P0397 Dako, almacenada a 4 °C
- Placa de fondo plano Maxisorp
- 3,3',5,5'-Tetrametil-bencidina (TMB)
- H2SO4
- Estreptoquinasa CSL Berhing
- Aprotinina Sigma-Aldrich
- Hirudina Pharmion
- PPACK Haemtech

Procedimiento:

1. Recubrir la placa de fondo plano Maxisorp con 50 µL de tampón de recubrimiento durante 1 hora.
2. Bloquear con 200 µL de tampón de bloqueo durante 1 hora.
3. Preparar muestras y la curva estándar a partir de plasma normal y lisado (50 µL) e incubar durante 1 hora.
4. Lavar la placa 3 veces con 200 µL.
5. Incubar con el segundo anticuerpo biotina anti-PAP, policlonal de cabra (50 µL) durante 1 hora.
6. Lavar la placa 3 veces con 200 µL.
7. Incubar con el tercer anticuerpo estreptavidina HRP (50 uL) durante 1 hora
8. Lavar la placa 3 veces con 200 uL.
9. Agregar 100 uL de TMB
10. Detener la reacción después de 8 minutos agregando 50 uL de H2SO4. Analizar la absorción con Spectramax a 450 nm

11.2. Técnica de laboratorio del ELISA DE CININÓGENO ESCINDIDO (CHK)

Reactivos:

• Pocillos Maxisorp 96 Fondo plano Nunc - Lab II

• Filtro de 0,45 µm Lab I

• Pegatinas de tapa Lab I

• Jeringa de 50 mL Lab I

• Tubos multicanal de 0,8 mL Lab I

• Aprotinina Sigma-Aldrich

• Plasma de controles

• βFXIIA - Laboratorios de investigación

• Sulfato de dextrano Mr ~500 000 Sigma-Aldrich 0,5 µg/ml Sala de productos químicos, frigorífico

• VHH D1 5 µg/ml Lab III, 627V5, cajón 5

• VHH H4biotina

• 2 µg/ml Lab III, 627V5, cajón 5

• Estreptavidina poli HRP Sanquin 1:2000 Lab II, absystem -20, 2242

• 3,3’,5,5’-Tetrametil-bencidina (TMB) Tebu Bio - Lab III, G627K6

• 0,3 M H_2SO_4 -

• PBS, PBS1-Tween 20, PBS con leche (mPBS)

Procedimiento:

1. Incubar 5 µg/ml de VHH D1 en 50 µl de PBS en una placa Maxisorb a temperatura ambiente mientras agita (600 rpm) durante 30 min y a 4 grados durante la noche.

2. Bloquear la placa con mPBS durante (un mínimo de) 60 min a temperatura ambiente mientras agita.

3. Preparar la muestra y el estándar en Stopmix como se describe en protocolo.

4. Agreguar 50 µl de muestra en duplo en la placa bloqueada, incube 60 min a temperatura ambiente mientras agita.

5. Lavar la placa 3 veces con PBS.

6. Agregar 50 µl de 2 µg/ml de VHH-H4 en Stopmix Light, incube 60 min a temperatura ambiente mientras agita.

7. Lavar la placa 3 veces con PBS.

8. Agregar 50 µl de poli-HRP de estreptavidina en una solución Stopmix Light, incube 60 min a temperatura ambiente mientras agita.

9. Lavar la placa 3 veces con PBS.

10. Agregar 100 µl de TMB, detenga la coloración con 50 µl de H_2SO_4 0,3 M.
11. Analizar la absorción con Spectramax a 450 nm, agite durante 5 segundos antes de leer.

11.3. Técnica de laboratorio del ELISA DE CAPTURA DE NANOCUERPOS DEL COMPLEJO INHIBIDOR C1

Reactivos

• Captura: Nanocuerpo 1B12 - reconoce inhibidor de la esterasa C1 escindido y complejado

• HBS, Leche HBS, HBS-Tween 20

• Nanocuerpo policlonal biotinilado anti-FXII (detecta todos los dominios de FXII(a))

• anti-PK policlonal de oveja/cabra, IgG purificada por afinidad (Cedarlane) - (detecta todos los dominios de PK)

• IgG policlonal anti-FXI de oveja/cabra, purificada por afinidad (Affinity biologicals) - (detecta todos los dominios de FXI(a))

• anti-peroxidasa de oveja/cabra de burro (DAKO)

• estreptavidina-poliHRP (Sanquin)

• Solución de parada: H_2SO_4 0,3 M

Procedimiento:

1. Diluir el nanocuerpo de captura y añadir 50 µl a una placa Maxisorp de 96 pocillos. Sellar la placa e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, mientras se agita. Continuar la incubación a 4 ˚C durante la noche.

2. Enjuagar los pocillos recubiertos con 200 µl de HBS

3. Bloquear los pocillos añadiendo 150 µl de mHBS al 1 % (p/v). Sellar la placa e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, mientras se agita.

4. Retirar la solución de bloqueo y añadir 50 µl de muestra. Sellar la placa e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, mientras se agita.

5. Enjuagar los pocillos 3 veces con HBS-Tween, después de lo cual puede agregar 50 µl del anticuerpo de detección del primer paso. Sella la placa e incuba durante 1 hora a temperatura ambiente, mientras agita.

6. Enjuagar los pocillos 3 veces con HBS-Tween, después de lo cual puede agregar 50 µl del segundo anticuerpo de detección/estreptavidina. Sella la placa e incuba durante 1 hora a temperatura ambiente, mientras agita.

7. Enjuagar los pocillos 3 veces con PBS-Tween y agregue 50 µl de sustrato TMB. Deje que la placa se desarrolle hasta que se obtenga la señal deseada (no más de 45 minutos). Detenga el desarrollo del sustrato mediante la adición de 25 µl de H_2SO_4. Analizar la absorción con Spectramax a 450 nm.

11.4. Técnica de laboratorio del INMUNOENSAYO MULTIPLEX LUMINEX® DISCOVERY

Reactivos:

• Cóctel de micropartículas premezcladas humanas magnéticas 0,6 ml de un cóctel de micropartículas concentrado con conservantes.

• Cóctel de biotina-Ab premezclado humano 0,6 ml

• Concentrado de estreptavidina-ficoeritrina(PE) 0,250 ml

• Diluyente RD2-1 895970 11 ml de una base proteica tamponada con conservantes.

• Diluyente de calibrador RD6-52 2 viales (21 ml/vial) de una base proteica tamponada con conservantes.

• Concentrado de tampón de lavado 21 ml surfactante tamponado con conservante.

• Microplaca de 96 pocillos de fondo plano utilizada como recipiente para el ensayo.

• Frascos de mezcla 2 de 8 ml utilizados para mezclar micropartículas con diluyente RD2-1.

• Selladores de placas 4 tiras de papel de aluminio adhesivo.

• Programa analizador MAGPIX®, Luminex® 100/200™, FLEXMAP 3D®, xMAP INTELLIFLEX® o • Bio-Rad® Bio-Plex® con plataforma X-Y

• Imán de microplacas portátil o lavador de placas con plataforma magnética

• Pipetas y puntas de pipeta

• Agua desionizada o destilada

• Pipeta multicanal, dispensador múltiple o unidad de dispensación automática

• Probeta graduada de 500 ml

• Agitador de microplacas orbital horizontal (órbita de 0,12") capaz de mantener una velocidad de 800 ± 50 rpm

• Microcentrífuga

• Tubos de ensayo de polipropileno para dilución de estándares y muestras

Procedimiento:

1. Preparar todos los reactivos, estándares y muestras como se indica

2. Agregar 50 µL de estándar o muestra por pocillo. Se proporciona un diseño de placa para registrar los estándares y las muestras analizadas.

3. Resuspender el cóctel de micropartículas diluido por inversión o agitación con vórtex. Agregar 50 µL del cóctel de micropartículas a cada pocillo de la microplaca. Cubrir bien con un sellador de placas de aluminio. Incube durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador de microplacas orbital horizontal (órbita de 0,12”) ajustado a 800 ± 50 rpm.

4. Con un dispositivo magnético diseñado para acomodar una microplaca, lavaraplicando el imán en la parte inferior de la microplaca, esperar 1 minuto antes de retirar el líquido, llenar cada pocillo con tampón de lavado (100 µL) y esperar 1 minuto antes de retirar el líquido nuevamente. Realice el procedimiento de lavado tres veces.

5. Agregar 50 µL de cóctel de anticuerpos y biotina diluido a cada pocillo. Cubra bien con un sellador de placas de aluminio e incube durante 1 hora a temperatura ambiente en el agitador ajustado a 800 ± 50 rpm.

6. Repetir el lavado como en el paso 4.

7. Agregar 50 µL de estreptavidina-PE diluida a cada pocillo. Cubra bien con un sellador de placas de aluminio e incube durante 30 minutos a temperatura ambiente en el agitador ajustado a 800 ± 50 rpm.

8. Repetir el lavado como en el paso 4.

9. Resuspender las micropartículas agregando 100 µL de tampón de lavado a cada pocillo. Incube durante 2 minutos en el agitador ajustado a 800 ± 50 rpm.

10. Leer dentro de los 90 minutos utilizando un analizador Luminex® o Bio-Rad®.

11.5. Tabla suplementaria

Resumen del estudio alergológico del endotipo de las anafilaxias por fármacos: pruebas cutáneas realizadas y su resultado y las pruebas de exposición realizadas.

FÁRMACO	TC REALIZADOS	TC -	TPO +	TRIPTASA +	CONFIRM ENDOTIPO IG E
PLATINO (N=8)	8	2	2	0	6
TAXANOS (N=9)	9	9	2	1	0
DOXORUBICINA (N=1)	0				0
CETUXIMAB (N=3)	3	3	1	1	0
TRASTUZUMAB (N=2)	2	2		0	0
BEVACIXUMAB (N=1)	1	1		0	0
PEMBROLIZUMAB (N=1)	1	1	1	0	0
CLADRIBINA	1	1	1	1	1
AZD0156	1	1		0	0
RITUXIMAB (N=7)	7	5	2	0	2
FABRAZYME (N=3)	3	3	1	0	0
CERTOLIZUMAB (N=1)	1	1			0
AMOXICILINA (N=7)	6	2	2	0	4
CEFUROXIMA (N=2)	2	1	1	0	1
PIPER-TAZO (N=1)	1	1	0	0	0
CIPROFLOXACINO (N=2)	2	2	0	0	0
RIFAMPICINA	1	1	0	0	0
METAMIZOL (N=8)	8	1	1	1	7
AAS (N=7)	0		4	3	0
CELECOXIB (N=2)	0		2	1	1
NAPROXENO (N=2)	0		1	1	1
IBUPROFENO (N=1)	1	1	1	0	0
PARACETAMOL (N=1)	1	1	1	0	0
FERINJECT (N=1)	1	1	0		0
AMIODARONA EV (N=2)	2	2	1	0	0
METILPREDNISOLONA	1	1	1	1	1
GADOLINIO (N=4)	4	1	1	0	3
VISIPAQUE (N=1)	1	0			1

11.6. Artículo relacionado con la tesis doctoral

Curr Treat Options Allergy (2022) 9:303–322
DOI 10.1007/s40521-022-00326-1

Galvan-Blasco, P., Gil-Serrano, J. & Sala-Cunill, A. New Biomarkers in Anaphylaxis (Beyond Tryptase). Curr Treat Options Allergy 9, 303–322 (2022). doi: 10.1007/s40521-022-00326-1

Anaphylaxis (R Muñoz Cano, Section Editor)

New Biomarkers in Anaphylaxis (Beyond Tryptase)

P. Galvan-Blasco, MD[1,2]
J. Gil-Serrano, MD[1,2]
A. Sala-Cunill, MDPhD[1,2,3,*]

Address
[*,1]Allergy Section, Department of Internal Medicine, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain
Email: anna.sala@vallhebron.cat
[2]Allergy Research Unit, Allergy Department, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Universitat Autonoma de Barcelona, Barcelona, Spain
[3]Innovation Unit, Quality, Processes, and Innovation Directorate, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

Published online: 28 November 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2022

This article is part of the Topical Collection on *Anaphylaxis*.

P. Galvan-Blasco MD and J. Gil-Serrano MD contributed equally.

Keywords Anaphylaxis · Biomarkers · Mast cell · Mediators · Tryptase · Contact system

Abstract

Purpose of Review The purpose of this review is to provide a better understanding of anaphylaxis pathophysiology and describe the underlying mechanisms, effector cells, and the potential biomarkers involved depending on the anaphylaxis endotypes.
Recent Findings New insight into the potential relevance of pathways others than IgE-dependent anaphylaxis has been unraveled, as well as other biomarkers than tryptase, such as the role of platelet activation factor, basogranulin, dipeptidyl peptidase I, CCL-2, and other cytokines.
Summary Gaining knowledge of all the mediators and cellular activation/communication pathways involved in each endotype of anaphylaxis will allow the application of precision medicine in patients with anaphylactic reactions, providing insights to the most appropriate approach in each case and helping to stratify severity and risk prediction.

Introduction

Anaphylaxis is a severe, multisystem syndrome that is rapid in onset and potentially lethal, requiring immediate medical intervention. However, the diagnosis of anaphylaxis is still based on clinical symptoms after exposure to a potential allergen or event, given that no biomarker allows an unequivocal diagnosis of anaphylaxis [1, 2•]. Therefore, anaphylaxis remains underrecognized, undertreated, and poorly understood. The current gold standard laboratory test involves the measurement of serum total mast cell tryptase (MCT) during an acute phase followed by a baseline measurement at least 24 h after the reaction. However, even when sampling of tryptase is timely, an increase is not detectable in all cases [1, 2•].

Phenotypes of anaphylaxis are defined by clinical presentation and endotypes are based on cellular and molecular mechanisms involved during an anaphylactic reaction [1, 2•]. The activation of different pathways during an anaphylaxis will depend on which receptors are activated in the underlying effector cells and which mechanism and mediators are involved in the reaction. This review summarizes the most recent knowledge of how different effector cells and their mediators are involved in anaphylaxis depending on the mechanism providing a better understanding of the pathophysiology of anaphylaxis and explores and discusses the role for new biomarkers of anaphylaxis beyond tryptase.

Endotypes and effector cells involved in anaphylaxis

The type of receptor activated in the different effector cells during an anaphylactic reaction will influence which mediators (tryptase, interleukin [IL]-6, …) are released and, subsequently, which can be potential diagnostic biomarkers [3••]. Depending on these cellular and molecular mechanisms, anaphylaxis is divided in different endotypes, summarized in Table 1.

The major molecular mechanism underlying anaphylaxis is the classic allergic IgE-mediated reaction involving mast cells (MC) and basophils. Both cell types express the high-affinity IgE receptor (FcεRI) on their surface and are considered the main effector cells in this pathologic event [4]. However, a considerable percentage of subjects do not show evidence of IgE-dependent immune activation; therefore, other effector cells and pathways must be involved in anaphylaxis. Nowadays, there is enough evidence to corroborate that IgG antibodies can induce anaphylaxis by binding to their different receptors (FcγR) [5••]. Such receptors are found in MC, basophils, neutrophils, monocytes, and macrophages conforming the major cellular types activated by this alternative pathway [3••]. In fact, some studies have shown that human IgG receptors are capable of activating macrophages and neutrophils to secrete platelet-activating factor (PAF), and then PAF can activate mast cells in vitro, reinforcing the role of this mediator in human anaphylaxis as described below [6]. Moreover, the amount of antibody and antigen seems to be crucial in determining IgG- or IgE-dependent anaphylaxis. Thus, to induce a similar response in IgG-dependent anaphylaxis, a higher dose of antigen is required compared to IgE-dependent [7]. Complement-mediated anaphylaxis has also been described in human anaphylaxis [8]. C3a and C5a, known as anaphylatoxins, are potent inflammatory mediators generated upon activation of the complement cascades. Some substances, such as peanuts, have been described to have the ability to rapidly activate complement,

Table 1 Main effector cells, receptors, and endotype involved in anaphylaxis (3–14, 19, 21, 23, 27–31, 33, 35–38, 40, 42, 43, 46, 47, 49, 80, 83)

	Receptor	Endotype
Mast cell		
Activators	FcεRI	IgE mediated
	FcεRII (CD23)	IgE mediated
	FcγRIIa	IgG mediated
	Mrgprs	IgE independent
	Trk	Non-immunological
	Kit/CD117 (SCFR)	Non-immunological
	μ-δ-opioid receptors	Non-immunological
	TLR 1–9	IgE independent
	NTAL	Unknown
	C3aR, CD88/C5aR	Complement mediated
	HR 1–2-3–4	All
	PAFR	All
	CD200 R1	Non-immunological
	Neurokinin 1-receptor	Non-immunological
	IL-33R, TSLPR	Unknown
	IL-4R	Unknown
	IL1R	Cytokine release syndrome
	IL-6R soluble	Cytokine release syndrome
Basophil		
Activators	FcεRI	IgE mediated
	FcγRIIa (CD32)	IgG mediated
	Mrgprs	IgE independent
	Trk	Non-immunological
	TLR	IgE independent
	C3aR, CD88/C5aR	Complement mediated
	CD35/C3b/C4b/CR1 CD11b/CD18/CR3, C3bR, CD11c/CR4	Complement mediated
	HR 1–2-4	All
	PAFR	All
	IL-33R, IL-25, TSLPR	Unknown

Table 1 (continued)

	Receptor	Endotype
Eosinophil		
Activators	FcεRI	IgE mediated
	FcεRII (CD23)	IgE mediated
	FcγRIIa (CD32)	IgG mediated
	Trk	Non-immunological
	TLR	IgE independent
	C3aR, CD88/C5aR	Complement mediated
	CD35/C3b/C4b/CR1 CD11b/CD18/CR3, C3bR	Complement mediated
	HR 1–2-3–4	All
	PAFR	All
	IL-33R, IL-25, TSLPR	Unknown
	IL-1R	Cytokine release syndrome
	IL-6R soluble	Cytokine release syndrome
	TNFR	Cytokine release syndrome
Neutrophil		
Activators	FcεRI	IgE mediated
	FcεRII (CD23)	Proteases
	FcγR (I-IV)	IgG mediated
	Trk	Non-immunological
	TLR	IgE independent
	C3aR, CD88/C5aR	Complement mediated
	CD35/C3b/C4b/CR1 CD11b/CD18/CR3	Complement mediated
	HR 1–2-4	All
	PAFR	All
	G-CSFR, GM-CSFR	All
	IL1R	Cytokine release syndrome
	IL-6R soluble	Cytokine release syndrome
	TNFR	Cytokine release syndrome
Monocyte/macrophage		
Activators	FcεRI	IgE mediated
	FcγR (I-III)	IgG mediated
	Mrgprs	IgE independent
	Tyr	Non-immunological
	TLR	IgE-independent
	C3aR, CD88/C5aR	Complement activation
	CD11b/CD18/CR3, CD35/C3b/C4b/CR1	Complement activation
	HR 1–2-4	All
	IL-6R soluble	Cytokine release syndrome
	TNFR	Cytokine release syndrome

Table 1 (continued)

	Receptor	Endotype
Platelet		
Activators	FcεRI	IgE mediated
	FcεRII (CD23)	Proteases
	FcγRIIa	IgG mediated
	TLR	IgE independent
	C3b/CD46	Complement mediated
	C1qR	Complement mediated Contact system mediated
	IL1R	Cytokine release syndrome
	IL-6R soluble	Cytokine release syndrome
	TNFR	Cytokine release syndrome
Epithelium		
Vasodilation, increased permeability	HR 1–2	All
	PAFR	All
	PAR2 (tryptase-R)	All
	CysLTR 1–2	All
	C3aR, CD88/C5aR	Complement activation
	Bradykinin 1–2 R	Contact system activation
	EP1-2–4, DP	All
	IL-4Ra	Unknown
	IL1R	Cytokine release syndrome
	IL-6R soluble	Cytokine release syndrome
	TNFR	Cytokine release syndrome

FcεRI, high affinity IgE receptor; *FcεRII (CD23)*, low affinity IgE receptor; *FcγRIIa*, IgG receptor; *Mrgprs*, Mas-related G protein-coupled receptor; *Trk*, tyrosine kinase receptor; *SCFR*, stem cell factor receptor; *TLR*, Toll-like receptor; *NTAL*, non-T cell activation linker; *HR*, histamine receptor; *TNFR*, tumor necrosis factor receptor; *PAFR*, plasmin activator factor receptor; *TSLPR*, thymic stromal lymphopoietin receptor; *G-CSFR*, granulocyte colony stimulating factor receptor; *GM-CSFR*, granulocyte–macrophage colony-stimulating factor receptor; *PAR*, protease activated receptor; *CysLTR*, cysteinyl leukotriene receptor; *EP*, E prostanoid receptor; *DP*, D prostaglandin receptor

with production of large amounts of anaphylatoxins that stimulates macrophages, basophils, and MC which contribute to the induction of anaphylaxis [9, 10]. In addition, the contact and coagulation systems can be activated in anaphylaxis through immunological and non-immunological mechanisms [11].

Different non-immunologic activating paths have been described in anaphylaxis. Some drugs (e.g., opioids, neuromuscular blockers, quinolones) are also capable of activating MC and basophils, triggering degranulation, through the Mas-related G-protein coupled receptor member X2 (MRGPRX2) [12, 13]. This is a highly relevant pathway independent of specific immunoglobulins. External factors such as physical exercise, exposure to cold, or ultraviolet radiation may also act as elicitors of MC [14, 15••, 16]. Another endotype discovered due to the increasingly common use of monoclonal antibodies and chemotherapeutic agents is cytokine release reaction. These reactions are suspected to be mediated by tumor necrosis factor alpha (TNFα), IL-1β and IL-6 produced by MC, monocytes, and T cells. In some patients, the endotype could be mixed due to co-occurrence of IgE-mediated reactions and cytokine release reactions [4].

Considering all the above, anaphylaxis endotypes can be divided mainly in two different groups, immune-mediated anaphylaxis (IgE-dependent and non-IgE-dependent such as IgG-dependent, complement system, contact system, cytokine release reactions) and non-immunological anaphylaxis.

Mast cell

MC are hematopoietic cells that reside in different tissues (such as connective tissue, blood, skin, among others) and have an important role in inflammation. MC are the key effector cells in anaphylaxis [16, 17]. They are involved in IgE-mediated reactions (immediate hypersensitive reactions), due to cross-linking by allergens of specific IgE (sIgE) attached to its high-affinity receptor (FCeRI) expressed predominantly by MC and basophils [18]. This interaction, allergen-sIgE-MC, results in intracellular signaling that triggers the release of MC mediators. There are two mayor types of MC, MC (T) that are characterized by a large content in tryptase and MC (TC) which produce both tryptase and chymase [19]. Characteristically, MC express an array of different receptors, the activation of which may induce activation through diverse pathways, as explained above. Figure 1 outlines the different MC activating receptors and mediators.

Basophil

Basophils are the largest and least common granular immune cells, representing about 0.5 to 1% of circulating leukocytes. Unlike MC, they are blood-circulating leukocytes and not tissue-resident cells [20, 21] Recent studies suggest that basophils activate complementary to MC and they play a key role in anaphylaxis, especially in food-induced anaphylaxis [22, 23]. Basophils share many mediators and receptors with MC [24] and are more commonly used to perform laboratory allergen-specific activation tests (BAT), since they are easy to sample from whole blood. BAT has been demonstrated useful to confirm IgE-mediated allergy and also to monitor allergen immunotherapy, in order to differentiate short-term desensitization versus sustained unresponsiveness to the allergen [25, 26].

Neutrophil, eosinophil, monocyte/macrophage, and platelet

The most recent studies on anaphylaxis have highlighted the role of other immune effector cells such as monocytes, macrophages, neutrophils, eosinophils, and platelets. Most of this evidence is based on murine models, so knowledge about their involvement in human anaphylaxis still remains scarce [27].

The implication of both monocytes and macrophages has been demonstrated in passive and active systemic anaphylaxis. They have been more

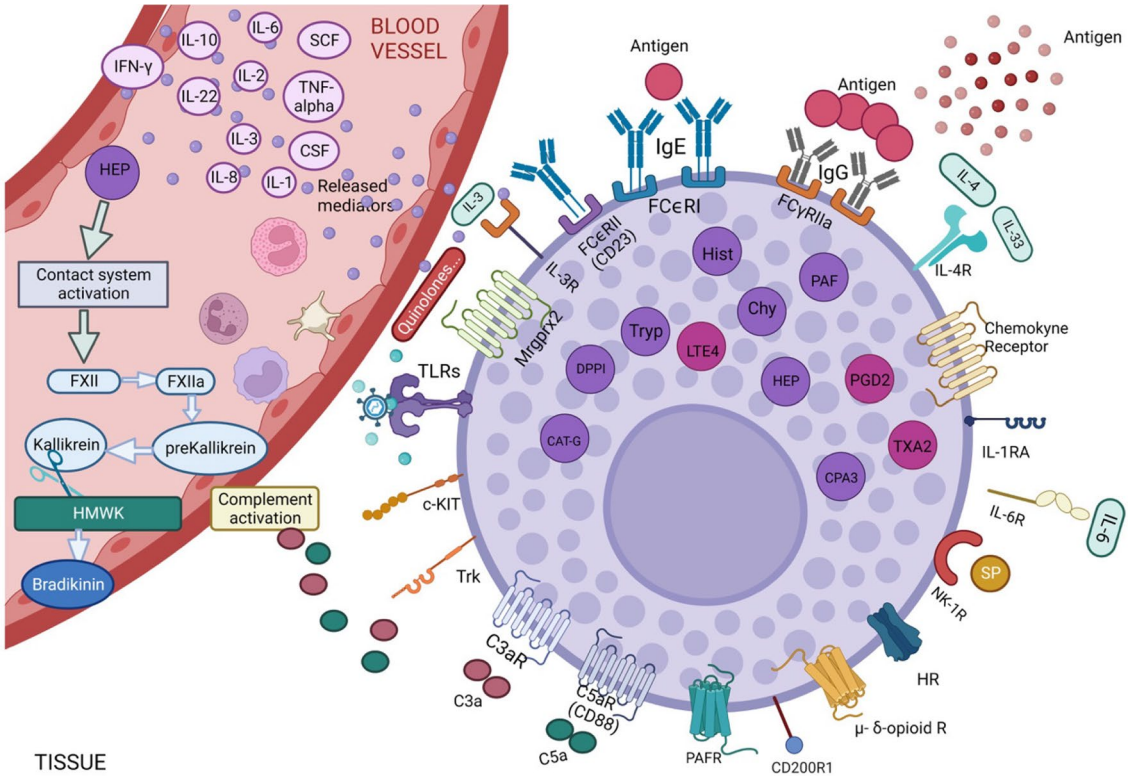


Fig. 1 The different MC activation receptors and mediators. FcεRI, high affinity IgE receptor; FcεRII (CD23), low affinity IgE receptor; FcγRIIa, IgG receptor; Mrgprs, Mas-related G protein-coupled receptor; Trk, tyrosine kinase receptor; TLR, Toll-like receptor; HR, histamine receptor; PAFR, plasmin activator factor receptor; NK-1R, neurokinin receptor 1; Tryp, tryptase; Hist, histamine; PAF, platelet activator factor; Chy, chymase; CPA3, carboxypeptidase A3; DPPI, dipeptidyl peptidase I/cathepsin C; CAT-G, cathepsin G; LTE4, lipoxygenase product E4; PGD2, prostaglandin D2; TXA2, thromboxane A2; HEP, heparin; FXII, factor XII; FXIIa, activated factor XII; CSF, stem cell factor; HMWK, high molecular weight kininogen; TNF-alpha, necrosis tumoral factor alpha. This image is created with BioRender.com

related to IgG-dependent and cytokine release reaction endotypes [27–29]. However, especially neutrophils have gained much relevance as key cellular player eliciting non-IgE-dependent anaphylactic reactions [4, 30]. Evidence in patients has shown elevated circulating serum levels of neutrophil elastase and myeloperoxidase, major mediators stored in their granules. These results supported the existence of a neutrophil-associated IgG molecular mechanism associated with drug-induced anaphylaxis [31–33]. As represented in Table 1, neutrophils not only express FcγR, but also FcεRI and MRGPRX2.

MC and eosinophils share several receptors and mediators (Tables 1 and 2), so suspecting their involvement in anaphylaxis seems reasonable. Accumulation of eosinophils has been detected in passive cutaneous anaphylactic reactions in guinea pigs, as well as in spleens and coronary arteries from anaphylactic human cadavers [34, 35]. And lastly, but by no means less importantly, there is evidence of platelet contribution in anaphylactic reactions. The release of important mediators (Table 2) has been observed in both IgE- and IgG-dependent pathways [6, 36–38].

Taken together, this data indicate that many myeloid cells have a role in the physiopathology of anaphylaxis.

Endothelium

The endothelium consists of a single and extensive layer of endothelial cells (ECs). Molecularly, stabilization of the endothelial barrier depends on a series of connections, such as tight junctions (TJ) and adherent junctions (AJ). A dysfunctional endothelium is the cause of important cardiovascular diseases such as thrombosis, atherosclerosis, or hypertension [39]. A damaged endothelium has been observed in patients with mastocytosis [40] and, in acute inflammatory situations as in COVID-19 disease, ECs contribute as effector cells to the cytokine releases syndrome [41]. Therefore, endothelium is an important organ-cell in anaphylaxis playing a role not only in the control of fluids and the vascular tone but also as an activation surface for the coagulation, contact system, and complement [11, 42, 43]. ECs release relevant anaphylactic mediators such as nitric oxide (NO), together with other molecules (presumably cytokines or interleukins) which also released, contribute to the pool of mediators in the reaction [3••]. Specifically, anaphylactic shock depending on endothelial Gq/G11 has been characterized in mice [43]. However, the exact contribution of these cells during anaphylaxis is still not fully understood.

Mediators release in anaphylaxis

During anaphylaxis there is a rapid release of mediators from different sources, but most important, from MC and basophils. These mediators are proteases, sulfated polysaccharides, cytokines, chemokines, vasoactive agents (histamine, bradykinin) and proinflammatory lipid mediators, among others [44]. They are usually divided into three classes: preformed mediators (that are stored in cytoplasmic granules), newly generated in minutes (proinflammatory lipid mediators), and newly generated over hours (growth factors, cytokines, and chemokines). Table 2 summarizes the main mediators, their major cell sources, best sampling time, and the availability of commercial assays.

Preformed mediators

Preformed mediators are stored in cytoplasmatic granules of the effector cells (mainly MC and basophils) and include proteases (tryptase, chymase), highly sulfated polysaccharides (heparin and other proteoglycans), and histamine [45].

Table 2 Summary of anaphylaxis mediators, cell source, testing characteristics, and evidence of their potential use as biomarkers in anaphylaxis (1–7, 9–22, 24, 27–40, 42–90)

Mediator	Source	Recommended sampling time	Methods available for routine assessment	Correlation with severe anaphylaxis	Half-life
Preformed					
Histamine (plasma, urine)	MC, BS NT	0–30 min	Yes	Yes	<15 min
Histamine (24-h urine)	MC, BS, NT	0–24 h	Yes	Yes	UNK (0–24 h)
N-m-histamine (plasma, 24-h urine)	MC, BS, NT	0–24 h	Yes	Yes	UNK (0–24 h)
N-m-imidazole acetic acid (24-h urine)	MC, BS, NT	0–24 h	Yes	UNK	UNK (0–24 h)
Tryptase (serum/plasma)	MC, BS	15 min–3 h	Yes	Yes	~2 h
Chymase (serum)	MC, BS	0–24 h	No	Yes	>24 h
Carboxypeptidase A3 (serum/plasma)	MC, BS	0–8 h	No	UNK	>tryptase (2–8 h)
Basogranulin (serum)	BS	UNK	No	No	UNK
Heparin (plasma)	MC, BS	UNK	No	Yes	UNK
DPPI/cathepsin C (serum)	MC, BS	UNK	No	UNK	UNK (similar to histamine)
Cathepsin G (serum)	MC, BS, EOS, NT	UNK	No	UNK	UNK
Newly generated over minutes					
Bradykinin (plasma)	Plasma	UNK	No	Yes	<1 min
FXII, PK, HK, thrombin (plasma)	Plasma	UNK	FXII, thrombin	UNK	UNK
LTE4 (24-h urine, plasma)	MC, BS, EOS, NT, MAC	0–24 h	No	Yes	7 min
LTB4, LTC4, LTD4 (24-h urine)	MC, BS, NT	0–24 h	No	UNK	<7 min
PGD2 (serum)	MC, EOS, NT, MN, PT	0–24 h	No	Yes	30 min
9α,11β-PGF2 (serum)	MC, PT	UNK (5–15 min)	No	UNK	UNK
2,3-dinor-11β-PGF2α (24-h urine)	MC, PT	UNK (0–24 h)	No	UNK	UNK
TXA2 (serum/plasma, urine)	MC, EOS, PT	UNK	No	UNK	30 s
TXB2 (serum/plasma, urine)	MC	UNK	No	UNK	60 min
PAF* (plasma)	MC, BS, EOS, NT, MAC, MN, PT, EC	UNK	No	Yes	<5 min
PAF-AH (serum)	MC, MAC, PT plasma	UNK	No	Yes	30 min
Nitric oxide	EC	UNK	No	UNK	UNK

Table 2 (continued)

Mediator	Source	Recommended sampling time	Methods available for routine assessment	Correlation with severe anaphylaxis	Half-life
C3a, C5a (plasma)	Plasma	UNK	No	No	UNK
TNF-α* (serum/plasma) Newly generated over hours	MC, MAS, NT, MAC	UNK	Yes	UNK	30 min
Stem cell factor (serum/plasma)	MC	UNK	No	Yes**	UNK
TGF-β (serum/plasma)	MC, EOS	UNK	Yes	UNK, potential**	2–3 min active 90 min latent**
CXCL4/PF4, PDGF	PT	UNK	No	UNK	<3 min
IL-1b (serum/plasma)	MC, NT	0–15 min	No	UNK	19 min**
IL-2, IL-22 (serum/plasma)	MC	0–10 h	No	IL-2 yes	UNK
IL-4/IL-13 (serum/plasma)	MC, BS, EOS	UNK (0–24 h)	No	IL-4 yes**	35–90 min
IL-10 (serum/plasma)	MC, EOS	UNK (0–24 h)	Yes	Yes	1–3.5 h
IL-6 (serum/plasma)	MC, BS, NT, MAC	UNK (0–24 h)	Yes	Yes	2–6 h
IL-8 (serum/plasma)	MC, EOS, NT	UNK (<3 h)	No	No	<4 h
CCL2/MCP-1 (serum/plasma)	MC, NT, MAC, MN, EC	UNK (0–30 min)	No	UNK, potential	30 min
CCL5/RANTES (serum/plasma)	MC, EOS, MN	UNK	No	UNK	14–18 h
MPO (serum/plasma)	NT, MN	UNK (<5 h)	No	Yes	UNK 4–5 h**
Other possible biomarkers (source cells)	Chondroitin sulfate (MC, BS), elastase* (NT), TSLP (MC, EC, SMC), IL-31 (MC, BS, EOS, MAC, LT), IL-33 (MC, BS), IL-3/IL-5/IL-16/IL-18 (MC, EOS), IL-17 (NT), IL-23/IL-27/FGF (MAC), G-CSF (MC, NT, MAC, MN, EC), GM-CSF (MC, BS, EC), M-CSF (MC, MN, EC), VEGF (MC, MAC, PT), S1P (MC, PT, EC, ERY), IFN- γ (NT, LT, NK), endothelin-1 (MC, MAC, MN, EC, SMC), prostacyclin (MC, PT, EC, SMC), plasminogen activator (MC), MBP (EOS)				

MC, mast cell; *BS*, basophil; *NT*, neutrophil; *PT*, platelet; *EOS*, eosinophil; *MAC*, macrophage; *MN*, monocyte; *EC*, endothelial cell; *SMC*, smooth muscle cell; *ERY*, erythrocyte; *LT*, T lymphocyte; *NK*, natural killer cell; *N-m*, N-methyl; *DPPI*, dipeptidyl peptidase I; *FXII*, coagulation factor XII; *PK*, prekallikrein; *HK*, high molecular weight kininogen; *PAF*, plasmin activator factor; *PAF-AH*, acetylhydrolase; *LTE4*, E4 leukotriene; *LTB4*, B4 leukotriene; *LTC4*, C4 leukotriene; *LTD4*, D4 leukotriene; *PGD2*, D2 prostaglandin; *TXA2*, A2 thromboxane; *TXB2*, B2 thromboxane; *TGF-β*, tumor grow factor beta; *TNF-α*, tumor necrosis factor alpha; *CXCL4/PF4*, platelet factor 4; *PDGF*, platelet-derived growth factor; *TSLP*, thymic stromal lymphopoietin; *FGF*, fibroblast grow factor; *G-CSFR*, granulocyte colony stimulating factor receptor; *GM-CSFR*, granulocyte–macrophage colony-stimulating factor receptor; *M-CSF*, VEGF CCL2/MCP-1 CCL5/RANTES S1P; *MPO*, myeloperoxidase; *MBP*, major basic protein; *IFN-γ*, interferon gamma

*Also preformed, but mainly newly generated

**Studies performed in mammals, not in humans

Histamine

Plasma histamine is an amine secreted by MC and basophils with vasoactive and pro-inflammatory functions. It is synthetized from the amino acid histidine and catalyzed by L-histidine decarboxylase. Histamine is stored in cytoplasmic granules and can be released when immunological or non-immunological activation occurs. There is evidence that neutrophils can also synthetize and release histamine under specific circumstances [46]. When MC/basophils are activated, histamine is released and it acts through its g-protein receptors (H1, H2, H3, and H4), causing arteriolar vasodilation, increased capillary permeability, bronchoconstriction, itching, swelling, rhinorrhea, urticaria, and rhinitis, among others [47]. The peak of histamine is 5–10 min from the onset of the reaction and is rapidly metabolized into methyl histamine by the N-methyltransferase or into imidazole acetaldehyde by diamine oxidase, and then secreted in urine [48]. In daily practice, histamine is not a good diagnostic biomarker for anaphylaxis due to its short half-life [4, 49].

Histamine metabolites

Methyl histamine and imidazole acetaldehyde had longer half-life compared to histamine and can be measured in urine or plasma after 30–60 min of the onset of the reaction [48]. Normal levels do not exclude a hypersensitivity reaction. Some false positive results may occur due to ingestion of foods with high concentrations of histamine (in example, in scombroidosis), endogenous production by other type of cells such as neurons or enterochromaffin-like cells in stomach, or by certain bacteria [24].

Tryptase

Tryptase is a neutral serine protease highly specific of MC, stored in large amounts in cytoplasmatic granules. It is currently used as a diagnostic biomarker in anaphylaxis. Also, basophils produce tryptase but in much lower amounts. Tryptase provides information about MC activation, distribution, and number so it is useful for diagnosis and follow-up of mast cell diseases [50, 51].

There are two biologically important forms of tryptase, alpha-protryptase and beta-tryptase. The alpha-protryptase is present in serum as an inactive proenzyme and is secreted constitutively. Beta-tryptase, on the other hand, is the functional tryptase, a mature tetramer stabilized by proteoglycans, stored predominantly in MC secretory granules and released by active MC. Tryptase acts binding to protease activated receptor type 2 (PAR-2, present in gastrointestinal, cardiovascular, neurons, among others). It is responsible of cleaving extracellular substrates, such as calcitonin gene-related peptide, kininogens, fibronectin, and vasoactive

intestinal peptide; also, it is a potent growth factor for EC, airway smooth muscle cells, and fibroblasts [45, 52]. It also has a chemotactic effect on neutrophils and eosinophils via IL-8 [53]. During anaphylaxis, tryptase is responsible for vascular vasodilation (activating the contact system to generate bradykinin) and bronchial hyperresponsiveness [49].

Basal tryptase in healthy individuals ranges from 0 to 11.4 ng/mL. Currently, it is accepted that levels of 120% of the baseline plus 2 ng/mL (1.2 × baseline tryptase + 2 ng/mL) is a significant increase, indicating MC activation (54, 55). In MC disorders, a basal tryptase > 20 ng/mL is considered as a minor criteria of mastocytosis [51].

During active MC degranulation in allergic reactions, β-tryptase is released. Levels of tryptase are increased from 15 min to 3 h after the anaphylaxis onset [54•, 56]. Sequential measurement of serum tryptase during anaphylaxis and basal serum levels increases sensitivity and specific of the diagnostic. Higher peak/baseline tryptase correlates with more severe symptoms [57]. Nevertheless, it is important to take into account that an increase is not detectable in all cases, for example, in food-induced anaphylaxis where tryptase does not increase as in drug-induced reactions [56, 58], but may still be useful for diagnosis. Current commercial methods measure immature alpha and beta tryptase, but as a diagnostic marker of anaphylaxis, it would be optimal to measure beta-tryptase alone, since this is the form released by MC.

Chymase

Chymase is a serine endopeptidase also found in MC (TC). It is usually released during MC/basophil activation, and its concentration in serum has been seen to be stable. There are no commercialized kits to measure chymase, so is not used routinely in anaphylactic reactions [59]. Chymase participates in local arterial pressure regulation due to the hydrolysis of angiotensin I into angiotensin II [60]; it also activates endothelin-1 and 2, leading to the production of metalloproteinases and cytokines [24]. It has been reported alternative methods to evaluate indirectly Chymase via alpha-2-macroglobulin, but is not systematically used [61]. Postmortem chymase concentrations in cases of fatal anaphylaxis have been shown to correlate with levels of tryptase [62].

Carboxypeptidase A3

Carboxypeptidase A3 is another metalloproteinase contained in MC and basophil granules [63]. Zhou et al. [64] measured levels of carboxypeptidase A3 in cases of anaphylaxis, systemic mastocytosis, and control groups. Significantly elevated levels were found 8 h after the onset of an allergic reaction compared to the control cohort. There are no available commercial methods for its quantification in daily practice.

Basogranulin

Basogranulin is a basophil granule protein that is released in parallel with histamine. It shares receptors and pathways with histamine [65]. Nowadays, there are no available methods for its measurement [66].

Heparin

Highly sulfated proteoglycan heparin is preformed in MC (predominantly) and also in basophil granules. It is stored in its active form with a negative charge. It has been reported that heparin has an important role in activating the plasma contact system [11, 67]. Due to its negative charge, it is capable of activating the FXII-dependent pathway and cleaving high molecular weight kininogen into bradykinin, leading to increased vascular permeability [11].

Dipeptidyl peptidase I (DPPI)/cathepsin C

Dipeptidyl peptidase I (DPPI)/cathepsin C is a member of the papain family proteases that is expressed in numerous cell types, including both MC and basophils. Levels of chymase and DDPI have been shown to increase and correlated during anaphylaxis, but do not correlate with tryptase [68, 69]. Its activity outside of cells is limited. There are no available measurement methods for its quantification currently.

Cathepsin G

Cathepsin G is a protease related to chymase and has similar functions (cleavage of angiotensin I to angiotensin II) [69]. It is found in MC granules. There are no available techniques to measure it.

Newly generated over minutes

Newly generated mediators are generated over minutes after the onset of stimuli by the different types of cells involved in the reactions.

Bradykinin (BK)

Is a nonapeptide from the kinin family with vasoactive functions that has been demonstrated to be released during anaphylaxis by activation of the contact system [11, 67]. When the contact system is activated by a negative charge (for instance heparin that is released in anaphylaxis), FXII is activated to FXIIa, which cleaves prekallikrein to kallikrein, which subsequently hydrolyses the high molecular weight kininogen to release BK. BK has a very short half-life, less than 1 min, due to its fast metabolism by the specific enzymes (angiotensin

converting enzyme, also known as kininase II), dipeptidyl peptidase IV, carboxypeptidase N also known as kininase I, and neutral endopeptidase [70]. BK acts through its specific receptors, B1 and B2, inducing an increase of vascular permeability and plasma extravasation [71]. Currently, it is not possible to measure BK in daily practice, due to its short half-life, so indirect methods are used to assess it in research setting.

Lipid mediators

Lipid mediators are synthetized de novo in activated MC and basophils. They derive from arachidonic acid and have vasoactive and pro-inflammatory functions.

Lipoxygenase products: leukotriene E4

Leukotriene E4 (LTE4) is produced by activated MC, neutrophils, eosinophils, and macrophages. It is derived from the precursor LTA4, converted to LTD4 and finally LTE4. LTE4 is the most stable metabolite of the lipoxygenase products and binds to three different receptors (CysLTR1, CysLTR2, CysLTR3). Its activation causes airway constriction, smooth muscle contraction, and increased vascular permeability [24]. LTE4 can be measured in urine, but due to their rapid metabolism, LTC4 and LTD4 cannot be measured [72].

Cyclooxygenase products: prostaglandins and thromboxanes

Generation of metabolites of arachidonic acid (thromboxane A2, thromboxane B2, prostaglandin (PG) D2, PGE2, PGF2) in anaphylaxis has been demonstrated in several studies with animals and humans [73, 74]. PGD2 is the main cyclooxygenase product formed in activated MC, also produced by neutrophils, monocytes, macrophages, and platelets, but not by basophils. PGD2 binds to its receptors DP1 and/or DP2 and increases vascular permeability and induces bronchoconstriction. PGD2 has a rapid degradation to more stable metabolites such D-prostaglandin (PGD), F-prostaglandin (PGF), and J-prostaglandin (PGJ), which are excreted in urine [75]. Nassiri et al. [76] suggest that serum levels of 9α,11β-PGF2 could be useful biomarkers of anaphylaxis. The urinary metabolite 2,3-dinor-11β-PGF2α can be measured in urine [75].

Platelet-activating factor (PAF)

PAF is a potent phospholipid derived mediator produced by activated MC, endothelial cells, polymorphonuclear (PMN) leukocytes, eosinophils,

macrophages, monocytes, and platelets. It is rapidly metabolized into its inactive metabolite lyso-PAF (by the enzyme PAF acetylhydrolase—PAF-AH). During anaphylaxis, PAF binds to its receptor on monocytes, platelets, macrophages, and neutrophil. It induces a potent bronchoconstriction and vasodilation with edema. Also is involved in platelet aggregation, activation of eosinophils, and PMN–leucocytes. Elevated levels of PAF correlate with the severity of anaphylaxis [77, 78]. Also, there is an inverse correlation between PAF and PAF-AH activity. Vadas et al. (79) showed that PAF correlates better to MC anaphylaxis compared to histamine and tryptase. PAF is common in both, IgE and IgG anaphylaxis, due to that it is released by all myeloid cell subsets. In mouse models, it had been demonstrated a synergistic effect with histamine [27]. One of the challenges of measuring PAF and PAF-AH in a daily practice is its short half-life and the transport precautions it requires.

C3a and C5a

Activation of complement by immune complexes can lead to the generation of anaphylatoxins (AT), such as C3a and C5a, which can then bind to complement receptors on MC. C3a and C5a regulate vasodilation, increase the permeability of small blood vessels, and induce contraction of smooth muscles. Basophils and MC react upon AT stimulation with release of histamine [80]. In macrophages, neutrophils, and eosinophils, C3a and C5a can trigger oxidative burst [81, 84].

Newly generated over hours

Newly generated over hours mediators are mainly growth factors, cytokines, and chemokines. Specific mediators released by MC may have autocrine, paracrine, and endocrine effects of interest to the pathogenesis of anaphylaxis. The cytokines IL-8 and GM-CSF have paracrine effects on other cells of leukocyte lineage, including eosinophils, neutrophils, and macrophages [83]. Similarly, the expression of stem cell factor by MC can have facilitatory autocrine effects on mast cell survival, chemotaxis, growth, and proliferation [84, 85]. Another paracrine loop is mast cell-derived histamine binding to endothelial H1-receptors and leading to the elaboration of NO which contributes to vasodilation [86].

Stone et al. [87] analyzed the peak concentrations of different mediators including histamine, tryptase, cytokines [IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNFRI] and chemokines in a prospective study in patients who suffered anaphylaxis. All these mediators were higher in anaphylactic patients compared to control group. In this study, only tryptase, histamine, IL-2, IL-6, IL-10, and TNFRI correlated with hypotension, a finding similar to that found by Brown et al. [88]. Moreover, IL-6 and other inflammatory cytokines such as IL-8, TNF-a,

interferon gamma (IFN-g), and IL-1b induce the inactivation of cadherin, which mediate cell adhesion, leading to vascular leakage by increased capillary permeability. It has been postulated that IL-1 released from monocytes and macrophages activates endothelial expression of NO leading to this capillary permeability. On the other hand, recently, the role of IL-6 has been described as an excellent biomarker of cytokine release reactions because of its correlation with the severity of the reactions and its longevity in a blood serum. In addition, it has been demonstrated the role of IL-6 in the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) [89]. There are promising data regarding major basophil chemotactic factor, chemokine (C–C motif) ligand 2, or CCL-2. Concentration of CCL-2 has been found to be significantly higher in anaphylaxis compared to healthy control cohort, and potentially identified severe anaphylaxis cases [65]. Latest studies, including human and murine models, have detailed several novel mediators that may participate in anaphylaxis reaction [3••, 83, 90], as it has been summarized in Table 2.

Conclusions

Pathophysiology of anaphylaxis involves the activation of multiple pathways beyond IgE, different cell types, and a wide range of mediators. Therefore, measuring only one mediator may not be enough to diagnose anaphylaxis. This could partly explain the current lack of optimal biomarkers to confirm the diagnosis.

Given that anaphylaxis remains a clinical diagnosis, there is still exist a challenge in the laboratory diagnosis of anaphylaxis. Biomarkers are useful to reinforce the diagnosis and distinguish anaphylaxis from similar clinical scenarios. New biomarkers are pointing their interest such as chymase, carboxypeptidaseA3, PAF, PAF-AH, IL-2, IL-6, IL-10, and CCL-2, providing sample requirements, assay platform, process, and costs. However, a consensus on a reference range about sample handling and processing requirements for different biomarkers is needed.

Further studies applying these approaches are needed and they might provide greater insight into factors determining severity, clinical risk stratification, identification of mast cell disorders, and improving our understanding of this relatively complex acute condition.

Declarations

Conflict of Interest
The authors declare no competing interests.

Human and Animal Rights and Informed Consent

This article does not contain any studies with human participants or animal performed by any of the authors.

References

Papers of particular interest, published recently, have been highlighted as:
• Of importance
•• Of major importance

1. Cardona V, Ansotegui IJ, Ebisawa M, El-Gamal Y, Fernandez Rivas M, Fineman S, et al. World Allergy Organization anaphylaxis guidance 2020. World Allergy Organization Journal. 2020;13(10).
2.• Muraro A, Worm M, Alviani C, Cardona V, DunnGalvin A, Garvey LH, et al. EAACI guidelines anaphylaxis (2021 update). Allergy Eur J Allergy Clin Immunol. 2022;77(2):357–77.

This paper reviews the latest European guidelines on anaphylaxis.

3.•• Nuñez-Borque E, Fernandez-Bravo S, Yuste-Montalvo A, Esteban V. Pathophysiological, cellular, and molecular events of the vascular system in anaphylaxis. Front Immunol. 2022;13(March):1–20.

This study reviews the role of human vessels in anaphylaxis.

4. Jimenez-Rodriguez TW, Garcia-Neuer M, Alenazy LA, Castells M. Anaphylaxis in the 21st century: phenotypes, endotypes, and biomarkers. Vol. 11, Journal of Asthma and Allergy. Dove Medical Press Ltd.; 2018. 121–42.
5.•• Cianferoni A. Non–IgE-mediated anaphylaxis. J Allergy Clin Immunol [Internet]. 2021;147(4):1123–31.

This paper reviews pathways that may lead to anaphylaxis in the absence of specific IgE/allergen activation.

6. Kajiwara N, Sasaki T, Bradding P, Cruse G, Sagara H, Ohmori K, et al. Activation of human mast cells through the platelet-activating factor receptor. J Allergy Clin Immunol. 2010;125(5):1137-1145.e6.
7. Finkelman FD, Khodoun MV, Strait R. Rostrum: human IgE-independent systemic anaphylaxis. J Allergy Clin Immunol. 2016;137(6):1674–80.
8. Schäfer B, Piliponsky AM, Oka T, Song CH, Gerard NP, Gerard C, et al. Mast cell anaphylatoxin receptor expression can enhance IgE-dependent skin inflammation in mice. J Allergy Clin Immunol. 2013;131(2):541-8.e1-9.
9. Khodoun M, Strait R, Orekov T, Hogan S, Karasuyama H, Herbert BR, et al. Peanuts can contribute to anaphylactic shock by activating complement. J Allergy Clin Immunol. 2009;123(2):342–51.
10. Kodama T, Sekine H, Takahashi M, Iwaki D, Machida T, Kanno K, et al. Role of complement in a murine model of peanut-induced anaphylaxis. Immunobiology. 2013;218(6):844–50.
11. Sala-Cunill A, Björkqvist J, Senter R, Guilarte M, Cardona V, Labrador M, et al. Plasma contact system activation drives anaphylaxis in severe mast cell-mediated allergic reactions. J Allergy Clin Immunol. 2015;135(4):1031-1043.e6.
12. Subramanian H, Gupta K, Ali H. Roles of MAS-related G protein coupled receptor-X2 (MRGPRX2) on mast cell-mediated host defense, pseudoallergic drug reactions and chronic inflammatory diseases. J Allergy Clin Immunol. 2016;138(3):700–10.
13. Elst J, Maurer M, Sabato V, Faber MA, Bridts CH, Mertens C, et al. Novel insights on MRGPRX2-mediated hypersensitivity to neuromuscular blocking agents and fluoroquinolones. Front Immunol. 2021;27(12):668962.
14. Muñoz-Cano RM, Bartra J, Picado C, Valero A. Mechanisms of anaphylaxis beyond IgE. J Investig Allergol Clin Immunol. 2016;26(2):73–82.
15.•• Kow ASF, Chik A, Soo KM, Khoo LW, Abas F, Tham CL. Identification of soluble mediators in IgG-mediated anaphylaxis via Fcγ receptor: a meta-analysis. Front Immunol. 2019;12(10):190.

This paper is a meta-analysis that describes the potential soluble mediators that are involved in an IgG-mediated anaphylaxis reaction.

16. Reber LL, Hernandez JD, Galli SJ. The pathophysiology of anaphylaxis. J Allergy Clin Immunol. 2017;140(2):335–48.
17. Maurer M, Magerl M, Betschel S, Aberer W, Ansotegui IJ, Aygören-Pürsün E, et al. The international WAO/EAACI guideline for the management of hereditary angioedema—the 2021 revision and update. Allergy. 2022;77(7):1961–90.
18. Kabashima K, Nakashima C, Nonomura Y, Otsuka A, Cardamone C, Parente R, et al. Biomarkers for evaluation of mast cell and basophil activation. Vol. 282, Immunological Reviews. 2018. 114–20.
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. Siracusa MC, Kim BS, Spergel JM, Artis D. Basophils and allergic inflammation. J Allergy Clin Immunol. 2013;132(4):789–801.
21. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. J Allergy Clin Immunol. 2010;125(2):S73-80.
22. Parrish CP, Kim H. Food-induced anaphylaxis: an update. Curr Allergy Asthma Rep. 2018;18(8):41.
23. Dispenza MC, Bochner BS, MacGlashan DW. Targeting the FcεRI pathway as a potential strategy to prevent food-induced anaphylaxis. Front Immunol. 2020;11(December):1–8.
24. Kabashima K, Nakashima C, Nonomura Y, Otsuka A, Cardamone C, Parente R, et al. Biomarkers for

evaluation of mast cell and basophil activation. Immunol Rev. 2018;282(1):114–20.
25. Savage JH, Courneya JP, Sterba PM, MacGlashan DW, Saini SS, Wood RA. Kinetics of mast cell, basophil, and oral food challenge responses in omalizumab-treated adults with peanut allergy. J Allergy Clin Immunol. 2012;130(5):1123-1129.e2.
26. Paranjape A, Tsai M, Mukai K, Hoh RA, Joshi SA, Chinthrajah RS, et al. Oral immunotherapy and basophil and mast cell reactivity in food allergy. Front Immunol. 2020;14(11):602660.
27. Balbino B, Sibilano R, Starkl P, Marichal T, Gaudenzio N, Karasuyama H, et al. Pathways of immediate hypothermia and leukocyte infiltration in an adjuvant-free mouse model of anaphylaxis. J Allergy Clin Immunol. 2017;139(2):584-596.e10.
28. Jiao D, Liu Y, Lu X, Liu B, Pan Q, Liu Y, et al. Macrophages are the dominant effector cells responsible for IgG-mediated passive systemic anaphylaxis challenged by natural protein antigen in BALB/c and C57BL/6 mice. Cell Immunol. 2014;289(1–2):97–105.
29. Escribese MM, Rosace D, Chivato T, Fernández TD, Corbí AL, Barber D. Alternative anaphylactic routes: the potential role of macrophages. Front Immunol. 2017;8:8.
30. Jönsson F, Mancardi DA, Kita Y, Karasuyama H, Iannascoli B, van Rooijen N, et al. Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. J Clin Investig. 2011;121(4):1484–96.
31. Jönsson F, Mancardi DA, Albanesi M, Bruhns P. Neutrophils in local and systemic antibody-dependent inflammatory and anaphylactic reactions. J Leukoc Biol. 2013;94(4):643–56.
32. Francis A, Bosio E, Stone SF, Fatovich DM, Arendts G, Nagree Y, et al. Neutrophil activation during acute human anaphylaxis: analysis of MPO and sCD62L. Clin Exp Allergy. 2017;47(3):361–70.
33. Jiménez-Saiz R. Drug-induced IgG-neutrophil-mediated anaphylaxis in humans: uncovered! Vol. 75, Allergy. NLM (Medline); 2020. 484–5.
34. Edston E. Accumulation of eosinophils, mast cells, and basophils in the spleen in anaphylactic deaths. Forensic Sci Med Pathol. 2013;9(4):496–500.
35. Weg VB, Watson ML, Faccioli LH, Williams TJ. Investigation of the endogenous chemoattractants involved in 111In-eosinophil accumulation in passive cutaneous anaphylactic reactions in the guinea-pig. Br J Pharmacol. 1994;113(1):35–42.
36. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet receptors. In: Platelets. Elsevier; 2019. 169–92.
37. Kasperska-Zajaç A, Rogala B. Platelet function in anaphylaxis. J Investig Allergol Clin Immunol. 2006;16(1):1–4.
38. Beutier H, Hechler B, Godon O, Wang Y, Gillis CM, de Chaisemartin L, et al. Platelets expressing IgG receptor FcγRIIA/CD32A determine the severity of experimental anaphylaxis. Sci Immunol. 2018;3(22).
39. Sun HJ, Wu ZY, Nie XW, Bian JS. Role of endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the link between inflammation and hydrogen sulfide. Front Pharmacol. 2020;21:10.
40. Bucci T, Parente R, de Feo G, Cardamone C, Triggiani M. Flow-mediated dilation shows impaired endothelial function in patients with mastocytosis. J Allergy Clin Immunol. 2019;144(4):1106–11.
41. Libby P, Lüscher T. COVID-19 is, in the end, an endothelial disease. Eur Heart J. 2020;41(32):3038–44.
42. Guilarte M, Sala-Cunill A, Luengo O, Labrador-Horrillo M, Cardona V. The mast cell, contact, and coagulation system connection in anaphylaxis. Front Immunol. 2017;26:8.
43. Yuste-Montalvo A, Fernandez-Bravo S, Oliva T, Pastor-Vargas C, Betancor D, Goikoetxea MJ, et al. Proteomic and biological analysis of an in vitro human endothelial system in response to drug anaphylaxis. Front Immunol. 2021;25:12.
44. Passia E, Jandus P. Using baseline and peak serum tryptase levels to diagnose anaphylaxis: a review. Vol. 58, Clinical Reviews in Allergy and Immunology. Springer; 2020. 366–76.
45. Butterfield JH, Ravi A, Pongdee T. Mast cell mediators of significance in clinical practice in mastocytosis. Immunol Allergy Clin North Am. 2018;38(3):397–410.
46. Alcañiz L, Vega A, Chacón P, el Bekay R, Ventura I, Aroca R, et al. Histamine production by human neutrophils. FASEB J. 2013;27:2902–10.
47. Pucillo C, Lorentz A, Sharma M, Saluja R, Thangam EB, Jemima EA, et al. The role of histamine and histamine receptors in mast cell-mediated allergy and inflammation: the hunt for new therapeutic targets. 2018;9:1873
48. Takeda J, Ueda E, Takahashi J, Fukushima K. Plasma N-methylhistamine concentration as an indicator of histamine release by intravenous d-tubocurarine in humans. Anesth Analg. 1995;80(5):1015–7.
49. Sala-Cunill A, Guilarte M, Cardona V. Phenotypes, endotypes and biomarkers in anaphylaxis: current insights. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2018;18(5):370–6.
50. Jackson CW, Pratt CM, Rupprecht CP, Pattanaik D, Krishnaswamy G. Mastocytosis and mast cell activation disorders: clearing the air. Int J Mol Sci. 2021;22(20).
51. Valent P, Akin C, Metcalfe DD. Mastocytosis: 2016 updated WHO classification and novel emerging treatment concepts. Blood. 2017;129(11):1420–7.
52. Payne V, Kam PCA. Mast cell tryptase: a review of its physiology and clinical significance. Anaesthesia. 2004;59(7):695–703.
53. 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.
54.• Passia E, Jandus P. Using baseline and peak serum tryptase levels to diagnose anaphylaxis: a review. Clin Rev Allergy Immunol. 2020;58(3):366–76.
This paper is a revision of all the data on the usefulness of measuring tryptase during anaphylaxis and at baseline.

55. Valent P, Akin C, Arock M, Brockow K, Butterfield JH, Carter MC, et al. Definitions, criteria and global classification of mast cell disorders with special reference to mast cell activation syndromes: a consensus proposal. Int Arch Allergy Immunol. 2012;157(3):215–25.
56. Sala-Cunill A, Cardona V, Labrador-Horrillo M, Luengo O, Esteso 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.
57. Dua S, Dowey J, Foley L, Islam S, King Y, Ewan P, et al. Diagnostic value of tryptase in food allergic reactions: a prospective study of 160 adult peanut challenges. J Allergy Clin Immunol Pract. 6(5):1692–1698.e1.
58. Wongkaewpothong P, Pacharn P, Sripramong C, Boonchoo S, Piboonpocanun S, Visitsunthorn N, et al. The utility of serum tryptase in the diagnosis of food-induced anaphylaxis. Allergy Asthma Immunol Res. 2014;6(4):304–9.
59. Zhou X, Whitworth HS, M. EK, Brown TA, Goswami R, Eren E, et al. Mast cell chymase: a useful serum marker in anaphylaxis. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2011 Feb;127(2):AB143–AB143.
60. Atiakshin D, Kostin A, Trotsenko I, Samoilova V, Buchwalow I, Tiemann M. Carboxypeptidase A3—a key component of the protease phenotype of mast cells. Cells. 2022;11(3):570.
61. Caughey GH, Wilson TM, Carter MC, Metcalfe DD, Raymond WW, Su S, et al. α2-Macroglobulin capture allows detection of mast cell chymase in serum and creates a circulating reservoir of angiotensin II-generating activity. J Immunol. 2009;182:5770–7.
62. Nishio H, Takai S, Miyazaki M, Horiuchi H, Osawa M, Uemura K, et al. Usefulness of serum mast cell-specific chymase levels for postmortem diagnosis of anaphylaxis. Int J Legal Med. 2005;119(6):331–4.
63. Hellman L, Akula S, Fu Z, Wernersson S. Mast cell and basophil granule proteases - in vivo targets and function. Front Immunol. 2022;13:918305.
64. Zhou X, Buckley MG, Lau LC, Summers C, Pumphrey RSH, Walls AF. Mast cell carboxypeptidase as a new clinical marker for anaphylaxis. J Allergy Clin Immunol. 2006;117(2):S85.
65. Beck SC, Wilding T, Buka RJ, Baretto RL, Huissoon AP, Krishna MT. Biomarkers in human anaphylaxis: a critical appraisal of current evidence and perspectives. Front Immunol. 2019;5(10):494.
66. Mochizuki A, McEuen AR, Buckley MG, Walls AF. The release of basogranulin in response to IgE-dependent and IgE-independent stimuli: validity of basogranulin measurement as an indicator of basophil activation. J Allergy Clin Immunol. 2003;112(1):102–8.
67. Weidmann H, Heikaus L, Long AT, Naudin C, Schlüter H, Renné T. 2017 The plasma contact system, a protease cascade at the nexus of inflammation, coagulation and immunity. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 1864;1864(11 Pt B):2118–27.
68. Wolters PJ, Pham CT, Muilenburg DJ, Ley TJ, Caughey GH. Dipeptidyl peptidase I is essential for activation of mast cell chymases, but not tryptases, in mice. J Biol Chem. 2001;276(21):18551–6.
69. Caughey GH. Mast cell proteases as pharmacological targets. Eur J Pharmacol. 2016;5(778):44–55.
70. Cyr M, Lepage Y, Blais C, Gervais N, Cugno M, Rouleau JL, et al. Bradykinin and des-Arg(9)-bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001;281(1):H275–83.
71. Cicardi M, Zuraw BL. Angioedema due to bradykinin dysregulation. J Allergy Clin Immunol Pract. 2018;6(4):1132–41.
72. Raithel M, Zopf Y, Kimpel S, Naegel A, Molderings GJ, Buchwald F, et al. The measurement of leukotrienes in urine as diagnostic option in systemic mastocytosis. J Physiol Pharmacol. 2011;62(4):469–72.
73. Morel DR, Skoskiewicz M, Robinson DR, Bloch KJ, Hoaglin DC, Zapol WM. Leukotrienes, thromboxane A2, and prostaglandins during systemic anaphylaxis in sheep. Am J Physiol-Heart Circ Physiol. 1991;261(3):H782–92.
74. Schulman ES, Newball HH, Demers LM, Fitzpatrick FA, Adkinson NF. Anaphylactic release of thromboxane A2, prostaglandin D2, and prostacyclin from human lung parenchyma. Am Rev Respir Dis. 1981;124(4):402–6.
75. Idborg H, Pawelzik SC. Prostanoid metabolites as biomarkers in human disease. Metabolites. 2022;12(8):721.
76. Nassiri M, Eckermann O, Babina M, Edenharter G, Worm M. Serum levels of 9α,11β-PGF2 and cysteinyl leukotrienes are useful biomarkers of anaphylaxis. J Allergy Clin Immunol. 2016;137(1):312-314.e7.
77. Upton JEM, Hoang JA, Leon-Ponte M, Finkelstein Y, Du YJ, Adeli K, et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase is a biomarker of severe anaphylaxis in children. Allergy. 2022 Apr 9.
78. Vadas P, Gold M, Perelman B, Liss GM, Lack G, Blyth T, et al. Platelet-activating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis. N Engl J Med. 2008;358(1):28–35.
79. Vadas P, Perelman B, Liss G. Platelet-activating factor, histamine, and tryptase levels in human anaphylaxis. J Allergy Clin Immunol. 2013;131(1):144–9.
80. Klos A, Tenner AJ, Johswich KO, Ager RR, Reis ES, Köhl J. The role of the anaphylatoxins in health and disease. Mol Immunol. 2009;46(14):2753–66.
81. Murakami Y, Imamichi T, Nagasawa S. Characterization of C3a anaphylatoxin receptor on guinea-pig macrophages. Immunology. 1993;79(4):633–8.
82. Elsner J, Oppermann M, Czech W, Dobos G, Schöpf E, Norgauer J, et al. C3a activates reactive oxygen radical species production and intracellular calcium transients in human eosinophils. Eur J Immunol. 1994;24(3):518–22.

83. Nguyen SMT, Rupprecht CP, Haque A, Pattanaik D, Yusin J, Krishnaswamy G. Mechanisms governing anaphylaxis: Inflammatory cells, mediators, endothelial gap junctions and beyond. Int J Mol Sci. 2021;22(15):7785.
84. Zhang S, Anderson DF, Bradding P, Coward WR, Baddeley SM, MacLeod JDA, et al. Human mast cells express stem cell factor. J Pathol. 1998;186(1):59–66.
85. Ptaschinski C, Rasky AJ, Fonseca W, Lukacs NW. Stem cell factor neutralization protects from severe anaphylaxis in a murine model of food allergy. Front Immunol [Internet]. 2021;12:604192.
86. Berra-Romani R, Faris P, Pellavio G, Orgiu M, Negri S, Forcaia G, et al. Histamine induces intracellular Ca^{2+} oscillations and nitric oxide release in endothelial cells from brain microvascular circulation. J Cell Physiol. 2020;235(2):1515–30.
87. Stone SF, Cotterell C, Isbister GK, Holdgate A, Brown SGA. Elevated serum cytokines during human anaphylaxis: identification of potential mediators of acute allergic reactions. J Allergy Clin Immunol. 2009;124(4):786-792.e4.
88. Brown SGA, Stone SF, Fatovich DM, Burrows SA, Holdgate A, Celenza A, et al. Anaphylaxis: clinical patterns, mediator release, and severity. J Allergy Clin Immunol. 2013;132(5):1141-1149.e5.
89. Kang S, Tanaka T, Inoue H, Ono C, Hashimoto S, Kioi Y, et al. IL-6 trans-signaling induces plasminogen activator inhibitor-1 from vascular endothelial cells in cytokine release syndrome. Proc Natl Acad Sci. 2020;117(36):22351–6.
90. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1β secretion. Cytokine Growth Factor Rev. 2011;22(4):189–95.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable
law