



FACULTADE DE MEDICINA E ODONTOLOXÍA

TRABALLO DE FIN DE GRADO EN MEDICINA CON NIVEL DE

MÁSTER

Título:

Capacidad de activación de basófilos del veneno de *Vespa velutina nigrithorax* y sus alérgenos nVesp v 1 y nVesp v 5 en pacientes alérgicos a este himenóptero.

Autor: Laura Piñeiro Franco

Tutora: Carmen Vidal Pan

Co-Tutor: Jose Gómez Rial

Departamento: Departamento de Psiquiatría, Radiología, Salud Pública, Enfermería y Medicina

Curso académico: 2020-2021

Convocatoria: 22 de junio de 2021



Doña Carmen Vidal Pan, Doctora en Medicina y Cirugía, Jefe de Servicio de Alergología de la EOXI de Santiago de Compostela y Profesora Titular en el Departamento de Psiquiatría, Radiología, Salud Pública, Enfermería y Medicina. Área de conocimiento de Medicina. Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela.

Don Jose Gómez Rial. Doctor en Biología. Facultativo Especialista de Área de Inmunología en el Laboratorio Central del Hospital Clínico de la EOXI de Santiago de Compostela.

HACEN CONSTAR que la memoria del trabajo Fin de Grado-Máster, titulado “Capacidad de activación de basófilos del veneno de *Vespa velutina nigrithorax* y sus alérgenos nVesp v 1 y nVesp v 5 en pacientes alérgicos a este himenóptero” presentado por Doña Laura Piñeiro Franco ha sido realizado en el área de conocimiento de Medicina, Departamento de Psiquiatría, Radiología, Salud Pública, Enfermería y Medicina bajo su dirección y cumple los requisitos legales para su presentación y defensa para aspirar a la titulación de Grado Máster en Medicina.

Lo que firmamos a efectos oportunos en Santiago de Compostela a 18 de mayo de 2021.

Carmen Vidal Pan



Jose Gómez Rial

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas y terminología empleada	5
Resumen	6
Resumo	7
Abstract	8
1. Introducción 1.1. La <i>Vespa velutina nigrithorax</i> y su importancia en nuestro medio 1.2. Problemas de salud en el hombre por picadura de <i>Vespa velutina nigrithorax</i> 1.2.2 Reacciones por toxicidad 1.2.2 Reacciones por hipersensibilidad o alergia 1.3. Reconocimiento de IgE específica a <i>Vespa velutina nigrithorax</i> 1.4. La prueba de activación de basófilos como método diagnóstico complementario de alergia	9
2. Objetivos 2.1 Objetivos secundarios	17
3. Pacientes, material y métodos 3.1. Tipo de estudio 3.2. Ámbito de estudio 3.3. Selección de pacientes 3.4. Periodo de estudio 3.5. Determinaciones 3.6. Análisis de los datos 3.7. Aspectos éticos	17
4. Resultados 4.1 Análisis de las variables epidemiológicas. 4.2 Activación de basófilos. 4.2.1 Activación frente a controles 4.2.2 Activación frente a veneno de <i>Vespa velutina nigrithorax</i> 4.2.3 Activación frente a nVesp v 1 4.2.4 Activación frente a nVesp v 5 4.2.5 Relación de la activación con los niveles de IgE específica	24
5. Discusión	28
6. Conclusiones	30
7. Bibliografía	31
8. Agradecimientos	33
9. Participación del alumno en el presente estudio	33
10. Anexo I: Autorización del comité ético de Galicia	34

Relación de abreviaturas y terminología específica del presente Trabajo de Fin de Grado (TFG)

CCD: Carbohidratos con reactividad cruzada (del inglés Cross-reactive Carbohydrate Determinants)

sIgE: IgE específica

PLA2: Fosfolipasa A2.

PAB: Prueba de activación de basófilos.

BasoStep Kit® : Técnica *in vitro* de activación de basófilos utilizada en el presente estudio para medir la activación de basófilos.

fMLP: N-formilmetionil-leucil-fenilalanina. Péptido bacteriano que puede ser usado como control positivo en la PAB.

PBS: Suero salino con tampón fosfato.

CRD: Cuaderno de Recogida de Datos.

nVesp v 1: componente molecular del veneno de *Vespa velutina nigrithorax* obtenido de su fuente natural (n) correspondiente a la fosfolipasa A1.

nVesp v 5: componente molecular del veneno de *Vespa velutina nigrithorax* obtenido de su fuente natural (n) correspondiente al antígeno 5.

Resumen

Introducción: La alergia al veneno de la avispa asiática (*Vespa velutina nigrithorax*) se ha convertido en la causa más frecuente de anafilaxia frente al veneno de los himenópteros en nuestra área. No existe ninguna prueba diagnóstica rutinaria que permita estudiar la actividad biológica de este veneno en los sujetos sensibilizados.

Objetivos: El objetivo principal del presente estudio fue el de comprobar si los basófilos de los pacientes con antecedente clínico de anafilaxia tras la picadura de *Vespa velutina nigrithorax* y con IgE específica positiva frente a dicho veneno, se activan al exponerse al veneno de este insecto y a sus principales componentes moleculares.

Pacientes y métodos: Se incluyó a un total de 7 pacientes con antecedente clínico de anafilaxia tras picadura de *Vespa velutina nigrithorax* y con IgE positiva frente a este veneno que acudieron al Servicio de Alergología de la EOXI de Santiago de Compostela entre septiembre y diciembre de 2020. La prueba de activación de basófilos empleada fue el BasoStep Kit[®]. Se utilizaron cuatro concentraciones distintas de veneno completo de *Vespa velutina nigrithorax* y de sus componentes moleculares Vesp v 1 y Vesp v 5. La prueba se consideró positiva cuando, al menos, el 15% de los basófilos expresaron CD63 en su superficie.

Resultados: Cinco pacientes presentaron una prueba positiva frente al veneno completo de *Vespa velutina nigrithorax*. La concentración mínima necesaria para conseguir esa activación fue de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Con concentraciones superiores se observó, en algún caso, saturación de la respuesta de los basófilos. En relación a Vesp v 1 y Vesp v 5 se utilizaron dos rangos diferentes de concentración tras analizar los primeros 4 pacientes. Para Vesp v 1, cinco pacientes tienen resultados positivos frente a seis que se activan con Vesp v 5. Uno de los pacientes que no presentaron activación con el veneno completo, sí reaccionó ante sus dos componentes moleculares.

Conclusiones: La mayoría de los pacientes estudiados (6/7) presentaron, al menos, una prueba de activación positiva frente al veneno completo o sus componentes moleculares por lo que se puede concluir que el BasoStep Kit[®] es una prueba útil para confirmar la capacidad de activación de basófilos en los pacientes con antecedente de anafilaxia e IgE positiva frente al veneno de *Vespa velutina nigrithorax*.

Palabras clave: *Vespa velutina nigrithorax*; IgE; Vesp v 1; Vesp v 5; Anafilaxia; Basófilos; CD63

Resumo

Introdución: A alerxia ao veneno da avéspera asiática (*Vespa velutina nigrithorax*) converteuse na causa máis frecuente de anafilaxe fronte ao veneno dos himenópteros na nosa área. Non existe ningunha proba diagnóstica de rutina que permita estudar a actividade biolóxica deste veneno nos suxeitos sensibilizados.

Obxectivos: O obxectivo principal do presente estudio foi o de comprobar se os basófilos dos pacientes con antecedentes clínicos de anafilaxe tras a picadura de *Vespa velutina nigrithorax* e con IgE específica fronte a dito veneno, actívense ao expoñerse ao veneno deste insecto e aos seus principais compoñentes moleculares.

Pacientes e métodos: Incluíronse un total de 7 pacientes con antecedentes clínicos de anafilaxe tras a picadura de *Vespa velutina nigrithorax* e con IgE positiva fronte a este veneno que acudiron ao Servizo de Alergolóxía da EOXI De Santiago de Compostela entre setembro e decembro de 2020. A proba de activación de basófilos utilizada foi o BasoStep Kit[®]. Utilizáronse catro concentracións distintas de veneno completo de *Vespa velutina nigrithorax* e dos seus compoñentes moleculares Vesp v 1 y Vesp v 5. A proba considerouse positiva cando, polo menos, o 15% dos basófilos expresaron o CD63 na súa superficie.

Resultados: Cinco pacientes presentaron unha proba positiva fronte ao veneno completo de *Vespa velutina nigrithorax*. A concentración mínima necesaria para conseguir dita activación foi de 1 μg /mL. Con concentracións superiores observouse, nalgún caso, saturación da resposta dos basófilos. En relación a Vesp v 1 e Vesp v 5 utilizáronse rangos diferentes de concentración tras analizar aos catro primeiros pacientes. Para Vesp v 1, cinco pacientes teñen resultados positivos fronte a 6 que se activan fronte a Vesp v 5. Un dos pacientes que non presentou activación co veneno completo, si que o fixo fronte aos dous compoñentes moleculares.

Conclusións: A maioría dos pacientes estudados (6/7) presentaron, polo menos, unha proba de activación positiva fronte ao veneno completo ou ao seus compoñentes moleculares polo que se pode concluír que BasoStep Kit[®] é unha proba útil para confirmar a capacidade de activación de basófilos nos pacientes con antecedentes de anafilaxe e IgE positiva fronte ao veneno de *Vespa velutina nigrithorax*.

Palabras chave: *Vespa velutina nigrithorax*; IgE; Vesp v 1; Vesp v 5; Anafilaxe; Basófilos; CD63.

Abstract

Introduction: The allergy to the venom of the Asian wasp (*Vespa velutina nigrithorax*) has become the most frequent cause of anaphylaxis to the venoms of the hymenoptera of our region. There are no routine diagnostic tests that support the biological activity of this venom in sensitized subjects.

Aim of the study: The main objective of the present study was to compare if the basophils of patients with a clinical precedent of anaphylaxis to the bite of the *Vespa velutina nigrithorax* and with specific positive IgE to said venom, are activated on exposure to the venom of this insect and to its main molecular components.

Patients and methods: A total of 7 patients with a clinical precedent of anaphylaxis after being bitten by the *Vespa velutina nigrithorax* and with a positive IgE against said venom who went to the Allergology Services of the EOXI in Santiago de Compostela between September and December of 2020 were included. The activation test used was the BasoStep kit®. A total of Four different concentrations of the complete venom of the *Vespa velutina nigrithorax* and its molecular components Vesp v 1 and Vesp v 5 were used. The test was considered positive when, at least, 15% of the basophils expressed CD63 in their surface.

Results: Five patients presented a positive test result to the complete venom of the *Vespa velutina nigrithorax*. The minimum necessary concentration to achieve this activation was 1/mL. With superior concentrations, in some cases, a saturation of the basophils response could be observed. In relation to the Vesp v 1 and Vesp v 5 two different ranges of concentration were used after analyzing the first 4 patients. To Vesp v 1, five patients had positive results versus 6 which activated with Vesp v 5. One of the patients that didn't present activation with the complete venom, presented reaction to the two molecular components.

Conclusions: The majority of the studied patients (6/7) presented, at least, one positive activation test to the complete venom or its molecular components, by which result we can conclude that the BasoStep kit® is a useful test to confirm the capacity of the basophils activation in patients with a precedent of anaphylaxis and a positive IgE to the venom of the *Vespa velutina nigrithorax*.

Key words: *Vespa velutina nigrithorax*; IgE; Vesp v 1; Vesp v 5; Anaphylaxis; Basophils; CD63.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La *Vespa velutina nigrithorax* y su importancia en nuestro medio

La *Vespa velutina nigrithorax*, más conocida como la avispa asiática, es una especie foránea causante de importantes problemas de biodiversidad y salud en nuestro medio. Se han identificado hasta 12 subespecies de *Vespa velutina* en función de su diferente pigmentación de tórax y abdomen (1, 2). En concreto, la *Vespa velutina nigrithorax* se caracteriza, como su nombre indica, por una coloración negra dominante en su tórax. En la Figura 1 se presenta una imagen de *Vespa velutina nigrithorax* (Imágenes cedidas por Don Antonio Martínez Pernas).

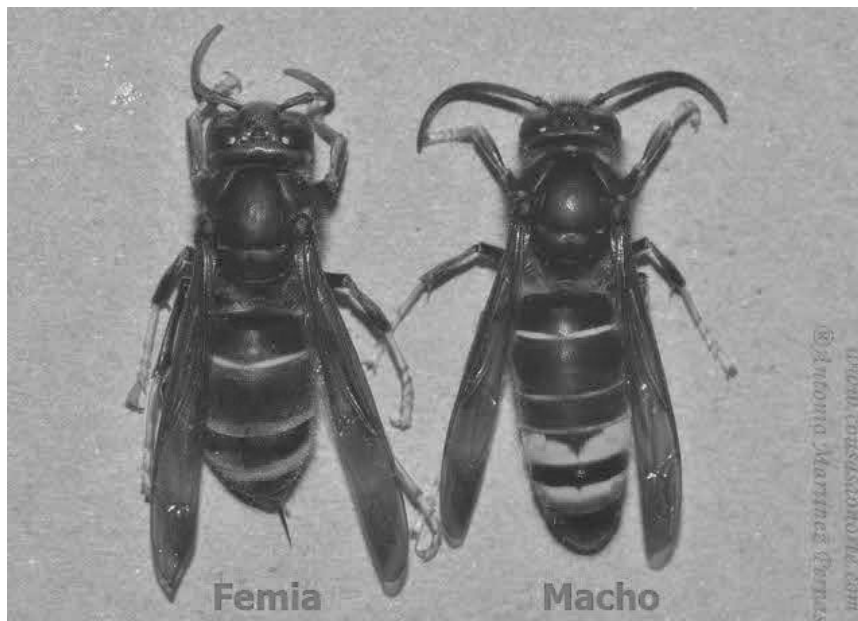


Figura 1. Imagen de sendos ejemplares (macho y hembra) de *Vespa velutina nigrithorax* (imágenes cedidas por Don Antonio Martínez Pernas)

Los primeros datos de la presencia de *Vespa velutina nigrithorax* en Europa corresponden a Francia, a donde llegó en el año 2004 (3); alcanzando el País Vasco al año siguiente (4). No se sabe con exactitud en qué momento llegó a Galicia esta especie invasora, pero desde el año 2013 (1,2,5) existen registros de los nidos de este insecto, observándose desde ese momento un incremento exponencial, tanto en el número de individuos identificados, como en el número de nidos retirados. Ya en el año 2011 Villemant y cols (XX) (1) realizaron una estimación de la extensión geográfica de la *Vespa velutina nigrithorax*, sugiriendo una fácil adaptación por las condiciones climatológicas favorables para su expansión (6). En la Figura 2 se puede ver la extensión reconocida de *Vespa velutina nigrithorax* en el año 2018. Respecto a la extensión en Galicia, en la Figura 3 se representa el número de nidos detectados en 2019 y hasta 2020. En el último año se detecta un número inferior de avisos, probablemente debido al confinamiento y las limitaciones de movimiento derivadas de la pandemia por coronavirus Sars-Cov 2.

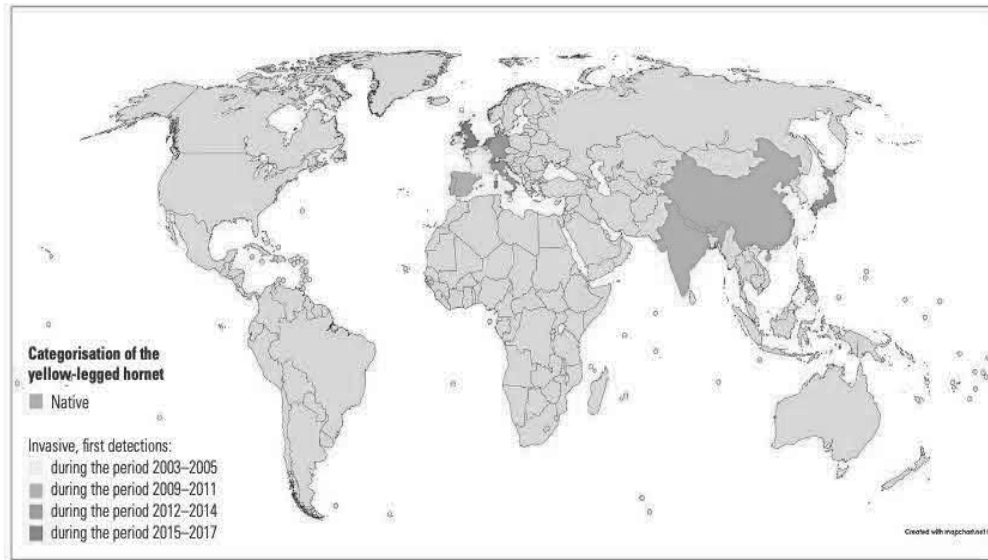


Figura 2. Distribución de *Vespa velutina nigrithorax* en 2018. L. Espinosa, S. Franco, M.P. Chauzat. Could *Vespa velutina nigrithorax* be included in the World Organisation for Animal Health list of diseases, infections and infestations?. *Rev Sci Tech* (2019); 38: 651-862(7).

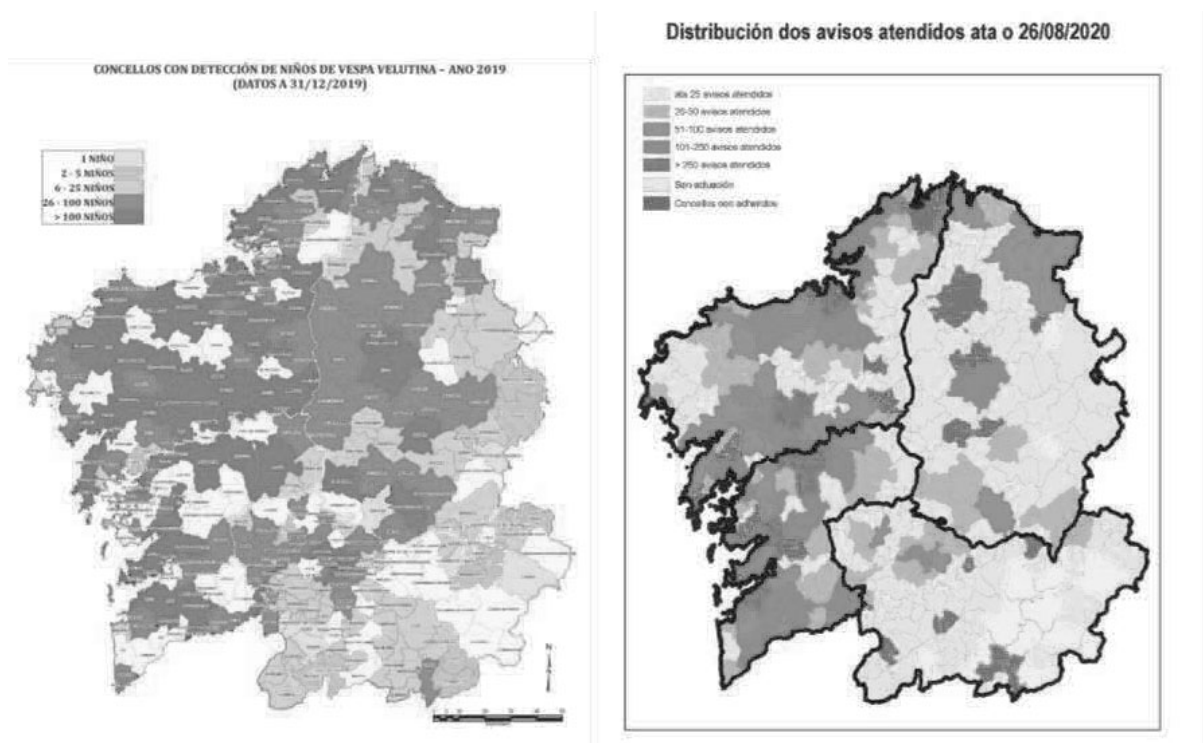


Figura 3. Distribución de los ayuntamientos en Galicia en los que se han detectado nidos de *Vespa velutina nigrithorax* en 2019 y hasta agosto de 2020. Fuente: Consellería de Medio Ambiente, Xunta de Galicia.

La *Vespa velutina nigrithorax* forma unos nidos característicos que son fácilmente identificables por su gran tamaño y su estructura, ya que cuentan con una apertura inferior. En un principio, se forma un nido primario sobre el que más tarde se construye el nido secundario, que albergará a miles de ejemplares de la especie. Si bien lo habitual es que se sitúen en altura, por ejemplo, en las copas de los árboles, cada vez son más los nidos que se reconocen en el suelo. En la Figura 4 se representa uno de estos nidos.

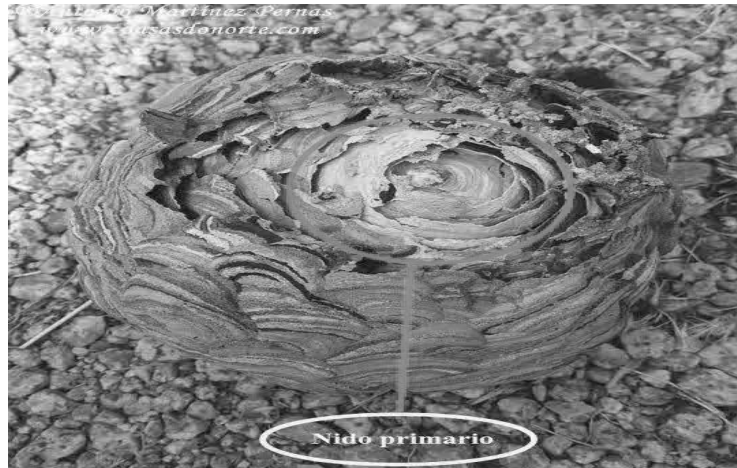


Figura 4. Fotografía original de un nido secundario con su nido primario central (imágenes cedidas por Don Antonio Martínez Pernas)

Al tratarse de una especie invasora, acarrea múltiples perjuicios para el ecosistema (5). Uno de los problemas principales que ocasiona es la desaparición de las abejas autóctonas, frente a las que actúan como depredadoras, pues constituyen el alimento para sus larvas (Figura 5).

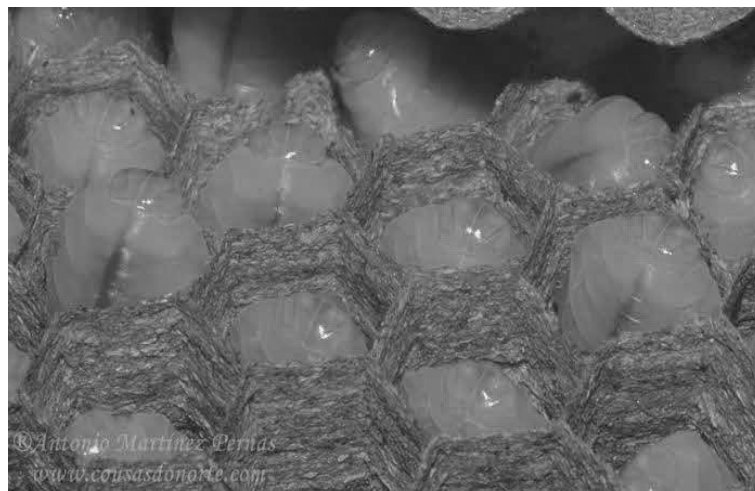


Figura 5. Fotografía original de larvas de *Vespa velutina nigrithorax* (imágenes cedidas por Don Antonio Martínez Pernas).

1.2 Problemas de salud en el hombre por picadura de *Vespa velutina nigrithorax*

1.2.1 Reacciones por toxicidad

Además del daño medioambiental, la *Vespa velutina nigrithorax* supone un riesgo potencial para la salud de las personas. De hecho, las reacciones por toxicidad ocasionadas por la picadura de este himenóptero pueden llegar a causar la muerte. Las principales toxinas identificadas tienen efecto nefrotóxico, cardiotoxico, neurotóxico, hepatotóxico, hemolítico, miotóxico y vasodilatador, pudiendo llevar a fallo multiorgánico y, consecuentemente, a la muerte (8). Se conocen 8 familias de toxinas. Las más importantes son las que producen alteraciones hemostáticas y las neurotoxinas. Podemos ver la interacción de las principales toxinas y sus efectos en la Figura 6.

La alteración hemostática puede cursar con efecto hemorrágico y hemolítico, empeorando la nefrotoxicidad por hipovolemia, o bien con efecto procoagulante, pudiendo provocar una CID y con ello la muerte. Las principales toxinas causantes de hemorragia son: las metaloproteasas; la PLA2 (ambas producen también daños en los tejidos); y la VEGF-tx (9), que además aumenta la permeabilidad vascular, estimulando el crecimiento de las glándulas productoras de veneno y facilitando su diseminación (8). La PLA-2 y la VEGF-tx también están relacionadas de manera indirecta con las reacciones alérgicas, como puede apreciarse en la Figura 6.

Por otra parte, tienen gran importancia las neurotoxinas, que pueden actuar por tres mecanismos diferentes: en primer lugar, a través de los canales de calcio y potasio, produciendo hemólisis y alteraciones en la coagulación (10); en segundo lugar, alterando el potencial de membrana presináptico para causar degeneración neuronal (11); o por último, a través de la acetilcolinesterasa, que permite paralizar a la presa (8,12). La transcripción génica varía tras inyectar veneno, aumentando la expresión de determinados genes que intervienen en la formación de esta ponzoña para reponer los depósitos, de modo que puede poder volver a picar y producir todas estas reacciones (13).

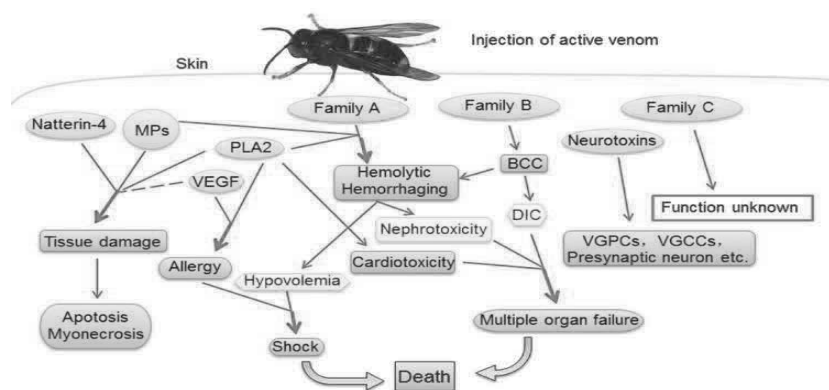


Figura 6: Toxinas de *Vespa velutina nigrithorax* y sus efectos multiorgánicos. Liu Z, Chen S, Zhou Y, Xie C, Zhu B, Zhu H, et al. Deciphering the venom transcriptome of killer-wasp *Vespa velutina*. Sci Rep. 2015;5. (8)

1.2.2 Reacciones por hipersensibilidad o alergia

Además de reacciones por toxicidad, los componentes del veneno de *Vespa velutina nigrithorax*, al igual que los de otros himenópteros, pueden provocar reacciones de hipersensibilidad o alergia, dado que son en su mayoría proteínas o glicoproteínas de alto peso molecular y, por tanto, con gran capacidad sensibilizante (1,5).

Para que un sujeto presente una reacción alérgica al contactar con el veneno de un himenóptero es necesario que exista un contacto previo sin reacción. En ese primer contacto se produce la desviación inmunológica hacia la reacción alérgica con la formación de los correspondientes anticuerpos de tipo IgE. Una vez que el sujeto tiene esos anticuerpos específicos, frente a uno o varios de los componentes del veneno, si vuelve a sufrir una nueva picadura, tendrá riesgo de desarrollar la reacción alérgica. En función de su gravedad, estas reacciones se clasifican en:

- *Reacciones locales normales*, en el punto de la picadura. Se considera normal cualquier reacción que produzca una inflamación local que sea menor de 10 cm de diámetro y no se extienda más allá de dos articulaciones. Este tipo de reacciones no se consideran clínicamente relevantes (5).
- *Reacción local aumentada*, aquella que alcanza o supera un diámetro de 10 cm o se extiende más allá de dos articulaciones. Estas reacciones suelen indicar presencia de IgE específica pero no se asocian a un riesgo mayor de reacción sistémica, por lo que no precisan de tratamiento específico (5).
- *Reacción sistémica*, aquella que se presenta más allá del punto de inyección del veneno. Puede presentar diversa gravedad en función del número de órganos que se encuentre afectado, abarcando desde alteraciones leves que tan solo afectan a la piel (normalmente en forma de eritema o urticaria), hasta reacciones verdaderamente graves que pueden tener consecuencias fatales (5). Están mediadas por IgE específica y el riesgo de volver a presentar una reacción sistémica es alto, alrededor del 60%). Las reacciones sistémicas se pueden clasificar de varias formas si bien, en el presente TFG, se seguirá la clasificación de Brown (Tabla 1)(14).
- *Reacción sistémica tóxica*, cuando la reacción se produce por múltiples picaduras (se considera múltiple la picadura de alrededor de 50 ejemplares) (5). En estos casos puede desembocar en una reacción tóxica como la indicada en el apartado anterior, que provoca la muerte por fallo multiorgánico.

Tabla 1: Clasificación de Brown de anafilaxia. *Brown SG. Clinical features and severity grading of anaphylaxis. J Allergy Clin Immunol 2004; 114:371-6(14).*

LEVE	Sólo afectación de piel y tejidos subcutáneo.	Manifestado por eritema generalizado (flushing), urticaria, edema periorbitario o angioedema.
MODERADA	Afectación respiratoria, cardiovascular o gastrointestinal.	Manifestado por disnea, estridor, náuseas, vómitos, mareo (presíncope), diaforesis, opresión torácica, ocupación de garganta o dolor abdominal
GRAVE	Hipoxia, hipotensión o compromiso neurológico.	Manifestado por cianosis o/y SatO2 igual o < 92%, hipotensión (sistólica <90mmHg), obnubilación, colapso y deterioro neurológico.

1.3 Reconocimiento de IgE específica en el paciente alérgico a *Vespa velutina nigrithorax*

Para identificar a un paciente alérgico se pueden emplear distintos métodos *in vivo* e *in vitro*. Entre las pruebas *in vivo* destaca la prueba cutánea mediante la cual se pretende identificar la presencia de IgE específica en los mastocitos de la piel. Estas pruebas cutáneas se pueden hacer mediante la técnica del *prick* o intraepidérmica, o bien con la prueba intradérmica. Para el caso de la alergia al veneno de los himenópteros, las pruebas intraepidérmicas tienen una baja rentabilidad diagnóstica debido a su baja sensibilidad, siendo preciso recurrir a las pruebas en intradermo.

Entre las pruebas *in vitro*, el método más empleado para la identificación de IgE específica es el llamado ImmunoCAP (Thermofisher scientific). Se trata de un fluoroenzimo-inmuno ensayo, cualitativo y cuantitativo, destinado a identificar la presencia de IgE específica frente al alérgeno que se encuentra unido a una esponja de celulosa (fase sólida); al ponerse en contacto con el suero del paciente con IgE, se desencadena una reacción positiva claramente identificable y cuantificable.

En el momento de realizar este estudio, se dispuso de los primeros ImmunoCAPS frente al veneno completo de *Vespa velutina nigrithorax*. Sus componentes moleculares no están disponibles comercialmente. En un estudio previo realizado por el grupo del Servicio de Alergología del CHUS, se había comprobado que los pacientes con alergia a *Vespa velutina nigrithorax* presentan IgE específica positiva frente al veneno de estos: *Vespula spp* y *Apis mellifera* (5). En la Figura 7, se presenta la frecuencia de reconocimiento publicada por el grupo.

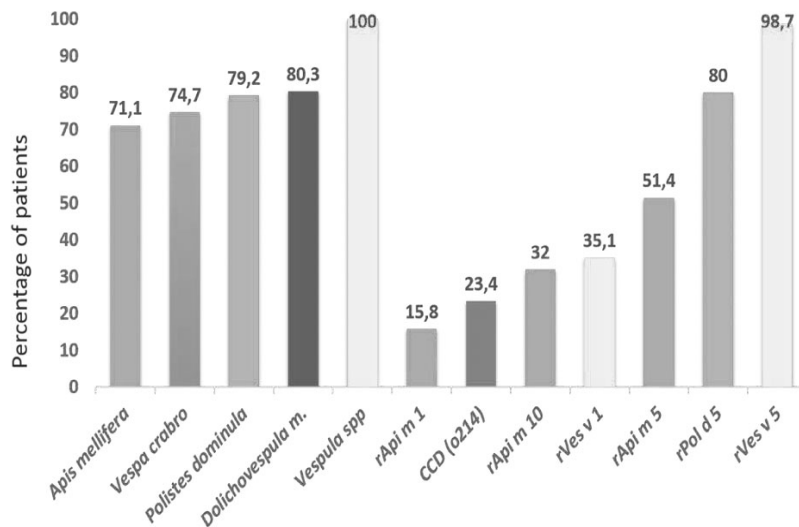


Figura 7: Porcentaje de pacientes con anafilaxia por *Vespa velutina nigrithorax* con IgE positiva (>0,35 kUA/L) a venenos de otros himenópteros (*Vespula spp* [n=76], *Polistes dominula* [n=77], *Apis mellifera* [n=76], *Vespa crabro* [n=75], and *Dolichovespula maculata*. [n=76] al lado izquierdo), y sus componentes moleculares (rApi m 1 [n=76], rApi m 5 [n=72], rApi m 10 [n=75], rVes v 1 [n=77], rVes v 5 [n=76], rPol d 5 [n=75], y o214 [MUXF, como un marcador CCD, n=77], al lado derecho). Cada veneno y su componente molecular están representados en el mismo color para facilitar la identificación. C. Vidal, M. Amisén, R. Monsalve et al. *Anaphylaxis to Vespa Velutina nigrithorax: pattern of sensitization for an emerging problem in Western countries. J Investig Allergol Clin Immunol* (2021); Vol. 31 (1,5).

En cualquier caso, mediante esta metodología se consigue únicamente identificar la existencia o no de IgE específica frente al veneno completo y a sus componentes moleculares, pero esto no indica necesariamente que el paciente vaya a reaccionar cuando se exponga al insecto.

La única prueba que permitiría comprobar de forma fehaciente el tipo de reacción sería una nueva exposición a la picadura del insecto. El problema de esta prueba, aparte del riesgo y la propia toxicidad del veneno, es que en condiciones experimentales, la llamada prueba de la repicadura no sirve como método diagnóstico; únicamente se utiliza como método de comprobación de una posible protección tras la vacunación específica (1,2).

1.4 La prueba de activación de basófilos como método diagnóstico complementario de alergia

Los basófilos son leucocitos poco abundantes (<1%) que responden a diferentes estímulos, entre los que cabe destacar la IgE. Tienen en su superficie receptores de alta afinidad y median reacciones de hipersensibilidad tipo I tras el entrecruzamiento de los complejos IgE-FcεRI (15) por antígenos multivalentes, entre los que se incluyen los alérgenos (16). Esto lleva a la activación del basófilo, con la consecuente degranulación y liberación de mediadores, tanto preformados como de nueva producción, entre los que destacan el IL4, IL13, TCD4 y la histamina, entre otros. Los superantígenos o la IL3 también tienen un papel en dicha

activación. De hecho, la IL3 está incluida en el buffer de estimulación de la prueba de activación de basófilos utilizado en el presente trabajo (16).

Aunque no se conoce muy bien la función de los basófilos, se sabe que activan células efectoras que llevan a manifestaciones clínicas visibles. Su activación se usa como marcador de sensibilización ante un antígeno/alérgeno, y por lo tanto en el diagnóstico de enfermedades como la alergia (16–18). La prueba de activación de basófilos (PAB) se presenta como una alternativa *in vitro* para el diagnóstico de las alergias, especialmente en aquellos casos en los que hacer una prueba *in vivo* ponga en peligro la vida del paciente, como es el caso de las picaduras de himenópteros, en el que la repicadura no puede ser utilizada (16). A diferencia de la *slgE*, la PAB presenta la ventaja de medir la respuesta efectora (no siempre concuerdan los resultados de la PAB y la *slgE*).

La degranulación de los basófilos puede producirse en dos tiempos: la degranulación inmediata, también llamada degranulación anafiláctica (DA); y la degranulación gradual (PMD) (16,19). En este trabajo se medirá la DA, que se trata de un proceso rápido y explosivo que se completa en cuestión de minutos tras la estimulación.

Existen determinados marcadores localizados en la membrana citoplasmática de los gránulos que en condiciones normales no se expresan, pero que pueden detectarse tras la fusión de la con la membrana plasmática en el proceso de (20,21). Estos marcadores son el CD63, también denominado LAMP-3, una glicoproteína asociada a lisosomas con cuatro dominios transmembrana y que se encuentra además de en los basófilos, en plaquetas, mastocitos, monocitos y macrófagos (22). Por otro lado, el CD203c, también denominada E-NPP3, ese trata de una proteína transmembrana tipo II con función de fosfatasa/fosfodiesterasa de nucleótidos (23). Aunque no se conoce por completo su función, se sabe que su expresión varía individualmente y aumenta con las exacerbaciones o el mal control de la enfermedad (24). Mientras que el CD63 representa mayoritariamente la degranulación anafiláctica, el CD203c se presenta en más formas de degranulación. Para picaduras de himenópteros, ambos marcadores pueden ser utilizados indistintamente, aunque el CD 203c presenta una sensibilidad ligeramente mayor (16,25).

Además, para reconocer ciertamente la activación de los basófilos es necesario diferenciar a estos del resto de células de la sangre (26). Para ello existen diferentes alternativas que dependen del kit comercial empleado. El alto coste y la falta de estandarización dificultan la implementación rutinaria de esta técnica. Esta selección debe ser cuidadosa, ya que influye en la eficacia diagnóstica de la prueba (27).

2. OBJETIVO

El objetivo principal del presente estudio es comprobar si los basófilos de los pacientes que han padecido una anafilaxia tras la picadura de *Vespa velutina nigrithorax*, se activan al volver a exponerse al veneno de este insecto y a sus principales componentes moleculares.

2.1 OBJETIVOS SECUNDARIOS

- a. Comprobar si existe relación entre el grado de activación y la gravedad de la reacción padecida.
- b. Comprobar si existe relación entre los niveles de IgE específica frente al veneno de *Vespa velutina nigrithorax* y el grado de activación de los basófilos.

3. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Tipo de estudio

Transversal. Resultado de la activación de basófilos antes del inicio de inmunoterapia específica y su relación con parámetros clínicos y de sensibilización alérgica, determinación única en una población definida.

3.2 Ámbito de estudio

Este estudio se realizó en el área sanitaria correspondiente a la *Estructura de Organización de Xestión Integrada* (EOXI) de Santiago de Compostela con una mayoría de la población que vive en el medio rural.

3.3 Selección de pacientes

Pacientes que acudieron al Servicio de Alergología de la EOXI de Santiago tras haber padecido una anafilaxia por la picadura de un ejemplar de *Vespa velutina nigrithorax*, en los que se confirma el patrón de sensibilización descrito previamente (IgE específica positiva a *Vespula spp*) (1). El estudio se realizará en una muestra pequeña de pacientes debido a la complejidad de la técnica. Las pruebas se efectúan antes del inicio de la inmunoterapia específica, a fin de evitar la interferencia que provocaría la vacunación en la activación de los basófilos.

3.4 Período de estudio

Inclusión de pacientes desde septiembre hasta diciembre de 2020.

3.5 Determinaciones

Se recogió la información en un cuaderno de recogida de datos de forma pseudonimizada, identificando a los pacientes mediante un código alfanumérico, sin datos personales. Además de las variables epidemiológicas de tipo edad, sexo y lugar de residencia, se incluyeron las siguientes variables :

- **Variables clínicas:** (a) escala de gravedad de la anafilaxia (Tabla 1); (b) tipo de reacción con las picaduras anteriores (local o reacción general); (c) administración de adrenalina necesaria para revertir el cuadro clínico; (d) enfermedades concomitantes (hipertensión arterial, enfermedad cardíaca previa, enfermedad pulmonar, diabetes); (e) tratamientos que emplee de forma habitual.
- **Determinación de IgE específica frente a los venenos de *Vespula spp*, *Ves v 1*, *Ves v 5* y *Vespa velutina nigrithorax*.** Estas determinaciones se realizaron mediante la plataforma InmunoCAP (Thermofsher Scientific), disponiendo comercialmente del veneno de *Vespula spp* y sus componentes moleculares; así como el veneno de *Vespa velutina nigrothotax* para uso de investigación.
- **Prueba de activación de basófilos.** Se empleará el BasoStep kit®, que puede apreciarse en la Figura 8. El análisis de las muestras se realizará por citometría de flujo en el Laboratorio de Inmunología del Servicio de Análisis Clínicos de la EOXI de Santiago de Compostela.



Figura 8. Productos del BasoStep kit®. Imagen propia.

Procesamiento de las muestras y metodología de la técnica del BasoStep®

Primer paso. Identificación de los basófilos del resto de células sanguíneas. En el BasoStep Kit® el basófilo es reconocido como CD123 + (proteína transmembrana que forma la cadena alfa de la IL 3 y confiere baja afinidad), HLADR- (para excluir a las células presentadoras de antígeno y monocitos que son también CD123+, pero a diferencia de los basófilos, HLADR+) (16,22,26,28). Además, el CD203c es más específico de los basófilos ya que solo se expresa en estos y en los mastocitos.

Controles positivo y negativo. El control negativo mide la activación basal, que sería óptima por debajo del 5% (16). Como control negativo se empleará el PBS (Phosphate-Buffered-Saline). El control positivo trata de medir la capacidad de los basófilos de responder a estímulos. En el BasoStep Kit® se utiliza el fMLP (N-formilmetionil-leucil-fenilalanina), que activa a los basófilos por la vía de las fosfolipasas C y las MAPK y no por IgE. Se estima que entre un 10 y un 15% de los individuos son no respondedores (16,22). En la Tabla 2 se muestran los reactivos propios del Basostep Kit®.

Tabla 2: Cuadro resumen de los reactivos utilizados en el BasoStep kit.

REACTIVOS BASOSTEP KIT®	
CONTROL POSITIVO	fMLP-antilgE: No siempre es de garantía.
CONTROL NEGATIVO	PBS: Suero salino buffer fosfato. Activación basal.
MARCADORES DE ACTIVACIÓN	CD63/CD203c
MARCADORES IDENTIFICACIÓN BASÓFILOS	CD123+/CD203+/HLADR-
REACTIVOS PROPIOS CON LOS QUE MEDIREMOS LA ACTIVIDAD	Vesp v1, Vesp v5, Veneno completo de <i>Vespa velutina nigrithorax</i>
BUFFER DE ESTIMULACIÓN	Calcio, heparina e IL3.

Etapas del procedimiento

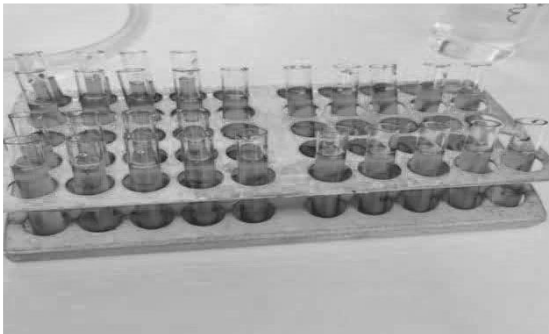
1. Los pacientes acuden al Servicio de Alergología en el Hospital de Conxo donde se realiza la extracción de la muestra de sangre en tubos con heparina litio. De forma inmediata, las muestras serán trasladadas al Laboratorio de Inmunología en el Hospital Clínico por la propia autora del presente TFG, manteniendo en todo momento la necesaria refrigeración (Figura 9). Para la realización de estas pruebas de activación de basófilos no se pueden emplear anticoagulantes como el EDTA, puesto que cesan la actividad coagulativa mediante el secuestro de Calcio, lo que conduciría a una menor activación celular.

2. Preparación de los tubos necesarios para cada paciente, debidamente rotulados con el *nº de paciente, control -, control+, extractos (Vespa velutina nigrithorax, nVesp v 1, nVesp v 5) y concentración.*
3. Elaboración de la solución madre de los extractos y sus diluciones.
4. En cada tubo, se pipetearán 100 mL de sangre del paciente y 100 mL de buffer de estimulación, excluyendo el control negativo (activación basal), que solo contendrá suero salino en formato PBS. Los líquidos se mezclarán con el Vórtex y se cubrirán con Parafilm®.
5. Las muestras se introducirán en baño María durante 20 minutos a 37°C.
6. Transcurrido ese tiempo, se añadirán 20 mL de un cóctel de anticuerpos monoclonales que irán marcados con diferentes fluorocromos. Estos anticuerpos serán los que señalen la presencia de los marcadores de activación de basófilos, además de distinguir a los basófilos de las otras células de la sangre (CD123, CD203c, CD63, HLADR). Se empleará de nuevo el Vórtex para mezclar, se fijará en frío con hielo (2-8°C) y cámara oscura durante 20 minutos. De esta manera, se consigue la fijación de los anticuerpos monoclonales. Todo el proceso se representa en la Figura 10.
7. Tras eliminar el hielo, se añadirán 4 mL de una solución hipotónica similar al agua, conocida como reactivo de lisis, que se utilizará para romper los hematíes (se estiman, aproximadamente, 1 basófilo por cada 1000 hematíes). Se deja reposar durante 10 minutos en oscuridad.
8. Para eliminar las células sobrantes se centrifugará durante 7 minutos a 1500 rpm.
9. A continuación, se decantará completamente el contenido de los tubos y se mezclará con el Vórtex. El material objeto de análisis se encontrará en el fondo del tubo.
10. Se añadirán 300µl de FACS Flow, solución similar al PBS con anticontaminante añadido.
11. Y, finalmente, se analizarán en el citómetro de flujo.



Figura 9: Las muestras de sangre en el laboratorio de Inmunología del CHUS tras ser extraídas a los pacientes, previamente a ser utilizadas en la PAB. *Imagen propia.*

Tubos utilizados en el procedimiento.



Pipetas diferentes en función del volumen que sea necesario instilar.



Vortex para mezclar.



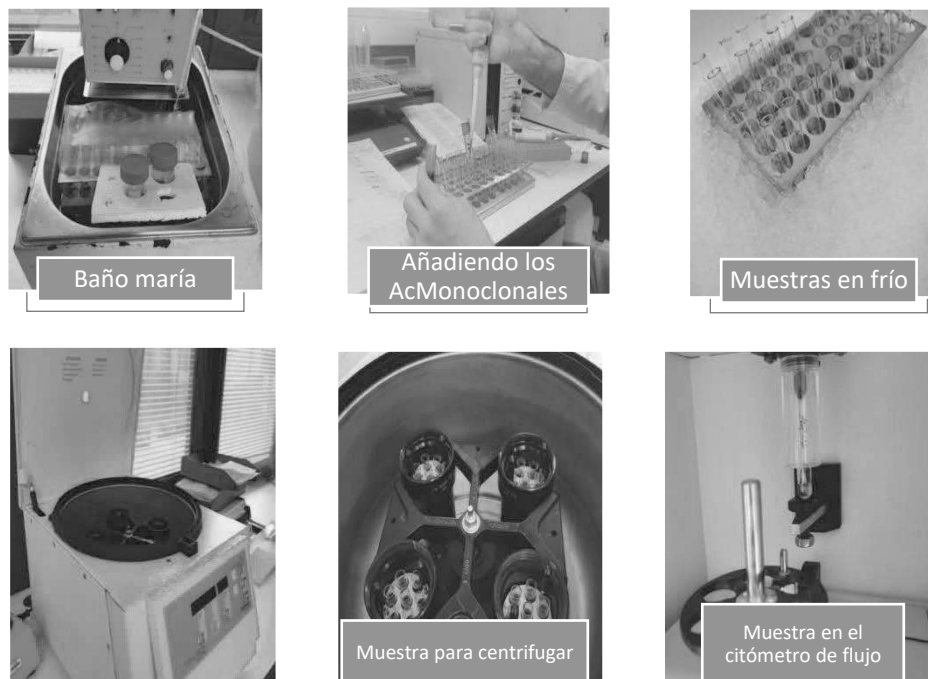


Figura 10: Imágenes del proceso en el laboratorio. *Elaboración propia.*

Reactividad y Sensibilidad

La reactividad se define como el porcentaje de basófilos que responden a un determinado estímulo. La sensibilidad, sin embargo, hace referencia a la mínima concentración de alérgeno necesaria para que respondan el 50% de los basófilos reactivos. Para determinar la sensibilidad, son necesarias lecturas de 6/8 concentraciones (16). El cálculo de la sensibilidad de vital importancia porque marcan la cantidad de dosis necesarias para obtener resultados concluyentes; en caso de utilizarse dosis demasiado altas, estas pueden superar el umbral de saturación de los basófilos, produciendo un efecto citotóxico y ocasionando falsos negativos. Asimismo, pueden tener lugar falsos positivos si las concentraciones son incorrectas, lo cual dificulta muchas veces que la PAB tenga validez en el caso de las picaduras de himenópteros. (22). Para alérgenos proteicos, como en este caso, dichos reactivos se diluyen a nenogramos y picogramos sin perder efectividad (16).

En la Tabla 3 podemos ver los diferentes puntos de concentración utilizados en este estudio. Las concentraciones serán distintas en función del tipo de alérgeno y del paciente, para evitar caer en el error de la incorrecta búsqueda de dosis. Los puntos de corte con más altos para el veneno completo porque presenta una concentración de 2g/l, frente a los extractos de nVesp v1 y nVesp v5 que presentan concentraciones de 0,33g/l y 0,24g/l, respectivamente.

Tabla 3: Puntos de concentración utilizados en algún punto del presente TFG para buscar aquellos que más se ajusten a la activación. VVN: *Vespa velutina nigrithorax*.

Veneno VVN	nVesp v1	nVesp v5
50 $\mu g/ml$	50 $\mu g/ml$	50 $\mu g/ml$
25 $\mu g/ml$	25 $\mu g/ml$	25 $\mu g/ml$
10 $\mu g/ml$	10 $\mu g/ml$	10 $\mu g/ml$
1 $\mu g/ml$	1 $\mu g/ml$	1 $\mu g/ml$
	10 $\eta g/ml$	10 $\eta g/ml$
	1 $\eta g/ml$	1 $\eta g/ml$
	0.1 $\eta g/ml$	10.1 $\eta g/ml$

3.6 Análisis de los datos

Dado el pequeño número de pacientes incluidos en el estudio, se ha realizado un análisis descriptivo de los resultados.

3.7 Aspectos éticos

El presente estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de Galicia (Sección Santiago-Lugo, Código: 2018-622 -Anexo I-).

El Proyecto se realizó respetando la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial de 1964 y la ratificación de las siguientes asambleas, la Orden SCO/256/2007, por la que se establecen los Principios y las directrices detalladas de Buena Práctica Clínica, el Convenio relativo a los derechos humanos y a la Biomedicina (Oviedo, 1997), la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica, la Ley 3/2018 de Protección de Datos de Carácter Personal y Derechos Digitales, la Ley 41/2002 (Básica Reguladora de la Autonomía del Paciente y de Derechos y Obligaciones en Materia de Información y Documentación Clínica), la Ley 3/2001 (Reguladora del Consentimiento Informado y de la Historia Clínica de los Pacientes), la Ley 3/2005 de modificación de la Ley 3/2001 y el Decreto 29/2009, por el que se regula el Acceso a la Historia Clínica Electrónica.

4. RESULTADOS

4.1 Análisis de variables epidemiológicas

El estudio cuenta con 7 pacientes a los que se le practicó la prueba de activación de basófilos con el BasoStep®. La distribución por sexos fue de 6 varones y una mujer, con una media de edad de 56 años (rango absoluto, 26-76 años), todos ellos residentes en el medio rural.

En la Tabla 4 pueden observarse todas las variables recogidas para cada uno de los pacientes:

- IgE total.
- Triptasa basal.
- IgE específica comercial frente a los venenos de *Vespula spp* y *Vespa velutina nigrithorax*.
- IgE específica frente a los componentes moleculares de *Vespula spp*, Ves v 1 y Ves v 5.

N	Edad	Sexo 1=varón	IgE total (UI/mL)	Triptasa basal	slgE <i>Véspula</i> (kU _A /L)	slgE Ves v 1 (kU _A /L)	slgE Ves v 5 (kU _A /L)	slgE <i>Vespa velutina nigrithorax</i> (kU _A /L)
#1	45	1	1102	3.2	4.7	2.9	0.5	4,0
#2	69	1	638	4.2	29.7	28.4	7.6	1,9
#3	56	1	24	6.1	4.1	0.0	6.1	0,7
#4	26	1	172	14.5	3.3	2.7	0.1	1,1
#5	74	0	343	3.8	18.8	0.1	18.7	3,4
#6	76	1	76	5.2	22.3	0.0	34.4	2,2
#7	48	1	356	4.8	16.7	19.5	1.2	4,0
<i>M_e</i> (rango)	56 (26-76)		343 (24-1102)	4.8 (3.2-14.5)	16.7 (3.35-29.7)	2.7 (0.0-28.4)	6.1 (0.1-34.4)	2.2 (0.7-4.0)

Tabla 4: Variables epidemiológicas y resultados de la cuantificación de IgE total, triptasa e IgE específica de los pacientes incluidos en el estudio.

4.2. Activación de basófilos

Se realizó el estudio con veneno completo de *Vespa velutina nigrithorax* y con los extractos de nVesp v 1 y nVesp v 5, facilitados de forma liofilizada por el Dr Rafael Monsalve, del laboratorio ALK, Madrid. El punto de corte se estableció en 15% de basófilos activados para considerar la prueba positiva.

4.2.1. Activación frente a controles

Todos los pacientes, excepto el paciente #1 respondieron correctamente a los controles, con diferencia clara entre el control positivo y negativo.

4.2.2. Activación frente a veneno de *Vespa velutina nigrithorax*

Para probar la activación frente al veneno de *Vespa velutina nigrithorax*, se utilizaron concentraciones de 1, 10, 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en los 4 primeros pacientes. Sin embargo, al observar que con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se producía la saturación de los basófilos, se continuó con las concentraciones más bajas de 1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de las que se presentan los resultados en 6 de los 7 pacientes (del paciente #7 no disponemos de la valoración a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En la Figura 11 está representada la activación de los 7 pacientes frente al veneno completo.

Considerando activación por encima del 15% de basófilos activados, se encuentra una PAB positiva en 5/7 pacientes. Los pacientes #1 y #6 presentan una prueba negativa, a pesar de que como se observa en la Tabla 4, ambos presentan IgE específica positiva.

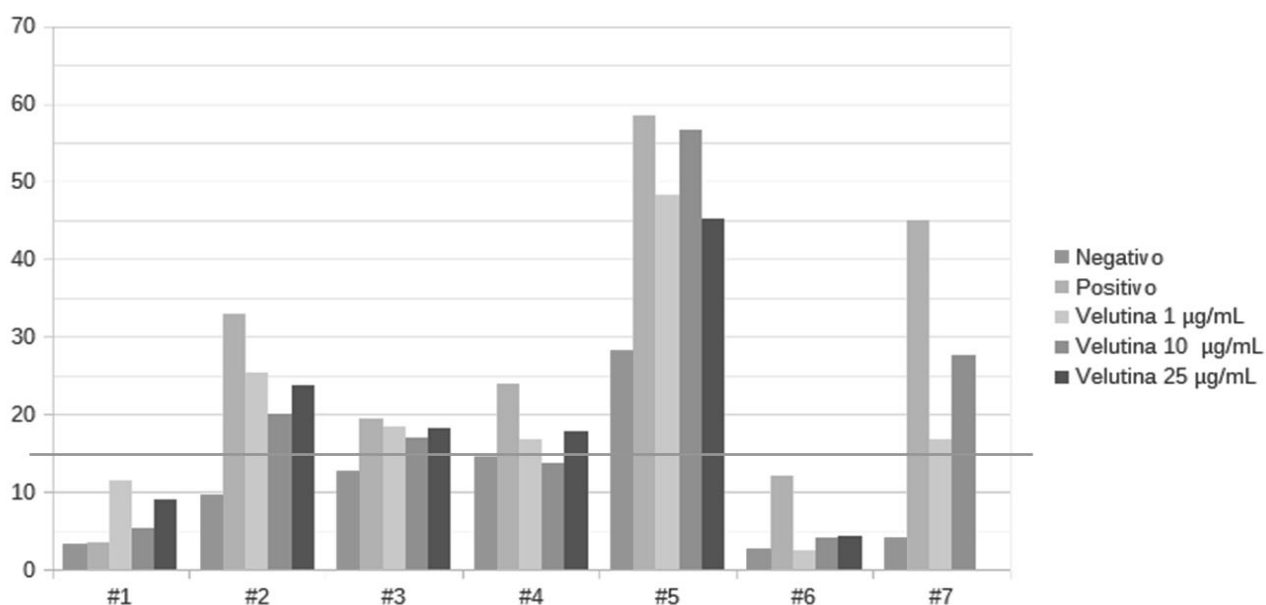


Figura 11: Representación gráfica de la activación de basófilos con el veneno de *Vespa velutina nigrithorax*. El umbral de activación se establece en el 15% de basófilos. Se activan los pacientes 2,3,4,5,7.

Todos los pacientes que presentaron la PAB positiva, consiguieron llegar al umbral de positividad con la concentración más baja utilizada (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$); en los pacientes #2, #3 y #4 dicha activación fue incluso mayor que con la concentración inmediatamente superior de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En contraste, la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ desencadena una mayor activación en los pacientes #5 y #7, si bien para este último, como se ha comentado previamente, no pudo analizarse la concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Con respecto a la concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la activación en los pacientes #2 y #5 es ligeramente inferior a la activación con la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pero superior a la activación con la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En síntesis, la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ es la que produce una mayor activación en los pacientes #1, #2, #3 y #4 (4/7), mientras que la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sería la más indicada para los pacientes #5 y #7 (2/7).

4.2.3. Activación frente a nVesp v 1.

Los basófilos de los cuatro primeros pacientes se expusieron a concentraciones de 1, 10, 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nVesp v 1. Sin embargo, en los 3 últimos pacientes se decidió disminuir la concentración para comprobar el efecto en la activación de los basófilos, empleando en estos casos concentraciones de 0.1, 1, 10 $\eta\text{g}/\text{mL}$.

En la Figura 12 se presentan los resultados de activación de los 4 primeros pacientes. Como se puede observar, los 4 pacientes presentan activación con nVesp v 1; incluso la muestra del paciente #1, que no se había activado con el veneno completo, muestra una activación superior al 15% con 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

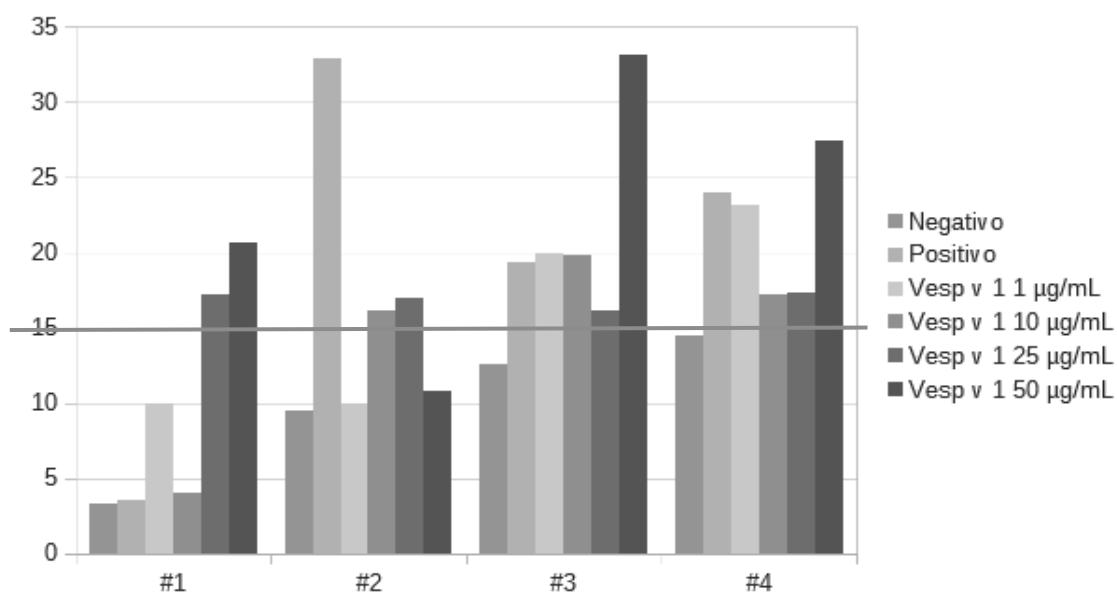


Figura 12: Representación gráfica de la activación de basófilos frente a nVesp v1 de los pacientes 1, 2, 3, 4. El umbral de activación se establece en el 15%. Se activan los 4 pacientes en algún punto.

En la Figura 13 se representan los resultados obtenidos en los pacientes #5, #6 y #7. Como se puede ver, al bajar la concentración, disminuye la activación de los basófilos y solo es posible conseguirla en el paciente #5.

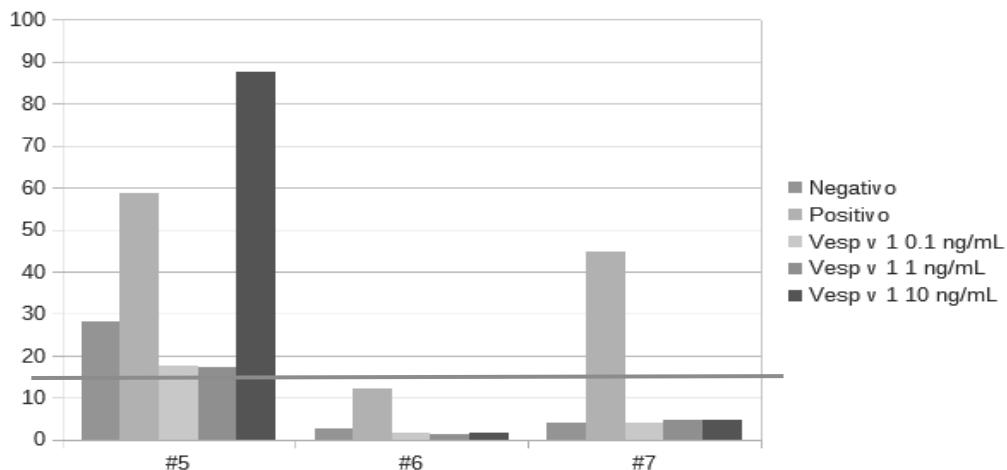


Figura 13: Representación gráfica de la activación de basófilos frente a Vesp v1 de los pacientes 5, 6, 7. El umbral de activación se establece en el 15%. Se activa únicamente el paciente número 5.

4.2.4. Activación frente a nVesp v 5

A continuación, se presentan los resultados obtenidos frente al segundo componente molecular (nVesp v 5; Figuras 15 y 16). Al igual que en el caso de nVesp v 1, los 4 primeros pacientes se expusieron a concentraciones altas de 1, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 14); mientras que los 3 últimos lo hicieron a 0.1, 1 y 10 ng/mL (Figura 15).

En los primeros 4 pacientes, nVesp v 5 consigue activación de basófilos. Se destaca, una vez más, que el paciente #1 no se activó con el veneno completo pero sí lo hace con los dos componentes moleculares testados, nVesp v 5 en este caso.

Respecto a las concentraciones bajas, sí parecen suficientes para conseguir la activación en los pacientes #5 y #7. El paciente #6 no consigue activarse tampoco con nVesp v 5.

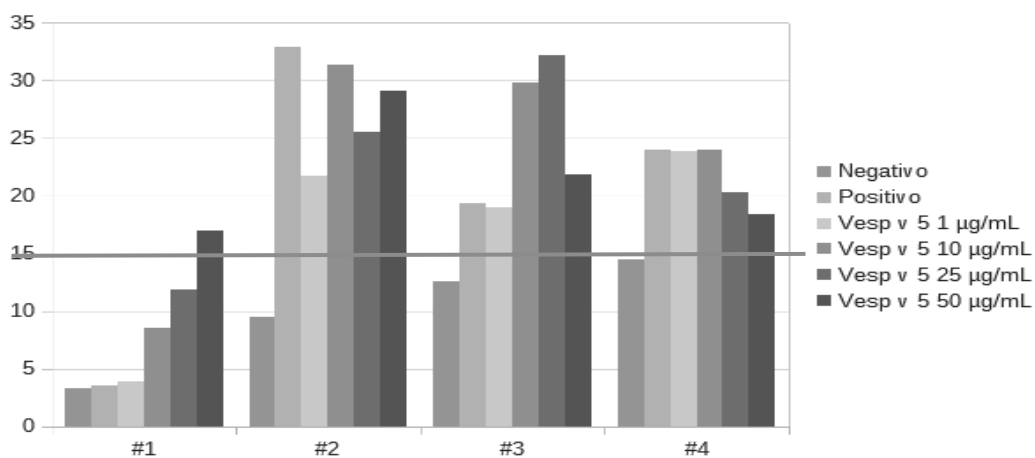


Figura 14: Representación gráfica de la activación de basófilos frente a Vesp v5 de los pacientes 1, 2, 3, 4. El umbral de activación se establece en el 15%. Se activan los 4 pacientes en algún punto.

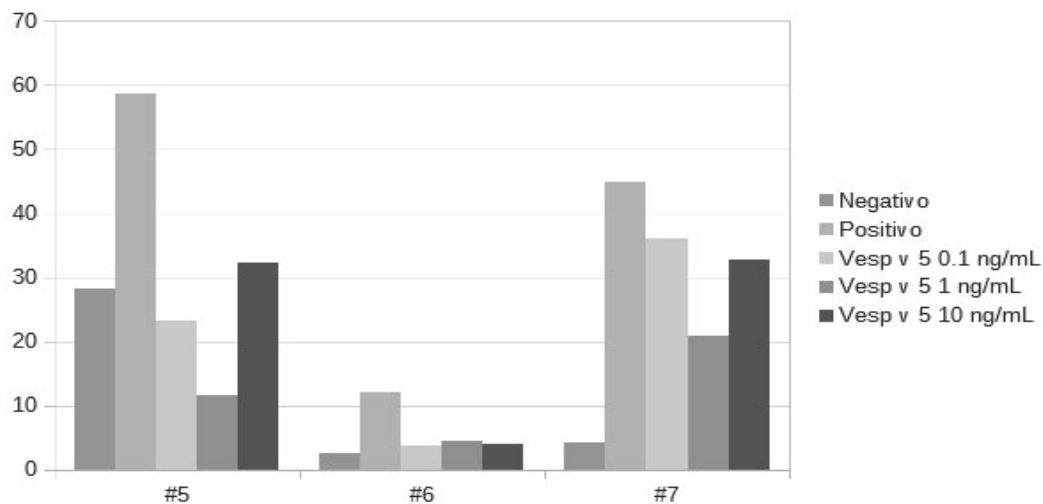


Figura 15: Representación gráfica de la activación de basófilos frente a nVesp v5 de los pacientes 5, 6, 7. El umbral de activación se establece en el 15%. Se activan los pacientes 5 y 7 en algún punto.

4.2.5. Relación de la activación con los niveles de IgE específica

No se detectó ninguna relación entre los niveles de IgE específica frente a los distintos alérgenos y la activación de los basófilos.

5. DISCUSIÓN

Como hemos visto a lo largo de este trabajo, la alergia a la *Vespa velutina nigrithorax* constituye un importante peligro para la salud de la población debido a su potencial tóxico y alergénico, que puede causar incluso a la muerte. El diagnóstico de la alergia se hace *in vitro* mediante la determinación de IgE específica por *InmunoCAP*. Dada la gravedad de las reacciones alérgicas, los sujetos no se pueden exponer a la prueba de exposición de la repicadura, por lo que se estudia el uso de otras técnicas *in vitro*, como la Prueba de Activación de Basófilos de la que trata el presente TFG.

Se ha aplicado la Prueba de Activación de Basófilos a través del BasoStep kit® a 7 pacientes, 6 hombres y 1 mujer, con una media de 56 años, todos ellos residentes en el medio rural. Los pacientes han acudido al servicio de Alergología del Hospital provincial de Conxo por la vía rápida del Sergas debido a anafilaxia de *Vespa velutina nigrithorax*. Los sujetos han entrado en el estudio entre el mes de septiembre y diciembre de 2020, antes de la administración de inmunoterapia.

El objetivo principal del estudio era ver si los pacientes alérgicos a *Vespa velutina nigrithorax* se activaban frente a extractos del veneno completo de la misma, así como ante sus principales componentes moleculares (nVesp v 1, nVesp v 5). Además, se pretendía

dilucidar si dicha activación tenía relación con la gravedad de las reacciones alérgicas o con los niveles de sIgE frente a *Vespa velutina nigrithorax*.

En el estudio de los casos incluidos para este proyecto, cabe destacar a los pacientes #1 y #6. El paciente #1 no se activó frente a *Vespa velutina nigrithorax*, a pesar de que las concentraciones utilizadas fueron suficientes para activar a 5/7 pacientes. Sin embargo, este paciente sí reaccionó ante nVesp v 1 y nVesp v 5, aunque necesitó concentraciones más altas para alcanzar el umbral en comparación con el resto de pacientes. Asimismo, cabe destacar su falta de respuesta al control positivo. Probablemente este paciente necesite mayores concentraciones para activarse. A pesar de ello, es el paciente que mayor IgE total y sIgE de *Vespa velutina nigrithorax* presenta y no hay ningún dato de los de la Tabla 4 que llamen la atención. Todo ello viene a señalar que las concentraciones más altas de IgE no conllevan necesariamente una mayor activación de los basófilos.

La muestra del paciente #6 no mostró activación ante ningún reactivo, a ninguna de las concentraciones. Cabe destacar que en nVesp v 1 y nVesp v 5 se utilizaron concentraciones de $\eta\text{g/ml}$. En lo que respecta al nVesp v 1, puede que esa escala de concentraciones no fueran suficientes para conseguir la activación, ya que solo 1/3 paciente se activó y lo hizo a la máxima concentración de 10 $\eta\text{g/ml}$. Sin embargo, las concentraciones de $\eta\text{g/ml}$ sí parecen adecuadas para conseguir la activación con nVesp v 5, ya que 2/3 pacientes reaccionaron con la dosis de 1 $\eta\text{g/ml}$, sin ser necesaria aplicar otras concentraciones superiores. Por lo tanto, la falta de activación del Paciente #6 ante los extractos no parece deberse al tipo de concentraciones utilizadas, al menos en lo que concierne al veneno completo y el componente nVesp 5. Tampoco se aprecia ningún dato de los de la Tabla 4 que ayude a entender el motivo de esta ausencia de reacción. Probablemente la explicación a estas diferencias de activación radique en otras variables desconocidas que no fueron consideradas en el presente trabajo.

En cuanto a los demás pacientes, cabe destacar que el paciente #7 no se activó frente a nVesp v 1, pero todo apunta a que no lo hizo por falta de concentración suficiente, ya que solo se pudo activar el paciente #5 y únicamente a la máxima concentración. Los demás pacientes respondieron bien a los controles y a las sucesivas activaciones.

Para que se produzca la activación en *Vespa velutina nigrithorax* son necesarias concentraciones de 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$. No obstante, para nVesp v 1 las concentraciones a nivel de $\eta\text{g/ml}$ parecen ser poco efectivas, y en caso de serlo, sólo a la máxima concentración estudiada. En contraposición, para nVesp v 5 las concentraciones de 0,1/1 $\eta\text{g/ml}$ fueron eficaces para alcanzar el umbral de activación.

Por último, no parece existir relación entre los niveles de sIgE de *Vespa velutina nigrithorax* y la activación de los basófilos frente a la misma. Por ejemplo, aunque los pacientes #1 como #7 presentan 4kU_A/L de sIgE de *Vespa velutina nigrithorax*, el paciente #1

no consigue llegar al umbral de activación, mientras el paciente #7 alcanza una activación por encima del 27%.

6. CONCLUSIONES

1. De los pacientes estudiados, 6/7 presentaron al menos una prueba de activación positiva, bien ante a *Vespa velutina nigrithorax* o ante alguno de sus componentes moleculares.
2. Concentraciones de $50\mu\text{g/ml}$ del veneno de *Vespa velutina nigrithorax* parecen sobrepasar el umbral de saturación de los basófilos, disminuyendo su activación.
3. Concentraciones de $1,10\mu\text{g/ml}$ de *Vespa velutina nigrithorax* alcanzan la activación óptima de basófilos.
4. Concentraciones de $\eta\text{g/ml}$ parecen no ser suficientes para alcanzar el umbral de activación con nVesp v 1, pero sí con nVesp v 5.
5. No parece haber relación entre los niveles de sIgE de *Vespa velutina nigrithorax* y el grado de activación de basófilos.
6. BasoStep Kit[®] se presenta como una prueba útil para confirmar la activación de basófilos en pacientes con antecedentes de anafilaxia e sIgE ante el veneno de *Vespa velutina nigrithorax*.
7. Los pacientes #1 y 6#, a pesar de tener antecedentes de anafilaxia a *Vespa velutina nigrithorax* y de presentar una sIgE positiva, no se activaron frente a la misma, por lo que puede haber otros factores diferentes de la concentración que interfieran en la activación que no se han tenido en cuenta. En este sentido, el estudio de estas variables puede ser interesante de cara a futuras líneas de investigación.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Vidal C, Armisén M, Monsalve R, González-Vidal T, Lojo S, López-Freire S, et al. Anaphylaxis to *Vespa velutina nigrithorax*: pattern of sensitization for an emerging problem in Western countries. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2019; 31.
2. Vidal C, Armisén M, Monsalve R, Gómez-Rial J, González-Fernández T, Carballada F, et al. Vesp v 5 and glycosylated Vesp v 1 are relevant allergens in *Vespa velutina nigrithorax* anaphylaxis. *Clin Exp Allergy*. 2020;50:1424-7.
3. Haxaire J, Bouguet J-P, Tamisier J-P. *Vespa velutina* Lepeletier, 1836, une redoutable nouveauté pour la faune de France (Hym., Vespidae). *Bull la Société Entomol Fr*. 2006;111:194-194.
4. L. Castro SP-C. *Vespa velutina* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Vespidae), recolectada en la Península Ibérica. *Heteropterus Rev Entomol*. 2010;10: 193-6.
5. González T, Hermida A (dir), López S (dir). Caracterización del perfil molecular de los pacientes alérgicos a *Vespa velutina* respecto a *Vespula vulgaris*, *Polistes dominula* y *Apis mellifera* [trabajo final de grado en Internet]. [Santiago de Compostela]: Universidad De Santiago de Compostela;2019.
6. Villemant C, Barbet-Massin M, Perrard A, Muller F, Gargominy O, Jiguet F, et al. Predicting the invasion risk by the alien bee-hawking Yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax* across Europe and other continents with niche models. *Biol Conserv*. 2011;144: 2142-50.
7. Espinosa L, Franco S, Chauzat MP. Could *Vespa velutina nigrithorax* be included in the World Organisation for Animal Health list of diseases, infections and infestations? *Rev Sci Tech*. 2019;38: 851-62.
8. Liu Z, Chen S, Zhou Y, Xie C, Zhu B, Zhu H, et al. Deciphering the venom transcriptome of killer-wasp *Vespa velutina*. *Sci Rep*. 2015;5.
9. Wu J, Mu L, Zhuang L, Han Y, Liu T, Li J, et al. Investigação de efeitos imunomoduladores de veneno bruto de *Tityus serrulatus* sobre funções de linfócitos T humanos Investigação de efeitos imunomoduladores de veneno bruto de *Tityus serrulatus* sobre função de linfócitos T humanos. *J Proteome Res* . 2014;9:3867-77.
10. De Graaf DC, Aerts M, Brunain M, Desjardins CA, Jacobs FJ, Werren JH, et al. Insights into the venom composition of the ectoparasitoid wasp *Nasonia vitripennis* from bioinformatic and proteomic studies. *Insect Mol Biol*. 2010;19(suppl. 1):11-26.
11. Ushkaryov YA, Volynski KE, Ashton AC. The multiple actions of black widow spider toxins and their selective use in neurosecretion studies. *Toxicon*. 2004;43:527-42.
12. Frobert Y, Créminon C, Cousin X, Rémy MH, Chatel JM, Bon S, et al. Acetylcholinesterases from Elapidae snake venoms: Biochemical, immunological and enzymatic characterization. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol*. 1997;1339:253-67.
13. Auld KL, Brown CR, Casolari JM, Komili S, Silver PA. Genomic association of the proteasome demonstrates overlapping gene regulatory activity with transcription factor substrates. *Mol Cell*. 2006;21:861-71.

14. Brown SGA. Clinical features and severity grading of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114:371-6.
15. Prussin C, Metcalfe DD. 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(suppl. 2):450-6.
16. Sabogal-Cuadro P, Zakzuk J. Basophil activation test: Technical aspects, methodology and clinical utility. *Rev Fac Med.* 2018;66:447-57.
17. Santos AF, Lack G. Basophil activation test: Food challenge in a test tube or specialist research tool? *Clin Transl Allergy.* 2016;6:1-9.
18. Hoffmann HJ, Santos AF, Mayorga C, Nopp A, Eberlein B, Ferrer M, et al. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2015;70:1393-405.
19. Crivellato E, Nico B, Mallardi F, Beltrami CA, Ribatti D. Piecemeal degranulation as a general secretory mechanism? *Anat Rec - Part A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2003;274:778-84.
20. Knol EF, Mul FPJ, Jansen H, Calafat J, Roos D. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol.* 1991;88:328-38.
21. MacGlashan D. Expression of CD203c and CD63 in human basophils: Relationship to differential regulation of piecemeal and anaphylactic degranulation processes. *Clin Exp Allergy.* 2010;40:1365-77.
22. Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH, Mertens CH, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, et al. Flow-assisted allergy diagnosis: Current applications and future perspectives. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2006;61:1028-39.
23. Bühring HJ, Seiffert M, Giesert C, Marxer A, Kanz L, Valent P, et al. The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical to the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3. *Blood.* 2001;97:3303-5.
24. Ono E, Taniguchi M, Higashi N, Mita H, Kajiwara K, Yamaguchi H, et al. CD203c expression on human basophils is associated with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:483-489.
25. Eberlein-König B, Varga R, Mempel M, Darsow U, Behrendt H, Ring J. Comparison of basophil activation tests using CD63 or CD203c expression in patients with insect venom allergy. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2006;61:1084-5.
26. Hausmann O V., Gentinetta T, Fux M, Ducrest S, Pichler WJ, Dahinden CA. Robust expression of CCR3 as a single basophil selection marker in flow cytometry. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2011;66:85-91.
27. Konstantinou GN, Asero R, Ferrer M, Knol EF, Maurer M, Raap U, et al. EAACI taskforce position paper: Evidence for autoimmune urticaria and proposal for defining diagnostic criteria. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2013;68:27-36.
28. Nucera E, Pecora V, Buonomo A, Rizzi A, Aruanno A, Pascolini L, et al. Utility of basophil activation test for monitoring the acquisition of clinical tolerance after oral desensitization to cow's milk: Pilot study. *United Eur Gastroenterol J.* 2015;3:272-6.

8. AGRADECIMIENTOS

A Jose Gómez y al resto de miembros del laboratorio de Inmunología del Hospital Clínico Universitario, por haberme dejado colaborar con ellos como una más.

A la profesora Carmen Vidal, por haber sido mi mentora en este proyecto, por su profesionalidad y dedicación profesional tanto hacia los pacientes, como hacia los alumnos y por demostrar que las mujeres también podemos llegar a lo más alto. Y como no, al resto de miembros del Servicio de Alergología del Hospital Provincial de Conxo, que de una manera u otra también han participado en este proyecto.

Al profesor González Quintela, por preocuparse de nuestra formación impartiendo seminarios en formato de “Píldoras del TFG”, por incitarnos a la investigación y por haberme hecho descubrir la Beca de Colaboración.

Por último, a mis amigos y familia, en especial a mis sobrinos, por haberme acompañado a lo largo de estos seis años.

9. PARTICIPACIÓN DEL ALUMNO EN EL PRESENTE ESTUDIO

El presente Trabajo de Fin de Grado se ha realizado teniendo en cuenta los datos preliminares de estudios previos del Servicio de Alergología de la EOXI de Santiago de Compostela.

Los pacientes incluidos en el estudio fueron remitidos al Servicio de Alergología del Hospital Provincial de Conxo por la Vía rápida de Anafilaxia habilitada por el SERGAS.

La alumna Laura Piñeiro Franco participó con su co-tutor en la realización de las Pruebas de Activación de Basófilos realizadas a los 7 pacientes en el laboratorio de Inmunología del CHUS, además de participar con su tutora en la interpretación de los datos resultantes de dichas pruebas.

Desde el Servicio de Alergología se le facilitó la bibliografía.

La solicitud de autorización del Comité Ético de Investigación de Galicia incluía el acceso de la alumna a dicha información.

10. ANEXO 1

Autorización del Comité Ético de Galicia



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Secretaría Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 981546425. Correo-e: oeio@sergas.es



DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Cristina Márquez Riveras, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 19/12/18 el estudio:

Título: Estudio de sensibilización a Vespa velutina en pacientes con anafilaxia por veneno de himenópteros en el área sanitaria de Santiago de Compostela

Versión:

Promotor/a: Carmen Vidal Pan

Investigador/a: Carmen Vidal Pan

Código de Registro: 2018/622

Y que este Comité, tomando en consideración la pertinencia del estudio, el conocimiento disponible, los requisitos legales aplicables y los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité, emite un dictamen **FAVORABLE** para la realización del citado estudio.



Documento firmado digitalmente por:
Márquez Riveras, Cristina: 19/12/2018 18:10
SAOC-H4G4-BOAH-OFHR-RC15-4523-9414-843