

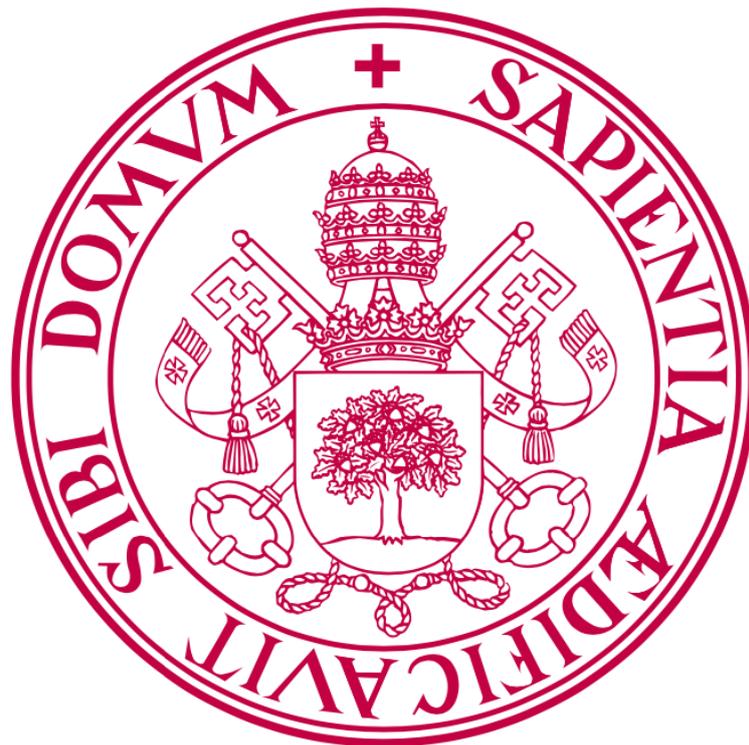
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**MONITORIZACIÓN DE LA PROTEÍNA E
CATIONICA PARA EVALUAR LA EFICACIA DE LA
INMUNOTERAPIA EN LA ESOFAGITIS
EOSINOFÍLICA**



**Autor: Sara Ramos Alonso
Tutor: Dra. Alicia Armentia
Cotutor: Sara Martín-Armentia**

SERVICIO ALERGOLOGÍA HOSPITAL UNIVERSITARIO RÍO HORTEGA, VALLADOLID

CURSO 2019/2020

TABLA DE CONTENIDOS

1.RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	
2.1. Eosinófilo	3
2.2. Proteína catiónica eosinofílica	6
2.3. Esofagitis eosinofílica	8
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS	11
5. RESULTADOS	12
6. DISCUSIÓN	15
7. CONCLUSIONES	16
8. BIBLIOGRAFÍA	17
ANEXOS: APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA HOSPITALARIA Y PÓSTER	19

1. RESUMEN

Contexto:

La proteína catiónica eosinofílica (ECP) ha demostrado ser un útil marcador de actividad para un gran número de enfermedades inflamatorias eosinofílicas activas. En los últimos años hemos tratado con éxito a pacientes que padecen esofagitis eosinofílica con inmunoterapia dirigida específica de alérgenos (AIT) y dieta por diagnóstico de componentes (CRD), los cuales podrían detectar posibles alérgenos implicados en la esofagitis eosinofílica (EEo).

Objetivo:

Se llevaron a cabo mediciones de ECP después de 3 años de AIT en pacientes con EEo y tras dos años de suspensión de este tratamiento sin recaída de la enfermedad, con el fin de evaluar la ECP como marcador objetivo de mejora de la esofagitis.

Métodos:

129 con EEo fueron probados para detectar alérgenos ambientales y alimentarios. Se realizaron análisis histológicos, botánicos y CRD. Las puntuaciones clínicas y las biopsias endoscópicas se realizaron cada seis meses durante cinco años. 15 pacientes sanos y 34 asmáticos por el polen fueron incluidos como grupos control.

La inmunoterapia dirigida y dieta por diagnóstico de componentes se administró a 91 pacientes con EEo y el tratamiento convencional (inhibidores de la bomba de protones, dieta empírica, corticoesteroides) en el resto de los pacientes (n=38). Se recogió suero de todos los pacientes antes de la terapia y después de la supresión del tratamiento. El análisis ciego aleatorizado de ECP se realizó en todas las muestras de tratados (AIT/convencional) y sujetos controles, y se correlacionó con hallazgos clínicos y endoscópicos.

Resultados:

Se midieron los niveles más altos de ECP en pacientes con EEo (media de 46.5 µg/mL) con respecto a los pacientes asmáticos por el polen (media de 19.19 µg/mL), y superiores en ambos procesos con respecto a pacientes sanos ($p < 0.0001$). En pacientes tratados con AIT, se observó una marcada disminución de la ECP, significativamente mayor que en pacientes con tratamiento convencional ($p < 0.001$). Esta mejora se correlacionó significativamente con los hallazgos clínicos y endoscópicos de la evolución favorable de la enfermedad ($p < 0.001$).

Conclusión:

La medición de la proteína catiónica eosinofílica (ECP) puede ser útil tanto para controlar la eficacia de la inmunoterapia específica de alérgenos (AIT) en esofagitis eosinofílica (EEo), como también puede ser utilizada como marcador de actividad de dicha enfermedad.

Palabras clave: Proteína catiónica eosinófila, esofagitis eosinofílica, inmunoterapia con alérgenos, diagnóstico resuelto por componentes.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. EOSINÓFILO

El eosinófilo es un granulocito pequeño, que mide 10-15 nanómetros de diámetro, de núcleo típicamente bilobulado. Es derivado de la médula ósea y después de abandonarla se diferencia completamente. Normalmente circula en la sangre en bajas concentraciones, con un 3-6% del total de granulocitos de la médula ósea. Tiene un metabolismo muy activo y su característica más relevante son los gránulos citoplasmáticos (1).

MEDIADORES:

Los eosinófilos producen una serie de mediadores entre los que destacan: en primer lugar, los preformados, derivados de proteínas granulares, que son almacenados en gránulos específicos; en segundo lugar, los lipídicos, sintetizados de novo; y en tercer lugar la producción de citocinas como TNF α y IL-5. Los eosinófilos son unos de los principales formadores de leucotrienos en la inflamación alérgica y también producen cantidades significativas de factor activador de plaquetas.

ACTIVACIÓN:

Los eosinófilos se encuentran en estado de reposo en la sangre periférica y los tejidos no inflamados. Para producir una respuesta inflamatoria efectiva los eosinófilos primero deben estimularse, un proceso por el cual las funciones efectoras tales como migración, adhesión, y fagocitosis aumentan, y luego ser activados para liberar sus mediadores. Una vez que están en los tejidos, los eosinófilos pueden generar sus propias citocinas inductoras de supervivencia, en concreto IL-5 y GM-CSF, a través de la interacción entre VLA-4 y VLA-6 y entre fibronectina tisular y laminina.

Tipos de gránulos

- a) Gránulos primarios.
- b) Gránulos grandes o específicos, también llamados secundarios.
- c) Gránulos pequeños.

a) Gránulos primarios

Son de tamaño variable, redondos, forman cristales y no tienen core. Están localizados en la membrana del eosinófilo. Contienen lisofosfolipasa A, proteína que forma los cristales de Charcot-Leyden (los cuales son característicos del esputo asmático). Están presentes en tejidos y líquidos corporales y constituyen el 5 a 10% de la proteína eosinófila (2).

b) Gránulos específicos

Formados por un núcleo cristalino y están rodeados por una matriz. Miden 0.3 a 1.2 nm de diámetro y están adheridos a la membrana, contienen 4 proteínas catiónicas eosinófilas básicas.

- I. Proteína básica principal (MBP).
- II. Proteína catiónica eosinofílica (ECP).
- III. Neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN).
- IV. Peroxidasa de eosinófilo (EPO) e hidrolasas lisosomales e histaminasa.

I. Proteína básica principal (MBP):

Constituye el 55% de los gránulos de proteína. Tiene toxicidad contra helmintos y estimula la liberación de histamina de los basófilos. Es liberada de los eosinófilos y depositada en la superficie de parásitos. Destruye a *E. coli* y células tumorales. Seguramente también tiene un papel en la hiperreactividad bronquial, causando ciliostasis y exfoliación de células respiratorias. El número de eosinófilos en sangre periférica de pacientes con asma se correlaciona con la concentración de MBP y la severidad de la hiperreactividad bronquial. La MBP es inhibida por antagonistas de la calmodulina, inhibidores de fosfolipasa A y el ácido poliglutámico.

II. Proteína catiónica eosinofílica (ECP):

Consiste en una cadena polipeptídica simple localizada en el cromosoma 14 de los eosinófilos. Se une a heparina y neutraliza su actividad anticoagulante, por lo que altera la fibrinólisis y acorta el tiempo de coagulación del plasma. Es una helmintotoxina más potente, de 8 a 10 veces más que MBP, con destrucción completa de *Esquistosoma*, *Trichinella spiralis* y *Microfilaria*.

III. Neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN):

Es una potente neurotoxina que puede dañar duramente las neuronas mielinizadas en animales de experimentación. Los pacientes con síndrome hipereosinofílico idiopático y pacientes con eosinofilia de líquido cerebroespinal presentan alteraciones neurológicas que tienen como síntomas cambios en el patrón de conducta, excitabilidad y déficit de atención.

IV. Peroxidasa de eosinófilo (EPO):

Es un potente bacteriostático. Se encuentra en la saliva y en la leche humana. Es el principal oxidante producido por la eritropoyetina. La producción de superóxido por los eosinófilos es incrementada por TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa). Dentro de la morfología normal del eosinófilo, también contienen aproximadamente 5 cuerpos lipídicos sin membrana (que son la fuente principal del ácido araquidónico) y además ciclooxigenasa y 5-lipooxigenasa que son requeridas para sintetizar prostaglandinas y leucotrienos. El eosinófilo al encontrarse en sitios de respuesta inflamatoria puede tener en su interior decenas de cuerpos lipídicos. Los cristales de Charcot-Leyden y la proteína básica principal, son los principales marcadores de los eosinófilos.

c) Gránulos pequeños

Contienen arilsulfatasa B y fosfatasa ácida. El proceso de degranulación que ocurre en respuesta a estímulos específicos, tales como la unión de IgA a los receptores de superficie del eosinófilo para IgA, es la liberación de proteínas granulares citoplásmicas.

FUNCIONES:

Opiniones sobre el papel de los eosinófilos en la salud y las enfermedades han cambiado con el tiempo. Durante años se pensaba que mejoraban las respuestas inflamatorias, ahora se cree que tienen un papel perjudicial. Incluso más recientemente se ha hecho evidente que los eosinófilos son la fuente de una gran gama de citoquinas, varias de las cuales se cree que tienen una función homeostática, en lugar de una proinflamatoria. Por ejemplo, la observación de que los eosinófilos secretan TGFalfa junto con estudios mostrando un aumento del número de eosinófilos en los bordes de las heridas en curación sugieren que pueden ser importantes en la curación de las heridas. Secretan IL-1, expresan receptores para HLA de clase II y presentan antígenos a las células T in vitro, lo que sugiere que pueden ser importantes como células accesorias en reacciones mediadas por células T. Hay evidencia de que los eosinófilos disminuyen la tasa de progresión de los tumores sólidos, presumiblemente por ser citotóxicos contra las células tumorales. Sin embargo, también hay pocas dudas de que los eosinófilos pueden causar daños tisulares graves bajo ciertas circunstancias. Los recuentos persistentemente altos de eosinófilos causan reacciones a medicamentos, infecciones parasitarias, leucemia eosinofílica y síndrome hipereosinofílico que se asocian con fibrosis (una afección que se presenta con insuficiencia cardíaca y signos consistentes con una cardiomiopatía restrictiva) (3).

Los eosinófilos se reclutan en el área inflamada en respuesta a los estímulos, modulando la respuesta inmune a través de la liberación al medio extracelular de su contenido derivado de gránulos. Se han identificado varios mecanismos de desgranulación. Los leucocitos polimorfonucleares contienen cuerpos multivesiculares que generan exosomas que se secretan en el entorno extracelular. Los exosomas eosinófilos participan en múltiples procesos y mecanismos.

La comprensión de que los eosinófilos podrían liberar mediadores proinflamatorios como PAF y eicosanoides, y la observación de que las proteínas básicas del eosinófilo eran tóxicas para el epitelio de las vías respiratorias ha llevado a un consenso de que los eosinófilos son una célula efectora importante para el daño tisular en el asma y podría causar muchas de las características patológicas de la enfermedad. Las células migran al foco inflamatorio y contribuyen al daño epitelial y a la remodelación de las vías respiratorias.

Eosinófilos y asma:

Los eosinófilos juegan un papel importante en la defensa contra las infecciones y son un elemento clave en el asma y las enfermedades alérgicas. Está bien establecido que un gran número de eosinófilos junto con células mononucleares son frecuentemente encontrados en y alrededor de los bronquios en pacientes que han muerto por asma. La aglomeración inmunológica del tejido bronquial de estos pacientes reveló la existencia de grandes cantidades de MBP depositados en las vías respiratorias. La presencia de un mayor número de eosinófilos en sangre periférica en asma crónico atópico y no atópico es conocido, aunque esta elevación no es tan grande como se ve en otras enfermedades asociadas a eosinófilos, y el recuento de eosinófilos de sangre periférica es a menudo normal.

Una necesidad primaria de los eosinófilos es la capacidad de migrar de la sangre a los tejidos. La acumulación de eosinófilos en las enfermedades alérgicas es probablemente debida a una combinación de factores entre los que se incluyen:

- Los patrones de adhesión selectiva.
- Quimiotracción selectiva.
- Sobrevivencia prolongada del eosinófilo bajo la influencia de citocinas generadas localmente.

La plena apreciación de la magnitud de la implicación del eosinófilo en el asma ha venido con el uso de broncoscopia de fibra óptica para obtener líquido BAL y biopsias endobronquiales de las vías respiratorias en pacientes con asma leve a moderada.

Hoy en día, la comunidad científica no duda del papel crucial que los eosinófilos juegan en el asma. La inflamación eosinofílica está presente en aproximadamente el 50% de los pacientes con asma y se asocia a mayor gravedad, mayor frecuencia de exacerbaciones y empeoramiento de la función pulmonar. Además, un peor control del asma se asocia con el aumento del número de eosinófilos en sangre y en esputo.

2.2. PROTEÍNA CATIONICA EOSINOFÍLICA

La proteína catiónica del eosinófilo (ECP) es una proteína altamente catiónica con un gran número de funciones biológicas entre las cuales destaca su función citotóxica. Es producida y secretada por los eosinófilos ante la presencia de numerosos estímulos, aunque puede acumularse tanto en los eosinófilos como en los neutrófilos (4).

La ECP puede ser determinada en numerosos fluidos biológicos y estas se utilizan como herramienta en la clínica para predecir el comportamiento de los granulocitos eosinofílicos en enfermedades inflamatorias y alérgicas. La patología en que la determinación de ECP ha sido más estudiada es el asma. La detallada interpretación de tales mediciones contribuye de forma decisiva a la toma de decisión por parte de los clínicos para establecer criterios determinados en cuanto a posibles ajustes de dosis y la monitorización de dichas patologías.

CARACTERÍSTICAS MOLECULARES:

La ECP es una proteína de simple cadena que contiene Zn en su estructura. Su heterogeneidad radica, en parte, en que la molécula presenta tres potentes sitios de glicosilación en su secuencia aminoacídica. Presenta homología aminoacídica con proteínas de la familia de las ARNasas. Tiene un gran contenido en arginina, lo que la hace ser una molécula muy afín y propensa a unirse a moléculas cargadas negativamente como las que se encuentran en las membranas celulares.

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES:

La ECP es una potente molécula citotóxica con capacidad de matar diferentes poblaciones celulares ya sean originarias de mamíferos o no. También le son atribuidas otras funciones asociadas a alteraciones en el funcionamiento de diferentes sistemas de órganos y numerosos tejidos en el organismo. Su mecanismo citotóxico posiblemente sea debido a la capacidad de la ECP de construir poros en las membranas celulares que permiten el paso de agua y pequeñas moléculas a su interior, lo cual desintegra la pared celular y produce lisis osmótica. Otro de los sitios de actuación de la ECP es el cerebro.

La ECP presenta efectos no citotóxicos in vitro. Entre ellos destacan la inhibición de la proliferación de la respuesta de células T frente a antígenos, la interferencia en la síntesis de inmunoglobulinas por las células B y la liberación de histamina y triptasa por los mastocitos del corazón y basófilos. Todos estos procesos confirman que los eosinófilos ejercen un efecto inmunomodulador en el organismo a través de la secreción de ECP.

Por otro lado, la ECP activa la secreción de moco en la vía aérea, motivo por el cual desempeña un papel muy importante en los procesos de reparación de los tejidos y es indicativo de la presencia de eosinófilos en los tejidos fibróticos. Esto es de importante para comprender el papel fundamental que tiene la ECP en enfermedades inmunoalérgicas como el asma o la esofagitis eosinofílica.

Otra de sus funciones recae sobre la coagulación y la fibrinólisis. Se ha demostrado que, a concentraciones bajas, la ECP acorta el tiempo de coagulación por aumento de la actividad del factor XII debido a diferentes mecanismos. Con respecto a la fibrinólisis, su papel consiste en el aumento del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA). También es capaz de interactuar con diferentes proteínas que actúan en la cascada del complemento.

DETERMINACIÓN EN LAVADO BRONCOALVEOLAR:

El lavado broncoalveolar es una herramienta muy beneficiosa para determinar la inflamación de la vía aérea. Normalmente, se separan alícuotas de 20 mL de una solución isotónica salina de 200 mL para realizar los lavados y se inyectan en los bronquios con ayuda de un broncoscopio de fibra óptica. El fluido es aspirado posteriormente a cada alícuota y son separadas del resto. Se

centrifuga a 4º y luego se almacena a -20º. Es conveniente no usar grandes volúmenes de fluido, ya que se detectan bajos niveles de ECP por dilución del material.

2.3. ESOFAGITIS EOSINOFÍLICA

No hay eosinófilos en la mucosa esofágica sana. Actualmente, la esofagitis eosinofílica (EEo) se define como una enfermedad esofágica crónica, inmunomediada localmente, caracterizada, clínicamente por síntomas relacionados con la disfunción esofágica y, histológicamente, por inflamación predominante con eosinófilos. La enfermedad se entiende como una entidad clínico-patológica, donde los síntomas y la histología siempre deben considerarse juntos, tanto para el diagnóstico como para el seguimiento o la evaluación de la respuesta al tratamiento (5).

Epidemiología:

En los últimos años, ha habido un aumento en la incidencia y prevalencia de EEo. En EE. UU. y Europa, la EEo es la causa más frecuente de disfagia en niños y adultos jóvenes. En la población general, se estima que es de aproximadamente 30-52 casos por cada 100.000 habitantes. Aunque EEo se han descrito en todas las razas y continentes, existe un ligero predominio entre los caucásicos. Es más frecuente en hombres que en mujeres (3:1). La edad media en el momento del diagnóstico oscila entre 30 y 50 años en adultos y 5,4 y 9,6 años en niños.

Etiopatogenia:

La esofagitis eosinofílica se considera una enfermedad inflamatoria esofágica asociada con enfermedades atópicas. Es causada por una respuesta inmune adaptativa a los antígenos específicos del paciente, principalmente alimentos.

Se desconoce si EEo está mediado por IgE o no. El resultado más probable es la presencia de linfocitos Th2 con una función de barrera esofágica alterada. Las principales citocinas y quimiocinas implicadas en el reclutamiento y la remodelación de los eosinófilos son la linfopoyetina del estroma tímico, la interleucina-13 (IL-13), CCL26 / eotaxina-3 y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β). La disfagia alimentaria crónica, la impactación alimentaria y las temidas complicaciones tardías están en parte relacionadas con la fibrosis subepitelial densa, probablemente inducida por IL-13 y TGF- β .

El deterioro de la barrera epitelial se produce debido a la predisposición genética, el reflujo y la ingesta de alimentos. Los alérgenos invasivos y los antígenos microbianos activan el sistema inmunitario innato y adquirido. Los eosinófilos se degranulan, liberan proteínas tóxicas y generan alteraciones en el ADN extracelular, que sirven como sistema de defensa, pero también causan daño tisular. Al liberar diferentes citocinas, los eosinófilos modulan la inflamación y promueven su cronificación, lo que finalmente resulta en fibrosis, que, a su vez, tiene efectos negativos sobre la función barrera de la piel.

Es una enfermedad compleja, que no sigue el patrón mendeliano clásico y produce interacción de múltiples genes, algunos con un efecto protector y otros como factor de riesgo para la enfermedad, cuya expresión podría estar condicionada por factores ambientales.

Síntomas:

Los síntomas en EEO se deben a una disfunción esofágica, que puede aparecer a cualquier edad. Sin embargo, puede detectarse con mayor frecuencia en niños y adultos jóvenes hasta la 5ª década de la vida.

Algunos pacientes presentan síntomas constantemente, otros intermitentemente, permanecen asintomáticos entre períodos de exacerbación. Los síntomas pueden estar presentes durante mucho tiempo (media de 3 a 5 años) antes de llegar a un diagnóstico de EEO en niños y adultos, especialmente si la enfermedad aparece progresivamente.

La presentación clínica varía según la edad, evolucionando desde síntomas inespecíficos como dolor abdominal y rechazo de alimentos en pacientes pediátricos hasta síntomas esofágicos más pronunciados como disfagia en pacientes adultos.

En niños en edad preescolar, el rechazo de alimentos y la ingesta de cantidades menores que las apropiadas para su edad son lo que encontramos más comúnmente. En los escolares, hay que tener en cuenta el rechazo de alimentos, las dificultades para introducir nuevos alimentos en la dieta, la preferencia por los líquidos y las dietas blandas, y la tendencia a ser "comedores lentos". En este grupo de niños, el dolor abdominal y los vómitos son los síntomas gastrointestinales más frecuentes. En niños mayores y adolescentes, la disfagia y el estrangulamiento son los síntomas más notables. La impactación es más común en tales casos que a edades tempranas. También mantienen una preferencia por las dietas blandas y la ingesta de líquidos, tienden a tener una dieta poco variada y pueden mostrar miedo y ansiedad a la hora de las comidas.

En adultos, la disfagia por sólidos y la impactación de los alimentos son los síntomas principales. El dolor en el pecho puede estar asociado con adultos. Sin embargo, algunos de ellos solo muestran síntomas de ERGE o molestias faríngeas inespecíficas.

En conclusión, existen diferentes patrones de presentación clínica que varían con la edad y pueden enmascarse mediante hábitos de adaptación. Además, la gravedad de los síntomas no se correlaciona necesariamente con la densidad de la inflamación eosinofílica. En general, los síntomas por sí solos no son suficientes para diagnosticar o evaluar la respuesta al tratamiento.

Diagnóstico:

Se requiere la presencia de los siguientes criterios de diagnóstico para el diagnóstico: 1. síntomas de disfunción esofágica; 2. inflamación esofágica eosinofílica, con ≥ 15 eosinófilos por campo de alta potencia que afecta solo al esófago; y 3. con exclusión de otras causas de eosinofilia esofágica.

La endoscopia gastrointestinal superior es la primera prueba de diagnóstico que se realiza cuando se sospecha EEO. Incluye la inspección del esófago, el estómago y el duodeno, la adquisición de biopsias esofágicas de los lugares anteriores y descartar otras patologías.

Esofagitis eosinofílica y alergia mediada por IgE:

Los pacientes con EEO generalmente padecen una gran cantidad de trastornos atópicos concomitantes que incluyen rinitis, asma y eczema. Además, las alergias alimentarias mediadas por IgE son comunes en pacientes con EEO.

Hay casos de pacientes que desarrollaron EEO después de haber sido tratados con inmunoterapia sublingual con polen y ácaros que remitieron con la retirada de la inmunoterapia.

Pronóstico:

En la EEO, el riesgo de desarrollar estenosis esofágica aumenta con la edad y el retraso en el diagnóstico y el tratamiento. La esofagitis eosinofílica es una enfermedad crónica; como tal, se necesita un seguimiento a largo plazo y una estrategia terapéutica. No es potencialmente mortal; sin embargo, si no se trata puede causar daño permanente al esófago. Además, como enfermedad crónica, la calidad de vida se ve sustancialmente afectada siempre que la EEO no se trate adecuadamente.

Hay una creciente incidencia y prevalencia de EEO. El retraso considerable entre el inicio de los síntomas y el diagnóstico sugiere que todavía hay médicos que no reconocen la enfermedad, lo que puede tener importantes implicaciones clínicas

Tratamiento:

Los tres pilares básicos en el tratamiento de la EEO son los siguientes: medicamentos, dietas de eliminación y dilatación endoscópica. Los dos primeros actúan sobre la inflamación, y el tercero actúa sobre la fibrosis establecida.

El tratamiento de la EEO podría comenzar con cualquiera de las dos opciones, ya sea medicamentos o dietas de eliminación. El primer paso en el tratamiento podría estar constituido por inhibidores de la bomba de protones (IBP), ya que estos medicamentos son bastante seguros. En pacientes que no responden a los IBP, el segundo paso podría ser la eliminación de dietas o corticoesteroides. El tratamiento debe ser individualizado de acuerdo con las preocupaciones y estilos de vida de cada paciente o su familia, y puede ser intercambiable con el tiempo.

Las estrategias terapéuticas a largo plazo y las mejores dosis de mantenimiento para las terapias farmacológicas aún no están bien definidas. Un enfoque razonable es disminuir la dosis al nivel más bajo que mantenga la remisión clínica e histológica hasta que haya más datos disponibles.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Nuestra hipótesis fundamental se centraba en saber si mediante la medición seriada de proteína E-catiónica en el suero de los pacientes, podamos hacer un seguimiento y evaluar la efectividad de la AIT en pacientes con EEO.

El objetivo principal es evaluar la ECP como marcador objetivo de mejora de la esofagitis eosinofílica mediante su medición en pacientes después de 3 años de AIT y dos años de suspensión de este tratamiento sin recaída de la enfermedad.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron pruebas a 129 pacientes con EEO para detectar alérgenos ambientales y alimentarios. Además, se realizaron análisis histológicos, botánicos y CRD. Las biopsias endoscópicas y las puntuaciones clínicas se realizaron cada seis meses durante cinco años. 15 pacientes sanos y 34 asmáticos por el polen fueron incluidos en el grupo control. A estos pacientes se les proporcionó información suficiente para decidir si recibían tratamiento habitual (corticoesteroides orales, inhibidores de la bomba de protones, dieta de 6 alimentos, etc) o inmunoterapia dirigida y dieta por diagnóstico de componentes. La hoja de información del paciente, el formulario de consentimiento informado y un nuevo consentimiento informado para el estudio de la biopsia histológica fueron aprobados por el Comité de ética del Hospital Universitario Río Hortega.

La inmunoterapia dirigida y dieta por diagnóstico de componentes se administró en 91 pacientes con EEO y el tratamiento convencional (inhibidores de la bomba de protones, dieta restrictiva, corticoesteroides) en el resto de los pacientes (38). Se recogió suero de todos los pacientes antes de la terapia y después de la supresión del tratamiento.

Después se compararon los niveles de ECP en el suero de 36 pacientes después de 3 años de inmunoterapia y 2 años de supresión de AIT debido a la resolución de esta enfermedad (resultados clínicos y biopsias negativas) con los niveles de ECP en los 38 pacientes que siguieron el tratamiento convencional.

El análisis ciego aleatorizado de niveles de ECP se realizó en todas las muestras de tratados (AIT/convencional) y sujetos control, y se correlacionaron con los hallazgos clínicos y endoscópicos de la evolución favorable de la enfermedad. Se extrajo sangre para la muestra de suero de cada paciente, posteriormente se centrifugó en tubos de poliestireno para su almacenamiento, en lugar de tubos de vidrio (para evitar la disminución de los valores de ECP). Las muestras se congelaron en una biblioteca a -20°C hasta el final del estudio (12).

El método elegido para medir los niveles de ECP en suero fue Immulite 2000 ECP Siemens, alemán, un ensayo inmuno-quimioluminiscente de fase sólida de dos sitios, que se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los valores esperados en nuestro laboratorio en individuos sanos fueron 8.33 ± 5.86 ng/mL. También seguimos el Comité Nacional de

Procedimientos de Normas de Laboratorio Clínico para la recolección de muestras de sangre diagnósticas (13).

La técnica de medición de los niveles de ECP con Immulite 2000 presenta un rango de calibración de hasta 200 ng/m y sensibilidad de 0,2 ng/mL.

Análisis estadístico:

Los niveles de ECP se describieron como media \pm desviación estándar (SD). Al inicio, se realizó una prueba post-hoc de ANOVA con Bonferroni para detectar diferencias entre grupos. La prueba Wilcoxon no paramétrica para muestras emparejadas se utilizó para comparar los medias pre y posteriores al tratamiento. Para determinar los mejores valores de corte para detectar EEO, se realizó un análisis de curva de características de funcionamiento de recepción (ROC) y se calcularon la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos. Para todas las pruebas, se estableció un nivel de significancia en $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

Antes del tratamiento, los niveles medios de ECP eran más altos en pacientes con EEO (de $46,6 \pm 37,7$ ng/ml) en relación con los grupos asmáticos (de $19,2 \pm 18,9$ ng/ml) y en los controles saludables (de $8,3 \pm 5,9$ ng/ml), con una diferencia intergrupo significativa ($p < 0,0001$).

Además, los niveles de ECP fueron más altos en los pacientes con EEO que en los pacientes asmáticos por el polen ($p < 0.001$) y en controles sanos ($p < 0.001$), mientras que no se detectaron diferencias entre sujetos asmáticos y sanos (Figura 1).

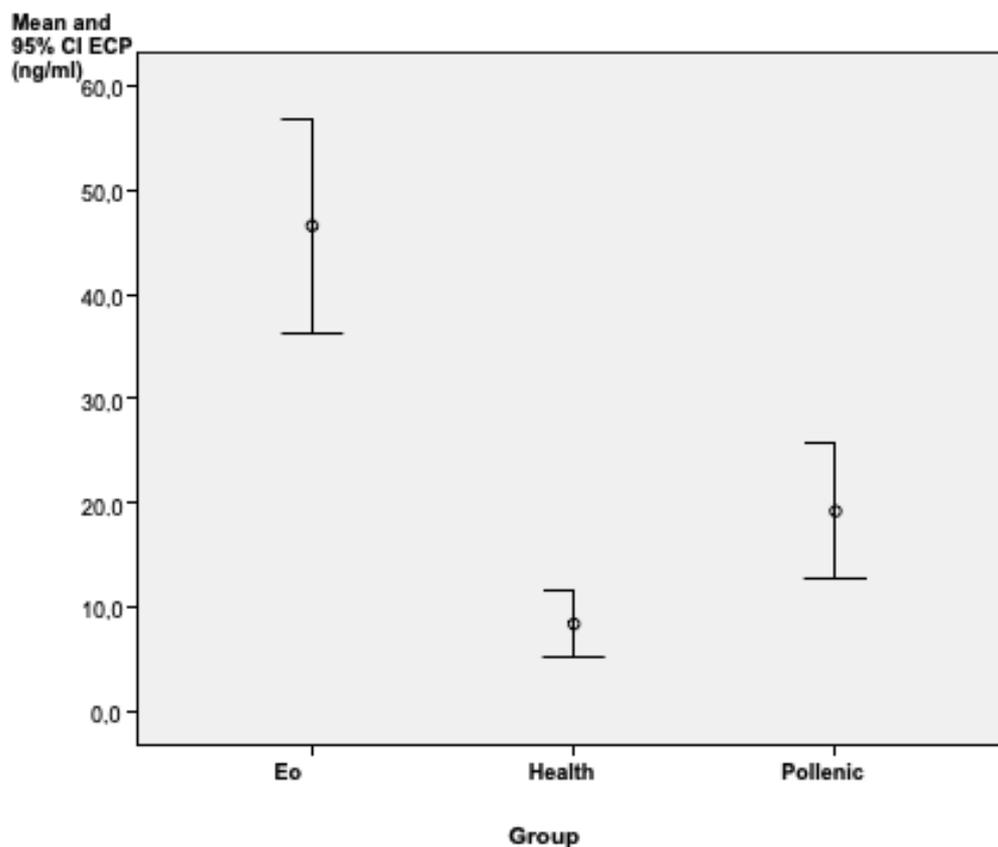


Figura 1. Media y niveles de ECP con IC 95% en pacientes con esofagitis eosinofílica, sanos y asmáticos por polen.

Para detectar EEO al inicio, los valores de ECP mostraron un área bajo la curva de 0,824.

El mejor corte se estableció en 13 ng/ml, con una sensibilidad del 90,7% y una especificidad del 67,3% (Figura 2).

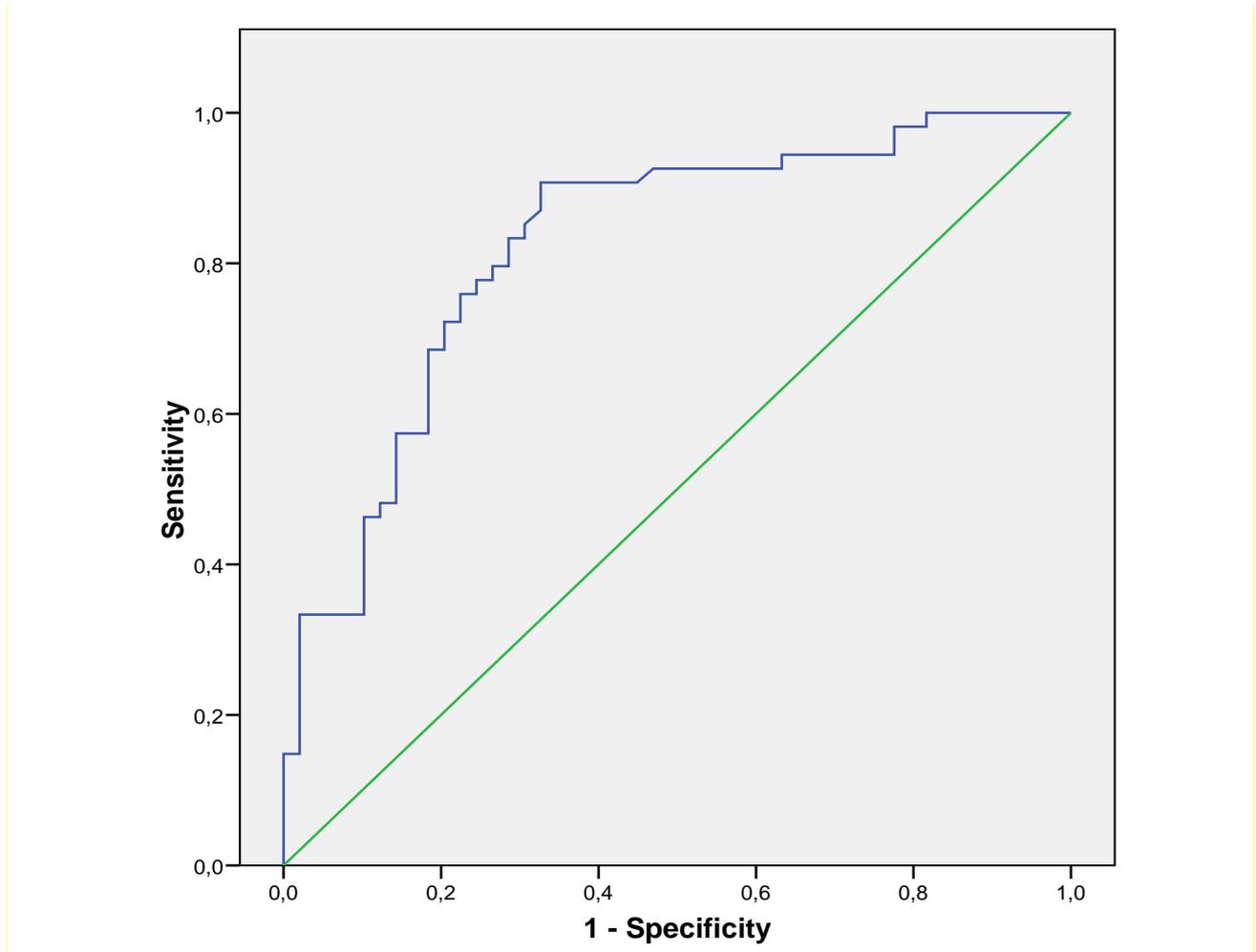


Figura 2. Análisis de ROC de curva para detectar EEO mediante la determinación de ECP (ng/mL).

	ECP = 20 ng/mL		ECP = 13 ng/mL	
	Value (%)	CI95%	Value (%)	CI95%
Sensitivity	75.9	63.6 – 88.2	90.7	82.1 – 99.4
Specificity	77.6	64.8 – 90.	67.3	53.2 – 81.5
Positive predictive value	78.8	66.8 – 90.9	75.4	64.1 – 86.6
Negative predictive value	74.5	61.6 – 87.4	86.8	74.8 – 98.9
Positive likelihood ratio	3.38	1.97 – 5.81	2.78	1.84 – 4.19
Negative likelihood ratio	0.31	0.19 – 0.51	0.14	0.06 – 0.32

Tabla 1. Estudio de prueba diagnóstica de ECP para detectar EEO.

Resulta obvio que lo ideal sería trabajar con pruebas diagnósticas de alta sensibilidad y especificidad, pero esto no siempre es posible. En general, las pruebas de screening deben ser de alta sensibilidad para poder captar a todos los enfermos. Una prueba muy sensible será especialmente adecuada en aquellos casos en los que el no diagnosticar la enfermedad puede resultar fatal para los enfermos, como ocurre con enfermedades peligrosas pero tratables, como los linfomas o la tuberculosis, o en enfermedades en las que un falso positivo no produzca serios trastornos psicológicos o económicos para el paciente (por ejemplo, la realización de mamografía en el cáncer de mama).

Por otra parte, la especificidad se refiere, como se señaló previamente, a la probabilidad de que un sujeto sano sea clasificado adecuadamente. En general, las pruebas confirmatorias del diagnóstico deben ser de alta especificidad, para evitar falsos positivos. Los tests de alta especificidad son necesarios en enfermedades graves, pero sin tratamiento disponible que las haga curables, cuando exista gran interés por conocer la ausencia de enfermedad o cuando diagnosticar a un paciente de un mal que realmente no padece pueda acarrear graves consecuencias, ya sean físicas, psicológicas o económicas (por ejemplo, en el caso del SIDA).

La progresión favorable de la enfermedad fue más frecuente en pacientes con AIT (39/40 pacientes, 97,5%) que en otras terapias (15/27 pacientes, 55,6%) ($p < 0.001$). Los pacientes tratados con AIT mostraron una disminución significativa de los niveles de ECP ($p < 0.001$), mientras que los pacientes con tratamiento convencional mostraron un aumento significativo pero leve después del tratamiento (Tabla 2).

Por otra parte, esta disminución significativa de los niveles de ECP se detectó por igual en pacientes con progresión de la enfermedad favorable o desfavorable ($p = 0,008$ y $p < 0,001$, respectivamente) (Tabla 2). Además, el análisis de la curva ROC (AUC, 0.441) detectó una ausencia de relación entre el ECP basal y la progresión de la enfermedad. CI95%, 0.314 – 0.569; pág. 0,372).

	N	Antes tratamiento	Después tratamiento	Sig.
Todos los pacientes	45	41.6 ± 32.4	29.4 ± 30.3	<0,001
Pacientes tratados con AIT	26	37.7 ± 29.5	14.3 ± 11.9	<0.001
Pacientes no tratados con AIT	19	46.8 ± 36.1	50.1 ± 35.6	<0.001

Tabla 2: Estadísticas de muestras relacionadas de niveles de ECP, en pacientes antes y después del tratamiento.

6. DISCUSIÓN

La esofagitis eosinofílica es una enfermedad alérgica reconocida. Actualmente la única manera de diagnosticar la EEO es con una endoscopia y una biopsia del esófago. Eliminar los principales alérgenos alimentarios de la dieta antes de cualquier prueba de alergia alimentaria es un tratamiento aceptado de EEO. Los alimentos excluidos generalmente incluyen: lácteos, trigo, soja, cacahuete, frutos secos y peces/mariscos. Estas dietas han demostrado ser útiles en algunos tratamientos para EEO, aunque pueden ser muy difíciles de seguir. Por lo general, los alimentos se añaden de uno en uno con endoscopias de seguimiento para asegurarse de que EEO permanece controlada, pero la recaída es muy frecuente.

Actualmente, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) no aprueba medicamentos para tratar la EEO. Sin embargo, se han demostrado medicamentos para reducir el número de eosinófilos en el esófago y mejorar los síntomas. Los corticosteroides, que controlan la inflamación, son los medicamentos más útiles para el tratamiento de la EEO. Ingerir pequeñas dosis de corticoesteroides es el tratamiento más común. Existen diferentes formas de corticoesteroides ingeridos. Al principio, se pueden necesitar dosis más altas para controlar la inflamación, pero las dosis más altas están relacionadas con un mayor riesgo de efectos secundarios.

Inhibidores de la bomba de protones (IBP), que controlan la cantidad de ácido producido, también se han utilizado para ayudar a diagnosticar y tratar EEO. Algunos pacientes responden bien a los IBP y tienen una gran disminución en el número de eosinófilos e inflamación cuando se realiza una endoscopia y una biopsia de seguimiento. Sin embargo, los IBP también pueden mejorar los síntomas de la EEO sin mejorar la inflamación (6)(7).

La investigación de los últimos años ha contribuido a una mejor comprensión de la evaluación de la EEO y de la actividad de la enfermedad, pero es necesario avanzar en la evaluación de herramientas diagnósticas mínimamente invasivas, y nuevos enfoques terapéuticos.

Hemos descubierto que la inmunoterapia dirigida y dieta por diagnóstico de componentes era eficiente en el tratamiento de pacientes con EEO y bien tolerada. El análisis de biopsias utilizando métodos de histología vegetal puede mostrar tubos de polen en la mucosa esofágica. Los eosinófilos parecían actuar como si estuvieran respondiendo a infecciones parasitarias. El diagnóstico resuelto por componentes (CRD) con microarrays podría detectar posibles alérgenos involucrados e indicar una dieta de eliminación e inmunoterapia con alérgenos (AIT).

En toda forma de tratamientos debe ser necesario controlar su eficacia. Los métodos más comunes se basan en puntuaciones subjetivas clínicas y endoscopia con biopsia. Propusimos un método analítico simple, la medición de niveles de ECP.

Entre las cuatro proteínas de gránulos básicos, la proteína catiónica eosinófila (ECP) ha demostrado ser un monitor útil para muchas enfermedades inflamatorias activas y es producida exclusivamente por eosinófilos. Varios estudios reportan altas correlaciones individuales y grupales entre los niveles de ECP y los síntomas clínicos del asma, como aumentos en el flujo espiratorio máximo (PEF), capacidad de respuesta de las vías respiratorias con β 2-agonista y espirometría (8)(9). Las muestras séricas atópicas tienen niveles de ECP más altos que las muestras de control no atópico, incluso cuando el recuento de eosinófilos circulantes permanece dentro del rango normal (8). En pacientes asmáticos estacionales, las mediciones de ECP reflejan cambios en la actividad de la enfermedad a lo largo del año. Se han notificado correlaciones significativas entre los niveles de ECP y la hiperreactividad bronquial en pacientes levemente asmáticos (10).

Las mediciones séricas de ECP evitan incoherencias inherentes a las evaluaciones subjetivas y pueden indicar la gravedad de ciertos trastornos de la piel (11)(12).

La naturaleza objetiva de las mediciones ECP séricas presenta una ventaja sobre las medidas clínicas subjetivas, que son propensos a incoherencias derivadas de la amplia gama en evaluaciones individuales de investigadores y pacientes.

Varias necesidades no satisfechas deben resolverse urgentemente en la EEO, ya que la búsqueda de métodos de control de enfermedades no invasivos y biomarcadores para la práctica de rutina, el desarrollo o nuevas terapias, nuevas pruebas de alergia alimentaria para detectar alimentos desencadenantes, medicamentos y dosis necesarias para la terapia inicial y problemas de seguridad con la terapia de mantenimiento a largo plazo, entre otros. Además, las unidades de gestión multidisciplinarias de EEO, incluyendo gastroenterólogos, pediatras, alergólogos, anatomopatólogos, dietistas y todo especialista necesario.

7. CONCLUSIONES

Se ha demostrado que la medición de la proteína E catiónica puede ser útil para controlar la eficacia de la inmunoterapia específica como tratamiento en EEO, ya que se puede utilizar como un marcador de actividad de la enfermedad. De este modo, podría cambiarse la forma de enfocar el diagnóstico y seguimiento de estos pacientes evolucionando hacia un manejo menos invasivo y más cómodo tanto para el paciente como para los propios profesionales (pudiendo además resultar en un ahorro económico importante para el sistema).

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a la Dra. Armentia su dedicación, tiempo y ayuda para la realización de este trabajo.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Galeana DFB, Yamazaki DMA. Eosinófilos: Revisión de la literatura. 2003;12:8.
2. Galeana DFB, Yamazaki DMA. Eosinófilos: Revisión de la literatura. 2003;12:8.
3. Badillo CL, Mendoza D, López JGH. La historia del eosinófilo, su papel fisiopatológico y manifestaciones clínicas de la eosinofilia. 2018;27:15.
4. Álvarez A, Sánchez C, Garrido G, Guevara M, Riaño A, Varona P, et al. Características de la Proteína Catiónica del Eosinófilo (ECP) y su Uso como Marcador de la Activación Eosinofílica en Procesos Patológicos Inflamatorios. *Acta Farm Bonaer*. 2005;24:9.
5. Actualización terapéutica en esofagitis eosinofílica [Internet]. [citado 7 de mayo de 2020]. Disponible en: <http://actagastro.org/actualizacion-terapeutica-en-esofagitis-eosinofilica/>
6. Gomez Torrijos E, Gonzalez-Mendiola R, Alvarado M, Avila R, Prieto-Garcia A, Valbuena T, et al. Eosinophilic Esophagitis: Review and Update. *Front Med*. 2018;5:247.
7. Armentia A, Martín-Armentia S, Álvarez-Nogal R, Armentia BM, Gayoso MJ, Fernández-González D. Germination of pollen grains in the oesophagus of individuals with eosinophilic oesophagitis. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2019;49(4):471-3.
8. Tomassini M, Magrini L, Petrillo GD, Adriani E, Bonini S, Balsano F, et al. Serum levels of eosinophil cationic protein in allergic diseases and natural allergen exposure. *J Allergy Clin Immunol*. 1 de junio de 1996;97(6):1350-5.
9. Mogensen I, Alving K, Dahlen S-E, James A, Forsberg B, Ono J, et al. Fixed airflow obstruction relates to eosinophil activation in asthmatics. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2019;49(2):155-62.
10. Roquet A, Halldén G, Ihre E, Hed J, Zetterström O. Eosinophil activity markers in peripheral blood have high predictive value for bronchial hyperreactivity in patients with suspected mild asthma. *Allergy*. julio de 1996;51(7):482-8.
11. Amber KT, Chernyavsky A, Agnoletti AF, Cozzani E, Grando SA. Mechanisms of pathogenic effects of eosinophil cationic protein and eosinophil-derived neurotoxin on human keratinocytes. *Exp Dermatol*. 2018;27(12):1322-7.
12. Czech W, Krutmann J, Schöpf E, Kapp A. Serum eosinophil cationic protein (ECP) is a sensitive measure for disease activity in atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. abril de 1992;126(4):351-5.
13. Jo SY, Lee C-H, Jung W-J, Kim S-W, Hwang Y-H. Common features of atopic dermatitis with hypoproteinemia. *Korean J Pediatr*. noviembre de 2018;61(11):348-54.
14. Reimert CM, Poulsen LK, Bindslev-Jensen C, Kharazmi A, Bendtzen K. Measurement of eosinophil cationic protein (ECP) and eosinophil protein X/eosinophil derived neurotoxin (EPX/EDN). Time and temperature dependent spontaneous release in vitro demands standardized sample processing. *J Immunol Methods*. 3 de diciembre de 1993;166(2):183-90.
15. Rubira N, Rodrigo MJ, Pena M, Nogueiras C, Cruz MJ, Cadahia A. Blood sample

- processing effect on eosinophil cationic protein concentration. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol*. abril de 1997;78(4):394-8.
16. Ram G, Lee J, Ott M, Brown-Whitehorn TF, Cianferoni A, Shuker M, et al. Seasonal exacerbation of esophageal eosinophilia in children with eosinophilic esophagitis and allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol*. septiembre de 2015;115(3):224-228.e1.
17. Juhlin L, Venge P. Eosinophilic cationic protein (ECP) in skin disorders. *Acta Derm Venereol*. 1991;71(6):495-501.
18. Wardlaw AJ. Eosinophils in the 1990s: new perspectives on their role in health and disease. *Postgrad Med J*. agosto de 1994;70(826):536-52.
19. Vatrella A, Ponticiello A, Parrella R, Romano L, Zofra S, DiLeva A, et al. Serum eosinophil cationic protein (ECP) as a marker of disease activity and treatment efficacy in seasonal asthma. *Allergy*. agosto de 1996;51(8):547-55.
20. D'Amato G, Liccardi G, Russo M, Saggese M, D'Amato M. Measurement of serum levels of eosinophil cationic protein to monitor patients with seasonal respiratory allergy induced by *Parietaria* pollen (treated and untreated with specific immunotherapy). *Allergy*. abril de 1996;51(4):245-50.
21. Sastre B, Rodrigo-Muñoz JM, Garcia-Sanchez DA, Cañas JA, Del Pozo V. Eosinophils: Old Players in a New Game. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2018;28(5):289-304.
22. Armentia A, Martín-Armentia S, Martín-Armentia B, Santos-Fernández J, Álvarez R, Madrigal B, et al. Is eosinophilic esophagitis an equivalent of pollen allergic asthma? Analysis of biopsies and therapy guided by component resolved diagnosis. *Allergol Immunopathol (Madr)*. abril de 2018;46(2):181-9.

ANEXOS: APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA HOSPITALARIA Y PÓSTER.



Universidad de Valladolid
Facultad de Medicina

MONITORIZACIÓN DE LA PROTEÍNA E CATIÓNICA PARA EVALUAR LA EFICACIA DE LA INMUNOTERAPIA EN LA ESOFAGITIS EOSINOFÍLICA

Autores: Elena Criado Albillos, Sara Ramos Alonso. Tutor: Alicia Armentia. Cotutor: Sara Martín-Armentia



HOSPITAL UNIVERSITARIO
RÍO HORTEGA

INTRODUCCIÓN

La proteína E-catiónica ha demostrado ser un marcador útil para la monitorización de muchas enfermedades eosinofílicas activas. En los últimos años, se han tratado con éxito a pacientes con esofagitis eosinofílica (EEO) con inmunoterapia dirigida (AIT) y una dieta por un diagnóstico por componentes (CRD).

HIPÓTESIS

¿Es posible que, mediante la medición seriada de proteína E-catiónica en el suero de los pacientes, podamos hacer un seguimiento y evaluar la efectividad de la AIT en pacientes con EEO?

MATERIAL Y MÉTODOS

1º Comparación niveles de ECP en:

Esofagitis eosinofílica (129)	46,6 ± 37,7 ng/mL
Asmáticos (34)	19,2 ± 18,9 ng/mL
Sanos (15)	8,3 ± 5,9 ng/mL

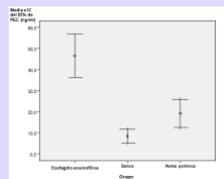


Figura 1. Media y niveles de ECP con IC 95% en pacientes con esofagitis eosinofílica, sanos y asmáticos por polen.

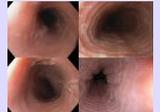
OBJETIVO

El propósito de esta investigación es encontrar un método no invasivo con el que hacer un seguimiento a los pacientes que padecen EEO y monitorizar la respuesta al tratamiento con AIT.

2º Comparación niveles de ECP en:

Pacientes EEO (129)	Tratamiento con	AIT (26)	Medición ECP
		Convencional (19)	Medición ECP

3º Correlación con hallazgos endoscópicos:



Hallazgos endoscópicos en Esofagitis Eosinofílica.

RESULTADOS

Se midieron los niveles más altos de ECP en pacientes con EEO con respecto a los pacientes asmáticos por polen, y superiores en ambos procesos con respecto a pacientes sanos. En pacientes tratados con AIT, se observó una marcada disminución de la ECP, significativamente mayor que en pacientes con tratamiento convencional. Esta mejora se correlacionó significativamente con los hallazgos clínicos y endoscópicos de la evolución favorable de la enfermedad.

	N	Antes trat.	Después	Sig.
Todos pacientes	45	41.6 ± 32.4	29.4 ± 30.3	<0,001
Pacientes con AIT	26	37.7 ± 29.5	14.3 ± 11.9	<0,001
Pacientes sin AIT	19	46.8 ± 36.1	50.1 ± 35.6	<0,001

Tabla. Estadísticas de muestras relacionadas de niveles de ECP, en pacientes antes y después del tratamiento.

CONCLUSIÓN

Se ha demostrado que la medición de la proteína E-catiónica puede ser útil para controlar la eficacia de la inmunoterapia específica como tratamiento en EEO, ya que se puede utilizar como un marcador de actividad de la enfermedad. De este modo, podría cambiarse la forma de enfocar el diagnóstico y seguimiento de estos pacientes evolucionando hacia un manejo menos invasivo y más cómodo tanto para el paciente como para los propios profesionales.

BIBLIOGRAFÍA

Armentia A, Martín-Armentia S, Álvarez-Nogal R, Armentia BM, Gayoso MJ, Fernández-González D. Germination of pollen grains in the oesophagus of individuals with eosinophilic oesophagitis. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* 2019;49(4):471-3
 Armentia A, Martín-Armentia S, Martín-Armentia B, Santos-Fernández J, Álvarez R, Madrigal B, et al. Is eosinophilic esophagitis an equivalent of pollen allergic asthma? Analysis of biopsies and therapy guided by component resolved diagnosis. *Allergol Immunopathol (Madr)*. abril de 2018;46(2):181-9

INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS (CEIm)

Dña. ROSA Mª CONDE VICENTE, Secretario del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos (CEIm) del Área de Salud Valladolid Oeste

CERTIFICA:

Que este Comité ha tenido conocimiento del Proyecto de Investigación, Trabajo Fin de Grado (TFG), titulado: **“Monitorización de la proteína e catiónica para valorar la eficacia de la inmunoterapia en la esofagitis eosinofílica”**, Ref. CEIm: **PI014-20**, Protocolo versión 1.0, y considera que:

Una vez evaluados los aspectos éticos del mismo, acuerda que no hay inconveniente alguno para su realización, por lo que emite **INFORME FAVORABLE**.

Este Proyecto de Investigación será realizado por las alumnas **Dª Elena Criado Albillos** y **Dª Sara Ramos Alonso**, siendo su tutora en el Hospital Universitario Río Hortega la **Dr. Alicia Armentia Medina**.

Lo que firmo en Valladolid, a 20 de Febrero de 2020

ROSA MARIA
CONDE
VICENTE - DNI
09296839D

Firmado digitalmente
por ROSA MARIA
CONDE VICENTE - DNI
09296839D
Fecha: 2020.02.20
10:14:10 +01'00'

Fdo. Dña. Rosa Mª Conde Vicente
Secretario Técnico CEIm