

Características de la Proteína Catiónica del Eosinófilo (ECP) y su Uso como Marcador de la Activación Eosinofílica en Procesos Patológicos Inflamatorios

Alina ÁLVAREZ¹, Carlos SÁNCHEZ¹, Gabino GARRIDO^{1*}, Mariela GUEVARA¹,
Annia RIAÑO¹, Patricia VARONA² & Juana M. RODRÍGUEZ³

¹ Laboratorio de Farmacología, Centro de Química Farmacéutica (CQF),
Apartado Postal 16042, 200 y 21, Atabey, Playa, La Habana, Cuba.

² Instituto Nacional de Higiene y Epidemiología (INHEM), La Habana, Cuba.

³ Hospital Pediátrico Docente "Juan Manuel Márquez", Marianao, La Habana, Cuba

RESUMEN. El marcador más utilizado en los últimos años para medir el comportamiento de diferentes patologías asociadas a procesos inflamatorios alérgicos tales como el asma, la rinitis alérgica y la dermatitis, entre otros, es la proteína cationica del eosinófilo (ECP), la cual es un indicador importante de la actividad de los granulocitos eosinofílicos. Fue obtenida por primera vez a inicios de la década de los años 1970 a partir de pacientes leucémicos, pero años después se esclareció su origen y se determinó que procedía de los eosinófilos. Frecuentemente es determinada en suero/plasma, pero las mediciones en el esputo parecen ser un reflejo más exacto del comportamiento de la ECP en el proceso local. A partir de su descubrimiento, han sido publicados diferentes artículos que describen sus características moleculares y funciones, así como su distribución en los diferentes tejidos y fluidos del organismo en circunstancias patológicas. El presente trabajo aborda la situación actual de esta proteína en el campo de las investigaciones biomédicas y su fuente potencial como herramienta para predecir la activación eosinofílica.

SUMMARY. "The Eosinophil Cationic Protein (ECP) Characteristic and its Use as a Marker of the Eosinophil Activation in Inflammatory Pathological Processes". The marker more used in the last years to measure the behaviour of different pathologies associated to such allergic inflammatory processes as the asthma, the allergic rhinitis and the dermatitis, among other, is the eosinophil cationic protein (ECP), which is an important indicator of the activity of the eosinophils granulocyte. It was obtained at the beginning of 1970 decade from patients with leukaemia, but some years later its origin was clarified and it was determined that it came from the eosinophils. Frequently it is determined in serum/plasma, but the measurements in the sputum seem to be a more exact reflection of the behaviour of the ECP in the local process. Starting from its discovery, different articles have been published describing its molecular characteristics and work, as well as its distribution in the different tissues and fluids of the organism in pathological circumstances. The present work approaches the current status of this protein in the field of the biomedical investigations and its potential source as tool to predict the eosinophil activation.

INTRODUCCIÓN

El eosinófilo pertenece al grupo de los granulocitos polimorfonucleares, que son originados a partir de la cascada hematopoyética. Su función principal es probablemente matar parásitos invasores, por lo que es capaz de fagocitar partículas bacterianas, pero principalmente su mecanismo aniquilador se basa en la producción de radicales libres y sobre todo en la liberación de gránulos proteicos tóxicos; también son productores de citocinas y mediadores inflamatorios como el leucotrieno C₄ (LTC₄) y el factor activador plaquetario (PAF)¹. Sin embargo,

en ausencia de parásitos, los eosinófilos activados pueden causar destrucción de los tejidos e inflamación^{2,3}. Además, un número de enfermedades inflamatorias están asociadas con eosinofilia: asma, rinitis alérgica, enfermedades atópicas de la piel, síndrome hipereosinofílico idiopático y enfermedades inflamatorias intestinales¹.

En el caso específico de la inflamación alérgica están involucradas un gran número de células, sin embargo solo tres de ellas parecen tener un rol protagónico en este proceso: los granulocitos eosinofílicos, los mastocitos y los linfocitos cooperadores tipo II (Th₂), donde los eo-

PALABRAS CLAVE: Activación, ECP, Eosinófilos, Inflamación.

KEY WORDS: Activation, ECP, Eosinophil, Inflammation.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: gabino.garrido@infomed.sld.cu.

sinófilos, junto con los mastocitos, son las principales células efectoras. La liberación por los eosinófilos de potentes proteínas citotóxicas como la ECP condiciona el desarrollo de síntomas agudos y subcrónicos de alergia ⁴. Esta proteína fue purificada por primera vez en 1971 a partir de gránulos de células mieloides obtenidas de pacientes con leucemia mieloide crónica, pero no fue hasta 1975 que fue descrito claramente que dicha proteína es originaria de los gránulos eosinofílicos ^{5,6}. El detallado conocimiento de esta molécula, de su actividad biológica y su relación con la activación eosinofílica, constituye hoy en día una información muy valiosa para los especialistas que investigan las enfermedades inflamatorias asociadas a procesos alérgicos.

CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LA ECP

La ECP posee un peso molecular de 16-22 kDa. Esta presenta homología aminoácida con proteínas de la familia de las ARNasas. La cantidad de Zn/mol de ECP es de 2,5 moles y su contenido celular en eosinófilos normales es de 10 mg/106 células..

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 aminoácida; hasta el presente se han encontrado seis variantes de ella. Esta proteína también es conocida como “ribonucleasa 3” (ARNasa 3) debido a su homología con ribonucleasas humanas y con otras de diferentes vertebrados. También la ECP muestra un 67% de homología con otra proteína que es liberada por los eosinófilos: la neurotoxina derivada del eosinófilo (EPX/EDN), pero con respecto a su actividad ARNasa es muy débil (solo un 1% de la actividad de la EPX/EDN), a pesar de que tres

residuos importantes para la actividad ARNasa están situados en ambas proteínas en similares posiciones. Por otra parte, la ECP tiene un punto isoeléctrico de 10,8 (alto en comparación con otras proteínas de la misma familia). Esto es debido a su rico 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 ⁷.

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE LA ECP

La ECP es una potente molécula citotóxica con capacidad de matar diferentes poblaciones celulares ya sean originarias de mamíferos o no ⁷; también le son atribuidas otras funciones asociadas a alteraciones en el funcionamiento de diferentes sistemas de órganos y numerosos tejidos en el organismo (Tabla 1). El mecanismo citotóxico probablemente ocurra debido a la capacidad de la ECP de construir poros en las membranas celulares que permiten el tránsito de agua y pequeñas moléculas, lo que afecta la integridad celular y provoca la lisis osmótica ⁸.

Otros de los sitios de acción de la ECP es el cerebro. Experimentos realizados en la década de los años 1980 demostraron que la administración de pequeñas concentraciones de ECP en el fluido cerebro-espinal de conejillos de indias produjo la destrucción de las células de Purkinje del cerebelo y fue mucho más potente que la EPX/EDN ⁹. Además, esta proteína se obtuvo por vía recombinante, eliminando su actividad ARNasa, con el objetivo de determinar si las funciones de ella estaban asociadas con su estructura. A pesar de esta modificación, la ECP tuvo actividad citotóxica en presencia de bacterias, efecto independiente de su actividad ARNasa ¹⁰. En modelos experimentales de insectos, se

EFECTOS CITOTÓXICOS	EFECTOS NO CITOTÓXICOS
Aniquilamiento de parásitos y células tumorales. Neurotoxicidad. Daño respiratorio epitelial. Actividad antibacteriana. Actividad antiviral.	Inhibición de la proliferación de linfocitos T. Liberación de histamina por los basófilos. Activación de las células mastocitarias del corazón. Alteración de la producción de proteoglicanos por los fibroblastos. Estimulación de la secreción de mucus en las vías aéreas. Alteración en la cascada de la coagulación. Antagonista de la heparina. Inhibición de la estreptocinasa. Interacción con el sistema del complemento. Inducción de moléculas de adhesión y factores de crecimiento en células epiteliales.

Tabla 1. Propiedades Funcionales de la ECP.

demonstró que esta proteína poseía actividad antiviral ⁷.

La ECP presenta efectos no citotóxicos *in vitro* ⁸. Entre ellos pueden incluirse la inhibición de la proliferación de la respuesta de células T frente a los antígenos, la interferencia con la síntesis de inmunoglobulinas por células B y la liberación de histamina y triptasa por los mastocitos del corazón, aunque también influye sobre la liberación de histamina que realizan los basófilos ¹¹. En células epiteliales, la ECP incrementa la expresión de varios receptores y ligandos como el factor de crecimiento asociado a la insulina-1 (IGF-1) y la molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) ¹². Todas estas evidencias permiten afirmar que los eosinófilos pudieran ejercer un efecto inmunomodulador en el organismo a través de la secreción de la ECP.

Por otra parte, la ECP estimula la secreción de mucus en las vías aéreas ¹³, el cual desempeña un papel muy importante en los procesos de reparación de los tejidos y es indicativo de la presencia eosinofílica en los procesos fibróticos. Estos resultados pudieran ser de particular importancia en la comprensión del rol que juegan los eosinófilos en enfermedades como el asma.

Además de estos efectos la ECP tiene otras funciones biológicas de gran importancia, ya que esta proteína también es capaz de actuar sobre la coagulación y la fibrinólisis. Se ha demostrado que, a bajas concentraciones, la ECP acorta el tiempo de coagulación del plasma por mecanismos asociados con el incremento de la actividad del factor XII. Si se aumentan demasiado estas concentraciones se produce un retardo de este proceso. El efecto de esta proteína sobre la fibrinólisis consiste en un aumento del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA). También la ECP tiene la capacidad de interactuar con proteínas que participan en la cascada del complemento. Es importante destacar que la mayoría de los efectos atribuidos a la ECP ocurren a concentraciones *in vitro* que son comparables con aquellas que ocurren *in vivo* (10^{-9} - 10^{-6} mol/L), aunque en determinadas circunstancias pudieran incrementarse ⁷.

Hasta el momento, la actividad de la ECP puede ser regulada *in vivo* y a ello se le atribuyen los principios reguladores siguientes: a) la heparina, en virtud de su naturaleza ácida, es capaz de unirse a la ECP formando un complejo molecular 1:1 y neutralizar su actividad y b) la interacción en ciertas condiciones con la α_2 -macroglobulina también neutraliza su acción; este puede ser un importante mecanismo de neutra-

lización debido a su interacción con los componentes del plasma ¹⁴.

LOCALIZACIÓN Y SECRECIÓN DE LA ECP

La ECP es sintetizada en los promielocitos. En los progenitores eosinofílicos obtenidos a partir de médula ósea humana, la ECP es encontrada uniformemente distribuida en gránulos primarios grandes, redondos, caracterizándose por ser organelos densamente homogéneos, pero también aparece en estados mielocíticos de diferenciación eosinofílica, en este caso en los eosinófilos maduros obtenidos donde la ECP es localizada en la matriz de gránulos específicos. Estos resultados se obtuvieron a partir del uso de técnicas inmuno-electrónicas y de fraccionamiento subcelular con anticuerpos monoclonales contra diferentes epítopes de la molécula de ECP ⁷. Estos resultados corroboran otras investigaciones realizadas, las cuales también determinaron que esta proteína se encuentra en pequeños gránulos en los que se almacenan arilsulfatasas y fosfatasas ácidas ¹⁵.

Con respecto a la identificación de los eosinófilos en los tejidos, se han utilizado los anticuerpos monoclonales EG2 y EG1. El primero permite identificar la presencia de eosinófilos activados y el segundo reconoce todos los eosinófilos, estén activados o no ¹⁶. Sin embargo, otros autores se cuestionan la veracidad de estos resultados ¹⁷ y otros reportan la presencia de la ECP en los neutrófilos ¹⁸. La explicación para estos resultados, aparentemente contradictorios, radica en el hecho de que la ECP es tomada del ambiente por los neutrófilos y se acumula en los gránulos primarios de estas células, por lo que no existen evidencias experimentales que la ECP sea producida en modo alguno por los granulocitos neutrofilicos ^{7, 19}. Además, la variación en los niveles de la ECP puede ocurrir en los tejidos, pero también puede tener lugar *ex vivo* por una mala manipulación experimental, debido a una pérdida de la proteína en preparaciones maltratadas y donde existan células débilmente fijadas ⁷.

Por otra parte, un gran número de estímulos son capaces de inducir la secreción de gránulos proteicos a partir de los eosinófilos humanos ⁷, no sólo la ECP y la EPX/EDN, sino también la mieloperoxidasa del eosinófilo (EPO) y la proteína básica mayor (MBP), aunque la EPX/EDN también es producida en pequeñas cantidades por los neutrófilos ^{7, 20} y la MBP también se ha encontrado en los basófilos ¹.

Entre los diferentes estímulos que inducen la secreción de ECP en eosinófilos se encuentran las inmunoglobulinas (Igs) tales como IgE e IgG, diferentes quimiocinas como la proteína secretada y expresada sobre células T, regulada a partir de una activación (RANTES) y la proteína inhibitoria macrofágica 1α (MIP- 1α) y proteínas de la cascada del complemento como C5a y C3a, aunque existen otros como el PAF y estímulos solubles como el ionóforo de calcio (A-23187) y el compuesto quimiotáctico f-MLP (N-formil-metionil-leucil-fenilalanina). Además, en los eosinófilos obtenidos a partir de pacientes atópicos expuestos a alérgenos como el polen y pacientes con síndrome hipereosinofílico se encontraron evidencias que demostraron una producción elevada de gránulos proteicos, probablemente debido a la acción de diferentes citocinas ⁷. Existen evidencias experimentales que demuestran la acción reguladora de diferentes citocinas sobre la desgranulación eosinofílica tales como la IL-3, la IL-5 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) ²¹. La IL-5, la IL-8 y la RANTES han sido reportadas como los principales agentes quimiotácticos eosinofílicos en determinados fluidos biológicos ^{1,22}. En el caso específico de la IL-5 también se ha demostrado que es capaz de promover la liberación de ECP a través de la activación de C3b ⁷.

Por otra parte, es importante destacar los mecanismos involucrados en la liberación de los eosinófilos. Se conoce hasta el momento que los complejos IgG inducen la liberación selectiva de la ECP, mientras la IgE induce la liberación de EPO. La liberación de EPO y de la MBP fue demostrada después de la exposición de eosinófilos hipodensos a complejos de IgE, mientras que la ECP no fue liberada. Las diferencias en la respuesta eosinofílica a diferentes estímulos han sido vinculadas a las diversas señalizaciones intracelulares y los receptores involucrados en ellos. Los receptores que están involucrados en la activación de la señal para la desgranulación de los eosinófilos parecen acoplarse con segundos mensajeros como las proteínas G. También se ha conocido que la desgranulación de los eosinófilos humanos es inhibida por bloqueadores de la familia de las tirosina-cinasas (genisteína), la que puede estar involucrada en desencadenar una cascada de señales que pudiera promover la desgranulación eosinofílica ⁷, pero se necesitan esclarecer aún más estos incipientes hallazgos.

Varias drogas son capaces de afectar la se-

creción eosinofílica *in vitro*. Los inmunosupresores ciclosporina A y la rapamicina inhiben la producción de ECP inducida por la IL-5 ²³ y el permirolast, un agente antialérgico, la producción de ECP inducida por el compuesto A-23187 ²⁴.

MEDICIONES DE LA ECP EN VARIOS FLUIDOS BIOLÓGICOS

Determinados niveles de la ECP en varios fluidos biológicos han sido medidos en numerosas y diferentes condiciones patológicas, lo que refleja una marcada activación eosinofílica en determinadas enfermedades tales como el asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), conjuntivitis, enfermedades inflamatorias intestinales (IBD), rinitis alérgica y artritis reumatoide, entre otras (Tabla 2).

DETERMINACIONES EN SUERO/PLASMA

La ECP puede ser medida tanto en suero como en plasma. Si es seleccionado el plasma para trabajar con las muestras sanguíneas se deben utilizar anticoagulantes como el ácido etilendiaminotetracético (EDTA) o el citrato de sodio para evitar la liberación espontánea de la ECP y por lo tanto su interacción con la heparina. Evidencias experimentales demuestran que este tipo de medición es muy limitada y en muchos casos no es recomendable su uso. En relación con el suero, los niveles de la ECP son mucho más altos y consistentes que en el plasma debido a que en el recipiente donde se toma la muestra sanguínea se sigue liberando extracelularmente la ECP, mientras que como ya se había mencionado anteriormente al añadir el anticoagulante se inactivan los eosinófilos y por lo tanto no son capaces de liberar ningún gránulo proteico *ex vivo*.

La liberación extracelular de ECP es un proceso activo que depende tanto del tiempo como de la temperatura, por lo que si se trabaja con el suero debe existir una estricta estandarización del procedimiento de manipulación de las muestras sanguíneas para evitar variaciones artificiales e inaceptables de los niveles de la ECP. En este caso, se recomienda que las muestras de sangre sean tomadas en tubos en presencia de un gel separador y que la coagulación sea llevada a cabo por espacio de una hora a 22 °C antes de la centrifugación y posterior separación del suero. Pueden ser utilizados tanto tubos de cristal como de plástico, sin embargo las diferencias en los materiales a utilizar y la inclusión de los activadores de la coagulación en los tu-

FLUIDOS BIOLÓGICOS	PATOLOGÍAS ASOCIADAS
<i>Suero/Plasma</i>	Asma Dermatitis atópica Fibrosis quística Rinitis alérgica
<i>Espuito</i>	Asma COPD Rinitis Alérgica Fibrosis quística Displasia bronco-pulmonar
<i>Lavado broncoalveolar (BAL)</i>	Asma Fibrosis pulmonar idiopática Neumonía eosinofílica crónica Rechazo a transplantes pulmonares
<i>Secreciones nasales</i>	Rinitis Alérgica
<i>Fluidos lagrimales</i>	Diferentes tipos de conjuntivitis
<i>Fluidos yeyunales y heces fecales</i>	Colitis ulcerativa (IBD) Enfermedad de Crohn (IBD)
<i>Fluido sinovial</i>	Artritis Reumatoide
<i>Saliva</i>	Asma

Tabla 2. Medición de ECP en fluidos biológicos y patologías asociadas.

Los niveles de la ECP pueden afectar los niveles de la ECP; esto significa que los rangos normales para medir la proteína tienen que ser preparados de acuerdo a las condiciones de cada laboratorio y no siguiendo específicamente las recomendaciones del fabricante. Los niveles de la ECP en EDTA/plasma probablemente reflejen correctamente los niveles circulantes de la ECP en el momento de la toma de la muestra. Estos niveles son la consecuencia de la producción y eliminación de la ECP; por ejemplo, la liberación local o sistémica de la proteína a la circulación, así como las variaciones en su retorno, por lo que los incrementos en la liberación de la ECP a la circulación en ciertas enfermedades no siempre conllevan a los incrementos anticipados en los niveles plasmáticos. En el caso del suero, además de los niveles circulantes de la ECP se reflejan la actividad secretora de la población de los eosinófilos en la sangre y como los niveles en suero son en su mayoría entre cinco y diez veces aquellos que se encuentran en el plasma, se ha planteado que es la actividad secretora eosinofílica la que determina los niveles; o sea que la actividad secretora es el resultado de la concentración de los eosinófilos en la sangre y por lo tanto la tendencia de los eosinófilos a liberar la ECP. En cuanto a la interpretación de este fenómeno, se plantea que los niveles del suero reflejan la tendencia de la población de los eosinófilos a liberar la ECP en un proceso específico que se genere a nivel local, por ejemplo en los pulmones de los pacientes asmáticos ^{4,7}.

Cientos de artículos publicados correlacionan

los niveles de la ECP con estados alérgicos y determinadas enfermedades asociadas a procesos inflamatorios. La mayoría de estas publicaciones muestran que la ECP proporciona información sobre los procesos que ocurren y que esta información puede ser usada para el monitoreo y el tratamiento de la enfermedad en cuestión. En ese sentido, los niveles de ECP están estrictamente relacionados con la tendencia a la exacerbación de la severidad de determinados estados patológicos tales como el asma y la dermatitis atópica, por citar dos ejemplos. Sin embargo, diferentes publicaciones se cuestionan estos resultados e incluso en ocasiones rechazan a la ECP como un marcador clínicamente útil. Algunos autores no interpretan adecuadamente determinados resultados y en estas afirmaciones toman en consideración conceptos que obviamente solo forman parte de una teoría reduccionista del problema, por lo que buscan un único marcador que solucione todos los problemas clínicos de determinadas enfermedades, por ejemplo el asma ⁴. Hoy en día se conoce que la participación de los eosinófilos en el proceso asmático es muy variable entre individuos ²⁵ y por tanto las mediciones de la ECP ayudarían a dar una panorámica del comportamiento de estas células en el proceso ⁴. Otros factores a tener en consideración en la variación en los resultados son probablemente la falta de conciencia de la importancia de la correcta manipulación de las muestras sanguíneas ²⁶, ya mencionado anteriormente y el hecho del reciente conocimiento del polimorfismo de los genes aso-

ciados a la ECP y su estrecha relación con la expresión de determinados síntomas alérgicos ²⁷.

DETERMINACIÓN EN ESPUTO

Existe una abundante literatura que demuestra que es posible medir de forma reproducible y eficaz tanto células como determinados marcadores en el esputo, con el objetivo de caracterizar y monitorear procesos inflamatorios en las vías aéreas en enfermedades tales como asma, COPD, y fibrosis quística. Los pacientes que padecen tanto de asma como de COPD son frecuentes productores de esputo de forma espontánea, pero en ocasiones es difícil obtenerlo y en estos casos hay que inducirlo y procesarlo ^{4,7}, lo cual es un procedimiento relativamente complicado, ya que para analizar los mediadores liberados de las células inflamatorias, se necesita separar las células a partir del sobrenadante ²⁸. Con el esputo inducido se pueden seleccionar las partes viscosas de éste o usar la expectoración completa ^{7,29}; pero en este último caso puede existir contaminación con la saliva y por lo tanto se necesita separar la saliva del esputo durante la inducción ³⁰. Para la dispersión celular y las mediciones de marcadores solubles, las muestras de esputo son tratadas con agentes reductores tales como el ditiotreitól (DTT) al 0,1% ²⁹ o homogenizadas por ultrasonificación ³¹; en este último caso las muestras corren menos riesgos de destrucción proteica. En el caso específico de la determinación de proteínas viscosas como la ECP se hace necesario adicionar detergentes catiónicos para recuperar la proteína totalmente, ya que sin la adición de tales detergentes la ECP se adhiere en un por ciento determinado a las paredes del recipiente ⁷.

Si el único interés es determinar la composición celular del esputo, se puede realizar un frotis y luego teñir para contar las células o extraer la muestra de esputo completo y medir el contenido de algún marcador celular específico en la extracción como medida del número de células de una población particular. La preparación del esputo para el conteo celular es técnicamente complicada y solo se puede realizar con calidad en laboratorios de reconocida experiencia. Como alternativa, la extracción de la muestra de esputo completa y la medición de marcadores específicos celulares ha sido propuesta como un ensayo de rutina clínica. El número de granulocitos eosinófilos en el esputo ha sido medido de esta forma de acuerdo a las determinaciones de la ECP en la muestra tomada; en este sentido un numeroso grupo de pu-

blicaciones demuestran que el número de eosinófilos medidos por este método se correlacionan con la severidad de patologías tales como el asma y cómo estos pueden verse reducidos como consecuencia de tratamientos con corticosteroides ⁴. Además, la inflamación eosinofílica presente en los bronquios de pacientes con COPD ha resultado exitosa con esteroides y esto puede verse reflejado en las diferentes mediciones de la ECP realizadas en esputo ^{4,32}.

DETERMINACIÓN EN LAVADO BRONCOALVEOLAR (BAL)

El lavado broncoalveolar es también considerado una herramienta muy útil para estudiar la inflamación en las vías aéreas. Generalmente, de una solución isotónica salina de 200 mL de volumen total, precalentada a 37 °C, se separan alícuotas de 20 mL para realizar los lavados y se inyectan en los bronquios con ayuda de un broncoscopio de fibra óptica; el fluido es aspirado inmediatamente después de cada alícuota y la primera es separada del resto. Para las mediciones de marcadores solubles como la ECP, el fluido es procesado inmediatamente mediante centrifugación a 4 °C y luego es almacenado a -20 °C. Es bueno destacar que con el uso de grandes volúmenes de fluido, en la mayoría de los casos se detectan bajos niveles de ECP debido a la dilución del material.

Altas concentraciones de ECP en BAL han sido asociadas con la reacción asmática tardía en pacientes después de haber sido expuestos a alérgenos, así como una correlación positiva entre los niveles de ECP en BAL con la severidad del asma. Sin embargo, resultados contradictorios han sido reportados en relación con la hiper-respuesta bronquial y la activación eosinofílica en BAL, los que en algunos casos se encontró una correlación inversa significativa entre la hiper-respuesta bronquial a la histamina y los eosinófilos, no así en los niveles de ECP, pero si ocurrió en respuesta frente a determinados alérgenos. Altos niveles de ECP en BAL también han sido encontrados en síndromes respiratorios, fibrosis pulmonar idiopática, neumonía eosinofílica crónica y luego de realizados trasplantes pulmonares donde los niveles de ECP se han asociado con el rechazo agudo del trasplante ⁷.

DETERMINACIONES REALIZADAS EN OTROS FLUIDOS BIOLÓGICOS

La ECP puede ser también determinada en otros fluidos no menos importantes. En el caso específico de las secreciones nasales son usadas

para obtener mediadores a partir del lumen nasal con el objetivo de estudiar reacciones inflamatorias en pacientes con diferentes tipos de rinitis alérgica. Altos niveles de ECP han sido observados en pacientes expuestos a alérgenos, como por ejemplo el polen y además se ha podido demostrar que tanto la ECP como los eosinófilos se acumulan durante la última fase de la reacción alérgica (3-24 h después del contacto con el alérgeno) ³³. Además, la ECP ha sido hallada, en altas concentraciones en fluidos lagrimales de pacientes con queratoconjuntivitis primaveral, queratoconjuntivitis atópica, conjuntivitis alérgica estacional y conjuntivitis papilar. Los niveles de ECP determinados en todos estos casos se correlacionan de forma significativa con los signos y síntomas alérgicos típicos de estas patologías y con el número de eosinófilos en estos fluidos ^{7,34,35}.

Durante la inflamación intestinal ha sido demostrado que la cantidad de granulocitos eosinofílicos crece considerablemente. Estudios morfológicos e inmunohistoquímicos han revelado una activación de eosinófilos intestinales en las IBD ³⁶ y un incremento de la liberación intestinal de la ECP en la colitis ulcerativa ³⁷. Los mecanismos basales de reclutamiento de los eosinófilos a la mucosa inflamada intestinal son probablemente similares a aquellos que ocurren en el asma y en procesos alérgicos, pero existen diferencias entre las moléculas de adhesión y las citocinas involucradas en estos procesos ¹. Los eosinófilos activados en sangre periférica y la liberación de la ECP también han sido detectados no solo en la colitis ulcerativa sino también en la enfermedad de Crohn, enfermedades caracterizadas por una infiltración eosinofílica importante ³⁸. En estas patologías, altos niveles de ECP también han sido detectados en fluidos yeyunales ³⁹ y heces fecales ⁴⁰. Otros estudios muestran altos niveles de ECP en fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide ⁴¹ y recientemente se ha logrado detectar la ECP en la saliva de pacientes asmáticos ⁴².

LA ECP Y EL MONITOREO DE LOS ENSAYOS CLÍNICOS

La ECP ha sido considerada como el marcador más utilizado en los últimos años por los clínicos para medir la actividad eosinofílica en procesos alérgicos, fundamentalmente en pacientes asmáticos, por lo que se considera una herramienta muy útil para seguir el comportamiento de los eosinófilos. Esto puede evidenciarse a través del monitoreo de diferentes ensa-

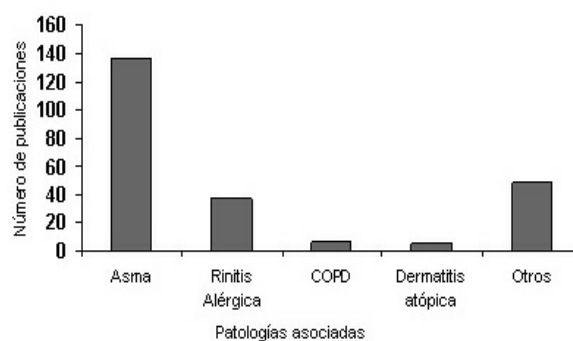


Figura 1. Ensayos clínicos en los que ha sido medida la ECP.

yos clínicos en los que ha sido medida la ECP. Del total de ensayos realizados hasta la fecha (226, según base de datos Medline), el 60% corresponde al asma, aunque también otras patologías vinculadas tanto a procesos alérgicos como inflamatorios han sido asociadas con esta proteína (Figura 1).

En el caso específico del asma, se realizaron los primeros ensayos clínicos con la ECP a finales de la década de los años 1980 en los que se pudo comprobar que un incremento en la actividad de los eosinófilos sanguíneos, debido a altos niveles de la ECP, era un prerrequisito para el desarrollo del asma crónica ⁴³ y alérgica ⁴⁴. Desde ese entonces, la ECP es estudiada en diferentes baterías de ensayos para probar la eficacia de los fármacos que se utilizan en esta patología. En tal sentido, pacientes con diferentes grados de severidad del asma han sido sometidos a tratamientos con agonistas β_2 adrenérgicos ^{45,46}, corticosteroides ^{47,48}, antagonistas de leucotrienos ^{49,50}, de citocinas del tipo Th_2 ^{51,52} y del tromboxano A_2 ⁵³, anticuerpos monoclonales ⁵⁴, antibióticos del tipo macrólidos ^{55,56} y teofilina ^{57,58} durante diferentes periodos de tiempo, en los que se obtuvo una disminución en los valores de la ECP, y por lo tanto, una disminución de la inflamación provocada por los eosinófilos. En el caso de las otras patologías relacionadas con la inflamación de las vías aéreas sucede algo similar pues los tratamientos resultan parecidos y se han obtenido semejantes resultados en la rinitis alérgica ⁵⁹ y en la fibrosis quística ⁶⁰.

CONCLUSIONES

La ECP es una proteína altamente catiónica con un gran número de funciones biológicas entre las cuales su función citotóxica clasifica como la más importante. Ella es producida y secretada por los eosinófilos ante la presencia de numerosos estímulos aunque puede acumularse tanto en los eosinófilos como en los neutrófilos.

La ECP puede ser medida en numerosos fluidos biológicos y esas determinaciones 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 al monitoreo de dichas patologías.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lampinen, M., M. Carlson, L.D. Hakansson & P. Venge (2004) *Allergy* **59**: 793-805.
- Capron, M. (1992) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **87** Suppl 5: 83-9.
- Dahl, R., P. Venge & K. Fredens (1992) *Eosinophils*. In Barnes: P.J, ed. Asthma: Basic mechanism and clinical management. London: Academic Press: pp. 111-124.
- Venge, P. (2004) *Allergy* **59**: 26-32.
- Olsson, I. & P. Venge (1972) *Scand. J. Haematol.* **9**: 204-14.
- Olsson, I & P. Venge (1974) *Blood* **44**: 235-46.
- Venge, P., J. Bystrom, M. Carlson, L. Hakansson, M. Karawaczzyk, C. Peterson, L. Seveus & A. Trulsson (1999) *Clin. Exp. Allergy* **29**: 1172-86.
- Venge P. (1998) *Eosinophils*. In: Barnes P., Rodger I.A., Thomson N.C., eds. Asthma: basic mechanism and clinical management, 3rd edn. London: Academic Press: pp. 141-57.
- Fredens, K., R. Dahl & P. Venge (1982) *J. Allergy Clin. Immunol.* **70**: 361-6.
- Rosenberg, H.F. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**: 7876-81.
- Bergstrand, H., B. Lundquist, B. Petersson, C.G. Petersson & P. Venge (1985) *Eosinophil derived cationic protein and human leukocyte histamine release*. In: Venge P., Lindblom A., eds. Inflammation: basic mechanisms tissue injuring principles and clinical models. Stockholm: Almqvist and Wiksell International: pp. 361-5.
- Chihara, J., T. Yamamoto, D. Kurachi, T. Kaku, I. Higashimoto & S. Nakajima (1995) *Int. Arch. Allergy Immunol.* **108** Suppl 1: 52-4.
- Hernnas, J., B. Sarnstrand, P. Lindroth, C.G. Peterson, P. Venge & A. Malmstrom (1992) *Eur. J. Cell. Biol.* **59**: 352-63.
- Venge, P. & J. Bystrom (1998) *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **30**: 433-7.
- Parmley, R.T. & S.S. Spicer (1974) *Lab. Invest.* **30**: 557-67.
- Tai, P.C., C.J. Spry, C. Peterson, P. Venge & I. Olsson (1984) *Nature* **309**: 182-4.
- Jahnsen, F.L., P. Brandtzaeg & T.S. Halstensen (1994) *J. Immunol. Meth.* **175**: 23-36.
- Sur, S., D.G. Glitz, H. Kita, S.M. Kujawa, E.A. Peterson, D.A. Weiler, G.M. Kephart, J.M. Wagner, T.J. George, G.J. Gleich & K.M. Leiferman (1998) *J. Leukoc. Biol.* **63**: 715-22.
- Bystrom, J., R.C. Garcia, L. Hakansson, M. Karawaczzyk, L. Moberg, J. Soukka & P. Venge (2002) *Clin. Exp. Allergy* **32**: 1082-91.
- Abu-Ghazaleh, R.I., S.L. Dunnette, D.A. Loege-ring, J.L. Checkel, H. Kita, L.L. Thomas & G.J. Gleich (1992) *J. Leukoc. Biol.* **52**: 611-8.
- Fujisawa, T., R. Abu-Ghazaleh, H. Kita, C.J. Sanderson & G.J. Gleich (1990) *J. Immunol.* **144**: 642-6.
- Lampinen, M., S. Rak & P. Venge (1999) *Clin. Exp. Allergy* **29**: 314-22.
- Eda, R., H. Sugiyama, R.J. Hopp, C. Okada, A.K. Bewtra & R.G. Townley (1993) *Int. Arch. Allergy Immunol.* **102**: 391-8.
- Kawashima, T., I. Iwamoto, N. Nakagawa, H. Tomioka & S. Yoshida (1994) *Int. Arch. Allergy Immunol.* **103**: 405-9.
- Amin, K., D. Ludviksdottir, C. Janson, O. Nettelbladt, E. Bjornsson, G.M. Roomans, G. Boman, L. Seveus & P. Venge (2000) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **162**: 2295-301.
- Bjork, A., P. Venge & C.G. Peterson (2000) *Allergy* **55**: 442-8.
- Jonsson, U.B., J. Bystrom, G. Stalenheim & P. Venge (2002) *Clin. Exp. Allergy* **32**: 1092-5.
- Kelly, M.M., V. Keatings, R. Leigh, C. Peterson, J. Shute, P. Venge & R. Djukanovic (2002) *Eur. Respir. J.* **20**: 24s-39s.
- Pizzichini, E., M.M. Pizzichini, A. Efthimiadis, S. Evans, M.M. Morris, D. Squillace, G.J. Gleich, J. Dolovich & F.E. Hargreave (1996) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**: 308-17.
- Pizzichini, E., M.M. Pizzichini, A. Efthimiadis, F.E. Hargreave & J. Dolovich (1996) *Eur. Respir. J.* **9**: 1174-80.
- Grebski, E., C. Graf, G. Hinz, B. Wuthrich & T.C. Medici (1998) *Eur. Respir. J.* **11**: 734-7.
- Dahlen, I, C. Janson, E. Bjornsson, G. Stalenheim, C.G. Peterson & P. Venge (2001) *Respir. Med.* **95**: 891-7.
- Bisgaard, H., H. Gronborg, N. Mygind, R. Dahl, N. Lindqvist & P. Venge (1990) *J. Allergy Clin. Immunol.* **85**: 891-5.
- Leonardi, A., F. Borghesan, D. Faggian, A. Secchi & M. Plebani (1995) *Allergy* **50**: 610-3.
- Montan, P.G. & M. van Hage-Hamsten (1996) *Br. J. Ophthalmol.* **80**: 556-60.
- Carvalho, A.T., C.C. Elia, H.S. de Souza, P.R.

- Elias, E.L. Pontes, H.P. Lukashok, F.C. de Freitas & J.R. Lapa e Silva (2003) *J. Clin. Gastroenterol.* **36**: 120-5.
37. Carlson, M., Y. Raab, C. Peterson, R. Hallgren & P. Venge (1999) *Am. J. Gastroenterol.* **94**: 1876-83.
38. Luck, W., M. Becker, B. Niggemann & U. Wahn (1997) *Eur. J. Pediatr.* **156**: 921-4.
39. Levy, A.M., G.J. Gleich, W.J. Sandborn, W.J. Tremaine, B.L. Steiner & S.F. Phillips (1997) *Mayo Clin. Proc.* **72**: 117-23.
40. Bischoff, S.C., J. Grabowsky & M.P. Manns (1997) *Dig. Dis. Sci.* **42**: 394-403.
41. Hallgren, R., A. Bjelle & P. Venge (1984) *Ann. Rheum. Dis.* **43**: 556-62.
42. Schmekel, B., J. Ahlner, M. Malmstrom & P. Venge (2001) *Respir. Med.* **95**: 670-5.
43. Venge, P., R. Dahl & C.G. Peterson (1988) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **87**: 306-12.
44. Venge, P. & R. Dahl (1989) *Eur. Respir. J.* **6**: 430s-434s.
45. Pinto Pereira, L.M., Y. Clement, J. Rouse, J. Matthew, Z. Asgarali, D. Ramoutar & S. Teelucksingh (2003) *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.* **23**: 69-74.
46. Stelmach, I., P. Gorski, J. Jerzynska, W. Stelmach, P. Majak & P. Kuna (2002) *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **89**: 67-73.
47. Meijer, R.J., H.A. Kerstjens, L.R. Arends, H.F. Kauffman, G.H. Koeter & D.S. Postma (1999) *Thorax* **54**: 894-9.
48. Taylor, D.A., M.W. Jensen, V. Kanabar, R. Engelstatter, V.W. Steinijans, P.J. Barnes & B.J. O'Connor (1999) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160**: 237-43.
49. Strauch, E., O. Moske, S. Thoma, K. Storm Van's Gravesande, G. Ihorst, M. Brandis & J. Kuehr (2003) *Pediatr. Res.* **54**: 198-203.
50. Yoshida, S., Y. Ishizaki, T. Shoji, K. Onuma, H. Nakagawa, M. Nakabayashi, K. Akahori, H. Hasegawa & H. Amayasu (2000) *Clin. Exp. Allergy* **30**: 1008-14.
51. Shioya, T., M. Satake, M. Sano, M. Kagaya, A. Watanabe, K. Sato, T. Ito, N. Ito, M. Sasaki & M. Miura (2002) *Eur. J. Clin Pharmacol.* **58**: 171-6.
52. Horiguchi, T., S. Tachikawa, M. Handa, K. Hanazono, R. Kondo, A. Ishibashi & K. Banno (2001) *J. Asthma* **38**: 331-6.
53. Fukuoka, T., S. Miyake, T. Umino, N. Inase, N. Tojo & Y. Yoshizawa (2003) *J. Asthma* **40**: 257-64.
54. Buttner, C., A. Lun, T. Spletstoesser, G. Kunkel & H. Renz (2003) *Eur. Respir. J.* **21**: 799-803.
55. Amayasu, H., S. Yoshida, S. Ebana, Y. Yamamoto, T. Nishikawa, T. Shoji, H. Nakagawa, H. Hasegawa, M. Nakabayashi & Y. Ishizaki (2000) *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **84**: 594-8.
56. Shoji, T., S. Yoshida, H. Sakamoto, H. Hasegawa, H. Nakagawa & H. Amayasu (1999) *Clin. Exp. Allergy* **29**: 950-6.
57. Yang, J., H.Y. Tu & Q.Q. Li (2001) *Acta Pharmacol. Sin.* **22**: 475-80.
58. Aizawa, H., T. Iwanaga, H. Inoue, S. Takata, K. Matsumoto, N. Takahashi, M. Yoshida & N. Hara (2000) *Int. Arch. Allergy Immunol.* **121**: 123-8.
59. Saengpanich, S., M. deTineo, R.M. Naclerio & F.M. Baroody (2003) *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **129**: 557-62.
60. Schmitt-Grohe S., O. Eickmeier, R. Schubert, C. Bez & S. Zielen (2002) *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **89**: 599-605.