Anexo I

DR. JUAN FRANCISCO LORO FERRER DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLINICAS DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,

CERTIFICA,

Que el Consejo de Doctores del Departamento en su sesión de fecha 3 de noviembre de 2015, tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada "EOSINOFILIA IMPORTADA: MECANISMOS, CAUSAS Y CONSECUENCIAS" presentada por la doctorando Dña. Cristina Carranza Rodríguez y dirigida por el Dr. D. José Luis Pérez Arellano y el Dr. D. Antonio Muro Álvarez.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 6 del Reglamento para la elaboración, defensa, tribunal y evaluación de tesis doctorales de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a 3 de noviembre de dos mil quince.

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS
PROGRAMA DE DOCTORADO MICROBIOLOGÍA Y ENFERMEDADES INFECCIOSAS

EOSINOFILIA IMPORTADA
MECANISMOS, CAUSAS Y CONSECUENCIAS

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR Dª. CRISTINA CARRANZA RODRÍGUEZ
DIRIGIDA POR EL DR. JOSE LUIS PÉREZ ARELLANO Y
EL DR. ANTONIO MURO ALVAREZ

EL DIRECTOR **EL DIRECTOR** **EL DOCTORANDO**

Las Palmas de Gran Canaria, Noviembre de 2015

“El talento es suerte.
Lo importante en la vida es la valentía.”
Woody Allen

Cuando acabé la carrera, por casualidad del destino y en cierta manera influenciada por mi hermano Josete, entré a colaborar y a intentar averiguar lo que era la investigación en el Departamento de Parasitología de la Universidad de Salamanca.

El laboratorio lo dirigía **Antonio Muro**, lo que fue la piedra angular de este recorrido, pues supuso una suerte en todos los sentidos; tanto profesional como personal. Sentimientos que, a pesar del tiempo-transcurrido no han cambiado...así que podría decir muchas cosas pero lo resumiré en un millón de gracias.

En este mismo camino fui encontrando buenos compañeros como mi querida **Elsa, Patricia**, **Javi**, **Tito**...con los que me divertía aprendiendo en el desconocido mundo del laboratorio de investigación. Pero de todos ellos, debo destacar a **Belén** porque hemos ido haciendo el mismo recorrido profesional, porque hemos tenido las mismas angustias y los mismos miedos, por lo que me he reído con ella y por dejarme seguir siendo parte de esos inicios en Salamanca, ella es mi alma gemela.

Mi segunda etapa se inicia con un cambio brusco de trabajo, de ciudad, de costumbres, de gente y de paisaje, donde el mar lo rodea todo. Pero todo ello fue más suave y fácil principalmente gracias a **Michele y su familia**, los cuales me permitieron crear mi pequeño núcleo familiar donde no tenia nada. Y fui aprendiendo con la ayuda de bastante gente, diversa toda ella, como **Margarita**, que no ha dejado de estar cerca; las **compañeras de la Unidad de Infecciosas,** que siempre que necesito algo me ponen buena cara; **Mayeya,** que siempre da energía; **Paloma**, que es tan buena en el laboratorio como de canguro; **Ana** y su disposición a cualquier cosa; **Antonio Tugores**, por la acogida en su laboratorio; **Limiñana y Tere** por hacerme algo mas entendible la estadística y algunos que sin querer no los nombro por olvido. Y en todo este trayecto de años tengo que agradecer "mil cosas" a **José Luis**, porque me ha enseñado a estudiar, a ser docente, a valerme por mi misma, a pensar...pero sobre todo a crecer y no solo profesionalmente sino como persona por los valores éticos que emana y dispersa a su alrededor.

Y como no voy a mencionar a mi **"gran familia"**, que sin ellos no seria lo que soy ni donde estoy...porque siempre suman y nunca restan, mis hermanos y mis sobrinos.

A mis **queridos padres** que este título para ellos es como un "Oscar", pues supone un reconocimiento a como, de generación en generación, se consigue lo impensable para ellos y por último porque está desde el principio y forma parte de todo a **Toñín**, ya que sin él hubiera sido impensable nada de lo acontecido porque es la pieza clave. Y de todo esto surgió **Darío** que me impregna de su alegría, de su inocencia y sobre todo de su amor, que ha sido tan importante para realizar este trabajo.

Larga fue la espera pero fructífero el camino.

Índice

Página

1. Introducción 24

1.1. Eosinofilia. Conceptos generales 25

1.1.1. Concepto y límites 25
1.1.2. Grados de eosinofilia 26
1.1.3. Significado clínico de una eosinofilia 26
1.1.31. Eosinofilia en el paciente autóctono no infectado por VIH 27
1.1.3.2. Eosinofilia en el paciente autóctono infectado por VIH 32
1.1.3.3. Eosinofilia importada 33
1.1.4. Protocolo diagnóstico ante un paciente con eosinofilia 34
1.1.5. Manejo terapéutico de un paciente con eosinofilia 37

1.2. Eosinofilia. Mecanismos de producción 40

1.2.1. Biología general del eosinófilo 40
1.2.2. Citocinas "eosinofílicas" 52
1.2.2.1. Aspectos generales 52
1.2.2.2. IL-5 52
1.2.2.3. Eotaxina-1 55
1.2.2.4. IL-13 57
1.2.2.5. IL-16 60
1.2.2.6. RANTES 61
1.2.3. Mecanismos de eosinofilia
1.2.3.1. Aspectos generales 65
1.2.3.2. Reclutamiento de eosinófilos 65
1.2.3.3. Eosinofilopoyesis local 68
1.2.3.4. Inhibición de la apoptosis 68

1.3. Eosinofilia. Consecuencias 75

1.3.1. Aspectos generales 75
1.3.2. Moléculas derivadas del eosinófilo
1.3.1.1. Proteína catiónica (ECP) 75
1.3.1.2. Neurotoxina (EDN) 77
1.3.1.3. VEGF 81
1.3.3. Eosinófilos y helmintosis 89
1.3.4. Eosinófilos y lesión tisular 91

2. Objetivos 93

3. Materiales y métodos 97

Objetivo 1: Prevalencia de eosinofilia en inmigrantes 106
Objetivo 2: Causas de Eosinofilia absoluta 107
Objetivo 3: Causas de Eosinofilia relativa 107
Objetivo 4: Citocinas eosinofílicas y helmintosis 111
Objetivo 5: Mecanismos de lesión: lesiones subclínicas 113
Objetivo 6: Mecanismos de lesión: ECP y EDN 116
Objetivo 7: Mecanismos de lesión: VEGF 118
Análisis estadístico 119
Consideraciones Éticas 120

4. Resultados 123

Objetivo 1: Prevalencia de eosinofilia en inmigrantes 128
Objetivo 2: Causas de eosinofilia absoluta 135
Objetivo 3: Causas de eosinofilia relativa 145
Objetivo 4: Citocinas eosinofílicas y helmintosis 153
Objetivo 5: Mecanismos de lesión: lesiones subclínicas 161
Objetivo 6: Mecanismos de lesión: proteínas agresoras 166
Objetivo 7: Mecanismos de lesión: factores angiogénicos 178

5. Discusión 185

6. Conclusiones 199

7. Bibliografía 204

8. Anexos 232

Tabla 1.1	Fármacos relacionados con eosinofilia	**27**
Tabla 1.2	Enfermedades inmunólogicas con eosinofilia y datos focales	**30**
Tabla 1.3	Parasitosis autóctonas causantes de eosinofilia	**31**
Tabla 1.4	Principales mediadores inflamatorios derivados de los eosinófilos	**42**
Tabla 1.5	Principales receptores de membrana en los eosinófilos	**43**
Tabla 1.6	Principales moléculas de adhesión	**48**
Tabla 1.7	Celulas productoras de IL-16 y su regulación	**60**
Tabla 1.8	Diferencias entre ECP/EDN	**79**
Tabla 1.9	Diferencias en los VEGF humanos	**82**
Tabla 1.10	Citocinas estimulantes de la producción de VEGF	**86**
Tabla 2.1	Clasificación del Índice de Masa Corporal	**102**
Tabla 3.1	Características de los 4 métodos comerciales de ELISA	**104**
Tabla 3.2	Características de los ELISAS de ECP y EDN	**113**
Tabla 4.1	Características generales de los inmigrantes del estudio	**125**
Tabla 4.2	Valores medios de IMC según los grupos etarios de los inmigrantes	**126**
Tabla 4.3	Eosinofilia (media ± DT) según el grupo etario	**128**
Tabla 4.4	Valores medios de eosinofilia absoluta y relativa según el área de procedencia	**129**
Tabla 4.5	Características de los inmigrantes con eosinofilia absoluta y eosinofilia parcial	**130**

Tabla 4.6	Categorías profesionales referidas por los inmigrantes con eosinofilia y eosinofilia relativa	**132**
Tabla 4.7	Características de los inmigrantes con eosinofilia importada absoluta	**135**
Tabla 4.8	Métodos diagnósticos analizados según el tiempo de estancia en España	**136**
Tabla 4.9	Parásitos según el grado de eosinofilia	**139**
Tabla 4.10	Manifestaciones clínicas según el tiempo de estancia	**140**
Tabla 4.11	Número de infecciones parasitarias según el tiempo de estancia	**141**
Tabla 4.12	Eosinofilia según el grupo de parásitos	**143**
Tabla 4.13	Eosinofilia dependiendo del método de diagnóstico	**144**
Tabla 4.14	Características de los inmigrantes con eosinofilia relativa importada	**145**
Tabla 4.15	Métodos diagnósticos analizados según el tiempo de estancia en España	**146**
Tabla 4.16	Principales características de los inmigrantes con eosinofilia parcial con diagnostico parasitológico	**148**
Tabla 4.17	Parásitos detectados según el tiempo de estancia en nuestro país	**151**
Tabla 4.18	Parásitos detectados en las principales zonas de orígen	**152**
Tabla 4.19	Características generales de los inmigrantes que forman parte del estudio de citocinas	**154**
Tabla 4.20	Medias de diferentes citocinas entre grupo control y grupo estudio	**155**
Tabla 4.21	Valores medios de las diferentes citocinas según el grupo de parasitos	**156**
Tabla 4.22	Valores medios de cada citocina (IL-16, IL-13, RANTES, Eotaxina) respecto a las diferentes parasitosis	**158**
Tabla 4.23	Significación estadística de cada citocina frente a los	**158**

diferentes parásitos

Tabla 4.24 Valores medios y desviación típica de IL-16 , RANTES y eosinofilos **160**

Tabla 4.25 Correlaciones ente IL-16, RANTES y eosinofilia **160**

Tabla 4.26 Características generales de los pacientes del objetivo 5 **162**

Tabla 4.27a,b Asociación de afectación valvular mitral y grado de eosinofilia **163**

Tabla 4.28a Hallazgos ecocardiográficos cualitativos **164**

Tabla 4.28b Hallazgos ecocardiográficos cuantitativos. Expresado como Media (DT) **164**

Tabla 4.29 Asiciación entre afectación valvular y el tipo de helminto **166**

Tabla 4.30 Nº de muestras utilizados para cada estudio ECP / EDN **167**

Tabla 4.31 Características generales de los inmigrantes que forman parte del estudio de las proteínas ECP y EDN **168**

Tabla 4.32 Valores de ECP y EDN entre grupo control y grupo de estudio **169**

Tabla 4.33 Determinación de ECP en el suero (ng/ml) de los sujetos infectados por diferentes parásitos **170**

Tabla 4.34 Comparaciones múltiples de los valores de ECP en suero entre los grupos de helmintos **170**

Tabla 4.35 Comparaciones múltiples entre grupo control y los diferentes helmintos **171**

Tabla 4.36 Correlacion entre los niveles de ECP y los eosinofilos **172**

Tabla 4.37 Tabla de contingencia Eosinofilia (si/no) * ECP normal o elevado **173**

Tabla 4.38 Determinación de EDN en el suero (ng/ml) de los sujetos infectados por diferentes helmintos **174**

Tabla 4.39 Comparaciones múltiples de los valores de EDN en suero entre los grupos de helmintos **174**

Tabla 4.40 Comparaciones múltiples de los valores de EDN en suero entre los grupos de parásitos **175**

Tabla 4.41 Correlación entre los niveles de EDN y los eosinofilos **177**

Tabla 4.42 Valores de ECP y EDN en orina en el grupo control y en el grupo estudio **178**

Tabla 4.43 Número de infecciones parasitarias que forman el grupo estudio **181**

Tabla 4.44 Características generales de los inmigrantes que forman parte del estudio de VEGF **181**

Tabla 4.45 Valores de VEGF entre grupo control y grupo de estudio **182**

Tabla 4.46 Valores de VEGF entre pacientes control y pacientes infectados por diferentes parásitos **182**

Tabla 4.47 Valores medios de VEGF en los diferentes especies de esquistosomas **183**

Tabla 4.48 Comparaciones múltiples entre grupo control y las especies de esquistosomas **184**

Tabla 4.49 Correlación entre VEGF y eosinofilos **185**

Figura 1.1 Manejo diagnóstico inicial ante un paciente con eosinofilia **35**

Figura 1.2 Orientación diagnóstica en el paciente con eosinofilia autóctona no asociada a infección VIH **36**

Figura 1.3 Manejo terapéutico en un paciente con eosinofilia idiopática **39**

Figura 1.4 Estructuras características de los eosinófilos **41**

Figura 1.5 Origen y cinética de los eosinófilos **46**

Figura 1.6 Quimioatractantes para eosinófilos **47**

Figura 1.7 Fases de la migración transendotelial **49**

Figura 1.8 Estructura de la interleucina 5 **53**

Figura 1.9 Estructura del receptor de la interleucina 5 **53**

Figura 1.10 Producción de eotaxina 1 **55**

Figura 1.11 Estructura terciaria de eotaxina 1 **56**

Figura 1.12 Estructura terciaria de IL-13 **58**

Figura 1.13 Receptores y señalización intracelular de IL-13 **59**

Figura 1.14 Estructura de un monómero de IL-16 **60**

Figura 1.15 Estructura de un monómero de RANTES **62**

Figura 1.16 Receptores y vías de traducción de RANTES **63**

Figura 1.17 Principales efectos biológicos de RANTES **64**

Figura 1.18 Citocinas relacionadas con aumento eosinofilopoyesis **66**

Figura 1.19 Localización tisular de los eosinófilos **67**

Figura 1.20 Recirculación de linfocitos y eosinofilia **67**

Figura 1.21 Tránsito de precursores eosinofilopoyéticos a órganos diana **68**

Figura 1.22 Esquema general de la apoptosis **69**

Figura 1.23 Vía final común de la apoptosis **70**

Figura 1.24 Vía mitocondrial de la apoptosis **71**

Figura 1.25 Vía de los receptores letales de la apoptosis **72**

Figura 1.26 Mecanismos de producción de eosinofilia **74**

Figura 1.27 Monómero de VEGF-F **81**

Figura 1.28 Isoformas de VEGF-A **83**

Figura 1.29 Receptores de VEGFs **85**

Figura 1.30 Señalización a través de VEGFR-2 **87**

Figura 2.1 Protocolo de recogida de datos en Inmigrantes **101**

Figura 4.1 Procedencia de los inmigrantes del estudio **126**

Figura 4.2 Valores medios de IMC según los grupos etarios de los inmigrantes **127**

Figura 4.3 Eosinofilia (media + DT) según el grupo etario **129**

Figura 4.4 Valores medios de eosinofilia absoluta y relativa según el área de procedencia **130**

Figura 4.5 Principales países de los inmigrantes A) con eosinofilia absoluta, B) eosinofilia relativa **131**

Figura 4.6 Prevalencia de eosinofilia absoulta y relativa en población inmigrante **132**

Figura 4.7 Prevalencia de eosinofilia por países **133**

Figura 4.8 Diagnóstico de los sujetos con eosinofilia absoluta según el método empleado **137**

Figura 4.9 Rendimiento diagnóstico al utilizar varias técnicas **138**

Figura 4.10 Número de infecciones parasitarias diagnosticadas por **139**

métodos directos
Figura 4.11 Número de hallazgos parasitarios según el tiempo de estancia **141**
Figura 4.12 Valores de eosinofilia según el número de infecciones parasitarias de cada sujeto **142**
Figura 4.13 Relación entre el número de parásitos y eosinofilia **142**
Figura 4.14 Eosinofilia según el grupo de parásitos **143**
Figura 4.15 Diagnóstico de eosinofilia parcial por diferentes métodos **147**
Figura 4.16 Rentabilidad de las técnicas diagnósticas **148**
Figura 4.17 Especie y número de parásitos diagnosticados por métodos directos **150**
Figura 4.18 Manifestaciones clínicas según el tiempo de estancia de los inmigrantes **152**
Figura 4.19 Países de origen de los inmigrantes A) grupo estudio, B) grupo control **155**
Figura 4.20 Valores medios de diferentes citocinas entre grupo control y grupo estudio **156**
Figura 4.21 Valores medios de diferentes citocinas entre grupo control y los diferentes grupos parasitarios **157**
Figura 4.22 Valores medios de cada citocina (Eotaxina, IL-13, IL-16, RANTES) frente a los diferentes parásitos **159**
Figura 4.23 Correlación a) IL-16 y eosinofilos, b) Rantes y eosinofilos **161**
Figura 4.24 Imagen característica de un paciente con afectación endomiocárdica **165**
Figura 4.25 Imagen característica de un paciente con afectación endomiocárdica **165**
Figura 4.26 Imagen característica de un paciente con afectación endomiocárdica **166**
Figura 4.27 Valores de ECP y EDN entre grupo control y grupo de **169**

estudio
Figura 4.28 Determinación de ECP en el suero (ng/ml) de los sujetos infectados por diferentes helmintos **170**
Figura 4.29 Valores de ECP en los diferentes parásitos **171**
Figura 4.30 Correlacion entre los niveles de ECP y los eosinofilos **172**
Figura 4.31 Determinación de EDN en el suero (ng/ml) de los sujetos infectados por diferentes helmintos **175**
Figura 4.32 Valores de EDN en los diferentes parásitos **176**
Figura 4.33 Valores de EDN según el método diagnóstico **177**
Figura 4.34 Correlación entre los niveles de EDN y los eosinofilos **178**
Figura 4.35 Valores de ECP y EDN en el grupo control y en el grupo de estudio **179**
Figura 4.36 Número de infecciones parasitarias que forman el grupo de estudio **180**
Figura 4.37 Valores de VEGF entre grupo control y grupo de estudio **182**
Figura 4.38 Valores de VEGF entre pacientes control y pacientes infectados por diferentes parásitos **183**
Figura 4.39 Valores medios de VEGF en los diferentes especies de esquistosomas **184**
Figura 4.40 Correlación entre VEGF y eosinofilos **185**

ADE: Amplitud de distribución eritrocitaria

ATP: Adenosín trifosfato

CFU-GEMM: *Colony-Forming Unit-Granulocyte, Erythrocyte, Monocyte / macrophage, Megakaryocyte*

ALT/GPT: Alanino amino transferasa/glutámico pirúvico transaminasa

AST/GOT: Aspartato amino transferasa/glutámico oxalacético transferasa

CHAK: *Chemokine activated killer*

CIETUS: Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca

CK: Creatin Quinasa

DFF: *DNA fragmentation factor.* Factor de fragmentación del ADN

ECA: enzima convertidora de la angiotensina

ECP: *Eosinophil cationic protein*. Proteína catiónica del eosinófilo

EDF: *Eosinophil differentiation factor*. Factor de diferenciación del eosinófilo

EDN: *Eosinophil derived neurotoxin*. Neurotoxina derivada del eosinófilo

EDTA: ácido etildiaminotetraacético

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

Eo-1: *Eotaxin-1*. Eotaxina-1

EP: *Eosinophil peroxidase*. Peroxidasa del eosinófilo

EPX: *Eosinophil protein X.* Proteína X del eosinófilo

FADD: *Fas associated protein with death domain*

FEM: Fibrosis endomiocárdica

GAG: glucosaminoglicanos

GGT: Gamma glutamil transpeptidasa

GM-CSF: *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor.* Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

HIF: *Hypoxic inducible factor*

HLA: *Human leukocyte antigen*. Antígeno leucocitario humano

HRE: *Hypoxia response element*

ICAM-1: *Intercellular adhesión molecule* 1. Molécula de adhesión intercelular 1.

IgA: Inmunoglobulina A

IgE: Inmunoglobulina E

IgG: IInmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

IL-12: Interleukin-12. Interleucina-12

IL-16: Interleukin-16. Interleucina-16

IL-2: Interleukin-2. Interleucina-2

IL-4: Interleukin-4. Interleucina-4

IL-5: Interleukin-5. Interleucina-5

IL-6: Interleukin-6. Interleucina-6

IL-8: Interleukin-8. Interleucina-8

IMC: Índice de masa corporal

IP-10: *Interferon gamma-induced protein*.

LTC4: *Leukotriene C4*. Leucotrieno C4

LXA4: *Lipoxin A4*. Lipoxina A4

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase.* Proteína quinasa activada por mitógenos

MBP: *Major basic protein*. Proteína básica principal

MCP: *Monocyte chemottractant protein.* Proteína quimiotractante del monocito

MIP-1α: *Macrophage Inflammatory Protein-1α.* Proteína inflamatoria macrofágica 1

MIP: *Macrophage inflammatory protein.* Proteína inflamatoria del macrófago

mRNA: Ácido Ribonucleico mensajero

NGF: *Nerve growth factor*. Factor de crecimiento nervioso

PAF: *Platelet-activating factor*. Factor activador de plaquetas

PDGF: *Platelet derived growth factor*. Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

PGE2: *Prostaglandin E2*. Prostaglandina E2

PSGL: *P-selectin glycoprotein ligand*. Ligando glucoproteico para la P-selectina

RANTES: *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*

RMN: Resonancia magnética nuclear

SDF-1: *Stromal derived factor*

SNC: Sistema nervioso central

TAC: Tomografía axial computerizada

TGF-α: *Transforming growth factor alpha*. Factor de crecimiento transformante α

TGF-β: *Transforming growth factor beta*. Factor de crecimiento transformante β

TNFα: *Tumor necrosis factor α.* Factor de necrosis tumoral α

TRADD: *TNF-receptor associated death domain*

TTPA: Tiempo de tromboplastina parcial activada

UEIMT: Unidad de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical

VCAM: *Vascular adhesión molecule.* Molécula de adhesión vascular

VCM: Volumen corpuscular medio

VEGF: *Vascular endotelian growth factor*. Factor de crecimiento endotelial vascular

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

VHD: Virus de la hepatitis D

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VLA: *Very late antigen*

VSG: Velocidad de sedimentación globular

γ-IFN: Interferon γ

1. Introducción

1.1. Eosinofilia. Conceptos generales

La eosinofilia es un dato relativamente frecuente en la práctica clínica. Su importancia radica en dos aspectos principales: diagnósticos y patogénicos. Así, desde un punto de vista diagnóstico, la detección de eosinofilia sugiere la presencia de diversas entidades. Por otro lado, en algunas circunstancias, la liberación de productos de estos leucocitos se asocia a lesiones tisulares.

En este apartado revisaremos inicialmente el concepto de eosinofilia, indicando sus limitaciones y nomenclatura. En un segundo apartado se consideran, de forma detallada, las principales causas de eosinofilia agrupadas desde un punto de vista práctico. Finalmente se consideran los principales aspectos terapéuticos, haciendo especial énfasis en el manejo de los antihelmínticos y en el tratamiento de la eosinofilia idiopática.

1.1.1. Concepto y límites

Se considera que existe eosinofilia cuando el número total de eosinófilos circulantes en sangre periférica es significativamente superior al presente en la población normal**.** Los valores descritos por diferentes autores son muy variables, oscilando entre 350 y 700/µL. Así, en el límite bajo, Rothemberg considera como límite para definir esta situación el de 350 eosinófilos/µL **(1)**, mientras que Bridgen considera que existe eosinofilia a partir de 700 /µL **(2)**. De cualquier forma, la mayor parte de autores consideran que existe eosinofilia cuando el número de eosinófilos es igual o mayor a 450/µL**(3, 4)**.

Sin embargo, este valor numérico debe ser matizado en relación con los datos clínicos, ya que algunos fármacos o diferentes situaciones (tanto fisiológicas como patológicas) pueden modificar esta magnitud. Entre los factores fisiológicos que influyen en el número de eosinófilos circulantes se encuentran los siguientes: la hora del día en la que se realice la extracción de la muestra, la edad, el sexo, y el embarazo. A modo de ejemplo, la variación diaria del número de eosinófilos puede ser de hasta un 40%, mayor por la noche que por la mañana, en relación con el ritmo circadiano de corticoides. También influye en esta magnitud el empleo de fármacos (p. ej. adrenalina, ß-bloqueantes o corticoides), que puede modificar de forma notable el número de eosinófilos (hasta en un 30%). Por último, la presencia de infecciones agudas

(principalmente víricas, bacterianas o protozoarias, especialmente la malaria) puede disminuir transitoriamente el número de eosinófilos circulantes, reapareciendo los valores basales una vez resuelto el problema infeccioso que ocasionó este descenso. Es importante insistir en que una infección no helmíntica puede llevar, de forma transitoria, a "normalizar" valores de eosinófilos muy elevados. Esta circunstancia puede observarse, en la práctica, en situaciones de patología importada (específicamente en el paciente con malaria), en las que, una vez resuelta la infección protozoaria, se detecta eosinofilia.

1.1.2. Grados de eosinofilia

En la práctica clínica, se acepta que el número total de eosinófilos tiene valor en la orientación diagnóstica.

Sin embargo, no existen trabajos rigurosos en los que se relacione el grado de eosinofilia con los determinados agentes etiológicos.

De cualquier forma, la mayor parte de los autores emplean como puntos de corte los valores de 1000 y 3000/µL para definir 3 grados de eosinofilia. Así, se consideraría eosinofilia leve entre 450 y 999 eosinófilos/µL; eosinofilia moderada entre 1000 y 2999 eosinófilos/µL y eosinofilia intensa cuando las cifras de eosinófilos superen los 3000/µL (**4**).

1.1.3. Significado clínico de una eosinofilia

Una regla práctica indica que la detección de eosinofilia en una persona que proceda o haya viajado a una región tropical debe hacer pensar en primer lugar en causas infecciosas, mientras que en una persona que no haya presentado este dato epidemiológico deben descartarse otro tipo de causas (inmunológicas, farmacológicas, neoplásicas o endocrinas). Una situación especial aparece en los pacientes infectados por el VIH, tanto debido a la propia naturaleza de la infección como a los fármacos utilizados en su control o a la presencia de enfermedades asociadas. Por ello, de forma operativa podemos distinguir tres situaciones diferentes en un paciente con eosinofilia:

1.1.3.1. Eosinofilia en el paciente autóctono no infectado por VIH

En nuestro país, las principales causas pueden incluirse en siete grupos (**tabla 1.1**): (*i*) farmacológicas. (*ii*) alérgicas, principalmente reacciones de hipersensibilidad de tipo I. (*iii*) inmunológicas no alérgicas. (*iv*) neoplasias. (*v*) alteraciones endocrinas y metabólicas. (*vi*) parasitarias. (*vii*) trastornos idiopáticos.

Tabla 1.1 Fármacos relacionados con eosinofilia

Fármacos empleados en infecciones
Penicilinas
Cefalosporinas
Glucopéptidos
Sulfamidas (Cotrimoxazol)
Tetraciclinas (sobre todo Minociclina)
Quinolonas (descrita en Ciprofloxacino y Norfloxacino)
Antituberculosos (sobre todo Rifampicina y Etambutol)
Nitrofurantoína
Antimaláricos (sobre todo Fansidar®, excepcionalmente cloroquina)
Fármacos empleados en enfermedades cardiovasculares
Inhibidores de la ECA (efecto de clase)
Espironolactona
Diltiacem
Quinidina
Alfa metil dopa
Fármacos empleados en enfermedades neurológicas
Antipsicóticos (clorpromazina, olanzapina)
Antidepresivos (imipramina, desimipramina, trazodona,triptófano[síndrome eosinofilia/mialgia])
Anticonvulsivantes (difenilhidantoína, carbamacepina, fenobarbital, valproato)
Fármacos antiinflamatorios y antireumáticos
Antiinflamatorios no esteroideos (efecto de clase)
Sales de oro
Fármacos empleados en enfermedades digestivas
Antagonistas H2 (ranitidina)
Inhibidores de la bomba de protones (omeprazol, lansoprazol)
Aminosalicilatos (sulfasalacina, mesalacina)
Fármacos empleados en enfermedades neoplásicas
Múltiples (bleomicina, metotrexato, procarbacina, fludarabina)
Otros
Hipoglucemiantes orales “clásicos” (Clorpropamida, Tolbutamida)
Anticoagulantes (Heparina sódica, Enoxaparina)
Hipolipemiantes (Colestiramina)
Hipouricemiantes (Alopurinol)
Anestésicos (Halotano)
Miorrelajantes (Dantroleno)

Las ***causas farmacológicas*** de eosinofilia son múltiples y presumiblemente se incrementarán a medida que se incorporen nuevos principios activos al arsenal terapéutico. Por ello, en cualquier paciente con eosinofilia, es esencial conocer de forma precisa la medicación que recibe, ya que algunos fármacos (incluso aquellos de empleo muy común) pueden ser los responsables de esta alteración analítica. En la **tabla 1.2** se recogen los fármacos más importantes, aunque somos conscientes de que el listado nunca puede ser exhaustivo (**2, 5, 6, 7, 8, 9, 10**). Tiene interés señalar que la eosinofilia relacionada con fármacos, en ocasiones no sólo es un dato analítico, sino que puede formar parte de un cuadro clínico más grave en el que también aparecen manifestaciones sistémicas (p. ej. fiebre, síndrome constitucional) o locales (p. ej. exantema, infiltrados pulmonares, nefropatía, hepatopatía, etc). Por otro lado, aunque la eosinofilia farmacológica no suele asociarse a atopia o a historia familiar, tanto en los pacientes con hepatopatía o nefropatía previa, como en los acetiladores lentos, es más frecuente que en la población general (**2**)**.**

Las ***reacciones de hipersensibilidad*** no farmacológicas mediadas por IgE son una causa muy frecuente de eosinofilia. Las más frecuentes son las rinitis (de las que existen diferentes variedades) y algunas formas de asma. También se incluirían en este grupo algunas respuestas inmunológicas a microorganismos, principalmente la aspergilosis bronco-pulmonar alérgica (**11**). En estas situaciones, los datos clínicos y los exámenes complementarios suelen permitir realizar un diagnóstico simple. En casos dudosos, la realización de estudios específicos (p. ej. la demostración de eosinófilos en la mucosa nasal, las pruebas de provocación bronquial o la medida de anticuerpos específicos) permiten el diagnóstico final.

También existen otras ***enfermedades inmunológicas no alérgicas*** que se asocian a eosinofilia. Desde un punto de vista patogénico estas entidades son de tres tipos: enfermedades autoinmunes órgano-inespecíficas, autoinmunopatías órgano-específicas e inmunodeficiencias.

Dentro de las *enfermedades autoinmunes sistémicas*, las que con mayor frecuencia presentan eosinofilia son la enfermedad de Churg-Strauss (**12,13**) y la fascitis eosinofílica (síndrome de Shulman) (**14**), una enfermedad similar a la esclerodermia (pero en la que la epidermis y dermis están respetadas), caracterizada por un inicio

agudo, muy frecuentemente tras un traumatismo, con eritema y edema, asociado posteriormente a induración en la piel de las extremidades. Con mucho menor frecuencia, aparece eosinofilia en otras enfermedades sistémicas como las formas graves de artritis reumatoide, o la granulomatosis de Wegener.

Las *formas localizadas de enfermedad autoinmune* pueden afectar a diversos órganos o sistemas (**tabla 1.2**). Así la afectación pulmonar de origen inmune es característica de la neumonía eosinofílica (tanto crónica como aguda) (**15,16**). La afectación cutánea de origen inmunológico asociada a eosinofilia aparece en varias situaciones como: algunas formas de eccema, la dermatitis herpetiforme, el pénfigo, el penfigoide bulloso, la enfermedad de Kimura (grandes masas subcutáneas en cuello o cabeza en pacientes procedentes del sudeste asiático) (**17**), la hiperplasia angiolinfoide con eosinofilia (lesiones superficiales más pequeñas que las de la enfermedad de Kimura) (**18**), el síndrome de Wells (celulitis eosinofílica, con imágenes características en la histología en "forma de llama") (**19**), el síndrome de Gleich (episodios recurrentes de angioedema, urticaria, prurito, fiebre, aumento de peso, aumento de IgM y eosinofilia) (**20**) y el síndrome NERDS (*nodules, eosinophilia, rheumatism, dermatitis, swelling*; es decir nódulos paraarticulares prominentes, urticaria recurrente con angioedema y eosinofilia tisular) (**21**). La principal enfermedad del sistema hematopoyético no maligna que se asocia a eosinofilia es la anemia perniciosa (**22**). Otras enfermedades localizadas con eosinofilia afectan al tubo digestivo (p. ej. enfermedad inflamatoria crónica intestinal y/o enteritis eosinofílica) (**23,24**), al sistema nervioso (meningitis eosinofílica) (**25**) o genitourinario [cistitis eosinofílica **(26)**, hemodiálisis (**27**) o diálisis peritoneal (**28**)].

Tabla 1.2. Enfermedades inmunológicas con eosinofilia y datos focales

Pulmonares
- Neumonía eosinófila crónica
- Neumonía eosinófila aguda
Cutáneas
- Eccema
- Dermatitis herpetiforme
- Pénfigo
- Penfigoide bulloso
- Enfermedad de Kimura
- Hiperplasia angiolinfoide con eosinofilia
- Síndrome de Wells
- Síndrome de Gleich
- Síndrome NERDS
Hematológicas
- Anemia perniciosa
Digestivas
- Enteritis eosinofílica
- Enfermedad inflamatoria crónica intestinal
Neurológicas
- Meningitis eosinofílica idiopática
Urológicas
- Cistitis eosinofílica
- Inicio de hemodiálisis
- Inicio de diálisis peritoneal

Las *inmunodeficiencias* que con mayor frecuencia se asocian a eosinofilia son el síndrome de Job (**29**) y la enfermedad de Omenn (**30).** Más rara vez aparece en el síndrome de Wiskott-Aldrich y en la deficiencia selectiva del IgA (en este caso asociada a fascitis eosinofílica).

En diversas ***neoplasias*** puede aparecer eosinofilia, principalmente en la enfermedad de Hodgkin (hasta en un 15% de casos) y en otras neoplasias hematológicas, en concreto leucemias (sobre todo con fenotipo M4) y linfomas (sobre todo de estirpe B) (**31**). En lo que respecta a los tumores sólidos, es más frecuente en las neoplasias de células grandes no queratinizadas de cuello, carcinomas indiferenciados de células grandes de pulmón, carcinomas epidermoides de pene, vagina, piel y nasofaringe, adenocarcinomas de estómago, colon y endometrio, así como en el carcinoma transicional de vejiga.

Las dos principales ***enfermedades endocrino-metabólicas*** en las que puede aparecer esta alteración hematológica son la insuficiencia suprarrenal (crónica y aguda) (**32**) y el embolismo por cristales de colesterol (**33**).

Aunque las ***helmintosis*** son mucho más frecuentes en el paciente procedente de regiones tropicales o que ha viajado a las mismas, no debe olvidarse que existen algunas parasitosis autóctonas capaces de producir eosinofilia (**34, 35**). Los helmintos autóctonos que con mayor frecuencia son capaces de ocasionar eosinofilia se indican en la **tabla 1.3.**

Tabla 1.3. Parasitosis autóctona causantes de eosinofilia

***Anisakis* sp.**
Echinococcus granulosus
Fasciola hepatica
Strongyloides stercoralis
***Taenia* sp.**
Toxocara canis
***Trichinella* sp.**
***Trichostrongylus* sp.**

Finalmente existen algunos ***procesos de causa desconocida*** en los que la eosinofilia es un dato importante. Las principales situaciones son el síndrome hipereosinofílico idiopático (**36**)**,** la eosinofilia hereditaria (**37**) y la eosinofilia idiopática adquirida. El *síndrome hipereosinofílico* es un conjunto heterogéneo de trastornos que se definen en la práctica por la asociación de cuatro datos: a) eosinofilia superior a 1500 eosinófilos, b) persistencia durante más de 6 meses, c) evidencia de afectación de órganos y d) exclusión de otras causas capaces de ocasionar eosinofilia. Los dos primeros criterios requieren una eosinofilia importante (moderada o intensa) y la persistencia de la misma, descartando de esta forma eosinofilias transitorias. El tercer criterio implica la afectación de algún órgano o sistema. Los principales órganos lesionados en el síndrome hipereosinofílico son *i*) corazón, apareciendo afectación endomiocárdica que por formación de trombos y cicatrización puede llevar a la insuficiencia cardiaca; (*ii*) sistema nervioso central, lo que puede manifestarse por fenómenos isquémicos, encefalopatía difusa y/o neuropatía periférica; (*iii*) pulmón,

cuya manifestación característica es la tos asociada o no a infiltrados pulmonares, pero sin asma; (*iv*) piel, tanto en forma de urticaria/angioedema como por pápulas pruriginosas y (*v*) bazo, cuya manifestación característica es la esplenomegalia. Finalmente, deben excluirse otras entidades capaces de desencadenar una eosinofilia prolongada. Como en todos los síndromes idiopáticos, este último criterio es complejo de aplicar ya que las pruebas precisas para excluir "todos" los agentes conocidos no han sido adecuadamente definidas. Por ello, en esta entidad se incluyen al menos tres tipos de procesos: eosinofilias reactivas a procesos no identificados, trastornos clonales linfoides que ocasionan eosinofilia reactiva a través de citocinas y trastornos clonales de la serie mieloide (**38, 39**). Evidentemente, en los dos últimos casos no deben cumplirse los criterios diagnósticos de neoplasias linfoides o mieloides que constituirían causas secundarias. La *eosinofilia familiar* es una situación excepcional, caracterizada por una herencia autosómica dominante y en la que existen datos de afectación cardiaca o neurológica (**37**). Finalmente, existen casos de eosinofilia prolongada, sin causa explicable en la que no existe evidencia de afectación de órganos, por lo que conceptualmente no pueden ser incluidos dentro del síndrome hipereosinofílico y que pueden ser definidos como *eosinofilia idiopática adquirida*.

1.1.3.2. Eosinofilia en el paciente autóctono infectado por VIH

La alteración inmunológica característica de la infección por VIH es la disminución de los linfocitos CD4. Las modificaciones del fenotipo linfocitario se han asociado a un incremento en el número de eosinófilos a medida que avanza la inmunodepresión (**40**), apareciendo, en algunas series hasta en un 12,6% de los pacientes (**41**). En nuestro país no existen estudios detallados acerca de este aspecto, aunque la impresión generalizada es que la presencia de eosinofilia en los individuos infectados por el VIH es menor que la descrita en las publicaciones citadas. De hecho, algunos autores sugieren que los estudios dirigidos a aclarar el mecanismo de la eosinofilia no aporta resultados en los pacientes con infección VIH (**42**). Sin embargo, existen algunas causas específicas de eosinofilia que deben ser consideradas de forma particular en este grupo. En concreto, debieran valorarse las siguientes posibilidades: (*i*) toxicidad medicamentosa (particularmente nevirapina, efavirenz y cotrimoxazol) (**43, 44, 45**); (*ii*) empleo de fármacos estimulantes de la hemopoyesis (GM-CSF); (*iii*)

insuficiencia suprarrenal por citomegalovirus (**46**); (*iv*) parasitosis *(Isospora belli*, *Strongyloides stercoralis*) y (*v*) foliculitis eosinofílica (**47**).

1.1.3.3. Eosinofilia importada

Como se ha señalado previamente, la presencia de eosinofilia en este contexto es casi exclusiva de las infecciones por helmintos. De forma excepcional, puede aparecer esta alteración analítica en algunas infecciones bacterianas (p. ej. resolución de una escarlatina o en formas crónicas de tuberculosis o lepra), enfermedades víricas (resolución de una infección vírica o infección VIH), micosis (especialmente en la coccidioidomicosis) (**48**) o algunas protozoosis concretas (*Isospora belli, Dientamoeba fragilis*, *Sarcocystis* sp y *Blastocystis hominis*) (**49, 50, 51, 52**).

Planteado de esta forma, el diagnóstico de eosinofilia aparentemente resulta sencillo, aunque en la práctica debemos realizar algunas matizaciones (**2, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59**):

- No todos los helmintos inducen eosinofilia del mismo grado. Así, se distinguen varios patrones de afectación como (*a*) la ausencia de eosinofilia (p. ej. hidatidosis no complicada), (*b*) formas fluctuantes (asociadas a los movimientos del parásito en los tejidos: *Loa loa*, *Dracunculus medinensis*, *Gnathostoma spinigerum*), (*c*) elevada durante toda la infección (p. ej. *Toxocara canis*, *Trichinella spiralis*), (*d*) limitada a un estadio parasitario (p. ej. fase larvaria de *Ascaris lumbricoides*), (*e*) de intensidad variable atendiendo a las diferentes fases de la parasitosis (p. ej esquistosomosis, estrongiloidosis o uncinariosis) o (*f*) presente tras un proceso intercurrente o durante el tratamiento (rotura de un quiste hidatídico, tratamiento de una filariosis).

- El estudio coproparasitario, prueba básica en el diagnóstico de las parasitosis intestinales, posee una baja sensibilidad en el diagnóstico de eosinofilia. Así, por ejemplo, en el diagnóstico de estrongiloidosis, incluso empleando técnicas coprológicas dirigidas, la sensibilidad es menor del 50% .

- Un mismo paciente puede presentar simultáneamente varias parasitosis, siendo diferente la participación de cada especie parasitaria en la aparición de eosinofilia. Así, por ejemplo, la detección en heces de *Trichuris trichura* (que por sí mismo ocasiona

exclusivamente una eosinofilia leve) asociada a valores elevados de eosinófilos obliga a la búsqueda de otros agentes causales.

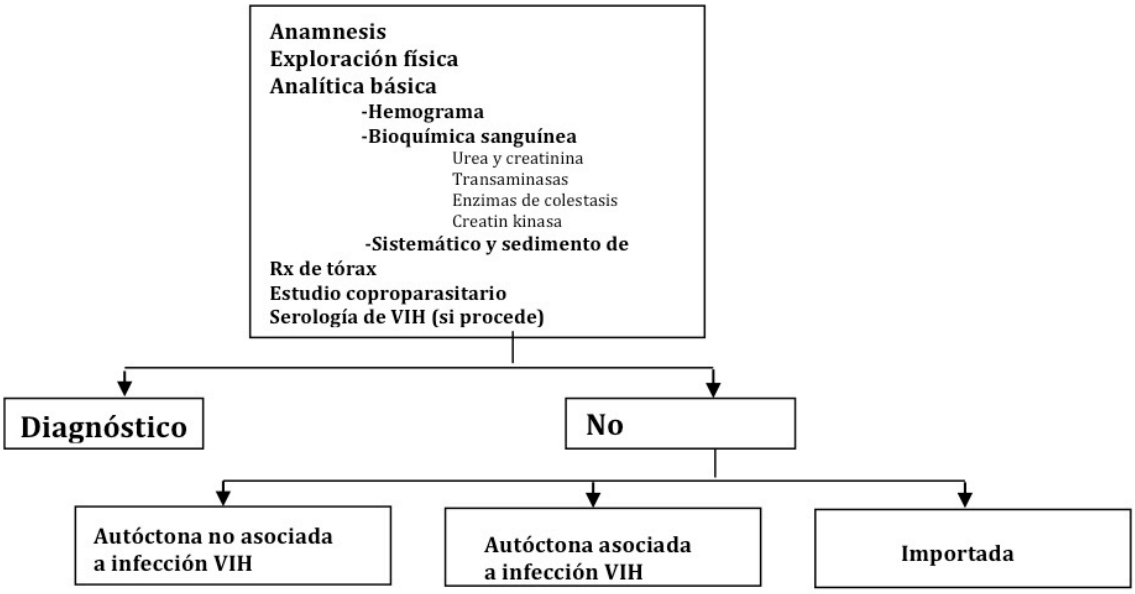
- Es muy importante considerar los aspectos geográficos, ya que determinadas parasitosis poseen una distribución localizada. Así, por ejemplo, no debe considerarse la posibilidad de una infección por *Loa loa* en países diferentes de los del centro de África o una infección por *Clonorchis sinensis* u *Opistorchis viverrini* en personas que nunca han estado en el Sudeste asiático.

1.1.4. Protocolo diagnóstico ante un paciente con eosinofilia

El estudio de un paciente con eosinofilia debe realizarse de forma ordenada, empleando pruebas sencillas en una primera fase, que permitirán un diagnóstico directo en muchos casos y en el resto permitirán clasificar al paciente en los tres grupos indicados previamente.

La ***fase inicial*** incluirá una anamnesis y exploración física completa, un hemograma (que identificará y permitirá conocer el grado de eosinofilia, además de evaluar las otras series), un estudio bioquímico (que incluya evaluación hepática, renal y muscular), una radiografía de tórax, un sistemático y sedimento de orina y un estudio coproparasitario (tres muestras). En presencia de factores de riesgo o datos clínicos sugerentes, deberá solicitarse una serología frente a VIH, con la autorización del paciente (**figura 1.1**).

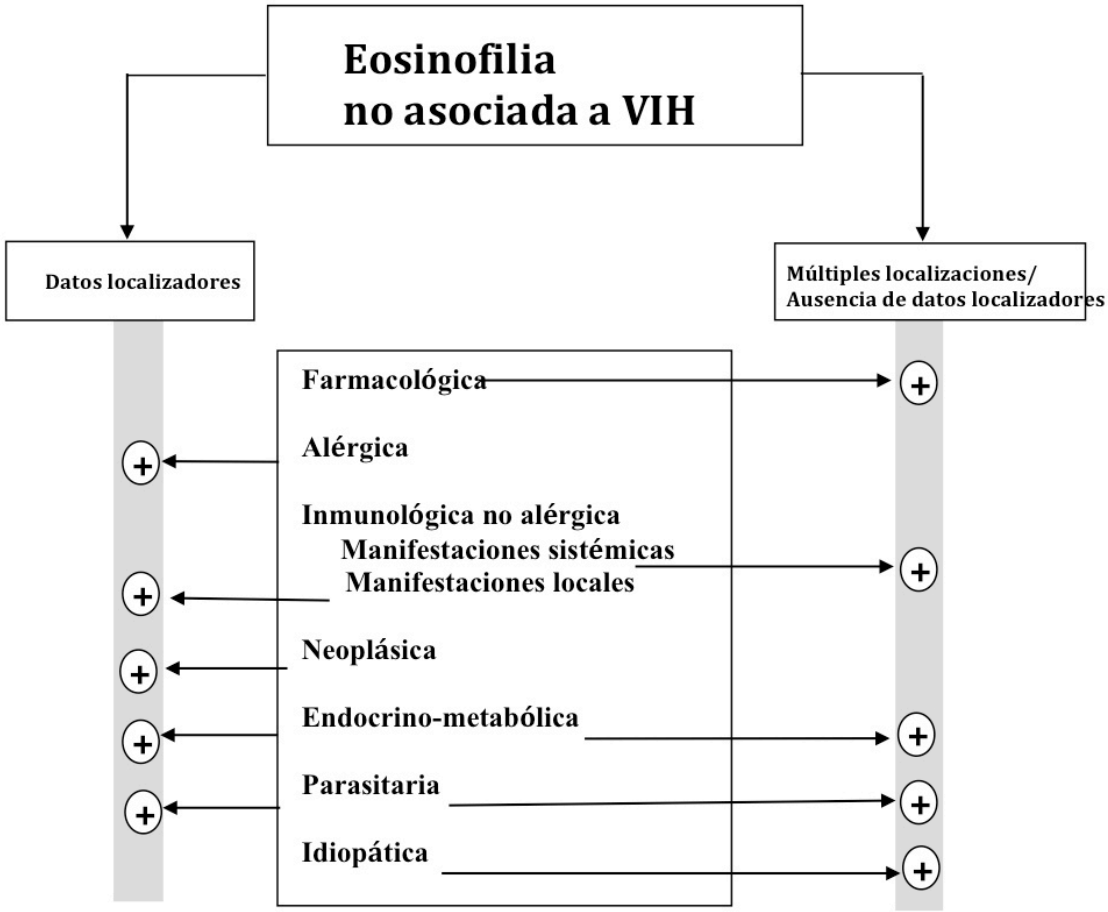
Figura 1.1. Manejo diagnóstico inicial ante un paciente con eosinofilia



Tras la aplicación de estas pruebas es posible realizar un diagnóstico etiológico o al menos sugerir las pruebas necesarias para realizarlo. Así, por ejemplo, ante la sospecha de una eosinofilia farmacológica deberá suspenderse el o los fármacos potencialmente implicados, añadiendo eventualmente corticoides si el cuadro clínico es grave. Por otro lado, la presencia de datos localizadores (pulmonares, cutáneos, osteo-articulares, etc.) llevará a los estudios complementarios pertinentes (estudios de imagen, endoscopia, biopsia tisular). En otros casos, tras la aplicación de este protocolo inicial únicamente podrá clasificarse la situación del paciente en uno de los grupos mencionados.

En el ***paciente que no ha viajado a regiones tropicales y no está infectado por el VIH***, deberá considerarse la realización de varias pruebas complementarias para descartar algunas entidades específicas, ya mencionadas previamente. Una ayuda diagnóstica consiste en considerar si el paciente presenta datos localizadores únicos (p. ej. pulmonares, cutáneas, etc.), múltiples datos localizadores o no existen otras manifestaciones clínicas **(figura 1.2).**

Figura 1.2. Orientación diagnóstica en el paciente con eosinofilia autóctona no asociada a infección VIH.



En el ***paciente que no ha viajado a regiones tropicales y está infectado por el VIH*** deberá reevaluarse de forma específica el uso de fármacos (cotrimoxazol, tuberculostáticos, antirretrovirales), la presencia de lesiones cutáneas (foliculitis eosinofílica, DRESS) y el estudio parasitario tanto coprológico (*Isospora belli*, *Strongyloides stercoralis*) como serológico (*Strongyloides* sp*)*. En ausencia de datos sugerentes, deberá controlarse periódicamente el hemograma sin necesidad de estudios más agresivos.

Finalmente, en el ***paciente en el que se sospeche patología importada*** se plantean dos situaciones diferentes (*i*) el paciente en el que existen datos localizadores, en cuyo caso deberán realizarse pruebas dirigidas tanto de imagen (ecografía, TAC, RMN), obtención de líquidos biológicos (estudio de esputo, punción lumbar, toracocentesis), o toma de muestras de tejidos (p. ej. piel, hígado, recto o médula ósea)

y (*ii*) si no existen datos de localización, en cuyo caso deberán realizarse estudios de despistaje, que incluyen técnicas específicas de estudio de heces (p. ej. técnica de Baermann), obtención de contenido duodenal (mediante endoscopia o Entero-Test®), estudios serológicos dirigidos (p. ej. empleando antígenos de *Schistosoma* sp. , *Strongyloides* sp. o *Dirofilaria* sp.), evaluación de hemoparásitos a diferentes horas del día y con técnicas específicas (test de Knott), estudio de orina de 24 horas y, eventualmente, pruebas de provocación (test de Mazzotti).

1.1.5. Manejo terapéutico de un paciente con eosinofilia

Evidentemente, la mejor forma de corregir una eosinofilia es el ***tratamiento etiológico***. En este sentido, la retirada de la medicación responsable (eventualmente asociada a corticosteroides en formas graves) hará desaparecer las eosinofilias debidas a fármacos; la corrección del defecto vitamínico normalizará el hemograma en la anemia megaloblástica o la administración hormonal corregirá las alteraciones de la insuficiencia suprarrenal.

El manejo de la eosinofilia producida por helmintos requiere algunas consideraciones especiales. Así, en la práctica todas las enfermedades tratables por helmintos responden a uno o varios de estos fármacos: albendazol, ivermectina, praziquantel, mebendazol y triclabendazol (**60, 61, 62, 63, 64, 65**). La ***dietilcarbamacina***, que todavía se indica en muchos textos actuales como tratamiento de las filariosis, además de sus importantes efectos secundarios, presenta un problema práctico: su dificultad de obtención por métodos convencionales. El ***praziquantel*** es el fármaco de elección en las cestodosis por adultos (teniosis, difilobotriosis e infección por *Hymenolepis* sp), así como en las trematodosis (esquistosomosis, paragonimosis, etc.). En las cestodosis por formas larvarias (hidatidosis, cisticercosis) el tratamiento farmacológico tiene un papel colateral. En los casos en los que está indicado, el ***albendazol*** es el que presenta una actividad mayor en las equinococosis (**66, 67**), mientras que el praziquantel es más eficaz en la cisticercosis (**68,69**). Las geohelmintosis (infecciones por *Trichuris*, *Ascaris* y uncinarias) y otras nematodosis intestinales (*Enterobius vermicularis*) responden adecuadamente a ***mebendazol*** o ***albendazol***, siendo en general más eficaz el albendazol que el mebendazol (con

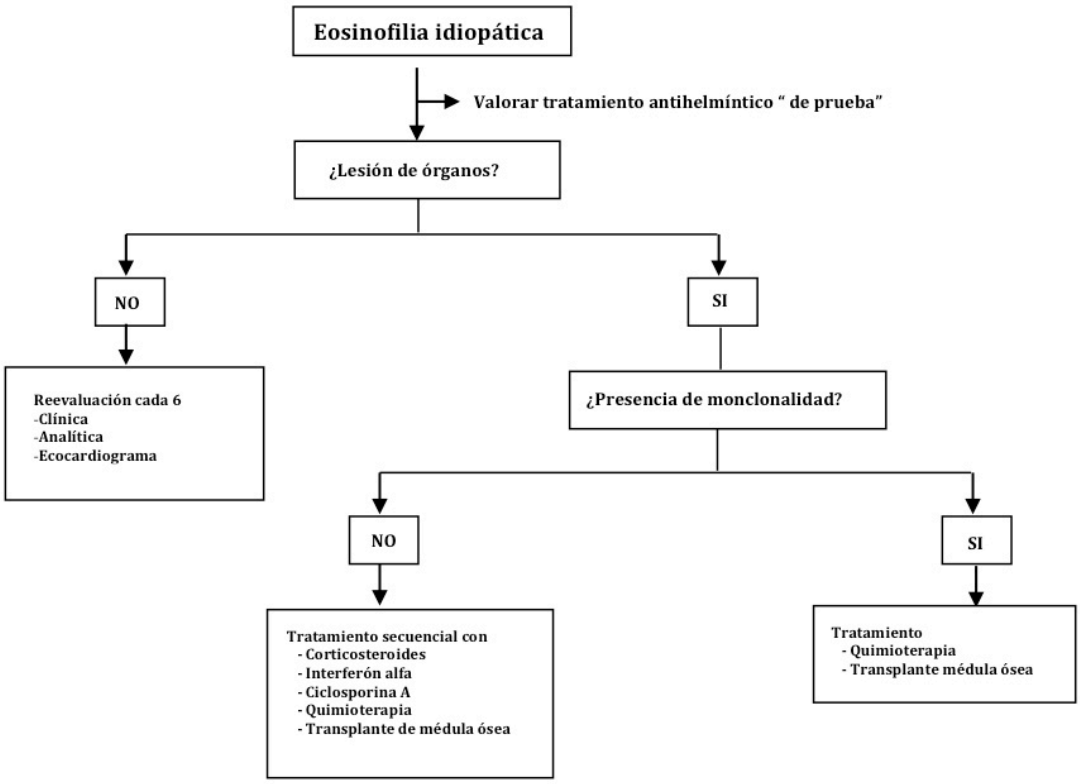
excepción de la infección por *Trichuris* en la que sucede lo contrario) (**68, 70**). El albendazol también es útil en el tratamiento de la toxocariosis (**71**), la triquinelosis (**72**) y la infección por *Ancylostoma caninum* o *braziliensis* (larva cutánea *migrans*) (**73**). La ***ivermectina*** constituye el fármaco de elección de la mayor parte de las filariosis (linfáticas, oncocercosis, loaosis e infecciones por *Mansonella streptocerca* y *Mansonella ozzardi*), con excepción de *Mansonella perstans* (que se trata con mebendazol de forma prolongada) (**74, 75, 76**). La ivermectina también constituye el fármaco de elección en la infección por *Strongyloides stercoralis* (**77**), y es útil en el tratamiento de la *larva cutánea migrans* (**73**). Finalmente el ***triclabendazol*** es el fármaco actual de elección en el tratamiento de la fasciolosis (**78**). La baja toxicidad de estos fármacos, su comodidad de administración y el efecto sinérgico de algunas combinaciones (p. ej. ivermectina y albendazol en las filariosis linfáticas) han sugerido su empleo empírico en situaciones en las que, aunque no se haya demostrado una helmintosis, se plantee esta posibilidad (**79**) o antes de efectuar el diagnóstico de síndrome hipereosinofílico.

En otras ocasiones, únicamente puede realizarse un ***tratamiento patogénico***, disminuyendo el número de eosinófilos, y de esta forma su potencial patógeno. Los corticosteroides constituyen el fármaco habitual en el manejo de las eosinofilias relacionadas con fenómenos inmunes o idiopáticas. El mecanismo de acción de estos fármacos es doble, ya que disminuyen la eosinofilopoyesis y promueven la eliminación de eosinófilos al incrementar la apoptosis y secuestro de estas células.

El manejo inicial de la eosinofilia idiopática (**figura 1.3**) requiere, además del eventual tratamiento antihelmíntico (ivermectina 400 µg/Kg y albendazol 400 mg en dosis única), la valoración de afectación de órganos. Si no existe afectación tisular, es aconsejable el seguimiento cada 6 meses, replanteando el diagnóstico y realizando un ecocardiograma de control (ya que la lesión cardiaca puede progresar insidiosamente, sin relación con la eosinofilia sanguínea). Si existe afectación orgánica, es importante estudiar la presencia de datos de clonalidad (anomalías cromosómicas, poblaciones con idéntico fenotipo, hibridación "in situ", etc.). En presencia de monoclonalidad, el tratamiento será el de la neoplasia hematológica responsable (quimioterapia y/o transplante de médula ósea). Específicamente en los casos de síndrome hipereosinofílico idiopático en los que se compruebe la translocación t (1,4) (q44,q12)

está indicado el tratamiento con imatinib (**80**). Si no se detecta clonalidad, el tratamiento inicial debe realizarse con prednisona (1 mg/Kg/día) en dosis descendentes hasta alcanzar la mínima dosis necesaria. Son factores que predicen una buena respuesta a los corticoides, la asociación con angioedema, la elevación de IgE y la eosinopenia prolongada tras una única dosis de corticoides. En aquellos casos en los que no existe respuesta a los corticoides puede emplearse α-interferón (**81, 82**) o ciclosporina (**83**). Finalmente, en casos muy agresivos debe intentarse el uso de quimioterapia y eventualmente transplante de médula ósea (**84, 85, 86**).

Figura 1.3. Manejo terapéutico en un paciente con eosinofilia idiopática



1.2. Eosinofilia. Mecanismos de producción

1.2.1. Biología general del eosinófilo

La primera ***descripción*** de los leucocitos polimorfonucleares eosinófilos (o de forma sencilla "eosinófilos") corresponde a Paul Ehrlich (1879), quien describió una subpoblación de leucocitos que se teñían con un compuesto cargado negativamente, denominado eosina (**87**).

Los eosinófilos han sido identificados en muchas especies de mamíferos, aves, reptiles y anfibios, siendo su ***morfología*** diferente dependiendo de las especies (**87, 88**). En los seres humanos, los eosinófilos son células móviles, con un diámetro aproximado de 8 mm y un volumen aproximado de 275 fl. Además de su avidez por la eosina, los eosinófilos presentan como dato morfológico característico un núcleo bilobulado con cromatina condensada. La activación de los eosinófilos por diferentes mediadores inflamatorios tanto "in vitro" (histamina, citocinas), como "in vivo" (síndromes hipereosinofílicos) da lugar a dos cambios característicos: la hipodensidad y la hipersegmentación nuclear (**89, 90**).

Ultraestructuralmente, el dato más característico de los eosinófilos es la presencia de muchos gránulos ovoides o esféricos que ocupan una quinta parte del citoplasma (**87**). Se distinguen cuatro tipos principales de gránulos: secundarios o específicos, pequeños, primarios y lipídicos (**figura 1.4**).

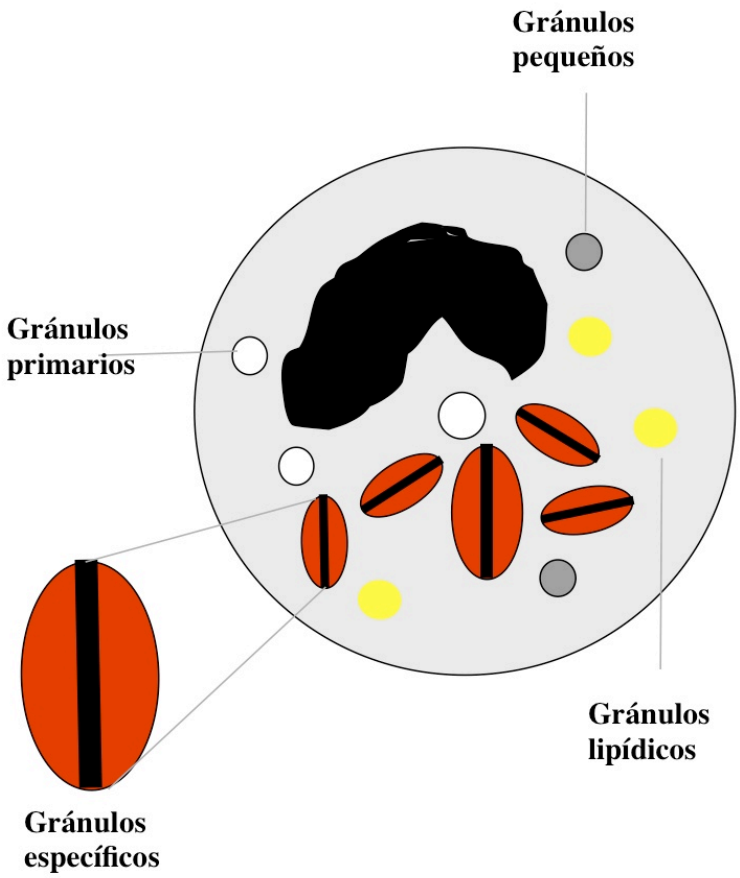
Los *gránulos secundarios o específicos* en humanos y otras especies de mamíferos contienen un núcleo denso ("core") y una matriz (**figura 1.4**), aunque existen diferencias notables dependiendo de la especie estudiada. El "core" está constituido principalmente por la proteína básica principal ("major basic protein" o MBP) y diversas citocinas (p.ej. GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5), mientras que en la matriz se encuentran varias proteínas importantes [proteína catiónica del eosinófilo (ECP), neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN), peroxidasa del eosinófilo (EP)], otras citocinas [p.ej. IL-6, TNFα, RANTES (*regulated on activation, normal T expressed and secreted*)] y enzimas (p. ej. ßglucuronidasa y catepsina D).

Los *gránulos primarios* contienen los cristales de Charcot-Leyden, que son incoloros, tienen una estructura característica hexagonal bipiramidal y una intensa actividad lisofosfolipasa.

Los *gránulos pequeños*, identificados en los eosinófilos tisulares y ausentes en eosinófilos circulantes o de la médula ósea, son ricos en arilsulfatasa B, fosfatasa ácida y , en menor proporción, catalasa.

Los *gránulos lipídicos*, sin membrana, contienen ácido araquidónico y las enzimas precisas para la síntesis de biolípidos. Su número aumenta tras la activación de esta estirpe celular.

Figura 1.4. Estructuras características de los eosinófilos



Los eosinófilos sintetizan y liberan un gran número de ***mediadores inflamatorios***, que básicamente corresponden a varios tipos de moléculas: biolípidos, citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento. En la **tabla 1.4** se indican, sin ánimo exhaustivo, los principales mediadores (modificado de la **referencia 87**).

Tabla 1.4. Principales mediadores inflamatorios derivados de los eosinófilos.

Tipo de mediador	Molécula	Denominación
Biolípidos	PAF	Factor activador de las plaquetas
	PGE2	Prostaglandina E2
	LTC4	Leucotrieno C4
	LPXA4	Lipoxina A4
Interleucinas	IL-1a	Interleucina 1
	IL-2	Interleucina 2
	IL-3	Interleucina 3
	IL-4	Interleucina 4
	IL-5	Interleucina 5
	IL-6	Interleucina 6
	IL-12	Interleucina 12
	IL-16	Interleucina 16
	γ-IFN	Interferón gamma
	TNFα	Factor de necrosis tumoral α
	GM-CSF	Factor estimulante de colonas granulocito- macrófago
Quimiocinas	Il-8	Interleucina 8
	MIP-1α	Proteína inflamatoria macrofágica 1
	RANTES	Reclutada tras activación. Normalmente expresada y segregada por los linfocitos T
	Eo-1	Eotaxina-1
Factores de crecimiento	TGF α y β	Factores de crecimiento trnsformante α y β
	PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
	VEGF	Factor de crecimiento endotelio-vascular
	NGF	Factor de crecimiento neural

Por otro lado, los eosinófilos poseen en su membrana plasmática un gran número de receptores. Atendiendo a su estructura química y función se clasifican en varios tipos: superfamilia de las inmunoglobulinas, receptores de citocinas, moléculas de adhesión, receptores de moléculas quimiotácticas (complemento, quimiocinas), enzimas, moléculas relacionadas con la apoptosis o señalización. En la **tabla 1.5 (a y b)** se indican los principales receptores del eosinófilo (basada en las referencias **88** y **91)**.

Tabla 1.5a. Principales receptores de membrana en los eosinófilos

Familia de receptores	Receptor	Función/es
Superfamilia inmunoglobulinas	CD 4	Correceptor HLA-II Adhesión LB/LT Diferenciación tímica
	CD 16	Receptor FC de IgG tipo III
	CD 32	Receptor FC de IgG tipo II
	CD 33	¿?
	CD 47	Receptor trombospondina. Molécula de adhesión
	CD 48	Adhesión a otras células que expresen CD2
	CD 50	ICAM-3. Regula la morfología leucocitaria
	CD 54	ICAM-1. Correceptor CD11b/CD18
	CD 58	LFA-3. Ligando de CD2
	CD 66	Molécula de adhesión y activación (6 isotipos) . Incluye CEA
	CD 89	Receptor FC de IgA
	CD 101	¿?
	HLA clase I	Antígenos de histocompatilidad de clase I
	HLA clase II	Antígenos de histocompatilidad de clase I
	FCεRI	Receptor de alta afinidad de FC de IgE
Receptores de citocinas	CD 25	Cadena α del receptor de IL-2
	CD 116	Cadena α del receptor de GM-CSF
	CD 117	Receptor del stem cell factor
	CD 119	Receptor de gamma interferón
	CD 120	Receptor de TNFα
	CD 123	Cadena α del receptor de IL-3
	CD 124	Cadena α del receptor de IL-4
	CD 125	Cadena α del receptor de IL-5
	CD 131	Cadena común de los receptores para GM-CSF, IL-3 e IL-5
	CD 213a	Cadenas α de los receptores de IL-13 (2 isotipos)
	IL-9R	Receptor de IL-9
	TGFßR	Receptor del TGFß
Moléculas de adhesión	CD 11a	Cadena integrina αL
	CD 11b	Cadena integrina αM
	CD 11c	Cadena integrina αX
	CD 15	¿?
	CD 18	Cadena ß de las integrinas CD11
	CD 29	Cadena ß de integrinas VLA
	CD 44	Hermes. Homing receptor
	CD 49d	Cadena integrina α4 (VLA-4)
	CD 49f	Cadena integrina α6 (VLA-6)
	CD 62L	L-selectina
	CD 156	ADAM 8. Extravasación de leucocitos
	CD 162	PSGL-1. Receptor "rolling"
	CD 174	Grupo Lewis
	α_D integrina	Cadena α de la integrina D
	$ß_7$ integrina	Cadena ß 7 de las integrinas

Tabla 1.5b. Principales receptores de membrana en los eosinófilos

Familia de receptores	Receptor	Función/es
Receptores de factores quimiotácticos	CD 35	Receptor de C3b unido a inmunocomplejos
	CD 88	Receptor de C5b unido a inmunocomplejos
	CD 181/182	Receptor de IL-8
	CD 183	CXC-R3. Receptor de 3 proteínas inducidas por interferón
	CD 191	CCR-1 . Receptor de RANTES
	CD 192	CCR-2 . Receptor de MIP-1
	CD 193	CCR-3 . Receptor de Eotaxina
	PAF R	Receptor de PAF
	LTB4 R	Receptor de LTB4
	C3a R	Receptor de C3a
	CystLT1R	Receptor de Leucotrieno C4
	CystLT2R	Receptor de Leucotrieno C4
	fMLPR	Receptor de péptidos formil-mrilados
	CRTH2	Receptor de prostaglandina D2
	Histamine 4R	Receptor de histamina
Enzimas	CD 13	Metaloproteasa. Receptor de coronavirus
	CD 45 RB/RO	Tirosina fosfatasa. Requerida para la activación celular
	CD 46	Cofactor de membrana del factor I para la inactivación de C3b
	CD 55	Decay accelerating factor. Acelera destrucción convertasas
	CD 59	Protectina. Inhibe la incorporación de C9 al complejo de ataque
	CD 87	Receptor del activador del plasminógeno
Moléculas relacionadas con apoptosis, señalización y de función desconocida	CD 9	Modula adhesión y migración
	CD 17	Lactosilceramida. Unión a bacterias promoviendo fagocitosis
	CD 24	Antígeno estable al calor . ¿Función desconocida?
	CD 28	Molécula coestimuladora al unirse al CD80
	CD 37	Traducción de señales
	CD 39	Función deconocida
	CD 43	Sialoforina. Molécula antiadhesiva
	CD 52	Función desconocida
	CD 53	Traducción de señales
	CD 63	Traducción de señales
	CD 65	Ceramida dodecasacárido
	CD 69	Activation inducer molecule. Involucrada en traducción de señales
	CD 71	Receptor de la transferrina
	CD 76	Lactosaminas
	CD 81	Complejo de transducción
	CD 82	Traducción de las señales
	CD 86	Ligando de CD 28 y de CD 152
	CD 92	Desconocida
	CD 95	Fas. Molécula inductora de apoptosis
	CD 97	Función desconocida
	CD 98	Regulación de la activación celular
	CD 99	Función desconocida
	CD 137	Función desconocida
	CD 139	Función desconocida
	CD 148	Función desconocida
	CD 149	Actualmente reclasificada como CD45
	CD 151	Función desconocida
	CD 153	Ligando de CD30
	CD 161	Función desconocida
	CD 165	Función desconocida
	Siglec 8	*Sialic acid binding Ig-like lectin* tipo 8
	Siglec 10	*Sialic acid binding Ig-like lectin* tipo 10
	LIR 1	*Leukocyte immunoglobulin-like receptor* tipo 1
	LIR 2	*Leukocyte immunoglobulin-like receptor* tipo 2
	LIR 3	*Leukocyte immunoglobulin-like receptor* tipo 3
	LIR 7	*Leukocyte immunoglobulin-like receptor* tipo 7
	TLR 7	*Toll like receptor* tipo 7
	TLR 8	*Toll like receptor* tipo 8

El ***origen*** de los eosinófilos en el adulto es la médula ósea, aunque como otras células sanguíneas, en fases iniciales del desarrollo, se producen en el bazo.

Existen tres compartimentos corporales en los que se encuentran las células de la serie eosinofílica: la médula ósea, la sangre circulante y los tejidos.

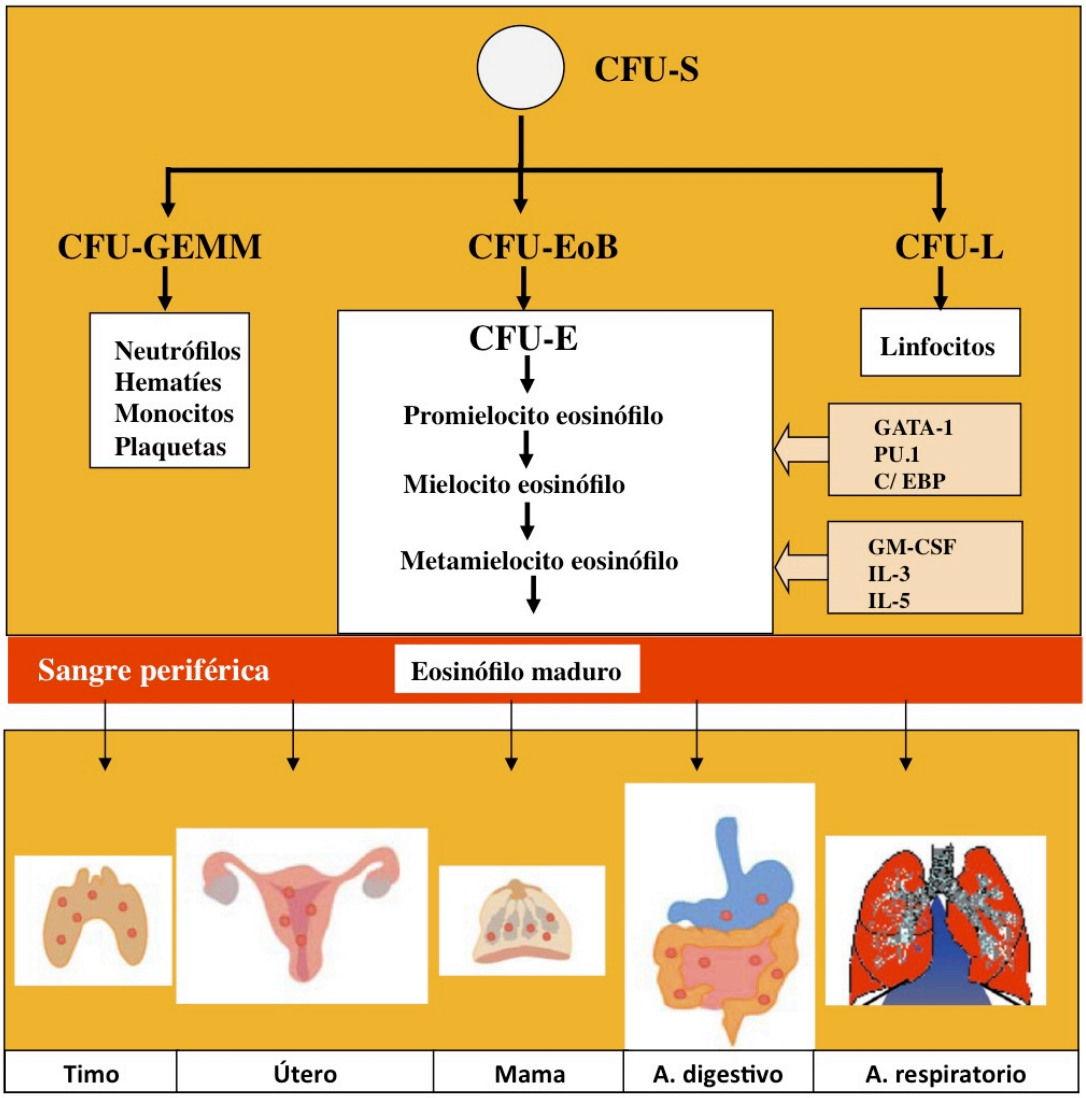
En la *médula ósea*, los eosinófilos, como todas las células hematopoyéticas, derivan de un progenitor común pluripotencial (CFU-GEMM) y un progenitor intermedio con los basófilos (**92**). La diferenciación hacia la serie eosinofílica depende de la interacción de al menos tres tipos de factores de transcripción: GATA-1 (un miembro de la familia de "zinc fingers"), PU.1 (un miembro de la familia ETS) y C/EBP (de la familia CCAAT/*enhancer-binding protein*). De ellos, el más importante es GATA-1, lo que se comprueba en modelos experimentales en los que al inactivar este factor de transcripción, desaparece la serie eosinófila (**93**). Posteriormente tiene lugar la diferenciación a precursores distinguibles morfológicamente: promielocitos, mielocitos y metamielocitos, que finalmente generan eosinófilos maduros (**figura 1.5**). La proliferación y diferenciación de la serie eosinofílica depende básicamente de tres citocinas: GM-CSF , IL-3· e IL-5. La serie eosinofílica comprende aproximadamente el 3% de la celularidad de la médula ósea (**87**). De ellos, aproximadamente un tercio son promielocitos/mielocitos (37%), otro tercio eosinófilos maduros (37%) y el resto (26%) metamielocitos (**87**). Se calcula que el tiempo de generación de eosinófilos desde la última mitosis oscila entre 2,5 y 3,5 días.

Los eosinófilos liberados a la *sangre periférica* son células terminales, es decir, sin capacidad de división ulterior (**94**). Su vida media de aproximadamente 18 horas y el tiempo medio de tránsito circulante es de 26 horas. Como se ha mencionado en el apartado previo, existen fluctuaciones circadianas en el número de eosinófilos circulantes, además de las inducidas farmacológicamente. Por otro lado, existen importantes diferencias interespecies en lo que respecta al número de eosinófilos circulantes.

Tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, la mayor parte de los eosinófilos se encuentran en los *tejidos*. Es preciso indicar, en este contexto, que los eosinófilos tisulares no vuelven a entrar en la circulación sistémica, siendo su vida media larga (días o semanas según diversos estudios) (**94**). Los principales órganos en los que se acumulan los eosinófilos son: el timo, los órganos sexuales femeninos (útero

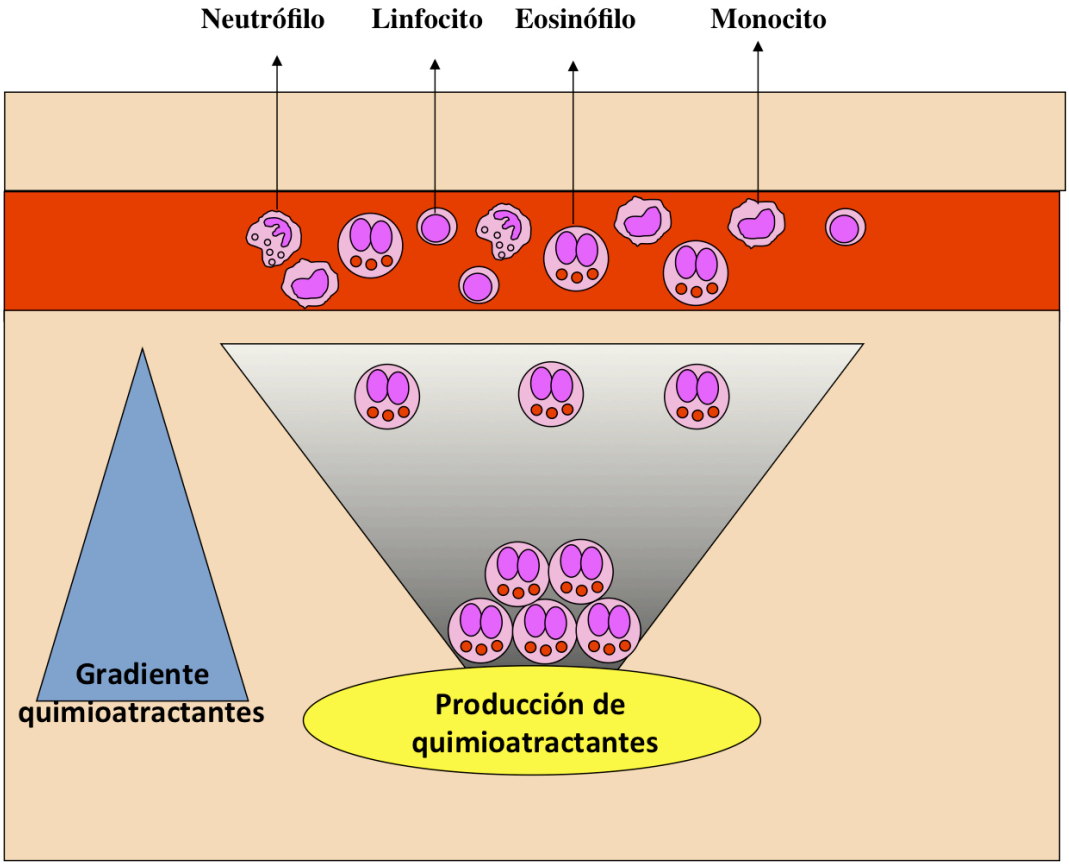
y mama) y los tejidos en contacto con el exterior (fundamentalmente tractos digestivo y respiratorio) (**figura 1.5**).

Figura 1.5. Origen y cinética de los eosinófilos



Un aspecto clave en la cinética de los eosinófilos consiste en el paso desde la sangre circulante a los tejidos. Los dos factores esenciales en este proceso son: *i)* la existencia de un gradiente de moléculas capaces de atraer de forma específica a los eosinófilos hasta el tejido (**figura 1.6**) y *ii)* la interacción entre las moléculas de superficie de los eosinófilos con receptores de adhesión en el endotelio.

Figura 1.6. Quimioatractantes para eosinófilos



En apartados posteriores se indicará el papel concreto de los principales quimioatractantes relacionados con el reclutamiento de eosinófilos y la modulación de las moléculas relacionadas con la adhesión eosinófilo-endotelio. En este apartado únicamente señalaremos algunas características del proceso de adhesión.

Las principales moléculas de adhesión pertenecen a tres familias: selectinas (familia CD62), integrinas y otras moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas **(tabla 1.6).** La familia de las *selectinas* está formada por tres moléculas, dos de ellas expresadas en el endotelio (CD62E o endotelial y CD62P o plaquetar, expresada en el endotelio activado) y una de ellas presente en los leucocitos (CD62L). Las selectinas se unen a los residuos glucídicos presentes en el otro componente del complejo leucocito-endotelio. Así, las selectinas endoteliales se unen a residuos de ácido siálico del grupo Lewis presentes en los leucocitos y la selectina leucocitaria a glicoproteínas endoteliales (GlyCAM y CD34). El grupo de las *integrinas* está compuesto por múltiples moléculas

heterodiméricas (cadenas α y β). Las integrinas se agrupan en familias que comparten la cadena β y difieren en la cadena α. Así, la familia β1 está formada por las moléculas VLA (*very late activation antigen*), implicadas en la adhesión intercelular y en la unión de leucocitos al tejido conectivo. La familia β2 (LeuCAM) está formada por tres miembros: CD11a/CD18 (también denominado LFA-1), cuya función es la adhesión intercelular, CD11b/CD18 y CD11c/CD18 (que corresponden a los receptores para el complemento tipo 3 y 4). Otras familias de integrinas son la β3, relacionada con la adhesión plaquetaria, y la familia β7, implicada en la recirculación linfocitaria. Otras moléculas de adhesión, pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas son ICAM-1 (*intercellular adhesión molecule*1), ligando de CD11a/CD18 y VCAM (*vascular adhesión molecule*), ligando de VLA-4.

Vbnbm

Tabla 1.6 Principales moléculas de adhesión

Grupo/Familia	Moléculas	Expresión y función	Ligando
Selectinas			
	CD62-E	Expresada en endotelio activado Adhesión débil a leucocitos	Sialil-Lewis leucocitario
	CD62-P	Expresada en endotelio activado Adhesión débil a leucocitos.	
	CD62-L	Expresada en leucocitos Adhesión débil a endotelio.	GlyCAM y CD34 endoteliales
Integrinas			
Familia ß 1 (VLA)	VLA 1,2,3,4,5,6	Expresión en leucocitos Unión a la matriz extracelular Unión intercelular (VLA-4)	VCAM endotelial
Familia ß 2 (Leu-CAM)			
	LFA-1 (CD11a/CD18)	Expresión en leucocitos Unión intercelular	ICAM endotelial
	CR-3 (CD11b/CD18)	Expresión en leucocitos Receptor para complemento	
	CR4 (CD11c/CD18)	Expresión en leucocitos Receptor para complemento	
Otras adhesinas			
	ICAM-1	Expresión en endotelio Unión intercelular	LFA-1 leucocitario
	VCAM	Expresión en endotelio Unión intercelular	VLA 4 endotelial

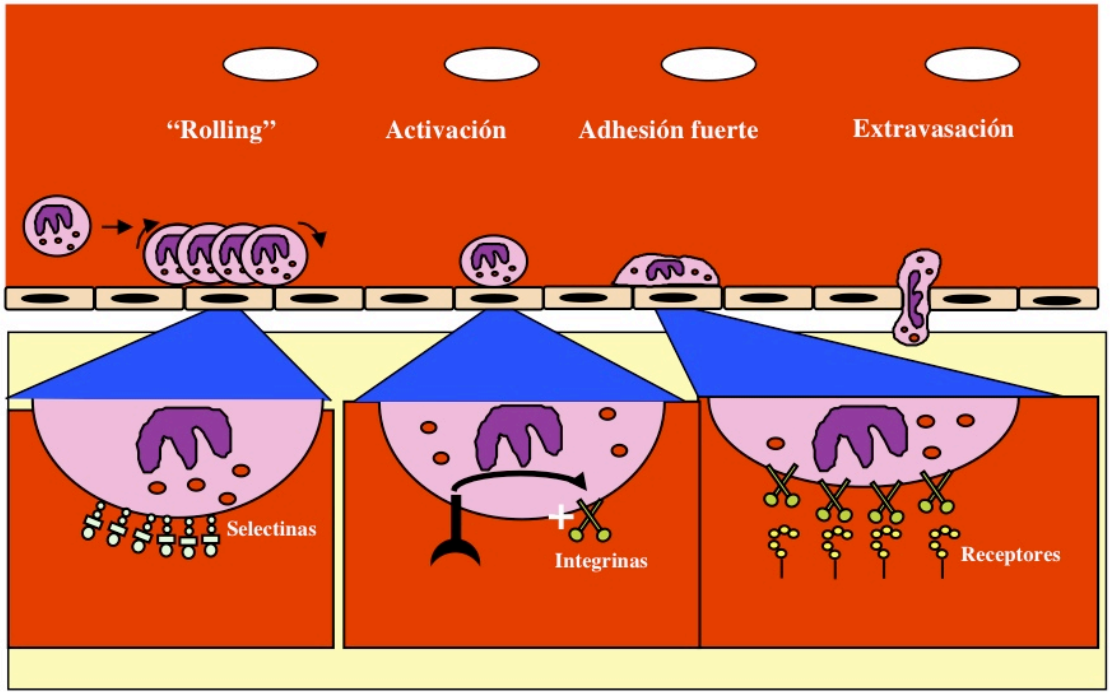
Las *selectinas* son las responsables de la ralentización de los leucocitos circulantes mediante un proceso de adhesión débil ("rolling"). De esta forma, los leucocitos circulantes son "frenados" por la interacción entre selectinas y sus ligandos. Aunque en el endotelio normal no se expresan estos ligandos, la acción de los mediadores inflamatorios induce la expresión de los contrarreceptores.

Si el estímulo desaparece, los leucocitos acceden de nuevo al torrente sanguíneo. Sin embargo, si persiste el efecto de los mediadores, las células endoteliales expresan *moléculas quimioatractantes* (p. ej. PAF o IL-8) *en la membrana celular* (no segregadas), capaces de unirse a sus receptores leucocitarios.

La unión de ambos componentes activa otras moléculas denominadas *integrinas*, que de esa forma pueden unirse a sus receptores específicos, mediando la adhesión fuerte entre endotelio y leucocito.

Finalmente tiene lugar la extravasación de los leucocitos hacia el tejido conectivo. Estos procesos se representan esquemáticamente en la **figura 1.7**.

Figura 1.7. Fases de la migración transendotelial



La adhesión y migración transendotelial de los eosinófilos presenta características comunes con otros leucocitos y algunos aspectos diferenciales (**95, 96**).

Así, en lo que respecta a las *selectinas y a sus ligandos*, los eosinófilos expresan 10 veces menos ligandos para la selectina E que los neutrófilos o basófilos, mientras que la expresión de PSGL es el doble que en las células mencionadas. Por ello, en el "rolling" de los eosinófilos el papel fundamental parece corresponder a la selectina P. Los niveles de selectina L en eosinófilos son ligeramente menores que los de los neutrófilos, reduciéndose rápidamente tras la activación celular. En lo que respecta a las *integrinas y sus ligandos*, los eosinófilos presentan dos peculiaridades: *i)* por un lado, son los únicos leucocitos circulantes que expresan VLA 6 ($\alpha 6\beta 1$) capaz de unirse a la laminina y *ii)* por otro lado, los eosinófilos recientemente aislados se unen preferencialmente a través de VLA-4 a su ligando VCAM-1. Sin embargo, tras la activación celular, disminuye la unión a VCAM-1 y aumenta la unión a ICAM-1.

Los eosinófilos desempeñan un importante ***papel fisiológico*** en diferentes órganos y tejidos.

Tanto en las superficies mucosas como en los órganos linfoides secundarios, los eosinófilos participan en la *inflamación y en la respuesta inmune*. El aspecto más estudiado es su papel como célula efectora, liberando enzimas, biolípidos, citocinas y factores de crecimiento. De hecho, en animales libres de patógenos no existen eosinófilos circulantes y es difícil observar eosinófilos en los tejidos. En el **epígrafe 1.3**. de esta introducción se señalarán varios aspectos esenciales de esta función. Además, los eosinófilos participan en otros procesos como la respuesta innata (**97**), la presentación antigénica (**88**), la diferenciación de los linfocitos T en el timo (**88**) o el equilibrio Th1/Th2 (**88**). Así, se ha demostrado la expresión de múltiples tipos de *Toll like receptors,* mediadores de la respuesta innata en la superficie del eosinófilo y la respuesta efectora a estímulos específicos (particularmente peptidoglicano) (**98**). Por otro lado, en diversos trabajos se ha demostrado la capacidad de los eosinófilos como células presentadoras de antígenos víricos, bacterianos y parasitarios (**86, 99**), al poseer HLA de clase I y II, expresar moléculas coestimulatorias y producir citocinas específicas. En tercer lugar, parece bien establecido el papel de los eosinófilos en la diferenciación de los linfocitos T en el timo promoviendo la deleción selectiva restringida por HLA de clase I (**100**). Finalmente, los eosinófilos modulan el equilibrio Th1/Th2 a través de la síntesis de indoleamina 2-3 dioxigenasa (IDO), una enzima

capaz de convertir triptófano en kinureínas. Estas sustancias modifican el equilibrio Th1/Th2 promoviendo la apoptosis de los linfocitos Th1 (**101**).

Además de las funciones inflamatorias e inmunológicas, los eosinófilos participan en otras funciones biológicas como la regulación de la función endometrial (**102**) o el desarrollo de las glándulas mamarias (**103**).

Finalmente, los eosinófilos desempeñan un **papel patogénico** importante en varias entidades de diferente origen: infecciones, sobre todo helmínticas, asma, enfermedades digestivas (esofagitis eosinofílica) o tumorales (algunos síndromes hipereosinofílicos) (**88**). La descripción concreta del papel del eosinófilo en los mismos escapa a los objetivos de esta revisión. Únicamente en apartados posteriores se indicarán algunos aspectos importantes de las relaciones entre eosinófilos y helmintos.

1.2.2. Citocinas "eosinofílicas"

1.2.2.1. **Aspectos generales**

En un sentido amplio, prácticamente todas las citocinas conocidas tienen relación con la biología de los eosinófilos. De hecho, en esta revisión se han indicado previamente las citocinas producidas por los eosinófilos (v. Pág. 30.) y los receptores para citocinas de esta estirpe celular (v. Pág. 31).

Sin embargo, un número menor de citocinas tiene una relación específica con esta estirpe celular. En este apartado, tras una revisión de la clásica citocina eosinofílica (IL-5) nos centraremos en otras citocinas cuyo papel en la eosinofilia relacionada con helmintosis ha sido menos estudiado.

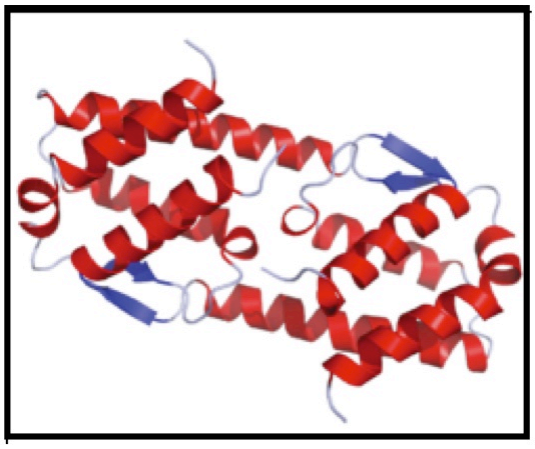
1.2.2.2 Interleucina 5 (IL-5)

Aunque en el ratón se había descrito previamente una molécula producida por linfocitos con capacidad de diferenciación de la serie eosinofílica (EDF), la clonación del gen responsable, su secuencia nucleotídica y su expresión en humanos fue objeto de ***descripción*** por Campbell y cols en 1987 (**104**).

Las principales ***células productoras*** de IL-5 son los linfocitos CD4 Th 2, aunque también se ha descrito su producción por eosinófilos, basófilos y linfocitos CD8 (+).

IL-5 pertenece a una familia de proteínas con una ***estructura*** similar, formada, entre otras moléculas, por IL-3, IL-4, GM-CSF (**105**). Un dato común a todas las proteínas de esta familia es su estructura terciaria, formada por 4 hélices α, ordenadas en una configuración *up-up/down-down*. La IL-5 humana segregada tiene un peso molecular de 45.000 a 60.000 Da, correspondiendo aproximadamente la mitad a residuos glucídicos añadidos durante el procesamiento intracelular. La estructura proteica corresponde a un homodímero (**figura 1.8**) formado por dos monómeros en configuración antiparalela. Cada monómero está formado por 115 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 12.000 Da. Es preciso señalar que los monómeros aislados no poseen actividad biológica.

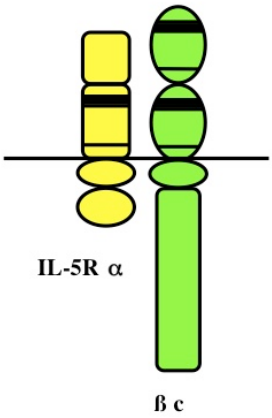
Figura 1.8. Estructura de la interleucina 5



En humanos, el ***gen*** que codifica la síntesis de IL-5 se localiza en el cromosoma 5, en proximidad con los encargados de codificar otras proteínas relacionadas (IL-3,, IL-4 y GM-CSF) (**106**).

La interleucina 5 ejerce sus efectos por interacción con su **receptor específico** (IL5R) (**107**). Este receptor presenta una estructura similar (heterodímeros de la familia de los receptores de hemopoyetinas) a la de los otras moléculas mencionadas (IL-3, GM-CSF). Está constituido por una cadena α (CD 116), específica para IL-5 y una cadena ß (ßc; CD 131) común a los receptores de la familia mencionada (**figura 1.9**). La cadena IL-5Rα aislada confiere la especificidad, pero presenta una baja afinidad por la citocina. La cadena ß no es capaz de fijar IL-5, pero tras la unión a la cadena α forma un receptor de alta afinidad para esta citocina.

Figura 1.9. Estructura del receptor de la interleucina 5



La ***traducción*** de las señales tras la unión IL-5 a su receptor tiene lugar a través de la cadena ßc (**108**). Las tres vías principales de señalización son: la vía JAK/STAT [*Janus kinase* (JAK)/*signal transducer and activator of transcription* (STAT)], la vía MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) y la vía PI3-K (*phosphatidylinositol 3-kinase*).

En lo que respecta a la vía *JAK/STAT*, es preciso mencionar que la principal kinasa de la familia *src* ativada por esta citocina es *Jak 2*. Otras kinasas de esta familia, activadas por IL-5, son *Lyn* y *Syk* y son esenciales en la activación de mecanismos antiapoptóticos. La activación de Jak 2 da lugar a la fosforilación de varios residuos de tirosina en la cadena ßc, tres de los cuales sirven como lugares de fijación de las proteínas STAT-1 y STAT-5, que continuarán la señalización hacia el núcleo.

La vía *MAPK* incluye tres cascadas de señales iniciadas por ERK (*extracellular signal regulated kinase*), JNK (*c-jun amino-terminal kinase*) y p38.

Finalmente, tras la estimulación por citocinas, la *PI3-K* fosforila el fosfatidilinositol de la membrana plasmática generando fosfatidil inositol trifosfato (PIP3). Esta molécula actúa como segundo mensajero amplificando la señal por interacción con otras moléculas a través de dominios tipo pleckstrina.

Los ***efectos biológicos*** de la IL-5 se ejercen lógicamente sobre aquellas células que expresan receptores para esta citocina: los eosinófilos, basófilos y, en el ratón, en precursores de los linfocitos B.

En ratones, la IL-5 participa con otras citocinas (sobre todo IL-4 e IL-3) en la diferenciación de los *linfocitos B* y en el cambio de isotipo hacia IgE. Sin embargo, en humanos los datos acerca de esta actividad son controvertidos.

Los efectos de la IL-5 sobre los basófilos son (**109, 110, 111**): i) promueve la degranulación (con liberación de histamina), incrementa la expresión de CD11b y aumenta la supervivencia, aunque con menor intensidad que la IL-3. ii) prima a estas células para la liberación de PAF y leucotrienos.

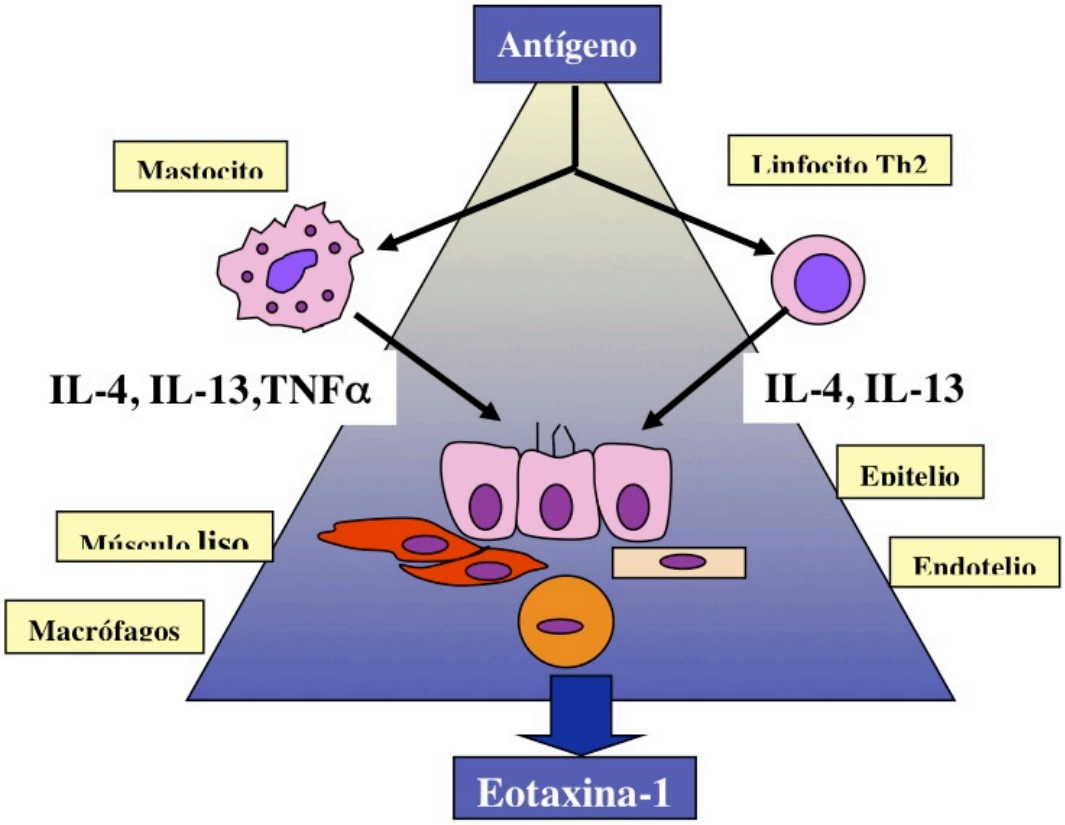
Finalmente, la IL-5 ejerce importantes acciones sobre los eosinófilos (**112**): *i)* incrementa la producción de eosinófilos por diferenciación medular, *ii)* facilita la liberación de eosinófilos a la sangre, iii) aumenta la supervivencia de estas células y *iv)* activa múltiples funciones de estas células (quimiotaxis, liberación de mediadores, expresión de moléculas de membrana).

1.2.2.3 Eotaxina-1

El ***descubrimiento*** de la eotaxina-1 tuvo lugar en 1993 en estudios experimentales de provocación alergénica, detectándose y purificándose en el líquido de lavado broncoalveolar **(113, 114).** Posteriormente, se han identificado dos moléculas funcionalmente similares denominadas eotaxina-2 y eotaxina-3 (**115, 116, 117**).

Múltiples ***tipos celulares*** (células epiteliales, macrófagos, endotelio vascular, músculo liso y los propios eosinófilos) son capaces de sintetizar y liberar eotaxina-1. Aunque el estímulo inicial para su producción son antígenos o alergenos (**117**), los mediadores directamente implicados en su síntesis son otras citocinas liberadas por mastocitos o linfocitos CD4 Th2 (**115, 118**) (**figura 1.10**).

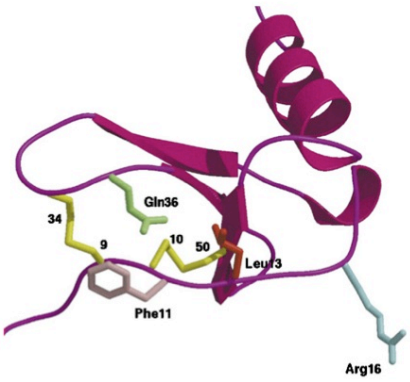
Figura 1.10. Producción de eotaxina-1



La eotaxina-1 presenta una **estructura proteica** característica de la familia de las quimiocinas (**119**). Esta denominación deriva de la contracción de dos términos: ***quimio***taxis y ***cito***cinas, es decir, moléculas liberadas por células inflamatorias e inmunes que modulan la movilidad celular. Las quimiocinas son proteínas básicas de bajo peso molecular, de las que se han descrito más de 45 tipos. Desde un punto de vista estructural, las quimiocinas se clasifican en 2 grupos principales: quimiocinas α (con un aminoácido entre las dos primeras cisteínas: CXC), quimiocinas ß (con las dos primeras cisteínas adyacentes: CC). Las quimiocinas α se subclasifican en dos grupos: *i*) aquellas que tienen una secuencia glutámico-leucina-arginina (p. ej. la interleucina 8), que atraen selectivamente a neutrófilos y *ii*) aquellas que no poseen esta secuencia, que tienen una acción quimiotáctica sobre linfocitos T activados (p. ej. IP-10, *interferon inducible protein*) o linfocitos T no activados (p. ej. SDF-1, *stromal derived factor*). Las quimiocinas ß actúan principalmente sobre monocitos (p. ej. MCP, *monocyte chemottractant protein*; MIP *macrophage inflammatory protein*), linfocitos (RANTES, *regulated on activation normal T expressed and secreted*), o eosinófilos (p. ej. eotaxina o RANTES).

En concreto, la eotaxina-1 es una quimiocina ß de 73 aminoácidos, con una estructura terciaria característica de esta familia (**120**) (**figura 1.11**). Eotaxina-2 y eotaxina-3 presentan una homología estructural con eotaxina-1 menor del 40% y difieren totalmente en la región amino terminal.

Figura 1.11. Estructura terciaria de eotaxina 1



El ***gen*** que codifica la síntesis de eotaxina-1 se localiza en la región cromosómica 17q11.2, en proximidad con otros genes de quimiocinas C-C.

Los ***receptores*** para quimiocinas (más de 17 descritos en la actualidad) también se clasifican en dos tipos principales: receptores para quimiocinas α (CXC**R**) y para quimiocinas ß (CC**R**). Estos receptores pueden aparecer de forma constitutiva en determinadas estirpes (p. ej CXCR1 en neutrófilos, CCR3 en eosinófilos o CCR5 en monocitos) o expresarse de forma diferente dependiendo de la diferenciación o activación celular. Los receptores para quimiocinas poseen 7 dominios transmembrana y se encuentran acoplados a proteínas G.

La eotaxina-1 es una quimiocina inusual, ya que únicamente es capaz de unirse a un receptor: CCR3 (**116**). Este receptor se expresa principalmente en eosinófilos, alcanzando una gran densidad (40.000-400.000/célula). Otras células que expresan CCR3 son los basófilos, los linfocitos Th2 y las células de la microglía. Las vías de traducción de las señales tras la unión eotaxina-1 a CCR3 son poco conocidas por el momento.

Los ***efectos biológicos*** de la unión eotaxina-1 a CCR3 son múltiples e incluyen (**115, 116, 121, 122**): *i)* aumento en la concentración de calcio intracelular , *ii)* aumento de la expresión de CD11b, *iii)* activación de MAPK (mitogen-activated protein kinase), *iv)* producción de radicales libres de oxígeno, *v)* polimerización de actina, que se asocia a un incremento de la quimiotaxis y estímulo de la liberación de gránulos.

Como consecuencia de estos efectos, eotaxina-1 participa de forma importante en la liberación de eosinófilos desde la médula ósea, en la acumulación de eosinófilos en los tejidos y en la activación de estas células.

1.2.2.4. Interleucina 13 (IL-13)

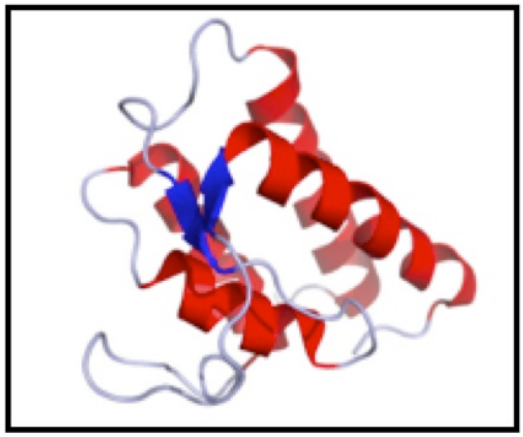
La primera **descripción** de la IL-13 tuvo lugar en 1989 como producto biológico de los linfocitos Th2 y su caracterización funcional y estructural se produjo cuatro años más tarde por diversos grupos de trabajo (**123**).

Aunque se ha descrito su producción por otros ***tipos celulares*** (p. ej. macrófagos, células NK, eosinófilos), la principal fuente de IL13 son los linfocitos CD4 Th2 activados (**124**).

Desde un punto de vista ***estructural***, la IL-13 pertenece a la clase de citocinas

tipo I presentando una estructural terciaria definida por un "core" constituido por 4 hélices α hidrofóbicas (**figura 1.12**).

Figura 1.12. Estructura terciaria de IL-13

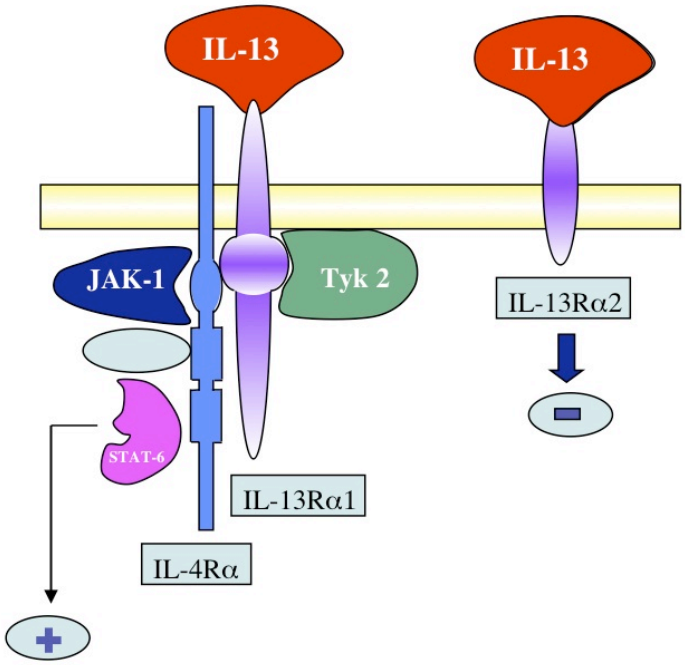


La interleucina 13 muestra muchas similitudes estructurales con la IL-4 aunque mientras que IL-4 es especie-específica, IL-13 tiene actividad interespecie (**123**).

El ***gen*** que codifica la síntesis de IL-13 consta de 4 intrones y 3 exones, localizándose en el cromosoma 5 (región 5q31) en proximidad con los genes que codifican IL-4, IL-3, IL-5 e IL-9.

La IL-13 es capaz de unirse a dos tipos de moléculas transmembrana que actúan como ***receptores:*** IL-13Ra-1 e ILRa-2, ambos miembros de la superfamilia de receptores hemopoyéticos. Los genes que codifican ambas cadenas se localizan en el cromosoma X. La molécula IL-13Ra-1 es un receptor de afinidad intermedia para IL-13, presentando una elevada afinidad cuando se asocia a la molécula IL-4Ra (**figura 1.13**). La interacción entre IL-13 y este receptor lleva a la activación de la vía de señalización intracelular JAK-1/STAT-6 y a la generación de las actividades biológicas de esta molécula. Por el contrario, la unión de IL-13 con ILRa-2 (expresado tanto como proteína de membrana, receptor soluble o molécula intercelular) parece constituir un mecanismo de regulación negativa de las actividades de esta citocina.

Figura 1.13. Receptores y señalización intracelular de IL-13



La interleucina 13 es una molécula que desempeña múltiples ***actividades biológicas***.

Así, en las células inmunes y/o inflamatorias interviene en la diferenciación y cambio de isotipo (IgE) de los *linfocitos B*, incrementa la expresión de CD23 y HLA de clase II, disminuyendo la expresión de genes proinflamatorios en las *células del sistema mononuclear fagocítico*, modula la expresión de receptores FCeRI en *mastocitos* y estimula el reclutamiento y activación de *eosinófilos*.

Por otro lado, IL-13 actúa sobre otros tipos celulares como *fibroblastos* (incrementando la síntesis de colágeno), *células epiteliales* (ocasionando hipersecreción de moco), *endotelio vascular* (incrementando la expresión de VCAM y de quimiocinas) y *músculo liso* (promoviendo su proliferación y respuesta a estímulos colinérgicos).

1.2.2.5. Interleucina 16 (IL-16)

La primera ***descripción*** de la IL-16 tuvo lugar en 1982 como un factor quimioatractante para los linfocitos (*lymphocyte chemoattractant factor*), recibiendo su denominación actual en 1995 (**125, 126**).

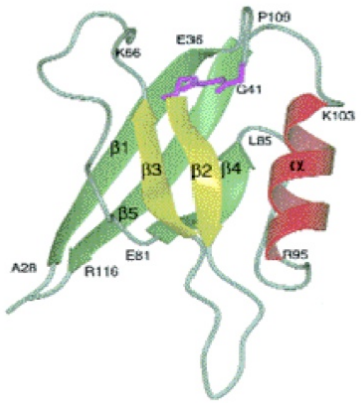
Varias ***estirpes celulares*** son capaces de sintetizar y liberar interleucina 16, aunque los estímulos y la regulación de su síntesis es diferente, como se expresa en la **tabla 1.7**.

Tabla 1.7. Células productoras de IL-16 y su regulación

Tipo celular	RNA m	Pro-IL-16	IL-6 preformada	Estímulos
Linfocitos CD8	Constitutiva	Constitutiva	Presente	Histamina/Serotonina Antígenos/Mitógenos
Linfocitos CD4	Constitutiva	Constitutiva	Ausente	Antígenos/Mitógenos
Mastocitos	Constitutiva	Constitutiva	Ausente	PMA/C5a
Eosinófilos	Constitutiva	Constitutiva	Ausente	GM-CSF
Células dendríticas	Constitutiva	Constitutiva	Ausente	IL-4/ GM-CSF
Células epiteliales	Inducible	Inducible	Ausente	TGFß/TNFα
Cerebelo	Constitutiva	Constitutiva	Ausente	Desconocidos
Fibroblastos	Constitutiva	Inducible	Ausente	IL-1ß/TNFα

La ***estructura*** habitual de la IL-16 tanto natural como recombinante es la de un homotetrámero formado por monómeros de 14 kDa. En la **figura 1.14** se indica de forma esquemática la estructura de un monómero.

Figura 1.14. Estructura de un monómero de IL-16



Inicialmente, la IL-16 es sintetizada como un precursor de 631 aminoácidos que posteriormente es procesado por la caspasa 3 para liberar el monómero. Bioquímicamente, la IL-16 es una proteína básica con un punto isoeléctrico de 9.1, no siendo importante la glicación.

El ***gen*** de la IL-16 en humanos se localiza en la región 15q26.1-3 y consta de 7 exones y 6 intrones. La región promotora no posee región TATA, aunque sí contiene dos regiones CAAT y tres lugares para la unión con factores de transcripción GABP.

Los efectos de la IL-16 tienen lugar por interacción directa con el ***receptor*** CD4 presente en varios tipos celulares, principalmente los linfocitos CD4, aunque también en subpoblaciones de monocitos, eosinófilos, células dendríticas y neuronas. En el ratón también ejerce efectos en la proliferación y generación de diversidad de los linfocitos B. La traducción de las señales es la descrita clásicamente a través de esta molécula de membrana.

Los ***efectos biológicos*** generales de la IL-16 con su receptor incluyen la estimulación de la quimiotaxis de las células inflamatorias e inmunológicas (linfocitos T, eosinófilos, monocitos y células dendríticas). Además, ejerce otros efectos dependiendo de las células diana.

Así, en los *linfocitos T* es un factor que estimula el paso de la fase G0 a G1. Tiene interés señalar que la IL-16 requiere del concurso de otras citocinas (IL-2 o IL-15) para que la proliferación linfocitaria sea eficaz. La acción combinada de IL-16 con las citocinas mencionadas da lugar a la proliferación de una población homogénea de linfocitos CD4 CD45 RO. Además, estimula la producción de GM-CSF e IL-3 por estas células e inhibe la replicación de VIH.

Por otro lado, estimula la expresión de a4b7 en *eosinófilos*, la expresión de HLA de clase II en *monocitos* e inhibe la entrada y replicación de VIH en *células dendríticas*.

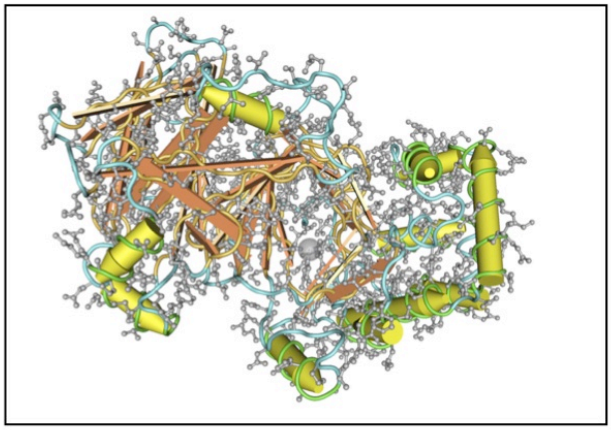
1.2.2.6. RANTES

La primera ***descripción*** de la molécula RANTES (*regulated upon activation, normal T expressed and secreted*) tuvo lugar en 1998 (**127**) en un estudio de hibridación sustractiva entre proteínas transcritas por linfocitos T y B. La nomenclatura actual de esta molécula es CCL5 (**128, 129, 130**).

Las principales ***células productoras*** de RANTES son los linfocitos T, aunque también se ha observado su producción por plaquetas, eosinófilos, células del epitelio tubular renal, fibroblastos y células tumorales.

Inicialmente, RANTES es sintetizado como una molécula precursora de 91 aminoácidos, con una región aminoterminal hidrofóbica de 23 aminoácidos, que al ser liberada da lugar al monómero de RANTES de 68 aminoácidos. La ***estructura*** del monómero es la característica de las quimiocinas ß (**figura 1.15**). Dependiendo de la concentración de RANTES, los monómeros permanecen aislados (o formando dímeros) o bien forman agregados multiméricos. Este hecho tiene gran trascendencia biológica, ya que las vías de señalización y los efectos biológicos son diferentes (ver más adelante).

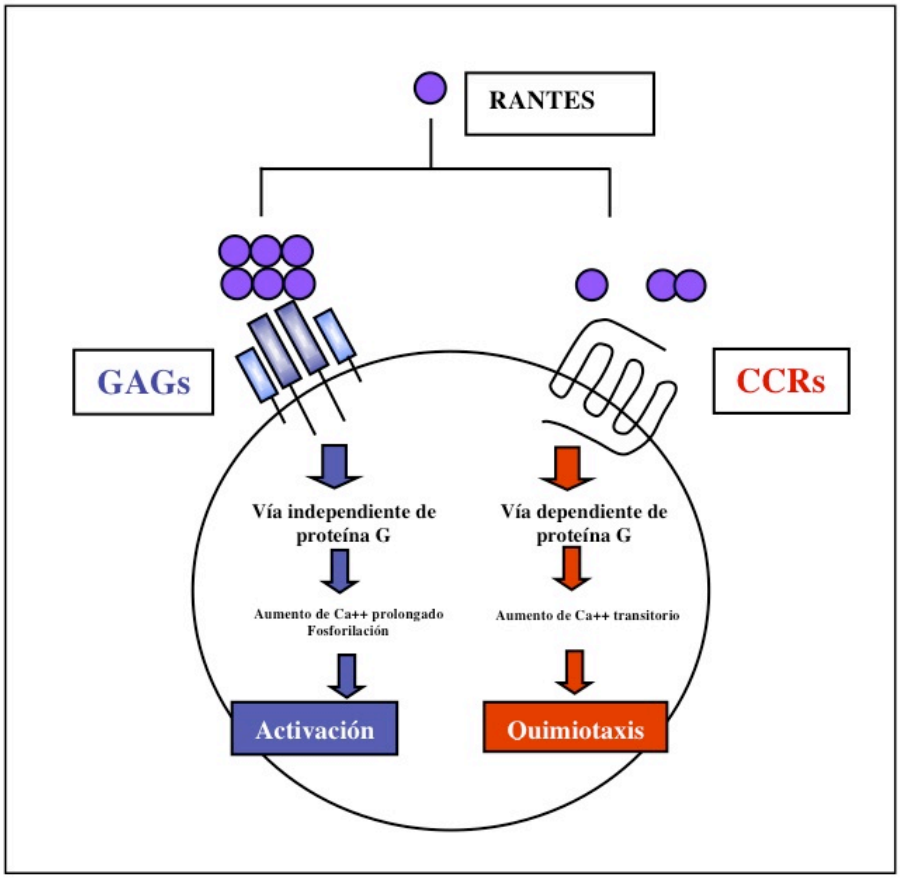
Figura 1.15. Estructura de un monómero de RANTES



El ***gen*** que codifica la síntesis de RANTES se ha identificado y clonado, localizándose en el cromosoma 17 (17q11.2-q12) (**131**).

Como señalábamos previamente, dependiendo de la concentración de RANTES, esta molécula se encuentra en forma monomérica/dimérica o multimérica. En el primer caso, actúa sobre ***receptores*** para quimiocinas, mientras que en su forma multimérica sus efectos están mediados por la unión a glucosaminoglicanos (GAG) (**132**) (**figura 1.16)**

Figura 1. 16. Receptores y vías de traducción de RANTES



En presencia de bajas concentraciones de RANTES, esta quimiocina tiene mayor afinidad por los receptores CCR (ya descritos previamente). A diferencia de la eotaxina 1, que únicamente ejerce sus efectos a través de CCR3, RANTES es capaz de unirse a cuatro receptores (CCR1, CCR3, CCR4 y CCR5). La traducción de las señales tiene lugar a través del sistema de la proteína G (**128, 129, 130**).

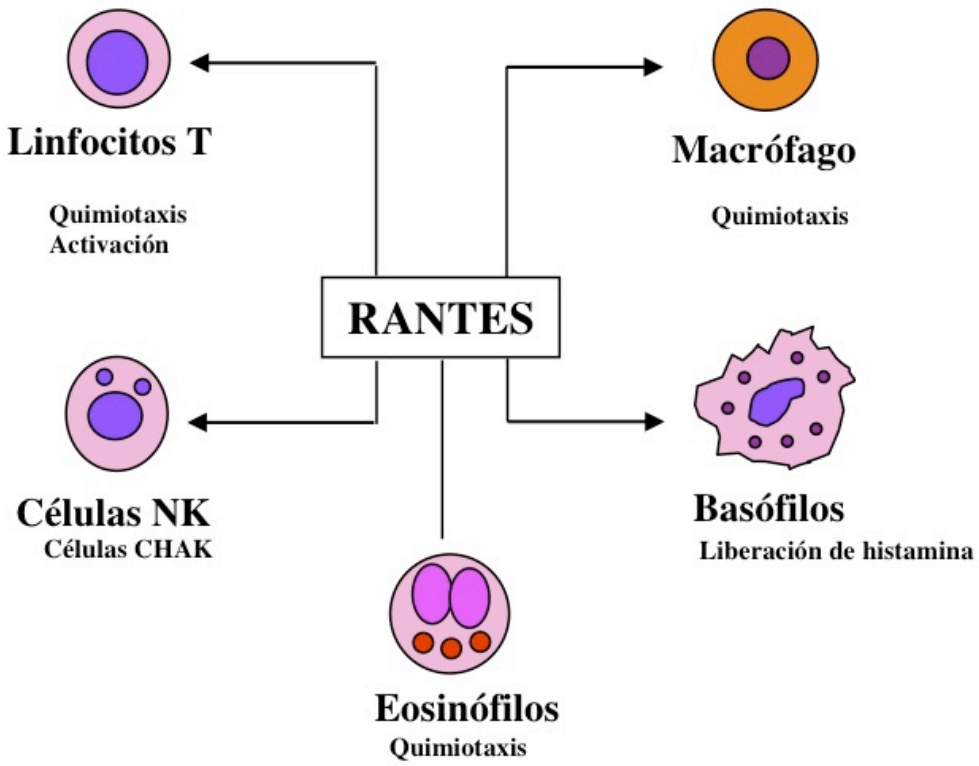
Sin embargo, en presencia de elevadas concentraciones de RANTES, los complejos multiméricos se unen a glucosaminoglicanos, que señalizan por vías independientes del sistema de la proteína G (p. ej. aumento prolongado de calcio intracelular) (**133**).

Tiene interés señalar en este apartado, que dependiendo de la concentración de RANTES; los efectos sobre la proliferación de VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) son diferentes. Así a concentraciones bajas, RANTES compite con la unión de VIH (cepas linfotrópicas), ya que tanto el virus como la citocina son ligandos del

CCR5. Por el contrario, a concentraciones elevadas, RANTES facilita la progresión de la infección por VIH (**132**).

Los principales ***efectos biológicos*** de RANTES, teniendo en cuenta los datos previos, se ejercen sobre múltiples tipos celulares (**figura 1.17**)

Figura 1.17. Principales efectos biológicos de RANTES



Así, actúa sobre diferentes tipos de ***linfocitos T***. En concreto, en sistemas libres de células endoteliales estimula selectivamente la quimiotaxis de linfocitos CD4, CD45RO (memoria) mientras que en sistemas transendoteliales induce quimiotaxis tanto de linfocitos CD4 como CD8, siendo de hecho la más potente quimiocina para linfocitos citotóxicos.

Las acciones sobre las células del ***sistema mononuclear fagocítico*** son similares a MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), siendo un potente estímulo quimiotáctico, aunque su capacidad de activación de la exocitosis es menor.

Por otro lado, la acción sinérgica de RANTES con IL-2 y g-IFG promueve la transformación de células *natural killer* en células activadas denominadas CHAK (*Chemokine activated killer*).

Finalmente, RANTES es un potente quimioatractante para ***eosinófilos*** y promueve la liberación de histamina por los ***basófilos***.

1.2.3. Mecanismos de eosinofilia

1.2.3.1. Aspectos generales

En la práctica, aunque la eosinofilia es definida por una elevación del número de eosinófilos circulantes, el hecho relevante es el aumento de eosinófilos en los diferentes tejidos. Los tres mecanismos por los que se produce esta situación son: *(i)* un incremento en el reclutamiento de eosinófilos a tejidos concretos, *(ii)* la generación local de esta estirpe celular y *(iii)* una disminución de la muerte celular de los eosinófilos.

Los mediadores responsables de estos procesos son los mismos: moléculas producidas por células pulmonares (principalmente inflamatorias e inmunes). Las principales citocinas implicadas son IL-5, IL-4, IL-13 e IL-16 y las quimiocinas más importantes son eotaxina-1 (existiendo menos datos acerca del papel de eotaxina-2 y 3) y RANTES.

Por razones anatómicas y facilidad de acceso (lavado broncoalveolar), la mayor parte de los estudios acerca de los mecanismos de eosinofilia se han realizado en estructuras pulmonares (parénquima y vía aérea) tanto en humanos como en animales experimentales. Otros factores importantes en el estudio de los mecanismos de eosinofilia han sido el empleo de animales manipulados genéticamente (knockouts de IL-5, eotaxina-1,IL-4, IL-13 o transgénicos que sobreexpresan estas moléculas) y la utilización de anticuerpos monoclonales frente a algunas de estas moléculas (**134, 135, 136**).

1.2.3.2. Reclutamiento de eosinófilos

En el reclutamiento de eosinófilos hacia los tejidos, las moléculas mencionadas desempeñan un papel diferente. Así, IL-5, actuando de forma coordinada con eotaxina-

1, induce una estimulación de la eosinofilopoyesis medular activando la diferenciación específica de esta estirpe (**figura 1.18**). La consecuencia es un incremento del "pool" de eosinófilos circulantes, aunque sin que tenga lugar una localización específica en ningún tejido.

Por el contrario, IL-4 e IL-13, sintetizadas localmente por linfocitos Th2 promueven el reclutamiento específico hacia estructuras parenquimatosas (**figura 1.19)**.

Figura 1. 18. Citocinas relacionadas con aumento de eosinofilopoyesis

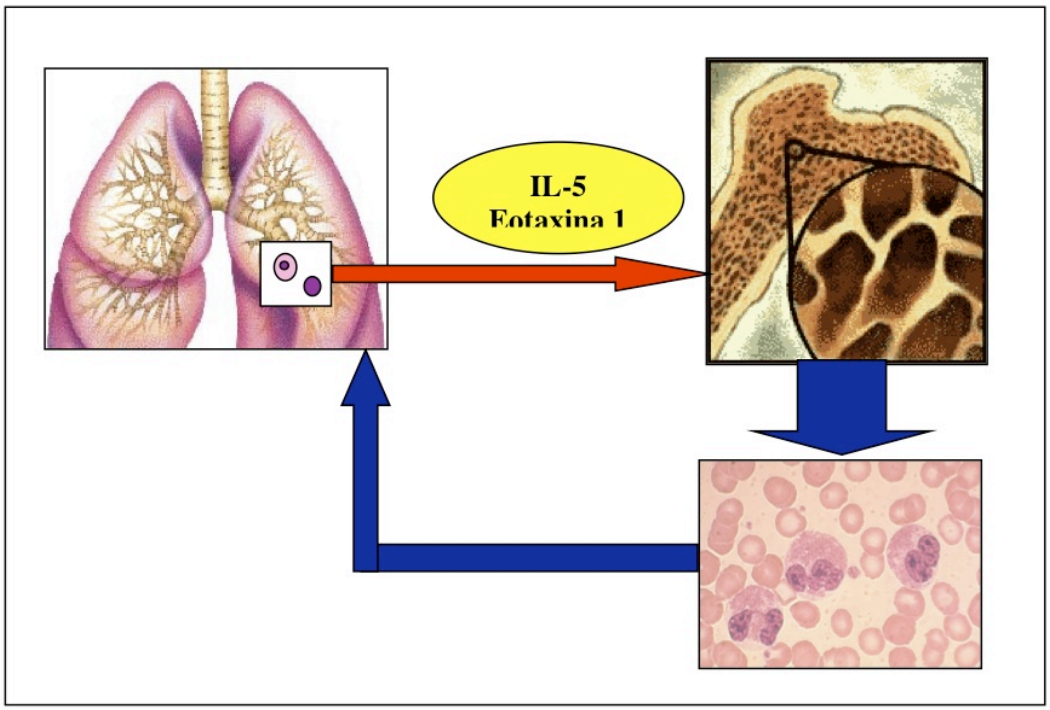
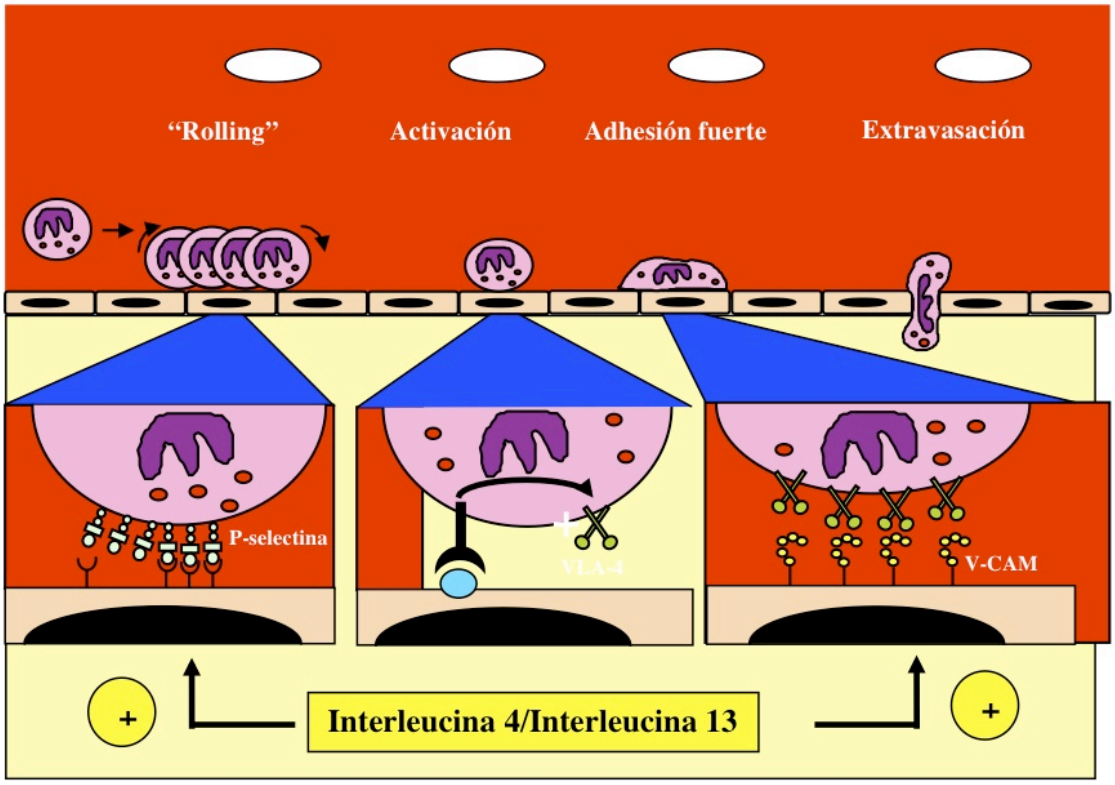
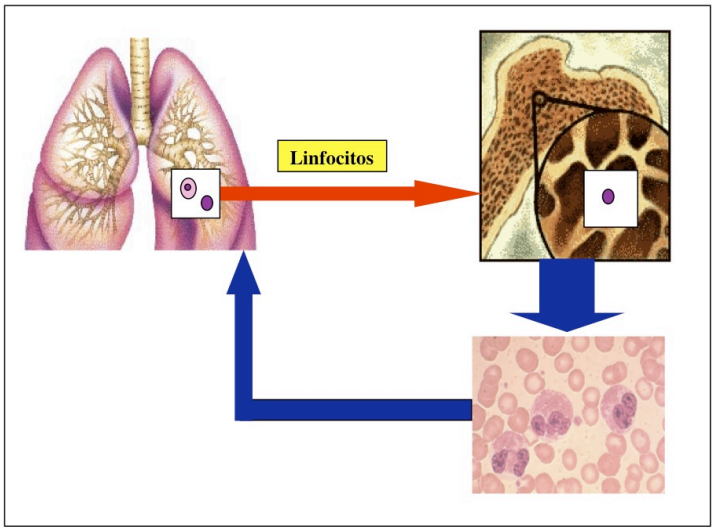


Figura 1.19. Localización tisular de los eosinófilos.



Un aspecto muy interesante, descrito recientemente, es el desplazamiento de linfocitos activados (p. ej. en el pulmón) hacia la médula ósea (**137**), en donde la producción local de citocinas estimula de forma directa la eosinofilopoyesis (**figura 1.20**).

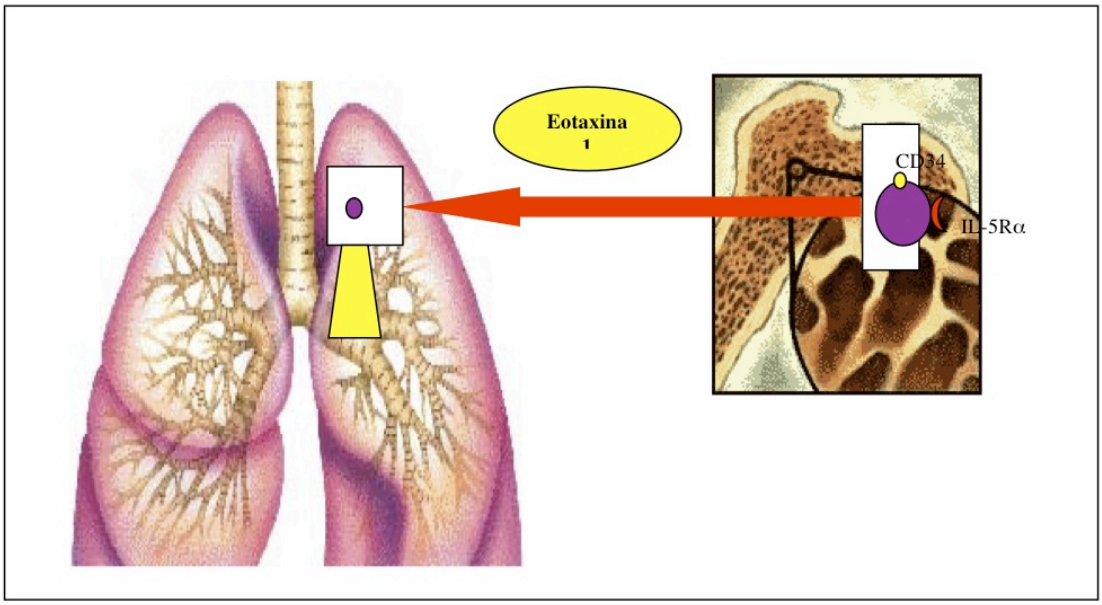
Figura 1.20. Recirculación de linfocitos y eosinofilia



1.2.3.3. Eosinofilopoyesis local

Además del mecanismo anterior que explica conjuntamente el aumento de eosinófilos circulantes y pulmonares, existen datos que demuestran la *eosinofilopoyesis en el parénquima.* Para ello, es preciso que los progenitores y/o precursores de esta estirpe, habitualmente alojados en la médula ósea se dirijan hacia el tejido diana (**figura 1.21**). Este aspecto ha sido comprobado de forma fehaciente, siendo la eotaxina-1 el principal mediador implicado (**138**).

Figura 1.21. Tránsito de precursores eosinofilopoyéticos a órganos diana



1.2.3.4. Inhibición de la apoptosis de eosinófilos

Finalmente, el aumento sostenido de eosinófilos en los tejidos también depende de una *inhibición de los mecanismos de apoptosis* de estas células (**139, 140, 141, 142, 143**). En este apartado revisaremos inicialmente las características generales del proceso apoptótico para indicar posteriormente los efectos anti o proapotóticos de diversas moléculas.

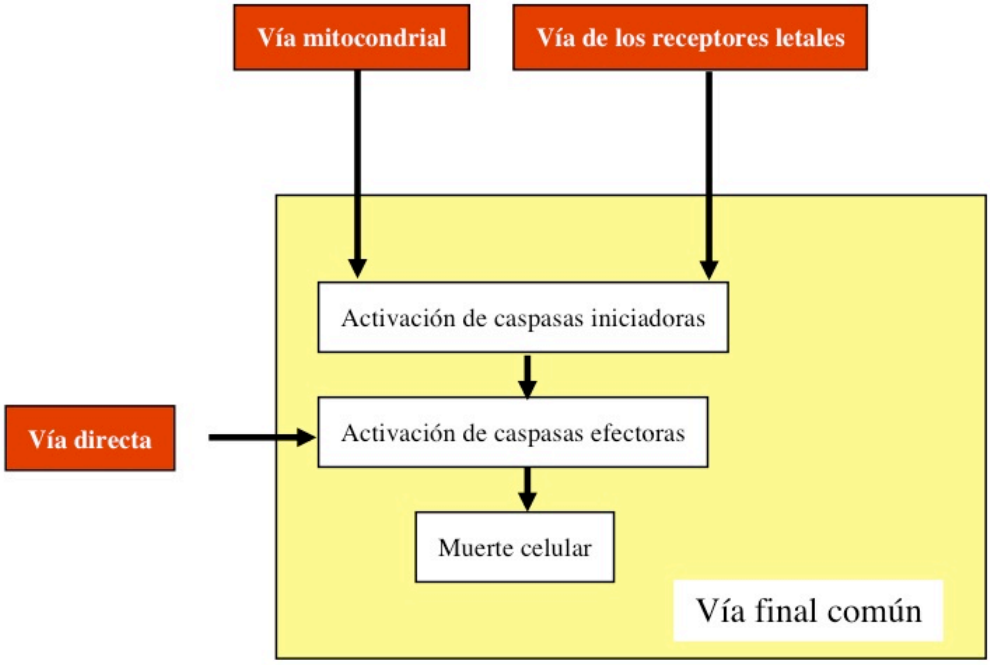
1.2.3.4.1. Aspectos generales de la apoptosis

La apoptosis es una de las dos formas principales de muerte celular (**144**). Existen dos modelos principales de apoptosis: el ***modelo inductivo***, en el cual las células ponen en marcha un programa de destrucción al recibir un estímulo, y el ***modelo***

de liberación, en el cual los sistemas represores de la apoptosis presentes en una célula son anulados al no recibir un estímulo (soluble o por contacto).

La apoptosis es un proceso que tiene lugar de forma bifásica: ***i***) tres tipos de ***rutas iniciadoras*** denominadas: a) vía mitocondrial, b) vía de los "receptores letales" y c) vía directa y ***ii***) una ***vía final común*** a todas las anteriores (**fig 1.22**).

Figura 1.22. Esquema general de la apoptosis

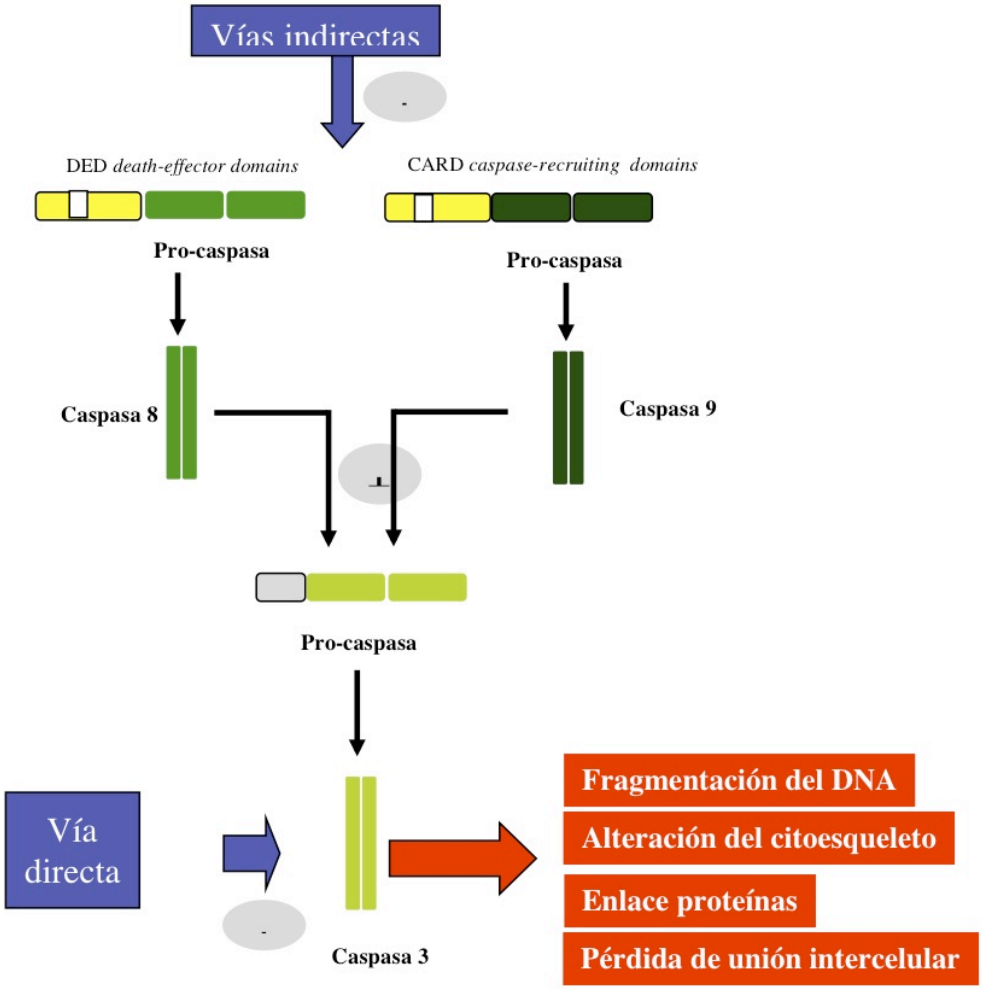


La vía final común de la apoptosis está mediada por un conjunto de enzimas denominadas caspasas (***C****ytosolic* ***A****spartate* ***S****pecific* ***P****roteases*) (**fig 1.23**). Se han descrito 13 enzimas, de las cuales sólo la mitad participan en el proceso apoptótico, siendo la función del resto la regulación de la síntesis de citocinas. Dentro de las caspasas implicadas en la apoptosis se distinguen dos tipos: las ***caspasas iniciadoras*** (2, 8, 9 y 10) y las ***caspasas ejecutoras*** (3, 6 y 7). Las acciones mejor caracterizadas corresponden a las caspasas 8, 9 y 3.

Una vez activadas, las caspasas ejecutoras dan lugar a los cambios morfológicos y funcionales propios de la apoptosis al modificar diferentes moléculas. Así, entre otros fenómenos, *i*) se libera un factor que lleva a la fragmentación característica del DNA (DFF, *DNA fragmentation factor*), *ii*) se activan proteasas (gelsolina) que destruyen la

actina y alteran el citoesqueleto, *iii*) se produce la unión cruzada de proteínas mediante la transglutaminasa y *iv*) se destruye la ß-catenina (alterando la unión intercelular).

Figura 1.23. Vía final común de la apoptosis

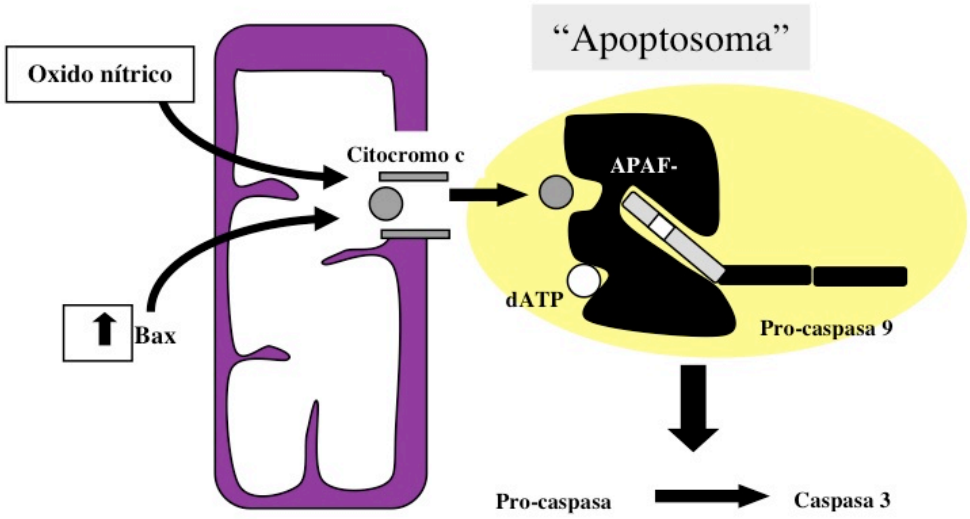


La primera forma de inicio de la apoptosis es la *vía mitocondrial.* Las células requieren para su adecuado funcionamiento la producción de energía, principalmente a través de la producción de ATP en las mitocondrias. Por ello, es razonable que la lesión funcional de las mitocondrias sea un elemento clave en la inducción de apoptosis. En la práctica, la lesión mitocondrial se manifiesta por la liberación del citocromo c que accede al citoplasma y, en unión a varias moléculas (dATP, una proteína adaptadora denominada APAF-1 y pro-caspasa 9) forma el "apoptosoma", generándose caspasa 9

que pone en marcha la vía final común (**fig. 1.24**). La liberación de citocromo c al citoplasma puede ser debida a una acción directa (p. ej. óxido nítrico) o a modificaciones de una familia de proteínas (familia bcl-2). Las proteínas de esta familia son de tres tipos que se diferencian por sus características estructurales y funcionales: *i*) *grupo 1*: ancladas en la membrana mitocondrial y con función antiapoptótica (p. ej. Bcl-2 y Bcl-xL); *ii*) *grupo II*: también ancladas en la membrana mitocondrial y con función proapoptótica (p. ej. Bax y Bak) y *iii*) *grupo III*: no necesariamente unidas a membranas y con actividad proapoptótica (p. ej. Bad, Bid).

La actividad proapoptótica de algunas proteínas (p. ej. Bax) se debe principalmente al incremento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, mientras que la principal acción de varias proteínas antiapoptóticas se debe al secuestro de las proteínas apoptóticas (p. ej. Bcl 2 se une a Bax; Bcl-xL se une a APAF).

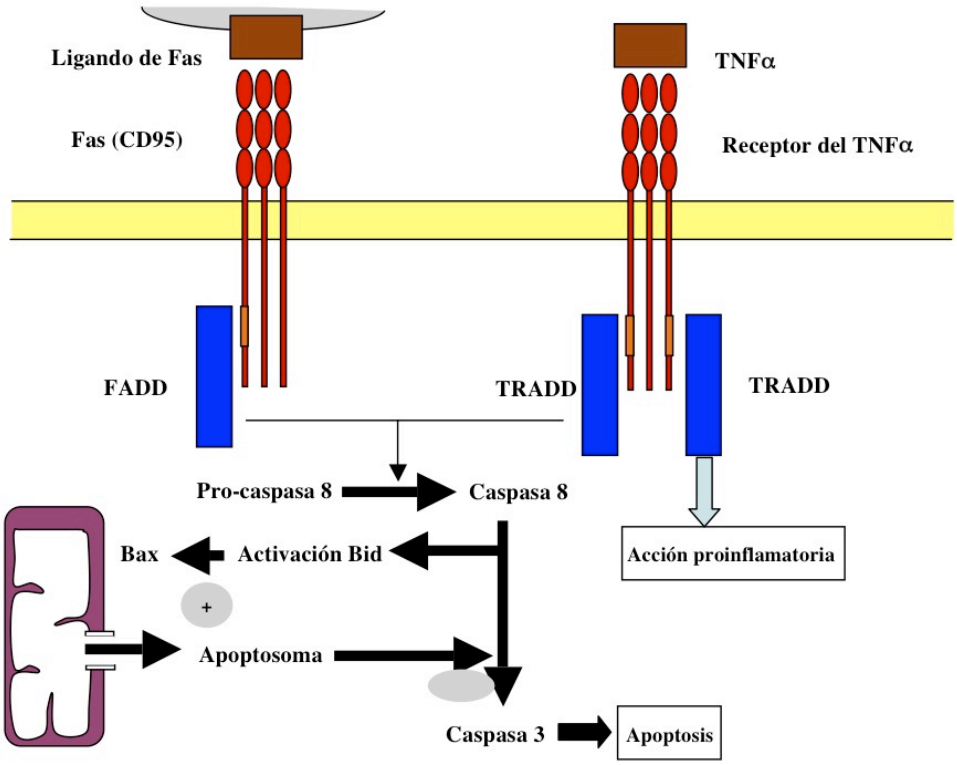
Figura 1.24. Vía mitocondrial de la apoptosis



La activación de la apoptosis por la vía mitocondrial se pone en marcha por múltiples agentes causales como la hipoxia, radiación o fármacos alquilantes (que activan la proteína p53), la supresión de factores tróficos (p. ej. NGF *nerve growth factor* en tejido nervioso) o la translocación cromosómica (p, ej. t 14:18 en los linfomas B de bajo grado de malignidad).

La segunda vía de inducción de apoptosis (*vía de los "receptores letales")* es la interacción de elementos extra-celulares (solubles, como TNFa o unidos a la membrana como la molécula Fas) con receptores celulares (**fig. 1.25**). Estos receptores poseen unas regiones que, tras la unión con sus ligandos, generan señales intracelulares relacionadas con la muerte celular (*death domains* o dominios letales). En el caso de la molécula Fas (CD95), tras la unión a su ligando (CD95L) se facilita la unión a una proteína adaptadora (FADD: *fas associated death domain*), formando un complejo que promueve la activación de la pro-caspasa 8. En el caso del receptor del TNFα, el proceso es similar, ya que tras la unión de la molécula soluble se produce la unión a una proteína adaptadora (TRADD: *TNF-receptor associated death domain*) que promueve la activación de la procaspasa-8. La caspasa 8 activa la vía final común de dos formas, estimulando directamente la pro-caspasa 3 y a través de la vía mitocondrial. Así, la caspasa 8 es capaz de activar la proteína Bid, que se une a Bax y promueve su inserción en la membrana mitocondrial.

Figura 1.25. Vía de los receptores letales de la apoptosis



La tercera vía (vía directa) de la apoptosis está mediada por las granzimas presentes, junto a citoperforinas, en los gránulos de los linfocitos T citotóxicos y en las células "natural killer". Las granzimas penetran en las células diana tanto a través de los poros inducidos por las citoperforinas como mediante receptores específicos. En el interior de la célula diana, las granzimas estimulan directamente la conversión de procaspasa 3 en caspasa 3 activando la vía final común.

1.2.3.4.2 Apoptosis/antiapotosis y eosinofilia

La principal molécula relacionada con la *inhibición de la apoptosis* en los eosinófilos es la interleucina 5, aunque también se ha demostrado este efecto para la eotaxina-1 (**144**). No hemos encontrado información acerca del efecto de las otras citocinas mencionadas en este proyecto doctoral (IL-13, IL-16 y RANTES) sobre la apoptosis de eosinófilos.

Los mecanismos de inhibición de la apoptosis eosinofílica por IL-5 son complejos y probablemente diferentes dependiendo del estado de maduración/ activación concreto.

Así, la apoptosis inducida por la vía de los receptores letales es inhibida por dos fenómenos diferentes: *i)* la disminución de la expresión de receptores CD95 inducida por IL-5 y *ii)* el aumento en la producción de óxido nítrico que altera la traducción de las señales de esta vía (**143**).

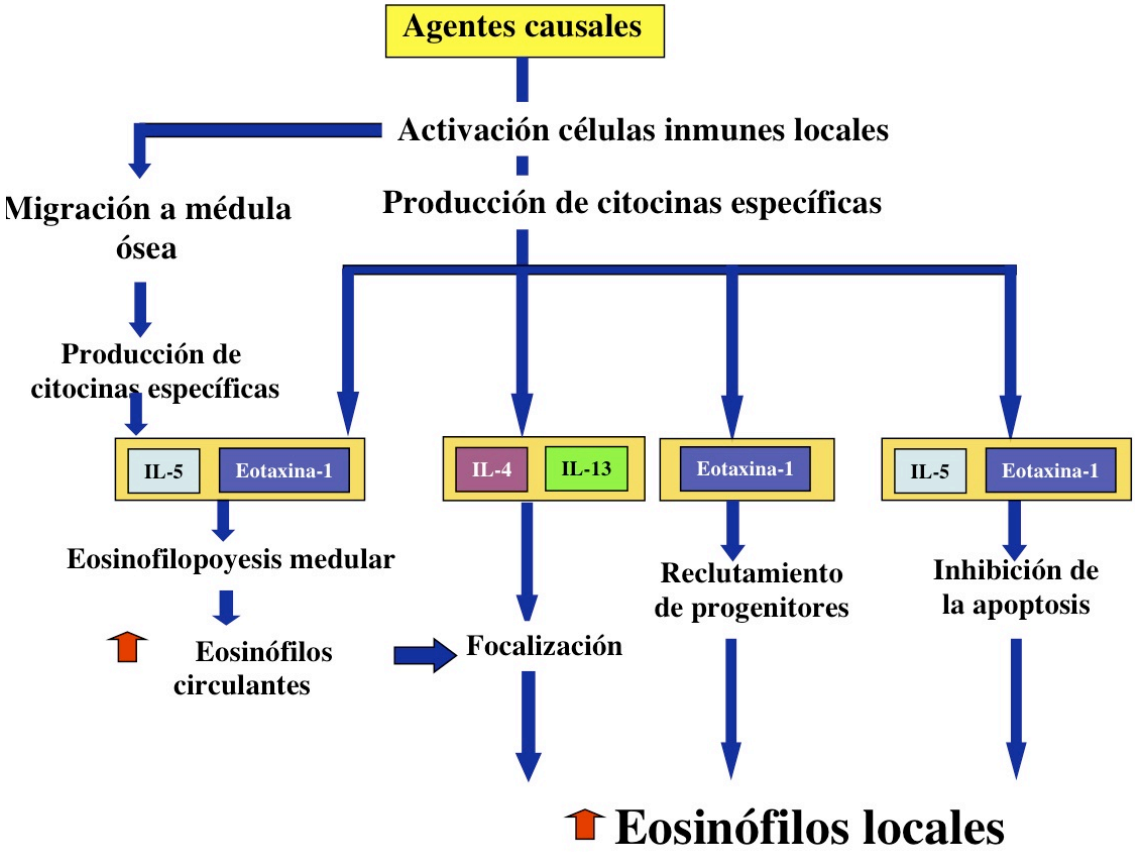
Por otro lado, la vía mitocondrial de la apoptosis es inhibida por IL-5 al aumentar los niveles de Bcl-xL, que bloquea la liberación de citocromo c inducida por Bax (**140**). Además, la IL-5 inhibiría la activación de Bid, disminuyendo también la activación de Bax (**142**).

Finalmente, los mecanismos de proteolisis que generan a partir de procaspasa 3, caspasa 3 activa, son menos eficientes en los eosinófilos (**140**).

Muchos de los fármacos utilizados en las enfermedades en las que la eosinofilia es un dato característico, ejercen su efecto, entre otras formas, *estimulando la apoptosis* de los eosinófilos. Los mejor caracterizados son los glucocorticoides y los inhibidores de la fosfodiesterasa (p. ej. teofilina). La descripción detallada de este aspecto excede los límites de esta revisión.

En la **figura 1.26** se indica de forma esquemática el papel de las principales citocinas y los diferentes mecanismos de producción de eosinofilia.

Figura 1.26. Mecanismos de producción de eosinofilia



1.3. Eosinofilia. Consecuencias

1.3.1. Aspectos generales

Los eosinófilos son células muy activas desde un punto de vista metabólico y poseen la capacidad de sintetizar y liberar múltiples mediadores inflamatorios y moléculas reguladoras (**v. Pág. 29**). En este apartado únicamente revisaremos en detalle tres importantes mediadores: la proteína catiónica, la neurotoxina y el factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGF).

La liberación de estas – y otras- moléculas se ha considerado que constituye un elemento clave en la defensa frente a los helmintos, aunque el papel concreto en cada parasitosis no está completamente aclarado. Por ello, en un segundo apartado, revisaremos el papel de los eosinófilos en las helmintosis.

Finalmente, varios de los mediadores liberados por los eosinófilos son también capaces de lesionar estructuras del hospedador. Este hecho es especialmente relevante en las estructuras cardiacas. Por ello, finalizaremos este apartado con una revisión de las lesiones tisulares relacionadas con la activación de los eosinófilos.

1.3.2. Moléculas derivadas del eosinófilo

1.3.2.1. Proteína catiónica derivada del eosinófilo (ECP *eosinophil cationic protein*)

La primera ***descripción*** de la proteína derivada del eosinófilo se realizó en 1971 al purificarse esta molécula a partir de gránulos de células mieloides obtenidas de un paciente con leucemia mieloide crónica, identificándose en 1975 que procedía de los eosinófilos (**145, 146**).

Desde un punto de vista ***estructural***, ECP pertenece junto a la neurotoxina derivada del eosinófilo, angiogenina, ribonucleasa pancreática y RNAsa 4 a una superfamilia de ribonucleasas específicas de pirimidina (**146**). De hecho, otra denominación de la ECP es RNAsa tipo 3. ECP es una proteína formada por una única cadena de aminoácidos, con un peso molecular de 16 a 22 kDa, que posee tres lugares potenciales de glicación (**fig. 1.27**). Dos características particulares de esta proteína son la presencia de zinc (2.5 mol of zinc por mol de ECP) y un punto isoeléctrico de 10.8, debido a la elevada cantidad de aminoácidos básicos, específicamente 20 argirinas **.**.

Debido a su carácter catiónico es una molécula con gran tendencia a adherirse a las células y, por otro lado, no es filtrada por los glomérulos, por lo que la presencia en la orina indica activación de los eosinófilos en el aparato urinario.

El ***gen*** de la ECP se localiza en el cromosoma 14 (q24-q31) en proximidad a los genes de los otros miembros de la superfamilia de las RNAsas. El gen de la ECP está formado por dos exones de tamaño diferente (67 y 667 pb) separados por un intrón de 230 pb (**147, 148, 149, 150**). La región promotora contiene las características secuencias CAAT y TATA, siendo el principal factor que incrementa la expresión del gen el derivado de una secuencia localizada en el intrón Esta secuencia reguladora es regulada por NFAT-1 y presenta diferentes polimorfismos que explican la diferente expresión de ECP en enfermedades alérgicas y parasitarias (**147, 148, 149, 150**).

La ***producción*** de ECP tiene lugar durante la maduración de la serie eosinofílica, alcanzando los niveles de mRNA una máxima expresión en el estadio de promielocito. No obstante, en los eosinófilos maduros, tanto de pacientes con eosinofilia como de sujetos normales se ha detectado la presencia de mRNA (**145**). La **secreción** de ECP depende de la interacción de diversos estímulos (inmunoglobulinas, lípidos, factores solubles) con los eosinófilos. Aunque se han descrito múltiples secretagogos de ECP, tiene interés señalar algunas características peculiares: *i)* Es importante la dosis de agente estimulante, ya que a concentraciones bajas tiene lugar la liberación de componentes específicos (p. ej. inmunocomplejos IgG y ECP, inmunocomplejos IgE y peroxidasa), mientras que a elevadas concentraciones se produce una liberación masiva de mediadores. *ii)* La capacidad de liberación de mediadores depende del estado funcional del eosinófilo, siendo mayor por ejemplo en pacientes con alergia al polen o en personas con síndrome hipereosinofílico. *iii)* En relación con la afirmación previa, los eosinófilos "primados" con citocinas eosinofílicas liberan más ECP que en situación basal. Entre los agentes que inhiben la secreción de ECP, los mejor caracterizados son la ciclosporina, el formoterol y el pemirolast (**146**). Curiosamente, los glucocorticoides ejercen una escasa inhibición en la liberación de este mediador.

La ***actividad biológica*** de ECP puede dividirse de forma esquemática en dos aspectos: las acciones citotóxicas y los efectos no citotóxicos. La acción citotóxica de la ECP se debe principalmente a la formación de poros de unos 50 Å en las membranas celulares, con la consiguiente lisis osmótica. Esta acción citotóxica se ejerce sobre

bacterias, parásitos, células tumorales y células normales del propio individuo. En lo que respecta a los virus, parece que la acción RNAsa ya descrita previamente es la responsable de la acción antiviral (**151**). En lo que respecta a las acciones no citotóxicas, las más importantes son (**145, 146, 152**): *i)* inhibición de la proliferación linfocitaria T y de la síntesis de inmunoglobulinas por los linfocitos B, *ii)* estímulo de la liberación de histamina y triptasa por los basófilos y mastocitos, *iii)* estímulo de la expresión de ICAM-1 y de receptor para IGF-1 en células epiteliales, *iv)* estímulo de la producción de moco, *v)* altera la producción de glicosaminoglicanos y promueve la formación de colágeno por los fibroblastos, *vi)* estimula la cascada de la hemostasia y la fibrinolisis, lo que puede justificar los fenómenos tromboembólicos característicos del síndrome hipereosinofílico y *vii)* interacciona con el sistema del complemento.

La concentración de ECP se ha medido en varios ***medios biológicos***, tales como líquido de lavado broncoalveolar, esputo, lavado nasal, lágrimas, líquido yeyunal o heces (**145, 153, 154, 155**), permitiendo identificar la participación de los eosinófilos en la patogenia de entidades específicas (p. ej. asma, neumonía eosinófila crónica, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, enfermedad celiaca, enfermedad inflamatoria intestinal). Los datos concretos en estas entidades escapan a los objetivos de esta revisión. Sin embargo es interesante señalar algunas peculiaridades de la medida de ECP en sangre periférica (**156**). Básicamente, se han realizado medidas de ECP en suero y en plasma (sangre anticoagulada con EDTA). Los resultados obtenidos son claramente diferentes, y siempre superiores en suero. El motivo es simple, ya que durante la formación del coágulo los eosinófilos pueden degranularse, contribuyendo de esta manera al aumento de ECP en el suero, mientras que el EDTA bloquea la degranulación. Teniendo en cuenta la corta vida media de ECP (aproximadamente 45 minutos), la medida de EDTA en plasma traduce de forma correcta los niveles preexistentes en sangre mientras que los niveles séricos indicarían la "propensión" a degranularse de los eosinófilos del paciente. En la práctica, la medida de ECP en suero es más útil en la distinción entre sujetos sanos y enfermos.

1.3.2.2. Neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN, *eosinophil derived neurotoxin*) / proteína X del eosinófilo (EPX, *eosinophil protein X*)

La ***descripción*** y purificación de la neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN) tuvo lugar en 1981 por Durack y colaboradores (**157**). El gen de la EDN fue clonado 1989 (**158**) y su estructura cristalográfica publicada en 1996 (**159**). La denominación de neurotoxina se debe al efecto de esta proteína sobre el SNC, ya que al ser inoculada intracerebralmente en animales experimentales a bajas concentraciones induce el denominado "fenómeno de Gordon", caracterizado clínicamente por un síndrome cerebeloso (**160**) y patológicamente por una degeneración de las células de Purkinje (**146**). Por otro lado, en 1983 se identificó por Peterson y Vange (**161**) una proteína derivada del eosinófilo a la que se denominó proteína X, aunque posteriormente se comprobó que se trataba de la misma molécula; por ello, la denominación actual de esta proteína es END/EPX.

Como se ha indicado en apartados anteriores, EDN/EPX forma parte de la familia de las ribonucleasas humanas y , por lo tanto, comparte muchos de los aspectos ***estructurales*** y ***genéticos*** de la ECP. Sin embargo, tanto desde un punto de vista estructural como funcional existen varias diferencias entre ambas moléculas (**tabla 1.8**).

Tabla 1.8. Diferencias entre ECP/EDN

	ECP (eosinophilic cationic protein)	**EDN** (eosinophilic-derived neurotoxin)
Ontogenia	Más actual	Más antigua
Nº lugares glicación	Mayor	Menor
Punto isoeléctrico	Mayor	Menor
Expresión	Hemopoyética (Eosinofilos)	Hemopoyética (Eosinofilos) Bazo Hígado Riñón
Secretagogos	Inmunocomplejos (IgG) C3a/C5a Partículas de Sephadex opsonizadas	Inmunocomplejos (IgA) f-MLP IL-3, IL-5, RANTES
Funciones citotóxicas		
Efecto antiviral	Menor	Mayor
Efecto antihelmíntico	Mayor	Menor
Fenómeno de Gordon	Limitado	Clásico
Funciones no citotóxicas		
Respuesta inmune	Inhibición linfocitaria T y B	Alarmina
Liberación de histamina	SI	NO
Modulación fibroblastos	SI	NO
Secreción de moco	SI	NO
Modulacón hemostasia	SI	NO
Modulación del sistema del complemento	SI	NO
Detección en orina en procesos sistémicos	NO	SI

Desde un punto de vista evolutivo, existen datos indirectos que sugieren que el gen de EDN/EPX es más antiguo que el de la ECP (**145**).

EDN/EPX es una molécula formada por una única cadena de aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 18,9 kDa, siendo el número de lugares de glicación menor que la ECP y, por lo tanto, existiendo una menor variabilidad en las formas moleculares de la misma (**160**). Existe aproximadamente una homología del 67% entre ECP y EDN/EPX (muy superior a otras RNAsas humanas) y ambas comparten una secuencia de 8-9 aminoácidos que las diferencian del resto de RNAsas

(**145**). Entre los 45 aminoácidos que diferencian ECP y EDN/EPX, 15 son argininas, lo que explica que, aunque la EDN/EPX sea una proteína catiónica, su pI es menor y es capaz de atravesar la membrana glomerular (**145**). Existen dos tipos de EDN/EPX que difieren en la presencia o no de 4 aminoácidos en la región amino-terminal (**162**).

La estructura del gen de EDN/EPX es muy similar a la del de ECP con un intrón entre un exón no codificante (exón 1) y un exón codificante (exón 2). La regulación de la expresión del gen depende de dos regiones promotoras [*Myc-associated zinc finger protein* (MAZ) y *SV-40 protein-1* (Sp1)] situadas en el intrón (**163**).

A diferencia del gen de la ECP, cuya expresión está limitada a la serie polimorfonuclear, el gen de EDN/EPX se expresa en otros tejidos como hígado, bazo y riñón (**163**), lo que sugiere la posibilidad de una ***producción*** local. También los estímulos que desencadenan la secreción de EDN/EPX son diferentes de los descritos para ECP (**tabla 1.8**), aunque no existen estudios sistemáticos en este aspecto (**145, 164**).

La ***actividad biológica*** de EDN/ECP también puede dividirse de forma esquemática en dos aspectos: las acciones citotóxicas y los efectos no citotóxicos, aunque el número de estudios publicados es menor con relación a la ECP. En lo que respecta a la actividad citotóxica, es interesante señalar que EDN/EPX posee una mayor actividad antivírica (**145**) y una menor actividad antihelmíntica (**165**). También se ha documentado la menor neurotoxicidad de ECP con respecto a EDN/ EPX (**160**).

En lo que respecta a los efectos no citotóxicos, EDN/EPX presenta claras diferencias biológicas con ECP. Así, e independientemente de la modulación de la respuesta inmune, EDN/EPX actúa como una "alarmina", reclutando y activando a células dendríticas en los lugares de infección (**166, 167, 168**). Por otro lado, EDN/PPX no ejerce acciones biológicas en la modulación de la actividad fibroblástica, en la liberación de histamina por mastocitos/basófilos, en la hemostasia, en la producción de moco o en la modulación del sistema del complemento (**169, 170, 171**).

EDN/EPX, de forma similar a ECP se ha medido en varios ***medios biológicos*** interpretándose como marcador de activación eosinofílica en varios procesos patológicos. Un aspecto que debe destacarse es la posibilidad de detección de EDN/PPX en orina en procesos sistémicos, lo que tiene importancia en estudios epidemiológicos, al ser una muestra incruenta. En lo que respecta a la determinación urinaria de esta

molécula interesa destacar tres aspectos: *(i)* presenta una variación diaria, siendo los valores más bajos por la tarde; *(ii)* la concentración puede elevarse de forma espuria por la presencia concomitante de infección urinaria y *(iii)* los valores deben corregirse atendiendo a la concentración de creatinina urinaria (**156**).

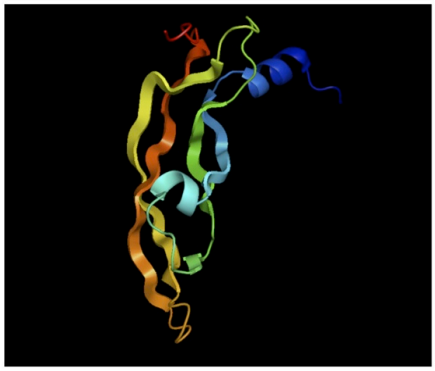
1.3.2.3. Factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGF, *vascular endotelial groth factor*)

Los factores de crecimiento vasculares-endoteliales (VEGFs) son una familia de moléculas pleotrópicas producidas por diferentes tipos celulares, entre los que se encuentran los eosinófilos (**172**). Desde su descripción inicial a principios de los años 80 por dos grupos de investigación (**173, 174**), los estudios acerca de la estructura y función de estas moléculas se han multiplicado de forma exponencial. En este apartado revisaremos de forma muy breve los aspectos más importantes en relación con el proyecto doctoral (**175, 176, 177, 178**).

1.3.2.3.1. Estructura y genética

Los VEGFs pertenecen a la superfamilia VEGF/PDGF (*platelet-derived growth factor*) y poseen como característica común 8 residuos de cisteína, dos de ellos relacionados con la formación de puentes intermoleculares y los otros seis implicados en la formación de puentes intramoleculares con formación de 3 dominios globulares (**fig. 1.28**) (**175**).

Figura 1.27 Monómero de VEGF-**F**



Se han descrito siete ***moléculas*** de la familia VEGF: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, PlGF (placental growth factor), VEGF-E y VEGF-F. En mamíferos, únicamente los

cinco primeros tienen importancia biológica, siendo VEGF-E una proteína vírica (virus Orf) (**179**) y VEGF-F una proteína presente en el veneno de serpientes (víboras) (**180**).

Dentro de las 5 moléculas identificadas en humanos, la que reviste mayor importancia biológica es el VEGF-A, en muchas ocasiones denominado simplemente VEFG. En la **tabla 1.9** se detallan las diferencias genéticas y funcionales de los cinco VEGF sintetizados en mamíferos .

Tabla 1.9. Diferencias en los VEGF humanos

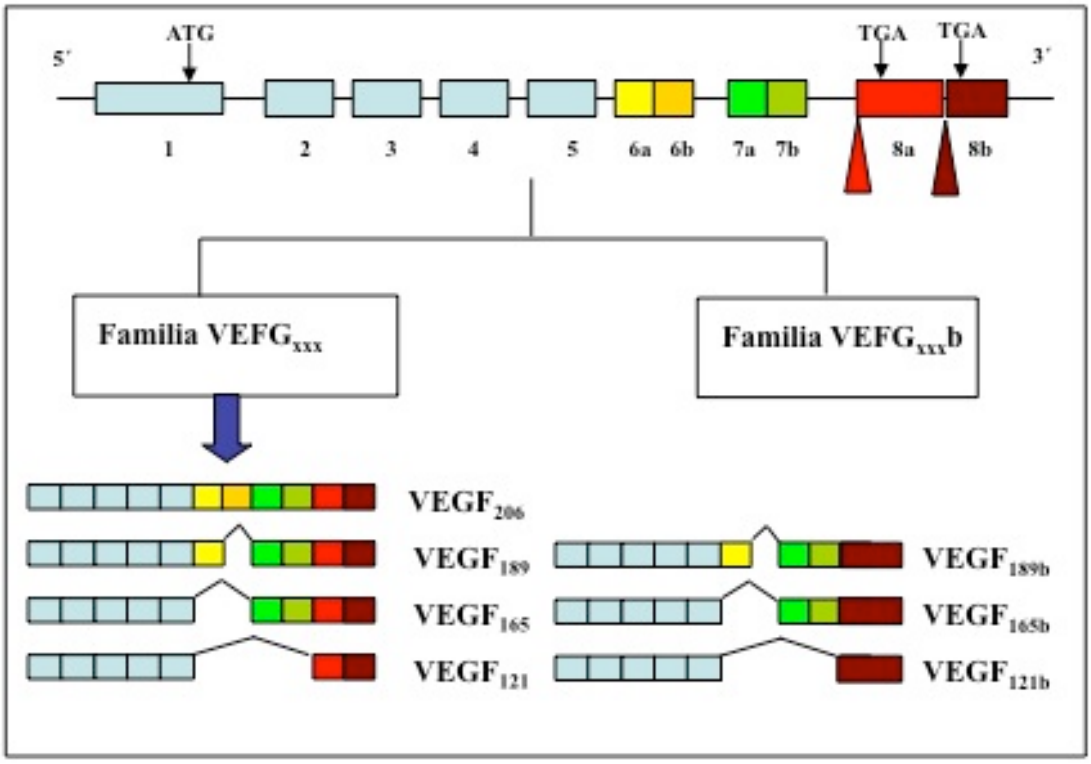
	VEGF-A	VEGF-B	VEGF-C	VEGF-D	PlGF
Cromosoma	6p23.1	11q.13	4q34	Xp22.31	14q.24
Isoformas	SI	SI	NO	NO	SI
Receptores	VEGFR1 VEGFR2 NP-1 NP-2	VEGFR1	VEGFR3	VEGFR3	VEGFR1 NP-1
Función biológica	Múltiple	Poco conocida - Vasos coronarios	Linfangiogénesis		Complementario de VEGF-A

El ***gen*** que codifica VEGF-A está formado por 8 exones **(figura 1.29**). De forma característica, el RNAm sufre un procesamiento alternativo ("splicing") por el que las proteínas derivadas (y englobadas con la denominación genérica de VEGF o VEGF-A) son diferentes (**181**). La nomenclatura general de estas proteínas incluye, además de la denominación general (VEGF), el número de aminoácidos total (xxx) un sufijo (b) si el procesamiento alternativo afecta a la porción distal del exón 8. El número total de aminoácidos deriva principalmente de la inclusión o no de aminoácidos codificados (total o parcialmente) por los exones 6 y 7 (**figura 1.29**).

Estos aspectos estructurales tienen una clara trascendencia biológica. Así, la inclusión o exclusión de los exones 6 y 7 modula las interacciones con proteoglicanos heparan sulfato (HSPGs) y receptores tipo neuropilina. Por otro lado, el procesamiento proximal o distal del exón 8 tiene consecuencias funcionales, ya que las isoformas VEGFxxx son proangiogénicas y las VEGFxxx**b** son antiangiogénicas.

Las isoformas principales en humanos de VEGF-A son $VEGF_{206}$, $VEGF_{189}$, $VEGF_{189b}$, $VEGF_{165}$, $VEGF_{165b}$, $VEGF_{121}$ y $VEGF_{121b}$. En las formas proangiogénicas, la isoforma que posee una mayor importancia biológica es $VEGF_{165}$, seguida de $VEGF_{121}$, $VEFG_{189}$ y $VEGF_{206}$.

Figura 1.28. Isoformas de VEGF-A



Los ***receptores*** para VEGFs son de 5 tipos principales (**177**): VEGFR-1 (*vascular-endothelial growth factor-1*), VEGFR-2 (*vascular-endothelial growth factor-2*), VEGFR-3 (*vascular-endothelial growth factor-3*), neuropilina-1 y neuropilina-2. Cada uno de los VEGFs presenta una selectividad específica por uno o varios de los receptores indicados (**figura 1.30**). VEGF-A es capaz de unirse a todos ellos con excepción de a VEGFR-3.

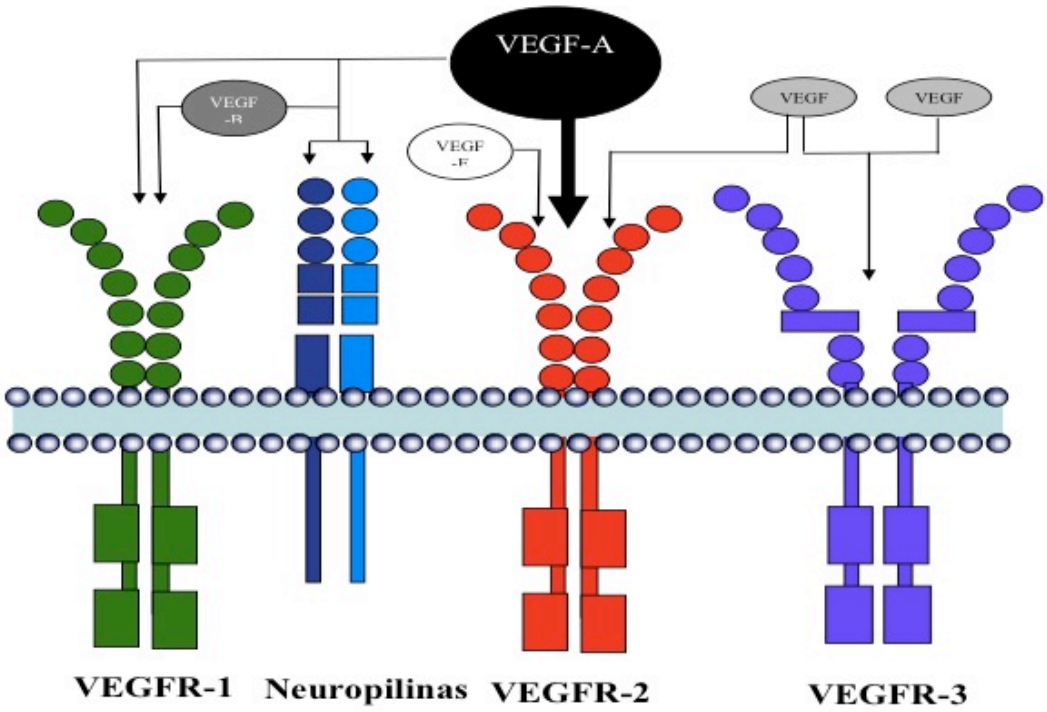
VEGFR-1 (también denominado *fms-like tyrosine kinase; Flt-1*) es una molécula constituida por 7 dominios tipo Ig extracelulares, una región transmembrana y

un dominio intracelular tirosina kinasa. Esta molécula se expresa en las células endoteliales, osteoblastos, células del sistema mononuclear fagocítico, células trofoblásticas placentarias, células mesangiales y algunas células madre hematopoyéticas (**182**). Aunque la afinidad del VEGFR-1 por VEGF-A es 100 veces mayor que por VEGFR-2, su actividad tirosina kinasa es menor. En la embriogénesis, la expresión de este receptor está ligada a un efecto negativo en la angiogénesis (**175**). En periodos posteriores, la unión VEGF-A a VEGFR-1 parece desempeñar un papel importante en la generación de señales paracrinas en las células endoteliales

VEGFR-2 (también denominado KDR: *kinase-insert domain receptor* o flk-1: *fms-like kinase*) tiene una estructura muy similar a VEGF-1. Este receptor se expresa principalmente en las células endoteliales, aunque también se ha demostrado en neuronas, megacariocitos, osteoblastos y células hematopoyéticas. Las principales acciones de VEGF-A se ejercen por interacción con este receptor.

Las **neuropilinas 1 y 2** fueron identificadas como los receptores de una familia de moléculas conocidas como semaforinas/colapsinas, una familia de moléculas reguladoras del desarrollo del sistema nervioso. Ambas se expresan durante el desarrollo embrionario en tejido nervioso, cardiovascular y esquelético, mientras que en el adulto su expresión es muy amplia (**183**). El papel de las neuropilinas, principalmente de NP-1 es actuar como correceptor de VEGFR-2 aumentando su acción biológica.

Figura 1.29. Receptores de VEGFs



1.3.2.3.2. Producción de VEGF

Múltiples tipos celulares son capaces de desencadenar la ***síntesis y liberación*** de VEGF-A en respuesta a ***estímulos*** muy diferentes: modificaciones metabólicas (hipoxia, hipoglucemia), hormonales (estrógenos), citocinas y otros factores de crecimiento, moléculas proinflamatorias y alteraciones genéticas (**179, 184**). Uno de los mejor caracterizados es la *hipoxia* , que induce la estabilización y translocación al núcleo de dos factores HIF (*hypoxic inducible factor*)1a e HIF2a . La unión con el factor nuclear HIF1ß con los factores HIFas, al interaccionar con una región específica del gen del VEGF (HRE, *hypoxia response element*) induce la síntesis de esta molécula (**185**). Por otro lado, la *hipoglucemia*, tanto en estudios de laboratorio (**184**) como clínicos (**186**) da lugar a un aumento en la síntesis de VEGF. Los *estrógenos* también juegan un papel importante en la inducción de la producción de VEGF tanto en situaciones fisiológicas (ciclo menstrual, ovulación) como patológicas (cáncer de mama) (**187**). Múltiples *citocinas y factores de crecimiento* (indicadas en la **tabla 1.10**) inducen la producción de VEGF (**172, 184**).

Tabla 1.10. Citocinas estimulantes de la producción de VEGF

Citocinas	Abreviaturas
Factor de crecimiento de fibroblastos 4	FGF-4
Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos	GM-CSF
Factor de crecimiento insulínico tipo 1	IGF-1
Inteleucina-1	IL-1
Interleucina-5	IL-5
Factor de crecimiento de queratinocitos	KGF
Factor de crecimiento transformante **beta**	TGF-β

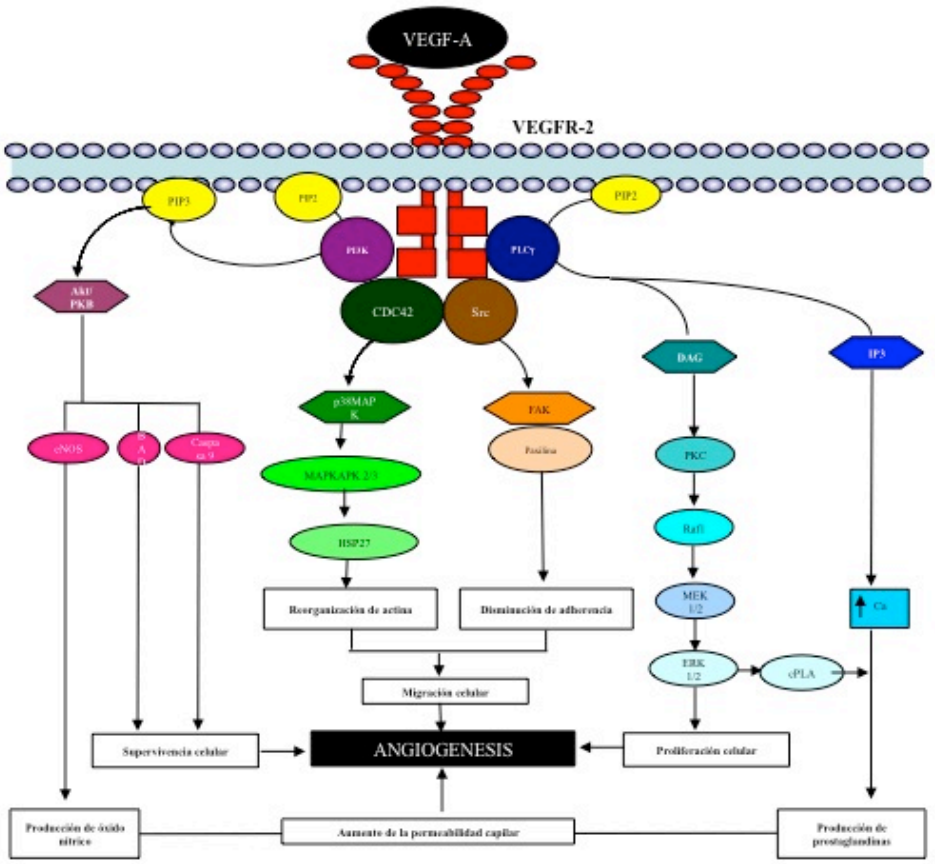
Entre los *mediadores inflamatorios* relacionados con la producción de VEGF deben destacarse los radicales libres de oxígeno (**188**) y el óxido nítrico (**189**).

Finalmente, varios tipos de *alteraciones genéticas*, presentes en enfermedades hereditarias o tumorales se asocian a una hiperproducción de VEGF. Las mejor caracterizadas se relacionan con mutaciones de p53, del gen que codifica la proteína de von Hippel-Lindau y de los genes supresores PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*).

1.3.2.3.2. Mecanismo de acción del VEGF

La interacción entre el VEGF-A y el receptor VEGFR-2 pone en marcha una serie de ***mecanismos de señalización*** iniciales que pueden ser resumidos en varias fases (**190**): *(i)* unión del ligando al receptor; *(ii)* dimerización del receptor; *(iii)* activación de tirosina-kinasa; *(iv)* autofosforilación del receptor y (v) unión y activación de adaptadores a los lugares de autofosforilación. La vía de señalización del VEGF/ VEGFR-2 es diferente a la de otros factores de crecimiento y se resume en la **figura 1.31.**

Figura 1.30. Señalización a través de VEGFR-2



Básicamente tras la interacción entre VEGF-A y VRGFR-2 se activan 4 vías de transducción: *(i)* Activación de PI3K (representada en colores morados/violetas) que transforma PIP2 en PIP3. Esta molécula actúa de dos formas en los efectos del VEGF: inhibiendo la apoptosis (por acción sobre BAD y caspasa 9) y estimulando la producción de óxido nítrico por acción sobre la isoenzima endotelial de la ONS. *(ii)* activación de CDC42 (representada en tonos verdes) que finalmente conduce a una reorganización de los filamentos de actina, *(iii)* Disminución de la adhesión de las celulas endoteliales (señalada en colores marrones/naranja) empleando como molécula adaptadora Src y *(iv)* activación de la fosfolipasa C gamma (vía representada en tonos azules), que partiendo de PIP2 genera DAG e IP3. Las consecuencias de esta vía son de dos tipos: la generación de prostaglandinas y la activación de la proliferación de las células endoteliales.

En resumen, los mecanismos por los que VEGF conduce a la angiogénesis son: *(i)* aumento de la supervivencia celular, *(ii)* incremento en la migración celular, *(iii)* estimulación de la proliferación celular y *(iv)* facilitación de la permeabilidad capilar.

1.3.2.3.4. VEGF y enfermedad

Se han detectado alteraciones en la producción de VEGF en neoplasias (**191**) y enfermedades no neoplásicas, en las que los mecanismos patogénicos implicados son la hipoxia y/o la inflamación.

Específicamente, se han descrito alteraciones (por exceso o defecto) en la angiogénesis en varios tipos de enfermedades *sistémicas*, tanto autoinmunes (artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia) (**192**) , metabólicas (diabetes *mellitus*) (**193**) o hematológicas (p. ej. enfermedad de Castleman) (**194**). Además, se han observado alteraciones de la angiogénesis en *enfermedades localizadas*: digestivas (enfermedad inflamatoria crónica intestinal (**192**), oculares (degeneración macular) (**195**), neurológicas (p. ej. esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer) (**196**), respiratorias (p. ej. enfisema o fibrosis pulmonar idiopática) (**197**) o renales (glomerulonefritis) (**198**).

1.3.3. Eosinófilos y helmintosis

Las funciones de los eosinófilos siempre han sido controvertidas, comprobándose en los últimos años que su papel en la salud y enfermedad es mucho más variado y complejo de lo que se consideraba previamente (**199,200**).

Así, inicialmente fueron considerados como mecanismo de defensa frente a los helmintos (**201**). Posteriormente, se consideró que la principal función de los eosinófilos era el control de la respuesta inflamatoria desencadenada por otros leucocitos. En los años 60 del siglo pasado, los estudios bioquímicos y moleculares reforzaron la idea inicial del eosinófilo como célula destructora tanto de agentes externos (helmintos) como de tejidos del hospedador como actividad colateral en las reacciones de hipersensibilidad. En este sentido, estudios basados en modelos experimentales animales mostraron que los eosinófilos eran reclutados en los primeras fases (horas-días) tras el acceso de los parásitos a los tejidos del hospedador y participaban activamente en la muerte de los mismos mediante la liberación de mediadores tóxicos eosinofílicos (**202, 203**).

Sin embargo, en algunos estudios que se realizaron en ratones deficientes en eosinófilos, se observó que no había diferencias en la carga parasitaria en presencia o ausencia de estas células (204 Humbles et al. 2004, 205 Lee et al. 2004, 206 Swartz et al. 2006). Además, existen datos que sugieren un papel "protector" en la persistencia del parásito en el organismo, de tal forma, que en ausencia de eosinófilos y sus citocinas asociadas, se desencadenaría una respuesta inmune inflamatoria por parte del hospedador mucho más agresiva, que conduciría a la muerte de los parásitos residentes en los tejidos y, además, a lesiones más graves en el hospedador (**207, 208, 209**). En otros términos, los eosinófilos desempeñarían un papel "beneficioso" tanto para el parásito (facilitando su supervivencia) como para el hospedador (limitando la respuesta inflamatoria) (**210**). Los mecanismos por los que los eosinófilos regularían la actividad macrofágica son poco conocidos en la actualidad (**211**).

La interpretación global de estos datos sugiere que, de forma general, los eosinófilos desempeñan un papel importante en la supervivencia de todos los helmintos en el hospedador, mientras que su participación en la eliminación de los mismos depende del tipo de parásito, entre otros factores (**212, 208, 209**),

En resumen, y con las limitaciones de los estudios realizados (**213**) la interpretación actual es que el principal papel de los eosinófilos es el mantenimiento de la homeostasia tisular local, al funcionar como reguladores de la inmunidad local y/o modular los procesos de reparación.

1.3.4. Eosinófilos y lesión tisular. Cardiopatía.

De forma indirecta, la eosinofilia puede indicar la presencia de una parasitosis que comprometa la vida del paciente y de esta forma ocasionar consecuencias nocivas. Así, aunque el diagnóstico específico de todas las parasitosis es importante para efectuar un tratamiento etiológico, sin lugar a dudas, el principal parásito que debe descartarse es *Strongyloides stercoralis*. Esta afirmación se debe a las características de su ciclo biológico, su persistencia durante décadas en el organismo y la posibilidad, relativamente elevada, de desarrollar un síndrome de hiperinfección cuando concurre una situación de inmunodepresión (p. ej. uso de corticoides a dosis elevadas o coinfección por VIH).

Por otro lado, los eosinófilos son capaces de sintetizar y liberar directamente un gran número de mediadores proinflamatorios (**ver 1.3**). Aunque ha sido controvertido, en la actualidad existen datos suficientes para afirmar que los eosinófilos (a través de sus mediadores) juegan un papel importante en el control de la fase larvaria de las parasitosis **(201,214)**. Por ello, la eosinofilia inducida por las helmintosis puede interpretarse como un mecanismo de defensa del hospedador. Sin embargo, estos mediadores inflamatorios liberados por los eosinófilos, pueden lesionar diversas estructuras del propio hospedador, siendo muy característica la afectación cardiaca (**215**). La lesión de las estructuras del corazón en la eosinofilia puede adoptar dos formas polares: fibrosis endomiocárdica de Davies (en áreas tropicales) o Loeffler (en regiones templadas) y miocarditis eosinofílica (**215**). Independientemente de la forma clínica que adopte, la afectación cardiaca por la eosinofilia inducida por parásitos ha sido documentada en estudios epidemiológicos así como en trabajos experimentales clínicos o en modelos animales (**216-218**). Sin embargo, en la actualidad quedan muchos aspectos no aclarados acerca de esta asociación, como la relación entre la afectación cardiaca eosinófila con el tipo de parásito causal, la importancia del grado de eosinofilia o la presencia de casos subclínicos.

2. Objetivos

II. OBJETIVOS

El **objetivo principal** de este Proyecto Doctoral consiste en determinar las causas principales de eosinofilia importada, los mecanismos biológicos implicados en su detección y las consecuencias de la misma, tanto desde un punto de vista clínico como de los mecanismos efectores.

Los **objetivos específicos** responden a las principales cuestiones identificadas en la Introducción y son los siguientes:

• Evaluar la ***prevalencia*** de eosinofilia importada en inmigrantes atendiendo a su procedencia geográfica.

• Identificar la/las ***causas*** más frecuentes de ***eosinofilia absoluta*** en inmigrantes subsaharianos.

• Describir la importancia de la identificación de una ***eosinofilia relativa*** en inmigrantes subsaharianos.

• Estudiar el patrón sérico de cuatro ***citocinas relacionadas con la eosinofilopoyesis y/o activación de eosinófilos*** (IL-13, IL-16. Eotaxina 1 y RANTES) en los principales grupos de helmintosis responsables de eosinofilia importada.

• Evaluar la presencia y características de ***lesiones de estructuras cardíacas*** en inmigrantes asintomáticos con eosinofilia.

• Estudiar la concentración de dos ***proteínas granulares derivadas del eosinófilo (ECP y EDN)*** en el suero y la orina de sujetos en los principales grupos de helmintosis responsables de eosinofilia importada.

• Evaluar la ***concentración plasmática de VEGF*** en el suero de sujetos en los principales grupos de helmintosis responsables de eosinofilia importada.

3. Materiales y Métodos

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño del estudio

Estudio prospectivo observacional realizado entre el 1 de enero de 2000 y el 25 de noviembre de 2014 con inclusión de casos consecutivos.

3.2. Población de estudio

3.2.1. Población diana

Como población diana se eligió para realizar todos los objetivos del estudio a inmigrantes irregulares que a su llegada a Gran Canaria ingresaron en el Centro de Acogida de inmigrantes de Udjiama (Cruz Roja) situado en el Polígono Industrial de Miller Bajo en Las Palmas de Gran Canaria, así como a los menores internados en el Centro de Menores de Inmigrantes de Arinaga, situado en el Polígono Residencial de Arinaga, y a pacientes inmigrantes que acudieron a la consulta de la Unidad de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical (UEIMT).

3.2.2. Fuente de Sujetos

Estos centros acogen a inmigrantes irregulares fundamentalmente de origen africano que se encuentran sin recursos en la Isla de Gran Canaria. La mayor parte de los inmigrantes eran derivados directamente desde el Centro de Internamiento de Inmigrantes de Fuerteventura o tras su liberación del Centro de Internamiento de Inmigrantes de Barranco Seco, en Las Palmas de Gran Canaria. Ambos centros están gestionados por el Ministerio del Interior, y se ingresa en ellos tras ser apresados por las fuerzas de seguridad del estado al intentar entrar en España ilegalmente. La permanencia en los mismos es, según marca la ley, de 40 días. En este tiempo pueden ser repatriados (si existe un convenio con el país de origen), o liberados, con una orden pendiente de expulsión tras cumplir estos 40 días. En el caso de ser liberados pendientes de expulsión, quedan sin alojamiento y sin medios, siendo acogidos (entre otros) en el centro UDJAMA de Cruz Roja. Caso aparte son los inmigrantes irregulares menores de edad, que por ley pasan a estar bajo la tutela del Gobierno de Canarias, que los interna en centros de menores, como el Centro de Menores de Arinaga.

3.2.3. Criterios de selección

Para la realización de los objetivos del estudio los criterios de inclusión fueron: i) tratarse de población inmigrante, ii) estancia en España de corto a medio plazo o ser rcién llegado a nuestro país. Se utilizó como criterio de exclusión la negativa de los sujetos a participar en el estudio, principalmente por razones culturales al negarse a que les fueran realizadas extracciones de sangre.

3.3. Recogida de datos

3.3.1. Lugar de recogida de datos

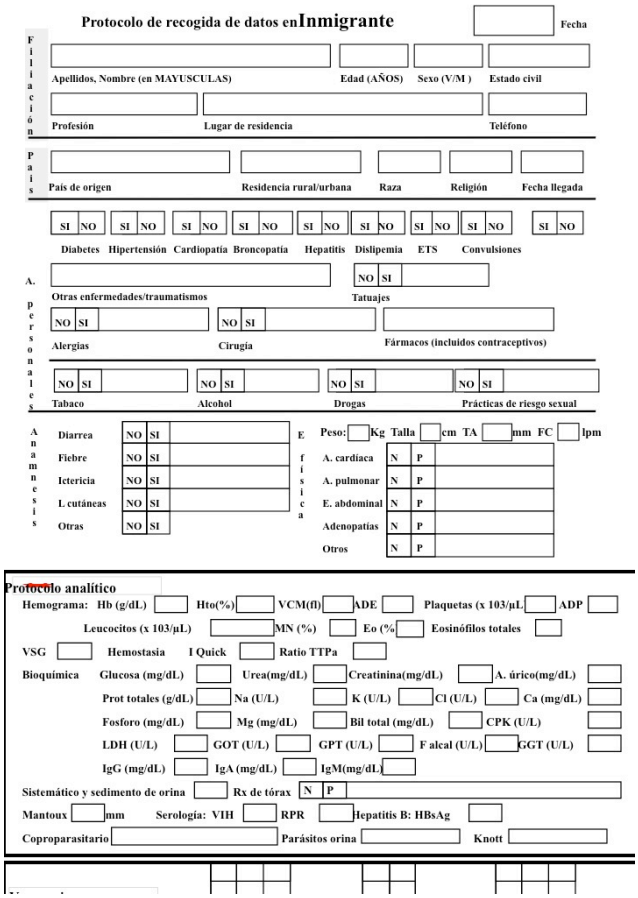
El protocolo de recogida de datos y extracción de muestras se realizó en el Centro de Acogida de Inmigrantes que Cruz Roja Española tiene en el Polígono Industrial de Miller Bajo en las Palmas de Gran Canaria, así como a los menores derivados a la consulta desde el Centro de Arinaga. El primero consta de tres habitaciones comunales donde duermen entre 30-40 personas, dos habitaciones con capacidad para 10 personas, reservadas para las mujeres y niños así como cuatro habitaciones individuales, utilizadas en ocasiones en casos de aislamiento preventivo (en concreto en escabiosis). Además cuenta con varias zonas comunes para aseo, ocio, clases (de español, orientación, diversas habilidades profesionales…) y un comedor común. Posee también dos almacenes, una zona administrativa, un control de entrada y una enfermería. Entre su personal habitual cuenta con un vigilante jurado, un coordinador, un administrativo, un trabajador social, dos educadores y un médico en horario de mañana, cinco días a la semana. Durante las tardes, noches y festivos el centro cuenta siempre con dos educadores y un guardia jurado.

3.3.2. Protocolo de recogida de datos

3.3.2.1. Datos clínicos

Se realizó un protocolo de recogida de datos (**figura 3.1)** que incluía los siguientes items:

Figura 3.1 Protocolo de recogida de datos en Inmigrantes



Protocolo de recogida de datos enInmigrante

Fecha

Filiación

Apellidos, Nombre (en MAYUSCULAS) | Edad (AÑOS) | Sexo (V/M) | Estado civil

Profesión | Lugar de residencia | Teléfono

Pais

País de origen | Residencia rural/urbana | Raza | Religión | Fecha llegada

SI NO | SI NO | SI NO | SI NO | SI NO | SI NO | SI NO | SI NO | SI NO

Diabetes | Hipertensión | Cardiopatía | Broncopatía | Hepatitis | Dislipemia | ETS | Convulsiones

A. personales

Otras enfermedades/traumatismos | Tatuajes NO SI

Alergias NO SI | Cirugía NO SI | Fármacos (incluidos contraceptivos)

Tabaco NO SI | Alcohol NO SI | Drogas NO SI | Prácticas de riesgo sexual NO SI

Anamnesis

Diarrea NO SI
Fiebre NO SI
Ictericia NO SI
L cutáneas NO SI
Otras NO SI

Efísica

Peso: Kg Talla cm TA mm FC lpm

A. cardiaca N P
A. pulmonar N P
E. abdominal N P
Adenopatías N P
Otros N P

Protocolo analítico

Hemograma: Hb (g/dL) Hto(%) VCM(fl) ADE Plaquetas (x 103/µL) ADP

Leucocitos (x 103/µL) MN (%) Eo (% Eosinófilos totales

VSG Hemostasia I Quick Ratio TTPa

Bioquímica Glucosa (mg/dL) Urea(mg/dL) Creatinina(mg/dL) A. úrico(mg/dL)

Prot totales (g/dL) Na (U/L) K (U/L) Cl (U/L) Ca (mg/dL)

Fosforo (mg/dL) Mg (mg/dL) Bil total (mg/dL) CPK (U/L)

LDH (U/L) GOT (U/L) GPT (U/L) F alcal (U/L) GGT (U/L)

IgG (mg/dL) IgA (mg/dL) IgM(mg/dL)

Sistemático y sedimento de orina Rx de tórax N P

Mantoux mm Serología: VIH RPR Hepatitis B: HBsAg

Coproparasitario Parásitos orina Knott

a) **Datos de filiación**: nombre y apellidos, edad, sexo, estado civil, profesión, lugar de residencia y teléfono. La profesión fue admitida como la referida por el sujeto y posteriormente codificada en 9 grupos profesionales: agricultura-ganadería, arte y oficios (p. ej. mecánico, zapatero, sastre….), comercial, construcción (entendiendo no sólo a obreros sino fontaneros, electricistas, soldadores…), deportistas (que todos refieren ser futbolistas), estudiantes, servicios (que engloba las actividades relacionadas con los servicios materiales no productores de bienes: chófer, limpiador…), sus labores y titulado superior (profesiones con estudios universitarios).

b) **Datos epidemiológicos**, que incluían el país de origen, el tipo de residencia previa (rural o urbana), raza, religión, la fecha de llegada a España, conducta dietética: consumo de

mamíferos (cerdo, vacuno, ovino), consumo de pescado crudo, consumo de otros animales (caracoles, ranas, serpientes), baños en agua dulce, uso de calzado.

c) **Antecedentes personales.** Además de los referidos de forma espontánea, se especificaron las enfermedades más prevalentes en la población general (diabetes, hipertensión, cardiopatía, broncopatía, hepatitis, enfermedades de transmisión sexual, problemas neurológicos y psiquiátricos).

d) **Hábitos patológicos.** Se evaluó de forma dirigida los siguientes hábitos: consumo de tabaco, alcohol, otras drogas, prácticas sexuales de riesgo.

e) **Anamnesis.** Además de los datos referidos de forma espontánea, se interrogó de forma dirigida acerca de la presencia de fiebre, diarrea, ictericia, prurito y lesiones cutáneas.

f) **Exploración física**. Se determinaron las magnitudes habituales: presión arterial, temperatura y pulso, además de la talla, peso e índice de masa corporal (IMC). El estado nutricional se evaluó mediante el estudio antropométrico, que consiste en la determinación del peso y la talla para poder calcular el IMC de cada individuo, para después clasificarlo según el valor del índice que se muestra en la **tabla 3.1**, tal como marcan las recomendaciones de la OMS.

Tabla 3.1: Clasificación del IMC (*fuente OMS)*

Clasificación del IMC	
Insuficiencia ponderal	< 18.5
Intervalo normal	18.5 - 24.9
Sobrepeso	⩾ 25.0
Preobesidad	25.0 - 29.9
Obesidad	⩾ 30.0
Obesidad de clase I	30.0 - 34.9
Obesidad de clase II	35.0 - 39.9
Obesidad de clase III	⩾ 40.0

Además, se realizó una exploración física completa con especial énfasis en lesiones cutáneas (nódulos, lesiones hiperpigmentadas, lesiones de rascado, etc), presencia de

adenopatías, auscultación pulmonar, auscultación cardíaca, presencia de hepato/esplenomegalia, sintomatología neurológica focal.
Si durante la realización del protocolo, se objetivaban síntomas específicos como fiebre, diarrea, ictericia, prurito, o lesiones cutáneas, o el médico evaluador lo consideraba pertinente, el inmigrante era remitido a la consulta especializada de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical del Hospital Universitario Insular de Gran Canaria.

3.3.2.2. Datos analíticos

Se programó un estudio analítico en todos los casos, que incluía un hemograma, hemostasia, bioquímica en sangre y orina, serología y toma de muestras de sangre, orina y heces para estudio parasitario. Las extracciones de sangre se realizaron mediante venopunción en el mismo Centro de Acogida, y ese mismo día se recogía la muestra de orina, remitiéndose ambas muestras a la unidad de recepción de muestras del Hospital Universitario Insular de Gran Canaria, donde posteriormente eran distribuidas. La recogida de las muestras de orina, así como la muestra de sangre para el estudio de filarias, se añadió al protocolo de estudio un año después de su inicio y se valoraba la presencia o no de hematuria y de parásitos. Las muestras de heces se recogían independientemente, manteniéndose refrigeradas en el centro UDJAMA a 4ºC hasta completar tres muestras, que posteriormente eran remitidas.

Las determinaciones del ***hemograma, hemostasia, bioquímica y urianálisis*** que se valoraron fueron: hemoglobina, hematocrito, VCM (volumen corpuscular medio), ADE (amplitud de distribución eritrocitaria), número total de leucocitos, número total de eosinófilos, porcentaje de eosinófilos, número total de plaquetas, índice de Quick, cociente TTPA (tiempo de tromboplastina parcial activada), VSG (velocidad de sedimentación globular), glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, proteínas totales, natremia, potasemia, cloremia, magnesemia, fosforemia, calcemia, bilirrubinemia total, actividad CK (Creatin Quinasa), actividad AST/GOT (aspartato amino transferasa /glutámico oxalacético transferasa) , actividad ALT/GPT (alanino amino transferasa /glutámico pirúvico transaminasa), actividad fosfatasa alcalina, actividad GGT (gamma glutamil transpeptidasa), IgG (inmunoglobulina G), IgM (inmunoglobulina M), IgA (inmunoglobulina A), sistemático y sedimento de orina. Las unidades de medida se indican en la **tabla 3.2**

Tabla 3.2 Valores analíticos normales

Variable	Valores de referencia
Hemoglobina	12- 18 g/dL
Volumen corpuscular medio	80-99 fl
Amplitud de distribución eritrocitaria	11.5-14.5
Leucocitos	4.5-10.8 x 10^3/µl
Eosinofilos	0.00-4.50 x 10^3/µl
Plaquetas	140-400 x 10^3/µl
*r*APTT	0.8-1.2
Índice de Quick	70-120 %
VSG	3-12
Glucosa	70-110
Urea	10-50 mg/dL
Creatinina	0.6-1.5 mg/dL
Ácido úrico	2.6-7.2 mg/dL
Proteínas totales	6.4-8.5 g/dL
Creatin Kinasa	21-232 U/L
AST	5-37 U/L
ALT	7-65 U/L
GGT	18-85 U/L
Ig G	615- 1.655 mg/dL
Ig M	63-277 mg/dL
Ig A	68-382 mg/dL

rAPTT: tiempo de tromboplastina parcial activada; AST:aspartato amino transferasa; ALT: alanino amino transferasa; IgG,IgM,IgA: inmunoglobulina G, M y A.

Dentro de la ***serología*** se incluyeron determinaciones para valorar infección por VIH, VHB, VHC, y lúes. En el caso de presentar positividad para el HBsAg se realizó la detección de anticuerpos frente al VHD.

El estudio ***parasitario directo*** se realizó en tres tipos de muestras: heces, orina y sangre. En todos los sujetos que se pudo recoger muestras de heces se realizó la búsqueda de quistes y/o huevos de parásitos intestinales mediante la ***técnica de Ritchie*** en tres muestras consecutivas, que consiste en la concentración mediante la centrifugación, con ayuda de formol y éter para separar y visualizar las diferentes formas parasitarias. Además,

en las mismas muestras de heces se completó el estudio realizando la ***técnica de Kato Katz*** para la búsqueda de huevos de helmintos, principalmente esquistosomas y uncinarias. Específicamente no se señalaron en este Proyecto Doctoral las amebas diferentes de *E. hystolítica*, ya que se consideraron especies no patógenas.

En casos seleccionados, dependiendo del país de origen del inmigrante, se realizó el cribado en busca de otros helmintos (filarias y esquistosomas urinarios). Para la búsqueda e identificación de filarias se utilizaron diferentes métodos dependiendo si las microfilarias estaban en sangre o en piel. La ***técnica de Knott*** se utiliza para concentrar e identificar diferentes tipos de microfilarias en sangre. Además el estudio se completó en casos seleccionados utilizando una técnica inmunocromatográfica que permite detectar, independientemente de la hora de recogida de la muestra (debido a la periodicidad diurna o nocturna que presentan los diferentes tipos de filarias), antígeno de *Wuchereria bancrofti* en sangre (***BinaxNow® Filariasis)***. En muestras de piel se realizaron ***pellizcos cutáneos*** para identificar microfilarias de la piel en los sujetos con lesiones cutáneas sugerentes de oncocercosis o que fueran de área endémica y presentaran prurito. En la búsqueda de esquistosomas urinarios se realizó ***sedimento urinario*** partiendo de una muestra puntual de orina preferiblemente entre las 12 mañana y 3 de la tarde (entre estas horas ocurre el punto más alto de excreción de huevos) y, si es posible, después de hacer un esfuerzo moderado el sujeto.

El ***estudio parasitario indirecto*** que se realizó, en sujetos seleccionados con eosinofilia absoluta o parcial, para la búsqueda de anticuerpos de diferentes parásitos mediante técnica de enzimoinmunoensayo (ELISA) utilizando antígenos frente a *Fasciola sp, Schistosoma sp, Dirofilaria sp.* y *Trichinella sp.*

Los resultados de estas pruebas se remitían nuevamente al Centro de Acogida de Miller Bajo, siendo valoradas por el médico contratado por Cruz Roja para el centro. En el caso de que se objetivara alguna alteración en los resultados analíticos a criterio del médico evaluador o presentara eosinofilia o algún parásito, el inmigrante era remitido a la consulta especializada de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical del Hospital Insular de Gran Canaria, donde en caso necesario, se completaba el estudio.

3.3.2.3. Otras pruebas complementarias

A todos los inmigrantes incluidos en el estudio se les programó la realización de un

test de ***Mantoux***. Se admitieron como positivos induraciones mayores o iguales a 10 mm.

También se programó la realización de una ***radiografía de tórax*** en proyección posteroanterior a todos los inmigrantes incluidos en el estudio, salvo a las embarazadas, que se excluyeron de la realización de la misma por su estado de gravidez. Esta técnica se realizó en la unidad de Radiodiagnóstico del centro de Atención Primaria de Miller Bajo, previa aceptación y citación según la demanda existente. La radiografía fue valorada por el médico de Cruz Roja como normal o alterada, siendo revisados los resultados por la UEIMT.

Además, se realizó en los sujetos seleccionados que presentaban eosinofilia e infección por un helminto un ***estudio ecocardiográfico,*** que se llevó a cabo en el Servicio de Cardiología del Hospital Insular.

3.4. Metodología utilizada

Los diferentes procedimientos y protocolos seguidos en este estudio se van a describir en relación al objetivo en el cual se han realizado.

3.4.1. Objetivo 1: Prevalencia de eosinofilia en inmigrantes

Sujetos Estudiados

Se realizó un estudio prospectivo en 2420 inmigrantes irregulares, que cumplían los criterios de selección anteriormente citados, desde el año 2000 hasta el año 2012. Para la consecución del objetivo 1 se pudo establecer la presencia o ausencia de eoinofilia mediante la realización de un hemograma en 1697 inmigrantes.

Técnicas utilizadas

Para la determinación de los valores hematológicos se emplearon las técnicas habituales de laboratorio del Hospital Universitario Insular de Gran Canaria, validadas y sometidas a los controles de calidad diario (interno) y externo (mensual). Los recuentos hematológicos celulares se realizaron sobre sangre total anticoagulada con EDTA, en un contador automático Coulter STKS.

Definiciones

Se consideró **eosinofilia absoluta** como la presencia de más de 450 eosinófilos por mililitro y **eosinofilia relativa** a la presencia de un tanto por ciento de eosinófilos en sangre superior al 5% con un número total inferior a 450 por mililitro.

3.4.2. Objetivo 2: Causas de eosinofilia absoluta y Objetivo 3: Causas de eosinofilia relativa

Sujetos Estudiados

Para la consecución del objetivo 2 se realizó el estudio en 515 inmigrantes que además de cumplir los criterios de selección tenían eosinofilia absoluta (>450 eosinofilos/µl) y para el objetivo 3 el estudio se realizó en 236 inmigrantes con eosinofilia relativa (<450 eosinófilos/µl y porcentaje de eosinófilos >5%).

Técnicas utilizadas

Además de la determinación de valores hematológicos, como previamente se detalla en el objetivo 1, en ambos objetivos se realizó el estudio parasitario directo e indirecto, protocolo que se detalla a continuación.

1. ***Estudios parasitológicos directos en heces***

Técnica de Ritchie

. Se coloca aproximadamente 1 gramo de heces en un bote estéril y se añade 10 ml de solución salina al 0,9% y se mezcla bien.

. La suspensión se filtra a través de una gasa estéril en un tubo de 15 ml y de fondo cónico.

. Centrifugar durante 10 minutos a 500G o su equivalente en rpm, se decanta el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 10 ml de formol al 10%. Se mezcla muy bien y se deja reposar mínimo 5 minutos.

. Añadir 3 ml de éter, agitar vigorosamente y centrifugar 10 minutos a 500 G.

. Se observarán 4 capas: éter superficial, restos fecales, formol al 10% y sedimento. Se decanta el sobrenadante y se extrae con cuidado una gota del sedimento para el examen al

microscopio a 40x para la visualización de huevos y/o larvas de helmintos y a 100x aumentos para la detección de protozoos.

Técnica de kato-Katz

. Extender en un portaobjetos con una espátula un volumen importante de heces (40-50 mg).

. Cubrir con un rectángulo de papel de celofán húmedo, que haya estado embebido durante un mínimo de 24 horas en solución de glicerina-verde de malaquita.

. Se pone la preparación sobre un papel de filtro y con la parte del celofán hacia abajo, se presiona hasta obtener una película fecal final para favorecer la extensión de las heces y eliminar el exceso de líquido.

. Dejar en reposo a temperatura ambiente la preparación para aclaramiento de las heces y poder detectar huevos de helmintos.

Cultivo en placa de Agar para detección de *Strongyloides stercolaris*

. Consiste en colocar una porción de aproximadamente 2 g de heces en el centro de una placa de agar nutritivo o agar tripticasa soya e incubar en estufa a 37°C.

. Si en la muestra hay larvas de *S. stercoralis*, se desplazarán sobre la placa diseminando las bacterias adosadas a su cuerpo, de manera que a las 24 horas de incubación el rastro de las larvas formará trazos sinuosos de colonias de bacterias.

. Mediante el uso de estereoscopio examinar la placa para confirmar las larvas

. Lavar con formalina al 10% y recoger las larvas, dejando sedimentar para su identificación.

2. *Estudios parasitológicos directos en orina*

Estudio del Sedimento urinario

En la orina pueden encontrarse huevos, larvas y algunos protozoos que causan infección en el hombre, pudiendo ocasionar o no secuelas patológicas en el tracto urinario. Los organismos que pueden detectarse en la orina son *Trichomonas vaginalis, Schistosoma haematobium, y Filarias.*

. Centrifugar la muestra de orina a 800 rcf durante 15 minutos.

. Limpiar para eliminar restos de grasa o suciedad el portaobjetos donde se va a examinar la muestra.

. Con una pipeta recoger 100µl de sedimento y extenderlo en el portaobjetos.

. Examinar la muestra inicialmente con escaso aumento (10x), se obtendrá así una visión general, luego intensificar el aumento (40x), lo cual permite identificar y contar el número de distintos elementos formes.
. Observar al microscopio en busca de huevos de *S.haematobium.*

3. ***Estudios parasitológicos directos en sangre periférica***

Técnica de knott

Se utiliza para concentrar e identificar microfilarias en sangre total.
. Se obtiene sangre completa por punción venosa en tubos con EDTA como anticoagulante.
. Transferir 1 ml de sangre anticoagulada a un tubo de 15 ml de fondo cónico
. Añadir lentamente 10 ml de formalina 2%. Se tapa el tubo y se mezcla suavemente invirtiéndolo y agitándolo. La formalina destruye los eritrocitos, fija los protozoarios sanguíneos y las microfilarias.
. Mantener durante 5 minutos a Tº ambiente antes de centrifugar.
. Centrifugar 10 min a 500 rcf y retirar el sobrenadante.
. Extender el sedimento sobre un portaobjetos que previamente se ha limpiado eliminando restos de suciedad.
. Dejar secar el sedimento y teñir para visualización de microfilarias. La tinción se puede realizar con Panóptico rápido, Hematoxilina de Harris o Giemsa.
. Identificar las diferentes especies de microfilarias teniendo en cuenta características morfológicas (tamaño, presencia o no de vaina, la disposición de los núcleos, etc... proporcionan caracteres importantes para llegar a su identificación).

Test Inmunocromatográfico para detección de *Wuchereria bancrofti* (BinaxNow® Filariosis)

El test BinaxNow®Filariosis es una prueba rápida inmunocromatográfica para la detección de antígeno de *W. bancrofti* en sangre total, suero o plasma.
La prueba se realiza siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Brevemente, 100µl de sangre total o suero se pipetean lentamente sobre la parte superior de la almohadilla blanca. Esperar hasta que la muestra haya fluido hasta la zona rosa y se encuentre completamente húmeda, se cierra la tarjeta y leer los resultados a través de la ventanilla a los 10 minutos.

4. ***Estudios parasitológicos directos en piel***

Los pellizcos cutáneos, que consisten en la búsqueda de microfilarias en piel, es el procedimiento diagnóstico más utilizado para el diagnóstico de oncocercosis.

. Se obtienen pequeñas biopsias dermoepidérmicas exangües (sólo epidermis y papilas dérmicas) de zonas concretas del cuerpo según la zona de origen del sujeto (escápulas, cresta iliaca, parte alta de los glúteos, gemelos).

. Con la ayuda de unas pinzas se levanta la piel y con un bisturí se corta una pequeña porción de piel.

. Las muestras se colocan sobre un porta o un pocillo de una placa de ELISA con fondo de "U", en la que se habrá añadido previamente suero fisiológico.

. Se observa cada 30 minutos en las horas siguientes (30 minutos a 4 horas) con un microscopio invertido, para detectar la presencia de microfilarias móviles.

. En los casos positivos, la identificación a nivel de especie se hará por tinción con Giemsa.

Este procedimiento se realizó con la colaboración del Servicio de Dermatología del Hospital Insular.

5. ***Estudios parasitológicos indirectos***

Se realizaron técnicas de detección de anticuerpos mediante ELISA utilizando los siguientes antígenos:

- Antígeno excreción/secreción de *Fasciola hepática,* para el diagnóstico de fasciolosis importada.
- Antígeno somático de *Schistosoma bovis,* para el diagnóstico de esquistosomiosis importada.
- Antígeno somático de *Dirofilaria immitis,* para el diagnóstico de filariosis tropical importada.
- Antígeno de larvas de *Trichinella spiralis,* para el diagnóstico de triquinelosis importada.
- Antígeno de larvas rabditiformes de *Strongyloides venezuelensis,* para el diagnóstico de estrongiloidosis importada.

Previamente se realizó validación y/o puesta a punto del método serológico en colaboración con el Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de Salamanca

(CIETUS) (**219, 220)** De forma esquemática el método es el siguiente: se tapiza la placa de ELISA con los antígenos referidos a diferentes concentraciones y diluidos en tampón carbonato (pH 9,6). Se añaden los sueros problemas a una dilución de 1:100, se incuban 1 hora a 37ºC, posteriormente se añade antiIgG anti-humana marcada con peroxidasa (Sigma, St Louis, Mo) a diferentes diluciones, dependiendo del antígeno, incubando a 37ºC durante 1 hora. Se utiliza como sustrato ortofenil diamina en tampón citrato pH 5 y se frena la reacción mediante la adición de ácido sulfúrico 3N. La densidad óptica se leyó en un lector de ELISA a 492nm.

Serología de *Strongyloides stercolaris* mediante técnica comercial

Se utilizó para la detección en suero de anticuerpos IgG frente a *Strongyloides stercolaris* mediante técnica de ELISA el Kit comercial (DRG Strongyloides IgG ELISA, DRG Diagnostics, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Serología de *Toxocara canis* mediante técnica comercial

Se utilizó para la detección de anticuerpos IgG en suero frente a *Toxocara canis* mediante técnica de ELISA el Kit comercial (NovaLisa *Toxocara canis* IgG ELISA, NovaTec Immunodiagnostica, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.4.3. Objetivo 4: Citocinas eosinofílicas y helmintosis

Sujetos Estudiados

Para llevar a cabo este objetivo se realizaron dos grupos que cumplían ambos los siguientes criterios: *i)* inmigrantes recién llegados a nuestro país con estancia inferior a 6 meses, *ii)* el origen de los inmigrantes era África subsahariana, *iii)* edad igual o superior a 15 años.

El **grupo de estudio** estaba formado por 76 pacientes de origen subsahariano con infección helmíntica, diagnosticados mediante métodos clásicos directos y parasitados por una única especie de helminto. De forma específica, el grupo de estudio se dividía en: 42 pacientes infectados por geohelmintos (21 Uncinarias, 15 *Trichuris trichura*, 6 *Ascaris lumbricoides*), 23 pacientes por esquistosomas (10 *S. mansoni*, 10 *S. haematobium,* 2 *S. mansoni/S. haematobium,* 1 *S. intercalatum*) y 11 pacientes por filarias (8 *Mansonella perstans*, 3 *Loa loa*).

El **grupo control** estaba formado por 45 individuos sanos (no presentaban manifestaciones clínicas), que procedían de las mismas áreas subsaharianas que el grupo de estudio, sin eosinofilia absoluta (156,8/µl ± 79,5) ni eosinofilia relativa y en los que se excluyó, mediante toda la metodología diagnóstica parasitaria anteriormente citada (métodos directos y serológicos), la presencia de parasitosis.

Técnicas utilizadas

Además de la determinación de valores hematológicos y el estudio parasitario directo e indirecto que se detalla en el objetivo 1 y 2, se llevó a cabo la cuantificación de los niveles séricos de varias citocinas: **Eotaxina-1, IL-13**, **IL-16 y RANTES.**

Para la obtención de **muestras de suero**, se obtuvo una muestra de sangre periférica por paciente. La sangre se recogía en tubos no heparinizados con gel separador de suero (Vacutainer® SST™ II *Advance*), inmediatamente después de la extracción se invertía el tubo suavemente 6 veces y se mantenía un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente para la retracción del coágulo. Entre 30 minutos y 2 horas después de extraer la muestra se procedió a centrifugar a 1800 G durante 10 minutos a 18-22ªC (condiciones estándar). Después, el suero era alicuotado en dos tubos y congelado a -80ªC.

Determinación de citocinas séricas

Se determinaron cuatro tipos de citocinas mediante técnicas de enzimoinmunoensayo (ELISA), utilizando para ello diferentes métodos comerciales disponibles en el mercado (tabla x) y procesando cada muestra a doble pocillo. La técnica de ELISA para las cuatro citocinas se puede resumir en los siguientes pasos: los pocillos de la placa están tapizados con un anticuerpo monoclonal específico antiinterleucinas humanas dependiendo del kit (Eotaxina-1, IL-16, IL-13 y RANTES), de manera que al añadir las muestras en los diferentes pocillos, si hay reacción antígeno-anticuerpo, queda inmovilizada en el soporte y mediante la adición del conjugado (anticuerpos policlonales marcados con una enzima) los anticuerpos reaccionan específicamente con los antígenos-anticuerpos fijados al soporte y forman un complejo que será fácilmente revelado mediante la adición de un substrato específico que, al actuar la enzima, producirá color que puede ser cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro.

Los límites de detección y el volumen de suero que es necesario para realizar las determinaciones de cada citocina se especifica en la **tabla 3.3.**

Tabla 3.3: Características de los kits comerciales de diferentes citosinas

	Nombre	Referencia	Límite de detección	Volumen de suero
Eotaxina	Human Eotaxin/CCL11 Immunoassay	R-D Systems, United Kingdom (DTX00)	< 5 pg/ml	100 µL
IL-13	Human IL-13 Immunoassay	R-D Systems, United Kingdom. (D1300)	< 32 pg/ml	200 µL
IL-16	Interleukin-16 human, ELISA system	Amersham Pharmacia Biotech,United Kingdom (RPN 2772)	< 8 pg/ml	50 µL
RANTES	RANTES Human, ELISA system	Amersham Pharmacia Biotech,United Kingdom (RPN 2771)	< 2 pg/ml	5 µL

3.4.4. Objetivo 5: Mecanismos de lesión: lesiones subclínicas

Sujetos estudiados

Para la consecución del objetivo 5 se seleccionaron dos grupos: grupo de estudio y grupo control. Los sujetos del **grupo de estudio** fueron reclutados en las consultas externas de la UEIMT, atendiendo a los siguientes criterios: a) ausencia de manifestaciones clínicas de cardiopatía, b) presencia de eosinofilia absoluta (> 450/µL), y c) aceptación explícita para formar parte del estudio. El **grupo control** estaba formado por sujetos asintomáticos procedentes de las mismas regiones geográficas en los que se descartó mediante las pruebas indicadas en apartados previos (objetivo 1,2 y 3) la presencia de eosinofilia y/o parasitosis, así como de manifestaciones cardíacas.

En total se incluyeron en el estudio 52 inmigrantes de raza negra procedentes de África subsahariana. Se excluyeron dos pacientes debido a la presencia de afectación reumática valvular mitral en un caso y prolapso valvular mitral asociado a insuficiencia valvular mitral ligera en el otro. Por ello, **el grupo de estudio** quedó formado por 37 pacientes con el siguiente diagnóstico etiológico; en 8 casos fue una esquistosomosis, en 13 casos una filariosis, en 7 casos una geohelmintosis (uncinariosis en 3 casos,

estrongiloides en 2 casos y un caso de ascariosis y trichurosis), en 4 casos coexistían varias entidades. **El grupo control** quedó constituido por 13 personas.

Métodos de estudio

El estudio ecocardiográfico se realizó en régimen ambulatorio en todos los casos. Los estudios se realizaron siempre en el mismo equipo (Sonos 5500 de Hewlett Packard), determinando las siguientes mediciones u observaciones:

a) La medida de las **dimensiones de las cámaras** ventriculares izquierda y derecha y aurícula izquierda, mediante técnica en **Modo M**, en planos paraesternal eje largo y corto.

b) El análisis de las **características morfológicas** de la estructura cardíaca, mediante ecocardiografía bidimensional (**Eco 2D**), con optimización de la imagen mediante ajuste de la frecuencia, y los parámetros de ganancia, compresión y procesado de la imagen. Se utilizaron los planos habituales paraesternal eje largo y corto, apical de 4 y 2 cámaras y subcostal. Se aplicó sistema de ampliación de zoom de alta resolución, sobre áreas concretas (zonas apicales ventriculares y de los planos valvulares), para una mejor visualización y/o cuantificación de las posibles alteraciones.

c) Se procedió al análisis de la **fracción de eyección ventricular izquierda** con **Eco 2D**, mediante la técnica biplana de Simpson.

d) Se estudiaron los parámetros de función de llenado ventricular mediante ultrasonidos **Doppler en onda pulsada** del flujo transmitral, transtricúspide (en apnea mesorespiratoria), con cálculo de las velocidades pico inicial (E en cm/seg) y su pendiente de deceleración (TD en milisegundos) y velocidad de contracción auricular (A en cm/seg), así como la relación E/A. Si la imagen lo permitía, se analizó el flujo de venas pulmonares (plano apical de 4 cámaras), con cálculo de las velocidades pico sistólica (S) en cm/seg, diástolica (D) y su relación S/D, y la velocidad pico (cm/seg) y duración (en milisegundos) de la onda auricular retrógrada (Ar). En todos los casos se analizaron las medidas de un mínimo de 4 latidos cardiacos consecutivos.

e) Se analizó la presencia de regurgitación valvular mediante **ultrasonidos Doppler codificado en color**, en planos paraesternal, ejes largo y corto, y apical 4 y 2 cámaras.

f) En los casos con insuficiencia tricúspide, se midió el valor de la presión sistólica pulmonar mediante el cálculo basado en la ecuación de Bernouilli: $4V^2+14$ (en mm Hg), donde V representa la velocidad máxima.

Definición de los hallazgos

Se clasificaron los hallazgos atendiendo a las siguientes descripciones basadas en los trabajos de la literatura sobre afectación cardíaca en presencia de eosinofilia en dos grupos:

a) Hallazgos clásicos

-***Engrosamiento endocárdico.*** Se describe como un engrosamiento de la pared, con aparición de capas refringentes y más ecogénicas en la zona endocárdica.

-***Trombo apical en el ventrículo izquierdo:*** imágenes ecodensas que se disponen tapizando el apex cardiaco izquierdo, produciendo obliteración de dicha zona y determinando limitación de volumen de sangre en el llenado de dicha cámara.

-***Trombo apical en el ventrículo derecho***: imágenes ecodensas que se disponen tapizando el apex cardiaco derecho, produciendo obliteración de dicha zona y determinando limitación de volumen de sangre en el llenado de dicha cámara.

-***Afectación (engrosamiento) de los velos valvulares mitrales*** (especialmente el velo posterior). El engrosamiento de los velos valvulares se determina por valores de su espesor superiores a 3 mm .

b) Hallazgos no clásicos:

-***Hipertrofia ventricular izquierda*** Criterios de Casale (Ann Intern Med 1986; 105:173-178)**:** Septo interventricular (> 12 mm): ligera : 12-13 mm; Moderada 13-14 mm; grave: 14-15 mm; Pared posterior > 11 mm : ligera 11-12 mm; moderada: 12-13 mm; grave: 13-14 mm

-***Dilatación ventricular izquierda*** (diámetro diastólico transverso ventricular >56 mm).

-***Derrame pericárdico*** (presencia de espacio libre de ecos > 5 mm en pared posterior del ventrículo izquierdo).

-***Ventrículo izquierdo hiperdinámico*** :Fracción de eyección ventricular ≥ 70%.

-Disfunción diastólica avanzada: restricción al llenado ventricular. Perfil restrictivo se define por una relación del cociente E/A de flujo transvalvular mitral > 2 y/o un TD < 130 milisegundos.

3.4.5. Objetivo 6: Mecanismos de lesión: proteínas citotóxicas derivadas de los eosinofilos (ECP y EDN)

Sujetos Estudiados

Para realizar este objetivo los sujetos que participaron cumplían los siguientes criterios: *i)* inmigrantes recién llegados a nuestro país con estancia inferior a 6 meses, *ii)* el origen de los inmigrantes era África subsahariana, *iii)* edad igual o superior a 15 años.

Se dividieron en dos grupos; el **grupo de estudio** estaba formado por inmigrantes de origen subsahariano con eosinofilia e infección helmíntica, diagnosticada mediante métodos directos, y parasitados por una única especie.

El **grupo control** estaba formado por individuos sanos de las mismas áreas subsaharianas que el grupo de estudio pero sin eosinofilia absoluta ni relativa y en los que se excluyó, mediante toda la metodología parasitaria anteriormente citada (métodos directos y serológicos), la presencia de parasitosis.

Técnicas utilizadas

Además de la determinación de valores hematológicos y el estudio parasitario directo e indirecto que se detalla en el objetivo 1 y 2, se llevó a cabo la cuantificación de los niveles séricos de varias proteínas: **ECP y EDN**.

Para la obtención de **muestras de suero** se siguió el mismo protocolo que se especifica en la página 112. Para la obtención de **muestras de orina** se recogió una muestra puntual de cada individuo en recipientes de polietileno estériles, siguiendo las recomendaciones habituales de limpieza previa de la región genital. Previo mezclado y homogeneizado adecuado de la orina, se procedió a alicuotar 1 ml de orina en criotubos, que se guardaron a -80ºC hasta su uso (orina sin centrifugar). Por otro lado, se centrifugaron 10 ml de orina a 450 g durante 10 minutos y se almacenó 1 ml del sobrenadante a -80ºC (orina centrifugada). La concentración de estas proteínas en orina puntual se expresa en relación a la concentración de creatinina en esa muestra, para ello se

realizó la determinación de creatinina en analizador Beckman Coulter AU mediante prueba colorimétrica cinética (método de Jaffé) y los resultados de ECP o EDN en orina se presentaron como µg/mmol creatinina.

La determinación de la concentración de proteína catiónica del eosinófilo **(ECP)** se llevó a cabo en el **suero** de 32 pacientes con infección helmíntica; 16 infectados por esquistosomas (11 *S. haematobium*, 5 *S. mansoni*), 11 por geohelmintos (Uncinarias) y 5 por filarias (4 *Mansonella perstans,* 1 *Loa loa*) y también se cuantificó **en la orina sin centrifugar** de 11 pacientes infectados únicamente por *Schistosoma haematobium,* ya que la ECP no atraviesa la barrera glomerular. El estudio de la concentración de neurotoxina derivada del eosinofilo **(EDN)** se realizó en 52 **muestras de suero** de pacientes con eosinofilia e infección helmíntica; 20 pacientes infectados por esquistosoma (8 *S. haematobium*, 5 *S. mansoni*. 7 *Schistosoma spp.)*, 14 por geohelmintos (9 Uncinarias, 5 *Strongyloides sp.*) y 18 por filarias (7 *Mansonella perstans*, 1 *Loa loa*, 1 *W. bancrofti, 9 Filaria spp.)* y también se midió en **orina centrifugada** de 21 pacientes con infección helmíntica (11 esquisotomas, 5 geohelmintos y 5 filarias) y en 20 pacientes del grupo control.

Cuantificación de ECP y EDN

Se efectuó la cuantificación de ambas proteínas (ECP y EDN) mediante sándwich ELISA utilizando dos kits comerciales (MBL International Corporation, USA), cuyas características se especifican en la **tabla X** y los resultados se expresaron dependiendo de la muestra utilizada, en suero como ng/mL y en orina como mg/mmol de creatinina. No hay reacción cruzada entre ambas proteínas. En la determinación de EDN y ECP se utilizó el suero a una dilución 1:5 y la orina a 1:51 y 1:2 respectivamente. Brevemente, el protocolo consiste en que las muestras problema se incuban en los pocillos recubiertos con un monoclonal anti-ECP humana o anti-EDN. Después de un lavado, se añade a los pocillos un anticuerpo policlonal anti-ECP humana o anti-EDN, que está marcado con peroxidasa y se deja en incubación. Después de un segundo lavado, se añade el sustrato de la enzima peroxidasa al cromógeno y se deja incubar durante un periodo de tiempo adicional. Finalmente, una solución ácida, añadida a los pocillos, detiene la reacción y estabiliza el color que se ha desarrollado en la reacción. Llegado a este punto se procede a determinar la densidad óptica (O.D.) de cada uno de los pocillos usando un lector de

microplacas, a una longitud de onda de 450 nm. La concentración de ECP se interpola en la curva que se obtiene mediante la lectura de los estándares.

3.4.6. Objetivo 7: Mecanismos de lesión: factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

Sujetos Estudiados

Para este objetivo se incluyeron 79 sujetos que cumplían los siguientes criterios: *i)* inmigrantes recién llegados a nuestro país con estancia inferior a 6 meses, *ii)* el origen de los inmigrantes era África subsahariana, *iii)* edad igual o superior a 15 años.

Se realizaron dos grupos: *i)* **el grupo control** estaba formado por **24 individuos** sanos de las mismas áreas subsaharianas que el grupo de estudio, sin eosinofilia absoluta ni relativa y en los que se excluyó, mediante toda la metodología parasitaria anteriormente citada (métodos directos y serológicos), la presencia de parasitosis, *ii)* **el grupo de estudio** estaba formado por **55 pacientes** de origen subsahariano con eosinofilia e infección helmíntica, diagnosticada mediante métodos directos de helmintosis, y parasitados por una única especie. El grupo estaba formado por 27 pacientes infectados por esquistosomas (17 *S. haematobium*, 10 *S. mansoni*), 15 pacientes infectados por geohelmintos (Uncinarias) y 13 con infección por filarias (9 *Mansonella perstans,* 3 *Loa loa*, 1 *Wuchereria bancrofti*).

Técnicas utilizadas

Además de la determinación de valores hematológicos y el estudio parasitario directo e indirecto que se detalla en el objetivo 1 y 2, se llevó a cabo la determinación sérica de VEGF.

Para la obtención de **muestras de suero**, se siguió el mismo protocolo que se ha especificado con anterioridad.

Determinación de VEGF

Se realizó la cuantificación de los niveles de VEGF en suero mediante sandwich ELISA en fase sólida usando el kit comercial (Biotrak Vascular Endothelial Growth Factor [(H)VEGF], Human Elisa System, GE Healthcare Buckingamshire,UK). La sensibilidad del ensayo es < 8pg/ml. Se procesó cada muestra por duplicado y el protocolo que se

siguió se resume a continuación: Se utiliza una anticuerpo monoclonal (anticuerpo de captura) específico para VEGF humano revestido sobre una placa de 96 pocillos, al añadir las muestras, cualquier VEGF humano presente se une al anticuerpo inmovilizado. Se lavan los pocillos y se añade el anticuerpo VEGF anti-humano policlonal biotinilado (anticuerpo de detección). Después de un segundo lavado, se añade avidina-peroxidasa y, posteriormente, la solución de sustrato, que produce un color azul en proporción directa a la cantidad de VEGF presente en la muestra inicial. A continuación, se añade el tampón de detención para terminar la reacción . Esto da como resultado un cambio de color de azul a amarillo que se cuantifica mediante espectrofotómetro a 450 nm.

3.5. Efectos indirectos del estudio

Como consecuencia del estudio se procedió al manejo terapéutico según diagnóstico y realización de informes clínicos de los sujetos del estudio.

3.6. Limitaciones del estudio

La elección de los centro de acogida Udjama y del Centro de Inmigrantes de Menores de Arinaga para llevar a cabo este proyecto doctoral permitía una selección adecuada de la muestra, aunque es posible que existieran algunos factores que limiten una adecuada extrapolación a la población: En primer lugar, es posible que el tanto por ciento de mujeres que residen de forma irregular en Gran Canaria sea superior al de este estudio, ya que existen otras asociaciones que acogen específicamente a mujeres. En segundo lugar, un número variable de inmigrantes que ingresaron en el centro, no residieron en el mismo el tiempo suficiente para realizar el estudio. En algunos casos esta corta estancia se relacionaba con un mayor nivel económico, lo que les permitió abandonar el centro. Finalmente, con frecuencia los inmigrantes subsaharianos son reacios a hacerse análisis de sangre por diversas razones (confusión entre donación y análisis, desconfianza y desconocimiento en el sistema, mística de la sangre…), con lo cual no dieron su consentimiento para iniciar el estudio o completarlo.

3.7. Análisis de los datos

El análisis estadístico se realizó de la siguiente manera:

Las variables categóricas se resumieron mediante porcentajes y las numéricas en medias y desviaciones típicas.

De forma general, las magnitudes cualitativas se expresaron en forma de tanto por ciento y las cuantitativas en forma de media y desviación típica, si siguen una distribución normal, y de mediana y rango intercuartílico en el caso de que su distribución no sea normal. Para el análisis inferencial se estudiaron inicialmente la normalidad y homoscedasticidad de las muestras. En aquellos casos en los que las muestras se distribuyeran normalmente y sus varianzas fueran similares, se emplearán análisis de pruebas paramétricas. Para estudiar las posibles asociaciones entre variables categóricas, se utilizó el test de independencia de la Ji-cuadrado para el análisis de los datos. Para evaluar la asociación entre una variable cuantitativa y una variable categórica se usó el test t de Student o ANOVA (en caso de que hubiera más de dos categorías) para variables de distribución normal, o la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para las no normales entre dos grupos, si es entre tres o más grupos la prueba Kruskal-Wallis seguido de análisis *post-hoc*. Para comparar las medias de las variables numéricas entre los dos grupos en estudio se utilizó el análisis de la covarianza. Para estudiar el grado de asociación o independencia de dos variables cuantitativas recurrimos a técnicas de correlación como forma de evaluar la fuerza de la asociación entre las variables.

En todos los contrastes de hipótesis realizados se consideró que el resultado era estadísticamente significativo cuando el correspondiente p-valor era inferior a 0,05.

Para realizar el estudio anteriormente mencionado, se utilizó el programa SPSS, versión 20.0 para Mac.

3.8. Consideraciones Éticas

El estudio se ha regido por los principios básicos contenidos en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (*World Medical Organization. Declaration of Helsinki. BMJ. 1996; 313: 14448-9).* Se han mantenido los niveles más altos de conducta profesional y confidencialidad y se ha seguido la legislación nacional aplicable en materia de protección de datos.

El derecho a la confidencialidad del paciente está garantizado y su identidad ha sido codificada. Solo las personas autorizadas han tenido acceso a detalles personales que

pudieran identificar al paciente, si los procesos de verificación de los datos así lo han requerido.

A todos los pacientes se les informó de los objetivos del estudio y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los mismos.

4. Resultados

4. RESULTADOS

Para llevar a cabo este trabajo incluimos, atendiendo a los objetivos, tanto a aquellos inmigrantes (menores y adultos) recién llegados (< 6 meses) a Gran Canaria como a inmigrantes cuya estancia en la isla era superior a este límite de tiempo, durante el periodo 2000 – 2014. Las características de este colectivo se muestran en la **tabla 4.1**.

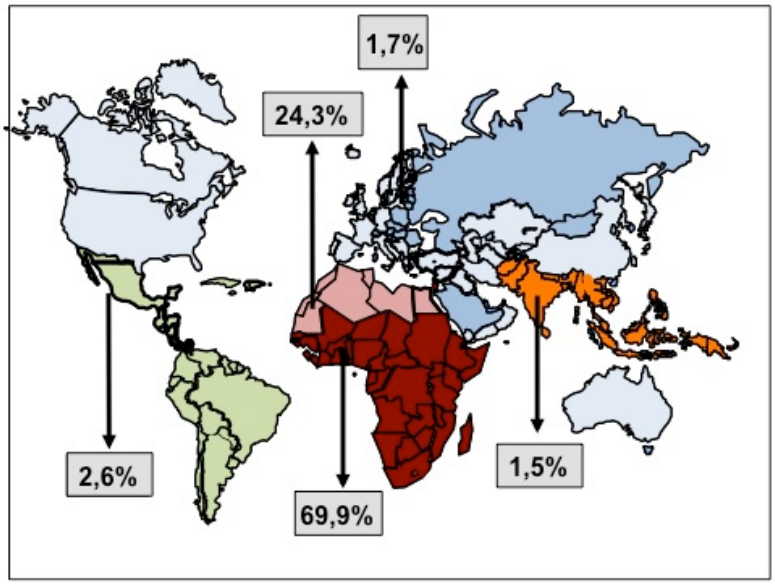
Tabla 4.1: Características generales de los inmigrantes del estudio

Características	Inmigrantes n (%)
Sexo	
Varón	2076 (85,8)
Mujer	344 (14,2)
Edad	
1-18	380 (15,7)
19-29	1252 (51,7)
30-39	462 (19,1)
> 40	145 (6)
NS/NC	181 (7,5)
Origen	
África Subsahariana	1690 (69,9)
África Norte	589 (24,3)
Latinoamérica	62 (2,6)
Sudeste Asiático	37 (1,5)
Otros	42 (1,7)
IMC	
Insuficiencia ponderal	29 (5,4)
Peso normal	387 (72)
Sobrepeso	113 (21)
Obesidad	9 (1,6)
Ámbito	
Urbano	723 (29,9)
Rural	662 (27,3)
NS/NC	1035 (42,8)
Hábitos tóxicos	
Tabaco	442 (18,3)
Alcohol	344 (14,2)
Ruta llegada	
Patera	2242 (92,6)
Otros medios	178 (7,4)

NS/NC: no sabe no contesta; IMC: índice de masa corporal

En total se incluyeron 2420 inmigrantes; la mayoría de los individuos eran varones (85,8%), con una media de edad de 25,7 ± 8,9 años y procedían fundamentalmente de África subsahariana (**Figura 4.1**). Los principales países de procedencia fueron: Marruecos (24%), Nigeria (16,4%), Sierra Leona (10,2%) y Ghana (9,9%).

Figura 4.1: Procedencia de los Inmigrantes del estudio

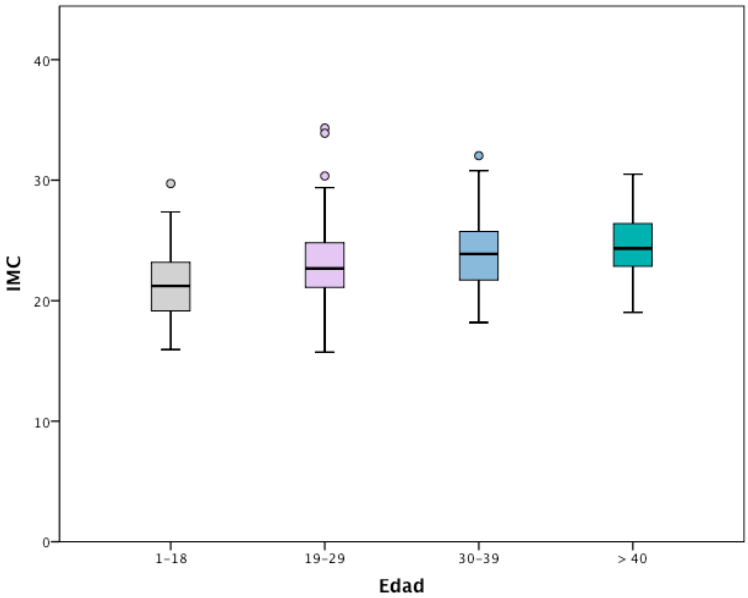


El 29,9% procedían de área urbana, el 27,4% de área rural en su país de origen y se desconocía en el resto de sujetos

El índice de masa corporal (IMC) se pudo calcular en 538 inmigrantes. Los sujetos se clasificaron en: insuficiencia ponderal en el 5,4%, peso normal en 72%, sobrepeso el 21% y obesidad en el 1,6%. Si calculamos el IMC según los grupos etarios podemos ver la distribución en la tabla y figura siguiente (**tabla 4.2, figura 4.2**)

Tabla 4.2 y Figura 4.2: Valores medios de IMC según los grupos etarios de los inmigrantes

Estadísticos descriptivos				
Edad		**N**	**Media**	**Desv. típ.**
1-18	**IMC**	105	21,3	2,8
19-29	**IMC**	297	23	2,8
30-39	**IMC**	95	24	2,8
≥ 40	**IMC**	41	24,5	3



Por otro lado si calculamos el IMC promedio, en inmigrantes recién llegados (16,82) fue inferior al valor encontrado en inmigrantes de estancia superior (22,4).

Reconocían el consumo de alcohol y tabaco el 32,5% de los sujetos. En cuanto a la forma de entrada a Gran Canaria la mayoría accedieron por medio de pateras o cayucos (92,6%), y solamente el 7,4% entraron empleando otros medios de locomoción.

A continuación se desglosan los resultados obtenidos para este estudio en siete apartados que corresponden a los siete objetivos propuestos.

4.1. Objetivo 1. Prevalencia de eosinofilia en inmigrantes

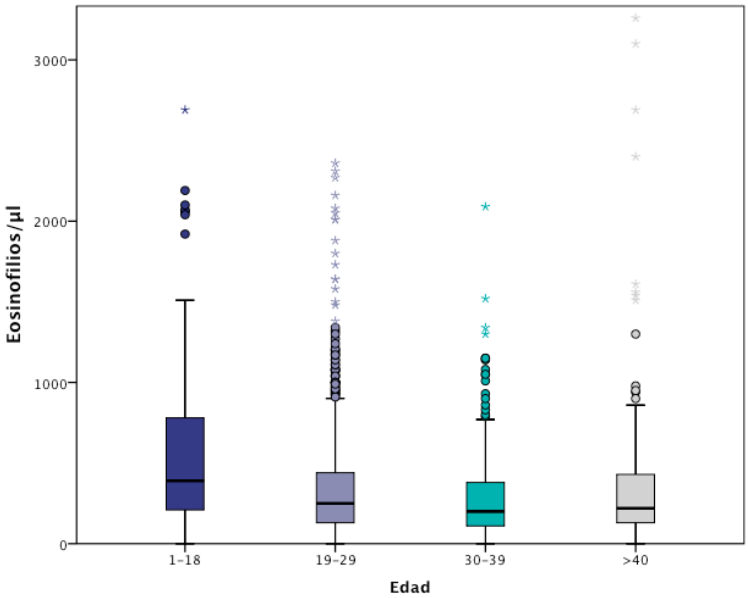
4.1.1. Características generales de los sujetos del estudio

Se realizó un estudio prospectivo en 2420 inmigrantes irregulares recién llegados (< 6 meses) a Gran Canaria durante el periodo 2000-2012. Se evaluó la presencia o no de eosinofilia mediante la realización de hemograma completo en 1697 (70,1%) inmigrantes, 1479 de ellos eran varones y la edad media era de 26,4 años (rango 1-82). El 67,4% procedían de África subsahariana, 27,2% de África del Norte, el 2,4% de Latinoamérica, el 1,5% de Europa del Este, el 1,2% de Asia y el 0,3% Oriente Medio.

Agrupamos el número de inmigrantes en cuatro grupos etarios (grupo 1: entre 1-18 años estaba formado por 247 inmigrantes; grupo 2: entre 19-29 años por 1002 inmigrantes; grupo 3 entre 30-39 años por 327 inmigrantes y grupo 4 los ≥ 40 años por 121 inmigrantes) y analizamos el número total de eosinofilos/µl (media ± DT) en cada grupo: en el grupo 1 la media de eosinofilos era de 588,6/µl ± 638,3, en el grupo 2 355,9/µl ± 377,3, en el grupo 3 de 286,8/µl ± 269,2 y en el grupo 4 de 418,4/µl ± 563,6 **(tabla 4.3, figura 4.3)**.

Tabla 4.3 y Figura 4.3: Eosinofilia (media ± DT) según el grupo etario

	Eosinofilos/µl	
Edad	**n**	**Media ± DT**
1-18	247	**588,6 ± 638,3**
19-29	1002	**355,9 ± 377,3**
30-39	327	**286,8 ± 269,2**
≥ 40	121	**418,4 ± 563,6**

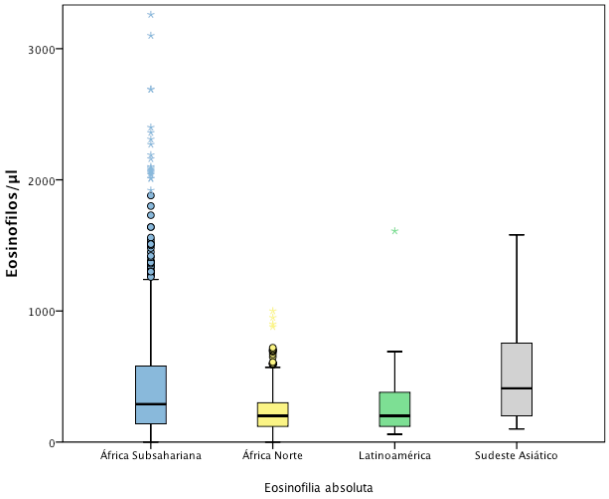


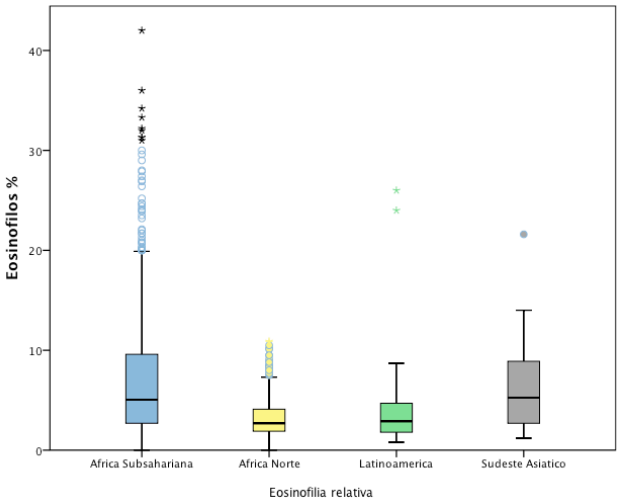
4.1.2. Prevalencia de eosinofilia y eosinofilia relativa en las principales áreas de origen de los inmigrantes

Si comparamos las principales áreas de origen de los inmigrantes observamos que la media de eosinofilia absoluta y de eosinofilia relativa es más elevada en los sujetos que procedían de África Subsahariana. (**tabla 4.4)**

Tabla 4.4 y Figura 4.4: Valores medios de eosinofilia absoluta y relativa según las áreas geográficas

	África Subsahariana	África Norte	Latinoamérica	Sudeste Asiático
N	1.140	461	41	20
Eosinofilia absoluta (media ± DT)	435,9 ± 485,1	251,7 ± 158,1	391,4 ± 756,3	514,5 ± 398
Eosinofilia relativa (media ± DT)	6,9 ± 6,1	3,2 ± 1,9	4,2 ± 5,1	6,3 ± 5,1





4.1.3. Prevalencia de eosinofilia

En el análisis del tipo de eosinofilia, un 27,2% (463 sujetos) presentaron **eosinofilia absoluta** (> 450 eosinofilos/µl) y un 14% (238 sujetos) presentaron **eosinofilia relativa**. Las principales características de los inmigrantes con eosinofilia absoluta y relativa se indican en la **tabla 4.5**.

Tabla 4.5: Características de los inmigrantes con eosinofilia absoluta y eosinofilia parcial

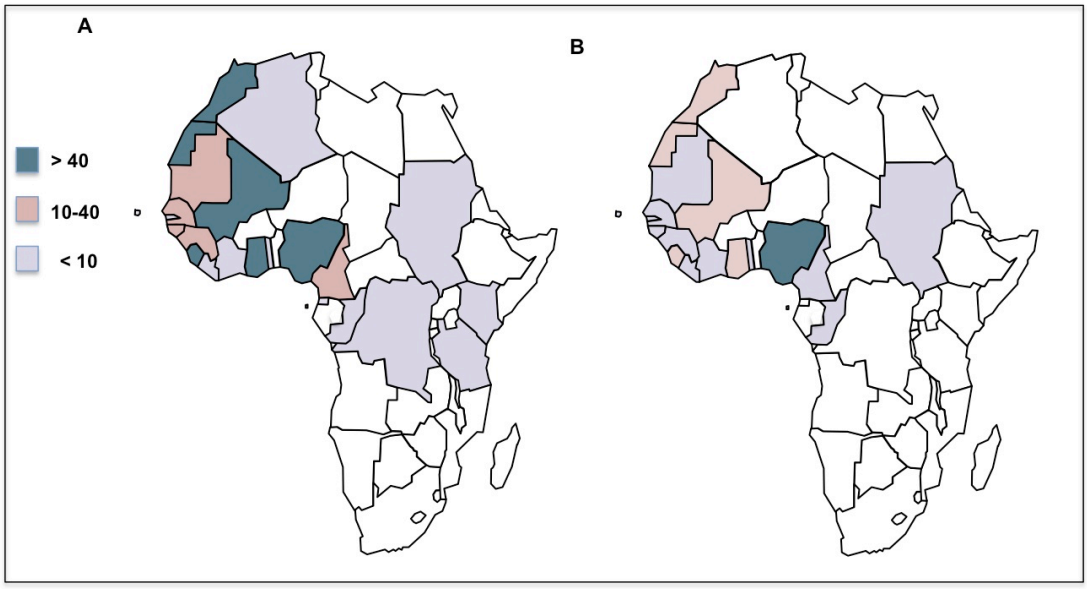
Características	Eosinofilia absoluta n(%)	Eosinofilia parcial n(%)
Sexo		
Varón	418 (90,3)	214 (89,9)
Mujer	45 (9,7)	24 (10,1)
Edad		
1-18	115 (24,8)	46 (19,3)
19-29	234 (50,5)	134 (56,3)
30-39	67 (14,5)	33 (13,9)
≥ 40	29 (6,2)	11 (4,6)
Origen		
África Subsahariana	354 (85,1)	195 (81,9)
África Norte	51 (11,01)	35 (14,7)
Sudeste Asiático	10 (2,15)	2 (0,84)
Latinoamérica	7 (1,51)	2 (0,84)
Europa Este	1 (0,21)	4 (1,68)
Ámbito		
Urbano	166 (35,8)	80 (33,6)
Rural	160 (34,5)	70 (29,4)
NS/NC	137 (29,5)	88 (36,9)
Manifestaciones		
Asintomáticos	368 (79,5)	220 (92,4)
Adenopatías periféricas	9 (1,9)	1 (0,4)
Digestiva	18 (3,9)	8 (3,4)

Lesiones cutáneas	14 (3)	5 (2,1)
Urinaria	25 (5,4)	1 (0,4)
Otros	29 (6,3)	3 (1,3)
Comorbilidad		
VHB	49 (11,9)	28 (14,6)
VHC	10 (2,6)	2 (1)
VIH	12 (2,8)	7 (3)
RPR+	9 (2,5)	1 (0,4)
Mantoux		
Realizados/Positivos	234/42 (17,9)	133/30 (22,5)

4.1.4. Características de los sujetos con eosinofilia absoluta

Los sujetos con eosinofilia absoluta eran principalmente varones (90,3%), con una edad media de 25,2 ± 9,1 con un rango entre 1-74 años. Las principales nacionalidades se representan en la **figura 4.4** y eran en orden descendente: Nigeria 17,3%, Mali 14,5%, Ghana y Marruecos 11%.y Sierra Leona 9,5%.

Figura 4.5: Principales países de los inmigrantes A) con eosinofilia absoluta, B) eosinofilia relativa



Las profesiones de este colectivo se agruparon en nueve categorías, de las cuales la más frecuente era la de estudiante, seguida de los que se dedicaban a la agricultura y/o ganadería **(tabla 4.6)**.

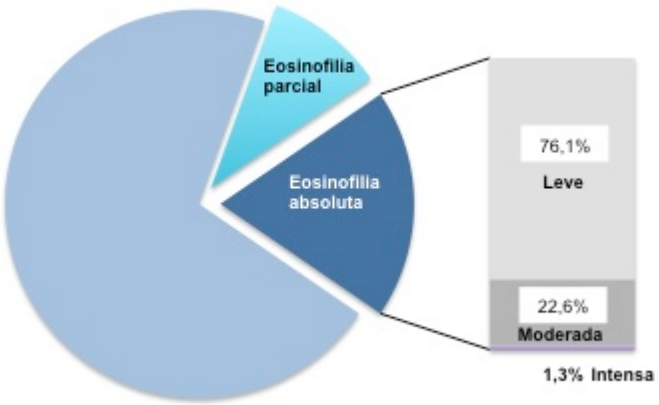
Tabla 4.6: Categorías profesionales referidas por los inmigrantes con eosinofilia y eosinofilia relativa

Grupo profesional	Eosinofilia absoluta n(%)	Eosinofilia parcial n(%)
Agricultura-ganaderia	58 (12,5)	31 (13)
Arte y Oficios	37 (8)	15 (6,3)
Comercial	20 (4,3)	11 (4,6)
Construcción	50 (10,8)	26 (11)
Deportista	4 (0,9)	5 (2,1)
Estudiante	109 (23,6)	50 (21)
Servicios	26 (5,6)	16 (6,7)
Sus labores	6 (1,3)	1 (0,4)
Titulado Superior	12 (2,6)	5 (2,1)
Ns-Nc	141 (30,4)	78 (32,8)

Ns-Nc: No sabe no contesta

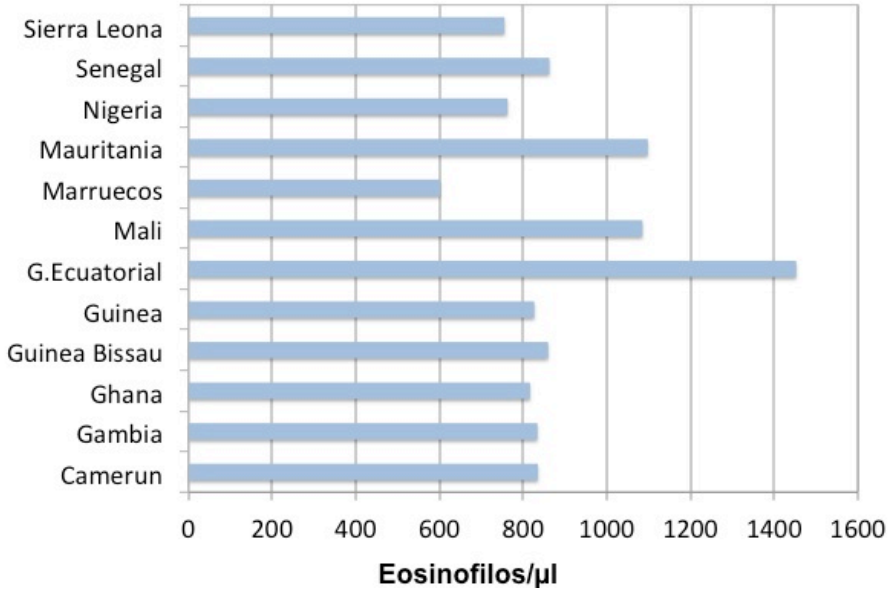
En cuanto al grado de eosinofilia el 76,1% tenia criterios de eosinofilia leve (450-999 eosinofilos/µl), el 22,6% tenia criterios de eosinofilia moderada (1.000-2.999 eosinofilos/µl) y solamente un 1,3% tenia criterios de eosinofilia intensa (>3.000 eosinofilos/µl) (**figura 4.5)**.

Figura 4.6: Prevalencia de eosinofilia absoulta y relativa en población inmigrante



La prevalencia media de eosinofilia varía según la procedencia del inmigrante, siendo los originarios de Guinea Ecuatorial los que presentaban valores medios elevados (1.452 eosinofilos/µl) y Marruecos los valores mas bajos (601 eosinofilos/µl) **(figura 4.6)**.

Figura 4.7: Prevalencia de eosinofilia por países



La procedencia rural o urbana en este colectivo era similar (34,5% *vs* 35,8%). La mayoría de los inmigrantes con eosinofilia absoluta estaban asintomáticos (79,5%) y en el resto de casos aparecían manifestaciones clínicas leves con problemas urinarios en el 5,4% (principalmente hematuria o disuria), digestivas (3,9%) como dolor abdominal y/o diarrea, lesiones cutáneas en el (3%) y adenopatías periféricas en el 1,9%. No se detecto ningún sujeto con manifestaciones clínicas graves secundarias a la eosinofilia. Además presentaban infecciones por virus hepatrotropos primarios (VHB y VHC) en el 11,9% y en el 2,6% respectivamente; infección por VIH en 2,8% e infección por *Treponema pallidum* (RPR positivo y FTA positivo) el 2,5%. También se valoró en este grupo la prevalencia de infección tuberculosa latente mediante la realización de intradermoreacción de Mantoux siendo positivo en un 15,2%.

4.1.5. Características de los sujetos con eosinofilia relativa

Las características de los inmigrantes con **eosinofilia relativa** eran similares a las de sujetos con eosinofilia absoluta **(tabla 4.4)**.

Eran varones el 91% de los sujetos con una edad media de 24,7 años ± 7,03. El principal origen era África subsahariana (81,9%) y los países de origen de estos sujetos se representan en la **figura 4.4** y son en orden descendente: Nigeria 19,3%, Marruecos 13,4%, y Ghana 11,8%. Un 33,6% tenían un origen urbano y un 29,4% eran de origen rural. Las

profesiones agrupadas en nueve categorías, eran similares a la del colectivo con eosinofilia absoluta; la más frecuente era estudiante (21%), seguida de los que se dedicaban a la agricultura y/o ganadería (13%) **(tabla 4.5)**.

Presentaban menos manifestaciones clínicas que los inmigrantes con eosinofilia absoluta ya que el 92,4% estaban asintomáticos, siendo anecdóticas las molestias digestivas (3,4%) y las lesiones cutáneas (2,1%). La infección frente a virus hepatrotopos primarios era del 14,6% (VHB) y 1% (VHC) respectivamente, frente a VIH en el 3% y frente a *Treponema pallidum* en el 0,4%. La prevalencia de tuberculosis latente detectado por intradermoreacción de Mantoux era mayor (22,5%) con respecto a los sujetos con eosinofilia absoluta.

4.2. Objetivo 2. Causas de eosinofilia absoluta en inmigrantes

Para determinar las posibles causas de eosinofilia absoluta se realizó la búsqueda de parásitos tanto mediante estudios directos (en muestras de heces, orina, sangre y piel) como mediante estudios indirectos (serología) frente a diferentes helmintos, siguiendo el protocolo previamente descrito en Materiales y Métodos (páginas 107-112).

4.2.1. Características generales de los sujetos del estudio

El *grupo de estudio* estaba formado tanto por inmigrantes recién llegados, cómo por pacientes inmigrantes, cuya estancia en nuestro país era superior a 6 meses, valorados en la consulta de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical del Hospital Insular desde el año 2.000 al año 2.014 que tenían como criterio de estudio una eosinofilia importada absoluta (> 450 eosinofilos/µl).

Para llevar a cabo este objetivo, se analizaron las causas de eosinofilia absoluta en **515 inmigrantes**. Las principales características de este grupo se describen en la **tabla 4.7**. La mayoría de los sujetos eran varones (88,6%) con una media de edad de 26 años. El 93,4% procedían de África, y principalmente del área subsahariana (82,9%), el 3,9% de Latinoamérica y el 2,7% del Continente Asiático. El grado de eosinofilia era en 396 sujetos leve (450-999 eosinofilos/µl), en 113 sujetos moderada (1000-2999 eosinofilos/µl) y sólo 6 casos presentaban una eosinofilia intensa (> 3000 eosinofilos/µl). En relación al tiempo de estancia en España, el 80% (412) eran inmigrantes recién llegados a Gran Canaria mediante pateras o cayucos.

Tabla 4.7: Características de los inmigrantes con eosinofilia importada absoluta

Características	Inmigrantes n (%)
Sexo	
Varón	456 (88,6)
Mujer	59 (11,4)
Edad	
Media ± DT	26 ± 9,8
1-18	121 (23,5)
19-29	253 (49,1)
30-39	85 (16,5)
≥ 40	39 (7,5)
Origen	
África Subsahariana	427 (82,9)
África Norte	54 (10,5)

Latinoamérica	20 (3,9)
Sudeste Asiático	14 (2,7)
Tiempo de estancia en España	
< 6 meses	412 (80)
> 6 meses	103 (20)
Eosinofilia	
Leve (450-999/µl)	396 (76,9)
Moderada (1.000-2.999/µl)	113 (21,9)
Intensa (≥ 3.000/µl)	6 (1,2)

4.2.2. Análisis de los métodos diagnósticos

El estudio parasitario que se realizó en cada sujeto se determinó en función del área geográfica de cada individuo así como de la posibilidad de obtención de las muestras correspondientes. La **tabla 4.8** refleja el número de pruebas diagnósticas y los resultados obtenidos en relación con el tiempo de estancia.

Tabla 4.8. Métodos diagnósticos analizados según el tiempo de estancia en España

Positivos/Realizados n (%)			
	< 6 meses	**> 6 meses**	**Total**
Coproparasitario	113/358 (31,5)	40/84 (47,6)	**153/442 (34,6)**
Sedimento urinario	53/234(22,6)	10/45 (22,2)	**63/279 (22,5)**
Técnica de Knott	18/227 (7,9)	13/72 (18)	**31/299 (10,3)**
Pellizcos cutáneos	0/0 (0)	0/9 (0)	**0/9 (0)**
ICT *Wuchereria bancrofti*	3/74 (4)	0/28 (0)	**3/102 (2,9)**
EIA *Schistosoma spp.*	93/342 (27,1)	16/83 (19,2)	**109/425 (25,6)**
EIA Filarias *spp.*	76/335 (22,7)	23/78 (29,4)	**99/413 (23,9)**
EIA *Fasciola spp.*	9/305 (2,9)	1/69 (1,4)	**10/374 (2,6)**
EIA *Strongyloides spp.*	44/131 (33,5)	18/40 (45)	**62/171 (36,2)**
EIA *Toxocara canis*	10/94 (10,6)	7/27 (25,9)	**17/121 (14)**
ICT: inmunocromatografía; EIA: Enzimoinmunoanálisis			

Las pruebas con mayor tanto por ciento de positividad fueron la serología frente a antígenos de *Strongyloides spp.* (36,2%) y el estudio coproparasitario (34,6%), pero el orden de rentabilidad de ambas pruebas se invierte dependiendo del tiempo de estancia de los sujetos. Así era más rentable en los inmigrantes recién llegados el estudio de *Strongyloides spp.* (33,5%) y algo menor el coproparasitario (31,5%) frente a los inmigrantes de estancia superior a 6 meses que la prueba más rentable era el coproparasitario (47,6%) seguido de la serología de *Strongyloides spp.* (45%).

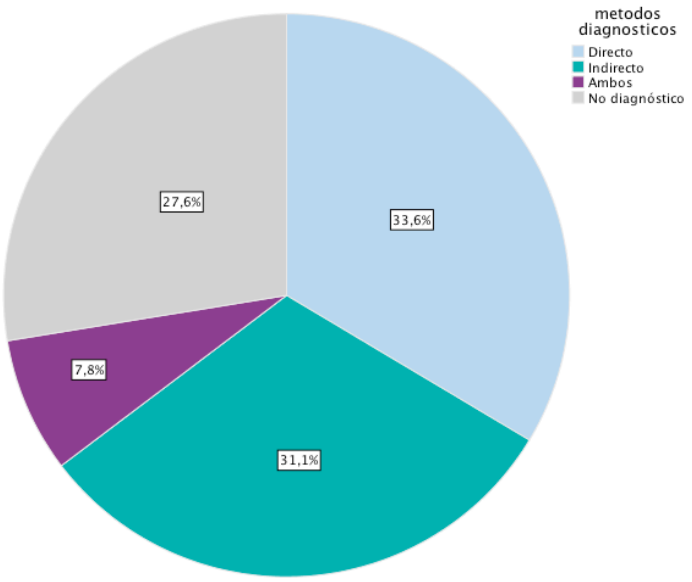
Hay que resaltar que la búsqueda de esquistosomas en el sedimento urinario y la serología frente a esquistosomas y frente a filarias tienen un porcentaje de positividad superior al 20%.

En los inmigrantes de mayor estancia la serología frente a *Toxocara canis* es del 25,9% aunque sólo se realizó en 27 pacientes. La detección de microfilarias por la técnica de Knott fue más rentable en los inmigrantes de mayor estancia (18%) con respecto a los recién llegados (7,9%). Se realizaron muy pocos pellizcos cutáneos (ninguno en el grupo de inmigrantes recién llegados), y todos fueron negativos. En el caso de detección de antígeno de *Wuchereria bancrofti* por inmunocromatografía no encontramos ningún caso positivo para los inmigrantes de mayor estancia, frente a 3 casos (4%) en el caso de los inmigrantes recién llegados.

4.2.3. Rendimiento diagnóstico de las técnicas empleadas

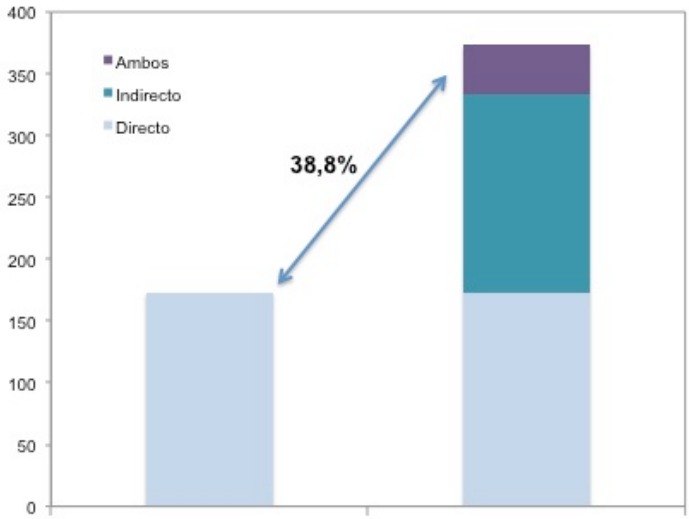
Por *métodos clásicos directos* se diagnosticó a 173 sujetos, por *serología* frente a diferentes parásitos a 160 sujetos y por *ambos* métodos a 40 individuos **(figura 4.8)**.

Figura 4.8: Diagnóstico de los sujetos con eosinofilia absoluta según el método empleado



La utilización conjunta de las técnicas diagnóstica directas e indirectas aumentó el rendimiento diagnóstico en los sujetos con eosinofilia absoluta en un 38,8% **(figura 4.9)**

Figura 4.9: Rendimiento diagnóstico al utilizar varias técnicas

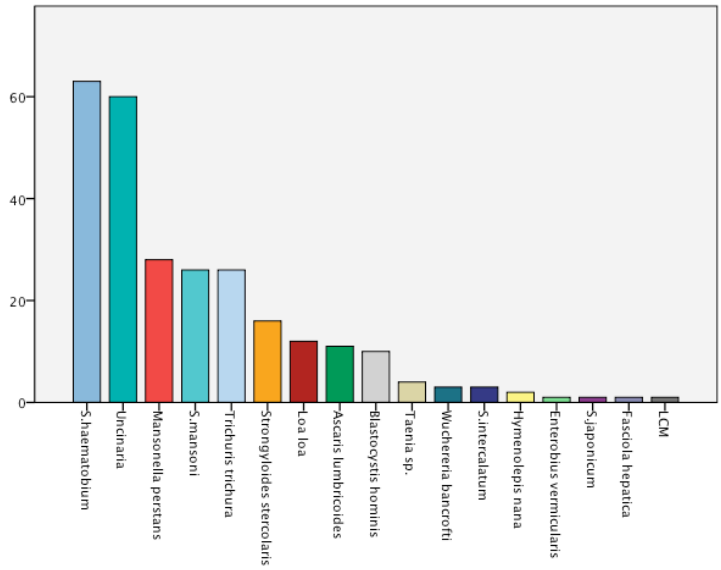


4.2.4. Diagnóstico etiológico de los sujetos con eosinofilia absoluta

Se pudo llegar al diagnóstico etiológico, aplicando la metodología anteriormente citada, en el **72,4%** (373) de los inmigrantes con eosinofilia absoluta, que oscila entre el 69,6% (287) en los inmigrantes recién llegados y el 83,4% (86) de los inmigrantes con estancia superior a 6 meses. De forma específica los sujetos de África Subsahariana el diagnóstico alcanza el 78,2% mientras que en los africanos del norte solamente se llega al diagnóstico en el 27,7%.

Específicamente los parásitos detectados por métodos directos indican en la **figura 4.10**, siendo el número de infecciones parasitarias por orden decreciente las siguientes: *Schistosoma haematobium* (63), Uncinarias (60), *Mansonella perstans* (28), *Schistosoma mansoni* (26), *Trichuris trichura* (26), *Strongyloides stercolaris (16), Loa loa* (12), *Ascaris lumbricoides* (11), *Blastocystis hominis* (10), *Taenia sp.* (4), *Wuchereria bancrofti* y *Schistosoma intercalatum* (3), *Hymenolepis nana* (2), y un solo caso de *Enterobius vermicularis, Schistosoma japonicum, Fasciola hepática* y Larva cutánea migrans. Hay que señalar que 14 inmigrantes estaban infectados por *Giardia lamblia* y 3 por *Entamoeba hystolitica,* y aunque son protozoos patógenos, no lo hemos tenido en cuenta por no ser un agente causal de eosinofilia.

Figura 4.10. Número de infecciones parasitarias diagnosticadas por métodos directos



En función del grado de eosinofilia, los hallazgos parasitológicos se muestran en la **tabla 4.9**. La gran mayoría de las especies parasitarias son más numerosas en el grupo de eosinofilia leve, excepto la filaria *Mansonella perstans* que aumenta en los pacientes con eosinofilia moderada.

Tabla 4.9: Parásitos según el grado de eosinofilia

	Grado de eosinofilia			
	Leve 450-999	**Moderada** 1000-2999	**Intensa** ≥ 3000	**Total**
Geohelmintos				
Ascaris lumbricoides	7	3	1	**11**
Uncinarias	41	19	0	**60**
Trichuris trichura	14	10	2	**26**
Strongyloides stercolaris	10	6	0	**16**
Enterobius vermicularis	1	0	0	**1**
Larva cutánea migrans	1	0	0	**1**
Esquistosomas/Tenias				
S.haematobium	38	23	2	**63**
S.mansoni	20	6	0	**26**
S.intercalatum	0	2	1	**3**
S.japonicum	1	0	0	**1**
Hymenolepis nana	1	1	0	**2**
Taenia sp.	3	1	0	**4**
Filarias				
Loa loa	7	5	0	**12**
Mansonella perstans	13	14	1	**28**
Wuchereria bancrofti	3	0	0	**3**
Protozoos				
Blastocystis hominis	8	2	0	**10**

En relación a las manifestaciones clínicas que presentaban los inmigrantes con diagnóstico parasitológico positivo, 243 sujetos (65,1%) no referian ningún síntoma; el resto presentaban manifestaciones inespecíficas como adenopatías periféricas en 22 (5,8%), lesiones cutáneas en 21 sujetos (5,6%), clínica digestiva, principalmente dolor abdominal, en 17 sujetos (4,5%), manifestaciones urinarias, principalmente hematuria, en 15 individuos (4%), y síntomas combinados en 39 sujetos (10,4%). El resto de manifestaciones como fiebre, manifestaciones oftamológicas (p.ej. paso de un gusano a través de la conjuntiva), cefalea o astenia aparecían en un escaso número.

Si comparamos los inmigrantes recién llegados con los de estancia superior a 6 meses, observamos en la **tabla 4.10** que mientras el 74,5% eran asintomáticos en el primer caso, solo el 33,7% lo eran en el segundo. Por lo tanto en el grupo de estancia superior a 6 meses con diagnóstico parasitológico aparecían una sintomatología más marcada que en el grupo de recién llegados (lesiones cutáneas 18,6% *vs* 1,7%; combinados 25,5% *vs* 5,9%, urinario 4,6% *vs* 3,8%).

Tabla 4.10: Manifestaciones clínicas según el tiempo de estancia

Manifestaciones	< 6 meses n= 287	> 6 meses n= 86
Asintomático	214 (74,5%)	29 (33,7%)
Adenopatias periféricas	21 (7,3%)	1 (1,1%)
Combinados	17 (5,9%)	22 (25,5%)
Digestivas	14 (4,8%)	3 (3,5%)
Lesiones cutáneas	5 (1,7%)	16 (18,6%)
Urinarias	11 (3,8%)	4 (4,6%)
Otras	5 (1,7%)	11 (12,8%)

4.2.5. Hallazgos parasitarios en función del tiempo de estancia de los sujetos

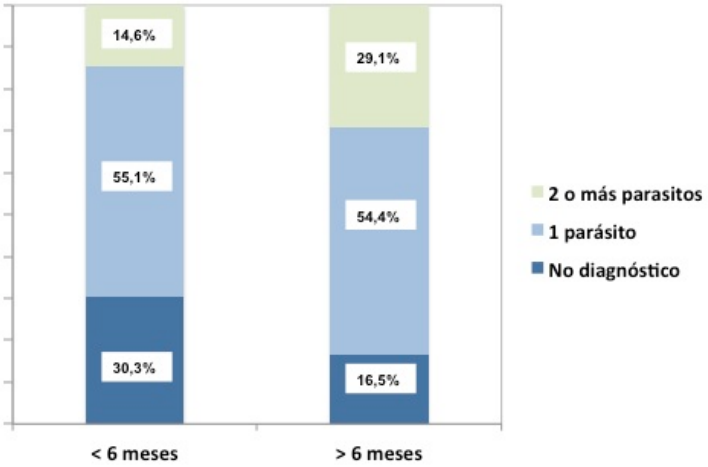
El número de infecciones parasitarias detectadas atendiendo al tiempo de estancia de los inmigrantes se detalla en la **tabla 4.11**.

Tabla 4.11: Número de infecciones parasitarias según el tiempo de estancia

Nº de infecciones parasitarias y tiempo de estancia n (%)			
	< 6 meses	> 6 meses	Total
0 parásitos	125 (30,3)	17 (16,5)	**142**
1 parásitos	227 (55,1)	56 (54,4)	**283**
2 parásitos	49 (11,9)	20 (19,4)	**69**
3 parásitos	10 (2,5)	6 (5,9)	**16**
4 parásitos	0 (0)	3 (2,9)	**3**
5 parásitos	1 (0,2)	1 (0,9)	**2**
Total	**412**	**103**	**515**

La coinfección por dos o más parásitos la encontramos en el 17,5% (90 inmigrantes), de los cuales 60 inmigrantes son recién llegados y 30 inmigrantes tienen una estancia superior a 6 meses. En la **figura 4.11** observamos como el hallazgo de dos o más parásitos es superior en los inmigrantes de mayor estancia (14,6% vs 29,1%).

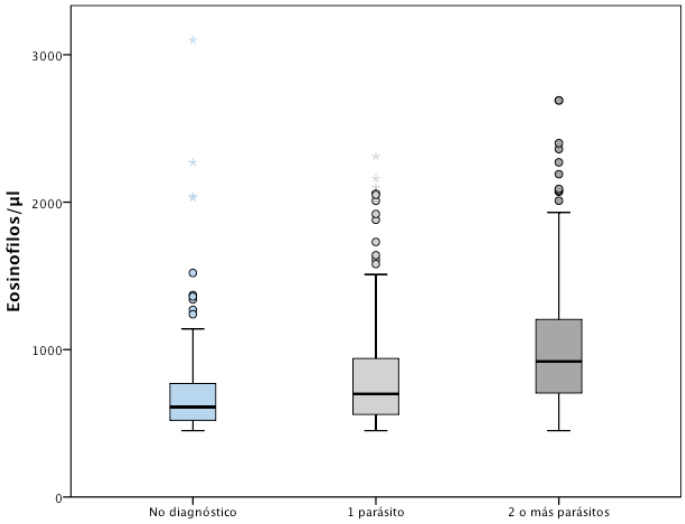
Figura 4.11: Número de hallazgos parasitarios según el tiempo de estancia



Las coinfección más frecuente fué la combinación de de filarias y esquistosomas en 31 casos seguido de filarias con geohelmintos en 28 casos.

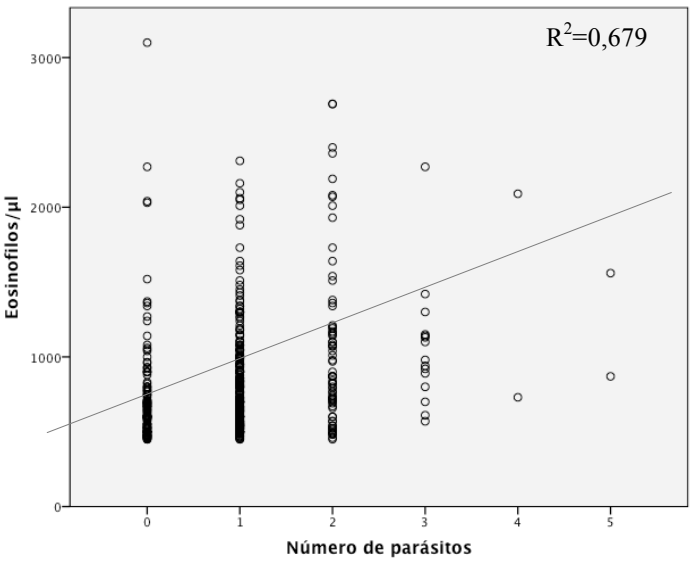
La detección de dos o más parásitos presentó un valor medio de eosinofilos superior con respecto a los infectados por un parásito o por ninguno (1198,3/µl ± 866,7 frente a 821,4/µl ± 410 y 739,9/µl ± 422,6) y se indica en la **figura 4.12**.

Figura 4.12: Valores de eosinofilia según el número de infecciones parasitarias de cada sujeto



Observamos que existía una correlación lineal entre el número de parásitos diagnósticados por sujeto y los valores de eosinofilia ($p<0,05$) **(figura 4.13)**.

Figura 4.13: Relación entre el número de parásitos y eosinofilia



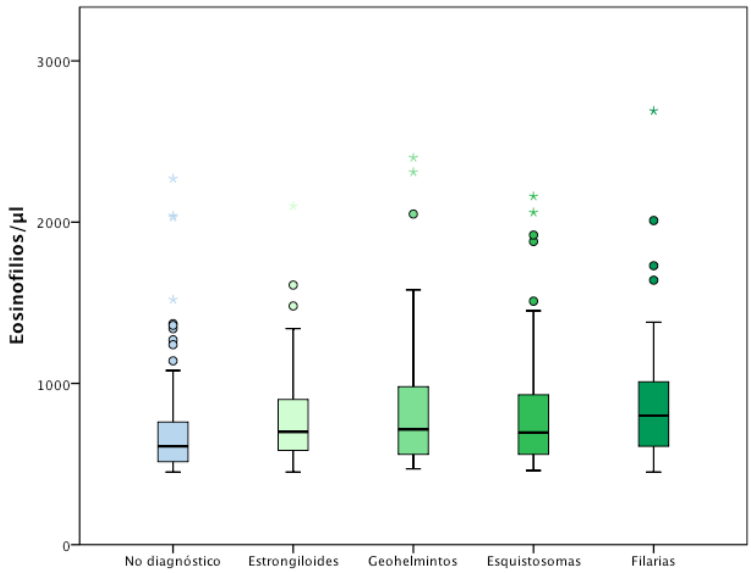
4.2.6. Valores medios de eosinofilia dependiendo del grupo de parásitos

Para observar si había diferencia los valores medios de eosinofilos atendiendo a los diferentes grupos de parásitos causantes de eosinofilia seleccionamos los inmigrantes que estuvieran infectados por un único tipo de parásito (n= 283). El valor medio de eosinófilos

en estos grupos se refleja en la **tabla 4.12** y **figura 4.14**, donde se observaron valores altos en los sujetos en los que llego aun diagnóstico etiológico.

Tabla 4.12 y Figura 4.14: Eosinofilia según el grupo de parásitos

Tipo de parasitos	Eosinofilos/µl N	Media ± DT
No diagnóstico	142	**739,9 ± 422,7**
Estrongiloides	63	**797,3 ± 318,2**
Geohelmintos	50	**856,4 ± 422,5**
Esquistosomas	99	**868,2 ± 530,8**
Filarias	57	**901,2 ± 407,9**



Si comparamos la media de eosinofillos en función del método diagnóstico (directo *vs* indirecto) observamos que era mayor en los tres grupos etiológicos principales cuando el diagnóstico se realizó por métodos directos **(tabla 4.13).**

Tabla 4.13: Eosinofilia dependiendo del método de diagnóstico

Eosinofilia (media ± DT)		
	Método diagnóstico	
	Directo	Indirecto
Geohelmintos	874,1 ± 434,6	764 ± 260,1
Esquistosomas	920,8 ± 611,8	767,6 ± 307,7
Filarias	960 ± 533,5	882 ± 363,6

4.3. Objetivo 3. Causas de eosinofilia relativa en inmigrantes

Para determinar cual son las posibles causas de eosinofilia relativa importada se utilizó la misma metodología empleada para el objetivo 2 y especificada en el apartado Materiales y Métodos (página 107-111).

4.3.1. Características generales de los sujetos del estudio

El *grupo de estudio* estaba formado tanto por inmigrantes recién llegados como por pacientes inmigrantes, cuya estancia en nuestro país era superior a 6 meses, valorados en la consulta de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical del Hospital Insular, desde el año 2.000 al año 2.014 que tenían como criterio una eosinofilia relativa importada (< 450 eosinofilos/µl y > 5%).

Estudiamos las causas de eosinofilia relativa importada en **236 inmigrantes**, la mayoría eran varones (89,8%), con edad media de 25 años (13-60 años). Casi todos (98%) procedían del continente africano (197 inmigrantes de África subsahariana y 34 de África del Norte), 3 sujetos eran de Latinoamérica (2 de Colombia y 1 de Honduras) y 2 de Asia (Indonesia, Sri Lanka). Principalmente eran inmigrantes en situación irregular (92,4%) recién llegados a España (< 6 meses) mediante pateras o cayucos. La procedencia era rural en el 29,7% y urbana en el 26,7%. Estas características se describen en la **tabla 4.14.**

Tabla 4.14. Características de los inmigrantes con eosinofilia relativa importada

Características	Inmigrantes n (%)
Sexo	
Varón	212 (89,8)
Mujer	24 (10,2)
Edad	
Media ± DT	25,3 ± 7,7
1-18	43 (18,2)
19-29	131 (55,5)
30-39	34 (14,4)
≥ 40	14 (6)
Origen	
África subsahariana	197 (83,5)
África Norte	34 (14,5)
Latinoamérica	3 (1,2)
Sudeste Asiático	2 (0,8)

Tiempo de estancia en España	
< 6 meses	218 (92,4)
> 6 meses	18 (7,6)
Ámbito	
Urbano	63 (26,7)
Rural	70 (29,7)
NS/NC	103
NS/NC: no sabe-no contesta	

4.3.2. Análisis de los métodos diagnósticos

Como en el objetivo 2, el estudio parasitario que se realizó a cada sujeto se determinó en función del área geográfica de cada individuo así como de la posibilidad de obtención de las muestras correspondientes. La **tabla 4.15** refleja el número de por pruebas diagnósticas realizadas y los resultados obtenidos relacionándolos en función del tiempo de estancia.

Tabla 4.15: Métodos diagnósticos analizados según el tiempo de estancia en España

Positivos/Realizados n (%)			
	< 6 meses	**> 6 meses**	**Total**
Coproparasitario	39/189 (20,6)	2/14 (14,3)	**41/203 (20,2)**
Sedimento urinario	7/105 (6,6)	2/11 (18,1)	**9/116 (7,7)**
Técnica de Knott	1/76 (1,3)	0/11 (0)	**1/87 (1,1)**
EIA *Schistosoma spp.*	19/127 (15)	4/14 (28,5)	**23/141 (16,3)**
EIA Filarias	6/126 (4,8)	0/13 (0)	**6/139 (4,3)**
EIA *Fasciola hepatica*	1/125 (0,8)	0/13 (0)	**1/138 (0,7)**
EIA *Strongyloides spp.*	26/79 (33)	1/11 (9)	**27/90 (30)**
EIA *Toxocara canis*	15/50 (30)	3/9 (33,3)	**18/59 (30,5)**

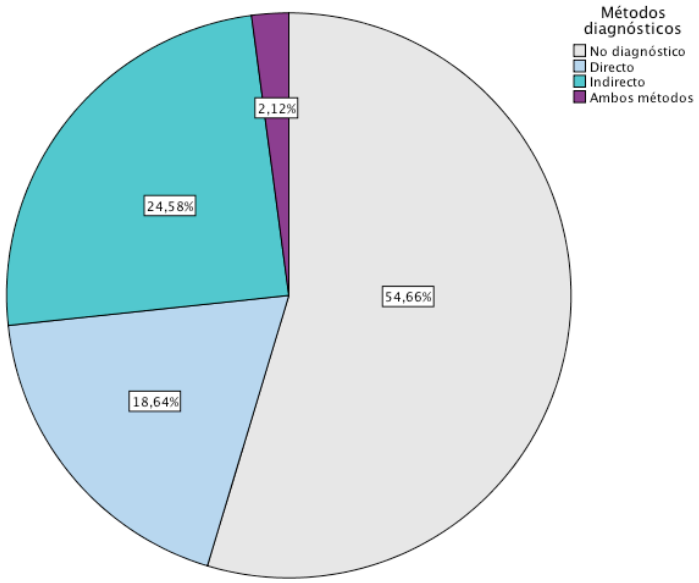
En los inmigrantes recién llegados el estudio serológico frente a *Strongyloides sp.* y a *Toxocara canis* presentó una positividad superior al 30% seguido del diagnóstico coproparasitario con un 20,6%. En los inmigrantes de estancia prolongada, aunque son un pequeño número (n=18), la serología de *Toxocara canis.* también es la presentó mayor rendimiento (33,3%) seguido de la serología frente a *Schistosoma sp.* (28,5%), el análisis del sedimento de orina (18,1%) y el estudio coproparasitario (14,3%). En cambio, en el grupo de pacientes con eosinofilia relativa la serología frente a *Strongyloides sp.* fué positiva sólo en un 9%. La técnica de Knott, el estudio serológico frente a Filarias *sp.* y *Fasciola sp.* fueron negativos en todos los casos. La detección antigénica frente a *Wuchereria bancrofti* y la búsqueda de filarias en piel mediante pellizcos cutáneos no se realizó en ningún caso.

4.3.3. Rendimiento diagnóstico de las técnicas empleadas

Aplicando la metodología previamente mencionadas, en los individuos con eosinofilia relativa se llegó al diagnóstico en el **45,3%** (107), oscilando entre el 44,5% (97) en los inmigrantes recién llegados y el 55,5% (10) en los de estancia superior a 6 meses en nuestro país.

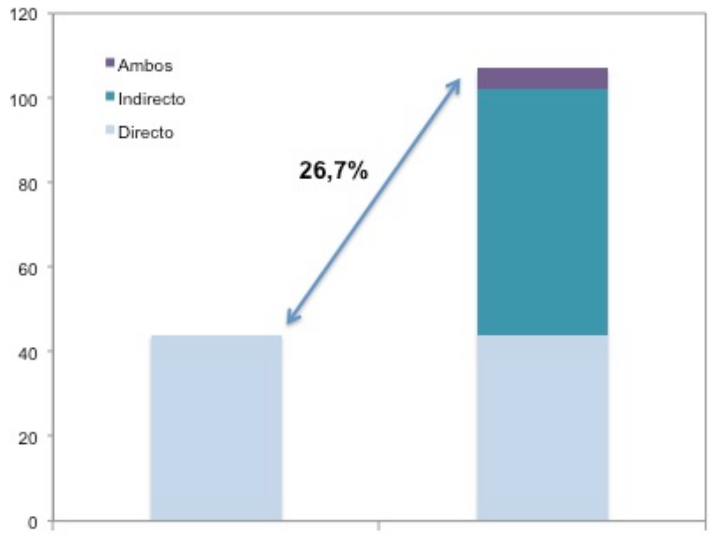
Cuando utilizamos para el diagnóstico únicamente la *técnicas parasitológicas clásica* se diagnosticaron 44 sujetos; si aplicamos solamente *métodos indirectos* se llegó al diagnóstico en 58 sujetos y por *ambos métodos* en 5 individuos **(figura 4.15).**

Figura 4.15: Diagnóstico de eosinofilia parcial por diferentes métodos



La utilización conjunta de las técnicas directas e indirectas aumenta el rendimiento diagnóstico en los sujetos con eosinofilia parcial en un 26,7% **(figura 4.16).**

Figura 4.16: Rentabilidad de las técnicas diagnósticas



4.3.4. Diagnóstico etiológico de los sujetos con eosinofilia relativa

De forma genérica, las principales causas fueron la infección por esquistosomas (31 casos que corresponde al 28,9% de las causas de eosinofilia relativa), la infección por geohelmintos (29 casos [27,1%]) seguido de la infección por *Strongyloides sp.* (27 casos [25,2%]). Hay que destacar que se diagnóstico la infección por *Toxocara canis*. en 18 casos (16,8%). El diagnóstico de infección por filarias fue baja (6,5%), incluyendo 7 casos y sólo en uno se encontraron microfilarias en sangre . Las principales características de estos tres grupos se detallan en la **(tabla 4.16)**.

Tabla 4.16. Principales características de los inmigrantes con eosinofilia parcial con diagnostico parasitológico

Características	Esquistosomas n (%)	Geohelmintos n (%)	Estrongiloides n (%)
Sexo			
Varón	29 (93,5)	24 (82,7)	24 (88,9)
Mujer	2 (6,5)	5 (17,3)	3 (11,1)
Edad			
Media ± DT	24,8 ± 7,7	21,7 ± 4,7	28,5 ± 8,1
Orígen			
África Subsahariana	31 (100)	28 (96,5)	17 (63)
África Norte	0	1 (3,5)	8 (29,6)
Sudeste Asiático	0	0	1 (3,7)
Latinoamérica	0	0	1 (3,7)

Tiempo de estancia en España			
< 6 meses	27 (87)	28 (96,5)	26 (96,3)
> 6 meses	4 (13)	1 (3,5)	1 (3,7)
Eosinofilia absoluta (media ± DT)	355,9 ± 64,7	344,8/µl ±59,2	301,5 ± 88
Eosinofilia parcial (media ± DT)	6,6 ± 1	6,4 ± 1,2	6,1 ± 1,1
Diagnóstico métodos directos	18[a] (58)	29[b] (100)	1[c] (3,7)
Diagnóstico métodos serológicos	13 (42)	0	26 (96,3)
Manifestaciones			
Asintomático	9 (41)	20 (87)	23 (88,5)
Digestiva	1 (4,5)	1 (4,3)	1 (3,8)
Lesiones cutáneas	2 (9)	0	2 (7,7)
Urinaria	9 (41)	2 (8,7)	0
Otras	1 (4,5)	0	0
Coparasitaciones	9 (29)	6 (20,7)	1 (3,7)

[a)] 9 *S.haematobium,* 10 *S.mansoni;* [b)] 6 *A.lumbricoides,* 6 *T.trichura,* 19 Uncinarias, 2 *E.vermicularis;* [c)] 1 *S.stercolaris,*

Es importante destacar que todos los inmigrantes infectados tanto por esquistosomosis y por geohelmintos procedían de África, específicamente del área subsahariana. Los inmigrantes infectados por estrongiloides procedían, además de África de otras áreas (uno del Sudeste Asiático y otro de Latinoamérica).

El diagnóstico se realizó principalmente en inmigrantes recién llegados, con excepción de la infección por esquistosomas que se diagnosticó hasta en un 13% en los de estancia prolongada.

En relación al método por el que se realizó el diagnóstico, en los infectados por geohelmintos el diagnóstico fue por técnicas directas en todos los casos, en los infectados por estrongiloides, excepto un caso, el diagnóstico fue por serología y en el caso de los esquistosomas se realizó por ambas técnicas.

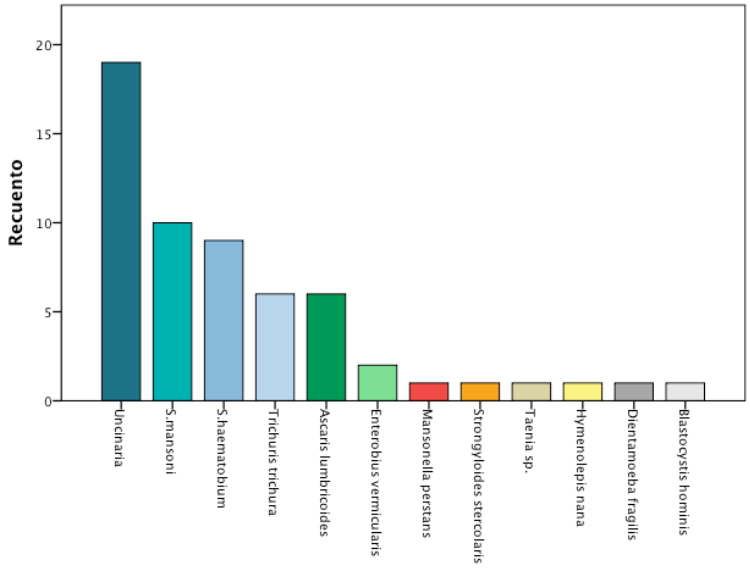
Tanto la media de eosinofilia absoluta como la media de eosinofilia relativa en estos tres grupos de parasitosis (sólo valoramos las infecciones por un único parásito) eran similares. Principalmente se encuentraban asintomáticos en el momento del diagnóstico, aunque destaca un elevado tanto por ciento (41%) de manifestaciones urinarias (hematuria) en los sujetos infectados por esquistosomas.

4.3.5. Número de infecciones parasitarias diagnosticadas por métodos directos

La especie y el número de parásitos diagnosticados por métodos directos, en orden descendiente fueron: Uncinarias (19), *Schistosoma mansoni* (10), *Schistosoma*

haematobium (9), *Trichuris trichura* (6), *Ascaris lumbricoides* (6), *Enterobius vermicularis* (2) y con un solo caso *Mansonella perstans, Strongyloides stercolaris, Taenia sp., Hymenolepis nana, Dientamoeba fragilis y Blastocystis hominis* **(figura 4.17).**

Figura 4.17: Especie y número de parásitos diagnosticados por métodos directos



4.3.6. Número de infecciones parasitarias

En cuanto al número de parásitos que albergaba cada sujeto, 94 sujetos (39,8%) estaban infectados por un único parásito, 12 estaban coparasitados por dos parásitos (5%) (en este caso todos eran inmigrantes recién llegados) y un único caso (0,5%) coinfectado por tres parásitos, que se trataba de un inmigrante de larga estancia infectado por *Schistosoma mansoni, Schistosoma haematobium* y Uncinaria. La coinfección más frecuente fue esquistosoma con geohelminto en 5 casos y esquistosoma con filaria en 4 casos.

En la siguiente tabla se muestra de forma desglosada en función del tiempo de estancia de los inmigrantes, el número de infecciones parasitarias diagnosticadas.

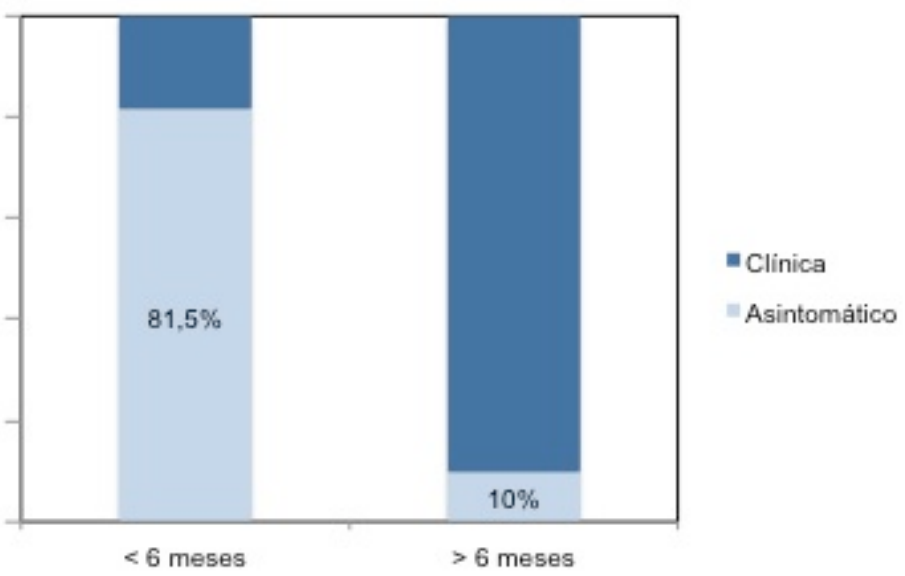
Comparando las infecciones parasitarias atendiendo el tiempo de estancia principalmente las encontramos en los inmigrantes recién llegados frente a los de estancia superior a 6 meses (90% vs 10%). En la siguiente tabla se muestran los datos de forma desglosada (**tabla 4.17).**

Tabla 4.17. Parásitos detectados según el tiempo de estancia de los sujetos en nuestro país

Parásitos detectados según el tiempo de estancia en nuestro país			
	< 6 meses	**> 6 meses**	**Total**
Geohelmintos			
Uncinaria	18	1	**19**
Trichuris trichura	6	0	**6**
Ascaris lumbricoides	5	0	**5**
Enterobius vermicularis	2	0	**2**
Total	31	1	**32**
Esquistosomas			
Schistosoma mansoni	9	1	**10**
Schistosoma haematobium	7	2	**9**
Schistosoma spp.	11	2	**13**
Total	27	5	**32**
Estrongiloides			
Strongyloides stercolaris	1	0	**1**
Strongyloides spp.	25	1	**26**
Total	26	1	**27**
Filarias			
Mansonella perstans	1	0	**1**
Filaria spp.	6	0	**6**
Total	**7**	**0**	**7**
Toxocara canis	15	3	**18**

El 69,1% de los inmigrantes con eosinofilia relativa e infección parasitaria están asintomáticos. En los individuos con sintomatología las manifestaciones eran leves, como hematuria, en el 16,8%, molestias digestivas en el 6,5% (dolor abdominal, diarrea ocasional, etc), lesiones cutáneas en el 3,7% (prurito, infección de piel y tejidos blandos....). Si comparamos la sintomatología entre los inmigrantes recién llegados y los inmigrantes de mayor estancia, el 81,5% son asintomáticos en el primer caso frente solo al 10% en el segundo caso **(figura 4.18).**

Figura 4.18: Manifestaciones clínicas según el tiempo de estancia de los inmigrantes



4.3.7. Causas de eosinofilia relativa comparando los dos principales orígenes de los inmigrantes

Si comparamos los resultados teniendo en cuenta los principales orígenes de los inmigrantes (África subsahariana [197] frente a África del Norte [35]) se llegó al diagnostico parasitario en el 45,6% de los subsaharianos y en el 41,2% en los del norte de áfrica, encontrando diferencias en los parásitos según la procedencia. Así, la estrongiloidosis y las toxocariosis eran más frecuentes no existiendo en estas áreas filariosis ni esquistosomiosis. En los Subsaharianos se invierte la relación (**tabla 4.18).**

Tabla 4.18. Parásitos detectados en las principales áreas de origen

Parásitos detectados según el área de origen n (%)		
	África Subsahariana n=197	**África Norte** n= 34
Esquistosomas	22 (11,1%)	0
Geohelmintos	22 (9,6%)	1 (2,9%)
Estrongiloides	16 (8,1%)	8 (23,5%)
Toxocara	14 (7,1%)	4 (11,7%)
Filarias	3 (1,5%)	0
Fasciolas	0	1 (2,9%)
Coinfección	10 (6,5%)	0

En los inmigrantes que procedían de África del norte el diagnóstico se realizó mediante métodos serológicos excepto en un caso que el diagnóstico fue directo (un individuo infectado por *Trichuris trichura*).

4.4. Objetivo 4. Citocinas eosinofilicas y helmintosis

4.4.1. Características generales de los sujetos del estudio

Se incluyeron en el estudio, previo consentimiento informado, 121 inmigrantes irregulares con los criterios que se especifican en la página 11 en el apartado materiales y métodos. Los criterios de exclusión fueron: *i)* no ser recién llegado a España, *ii)* no proceder de África subsahariana, *iii)* no querer formar parte del estudio.

Los sujetos se clasificaron en dos grupos; el **grupo de estudio** formado por 76 inmigrantes y el **grupo control** con 45 inmigrantes. Las características generales de estos sujetos se recogen en la **tabla 4.19.** Todos los sujetos procedían de África subsahariana y de forma detallada en la **figura 4.19** se indican los países.

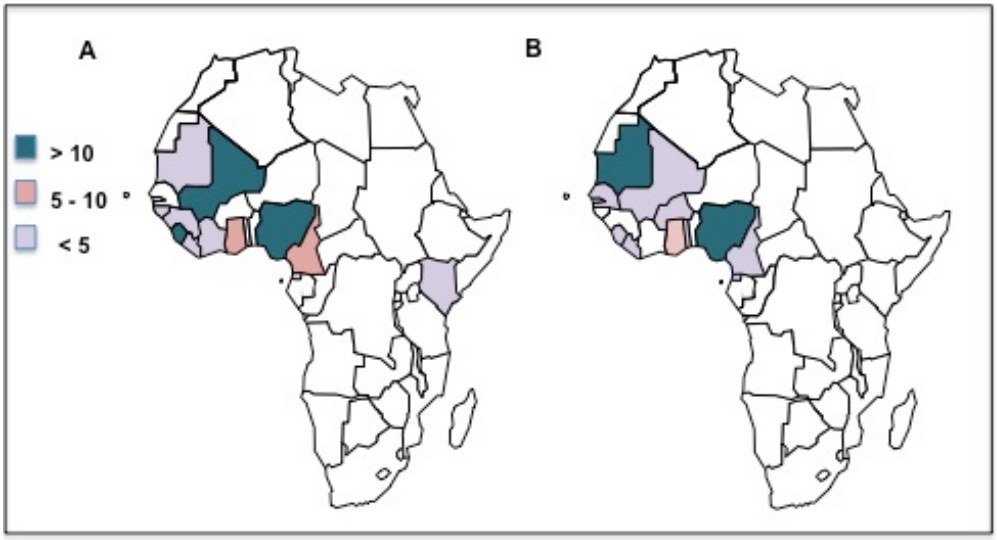
De forma específica los sujetos del grupo de estudio estaban infectados por un único parásito: 42 geohelmintos (21 Uncinarias,15 *Trichuris trichura*, 6 *Ascaris lumbricoides*), 23 esquistosomas (10 *S. mansoni*, 10 S.*haematobium,* 2 *S.mansoni/S.haematobium,* 1 *S. intercalatum*) y 11 filarias (8 *Mansonella perstans*, y 3 *Loa loa).*

Tabla 4.19. Características generales de los inmigrantes que forman parte del estudio de citocinas

Características	Grupo estudio n (%)	Grupo control n (%)
Sexo		
Varón/Mujer	66/10	37/8
Edad		
Media ± DT	25,9 ± 7,2	27,5 ± 5,6
Orígen*		
África Subsahariana	76 (100)	45 (100)
Eosinofilia absoluta (media ± DT)	704,8 ± 583,7	156,8 ± 79,5
Infección por parásitos		
Esquistosomas	23 (30,2)	Ninguno
Filarias	11 (14,5)	
Geohelmintos	42 (55,3)	
Manifestaciones		
Asintomático	59 (77,7)	45 (100)
Digestiva	1 (1,3)	0
Lesiones cutáneas	5 (6,5)	0
Urinaria	7 (9,2)	0
Otras	4 (5,3)	0

**Se especifican los países en la figura 4.19*

Figura 4.19. Países de origen de los inmigrantes A) grupo estudio, B) grupo control



4.4.2. Determinación de citocinas (Eotaxina, IL-13, IL-16 y RANTES) en la población de estudio

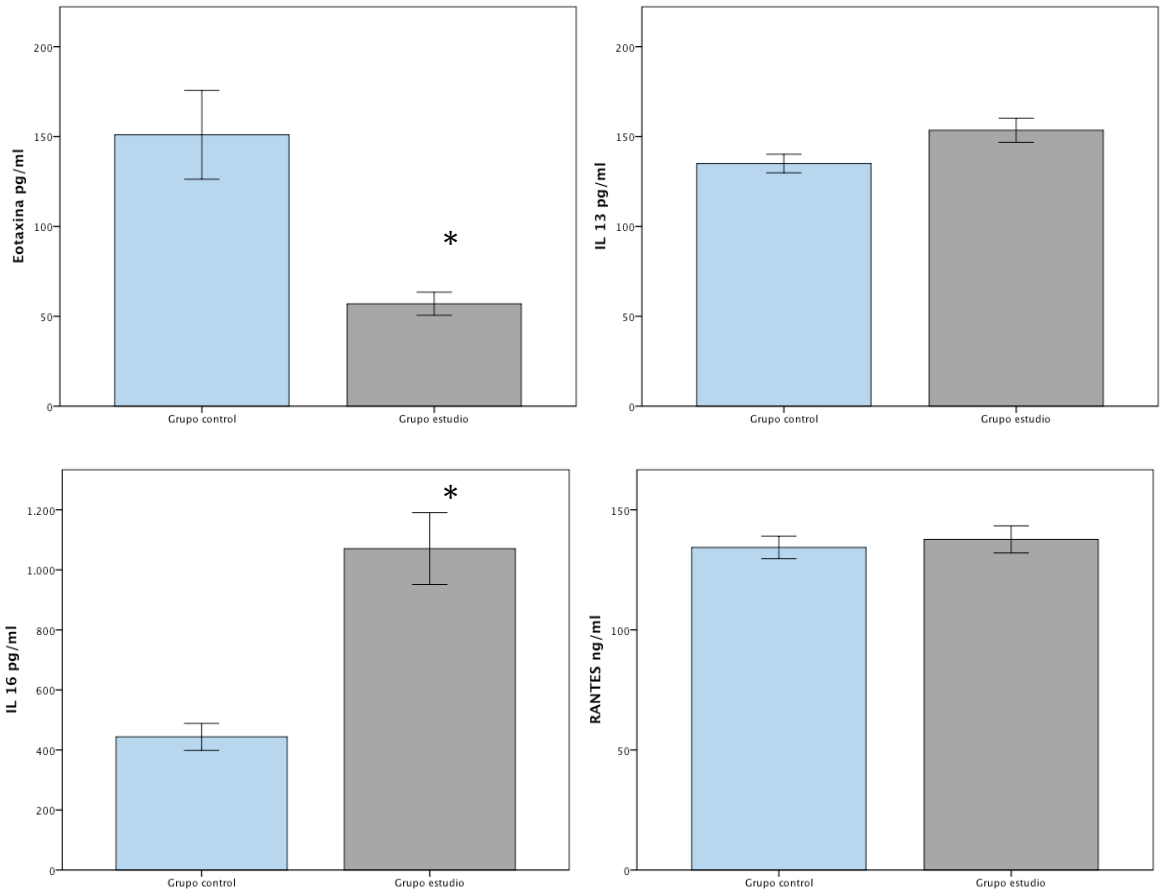
Se determinaron en todos los sujetos las concentraciones séricas de cuatro citocinas relacionadas con la eosinofilopoyesis y activación de los eosinofilos: Eotaxina, IL-13, IL-16 y RANTES, siguiendo el protocolo previamente especificado en la página 111.

Los valores medios para cada citocina comparando los sujetos controles con los sujetos con infección helmíntica (grupo estudio) se muestran en la **tabla 4.20** y se representan en la **figura 4.20**, encontrando diferencias significativas en IL-16 (p=0,000) y Eotaxina (p=0,001).

Tabla 4.20, Figura 4.20: Valores medios de diferentes citocinas entre grupo control y grupo estudio

Estadísticos de grupo

		N	Media	Desviación típ.	p-valor
Eotaxina pg/ml	**Grupo control**	45	151	165,7	**0,001**
	Grupo estudio	76	57	56,1	
IL 13 pg/ml	**Grupo control**	42	135	33,5	0,062
	Grupo estudio	76	153,5	58,7	
IL-16 ng/ml	**Grupo control**	42	443,7	290,9	**0,000**
	Grupo estudio	76	1070,8	1043,4	
RANTES ng/ml	**Grupo control**	45	134,3	31,4	0,650
	Grupo estudio	76	137,7	49,3	



4.4.3. Determinación de citocinas (Eotaxina, IL-13, IL-16 y RANTES) según el tipo de parásito

La media de los valores para cada citocina en función de la infección parasitaria de cada individuo se muestra en la **tabla 4.21**.

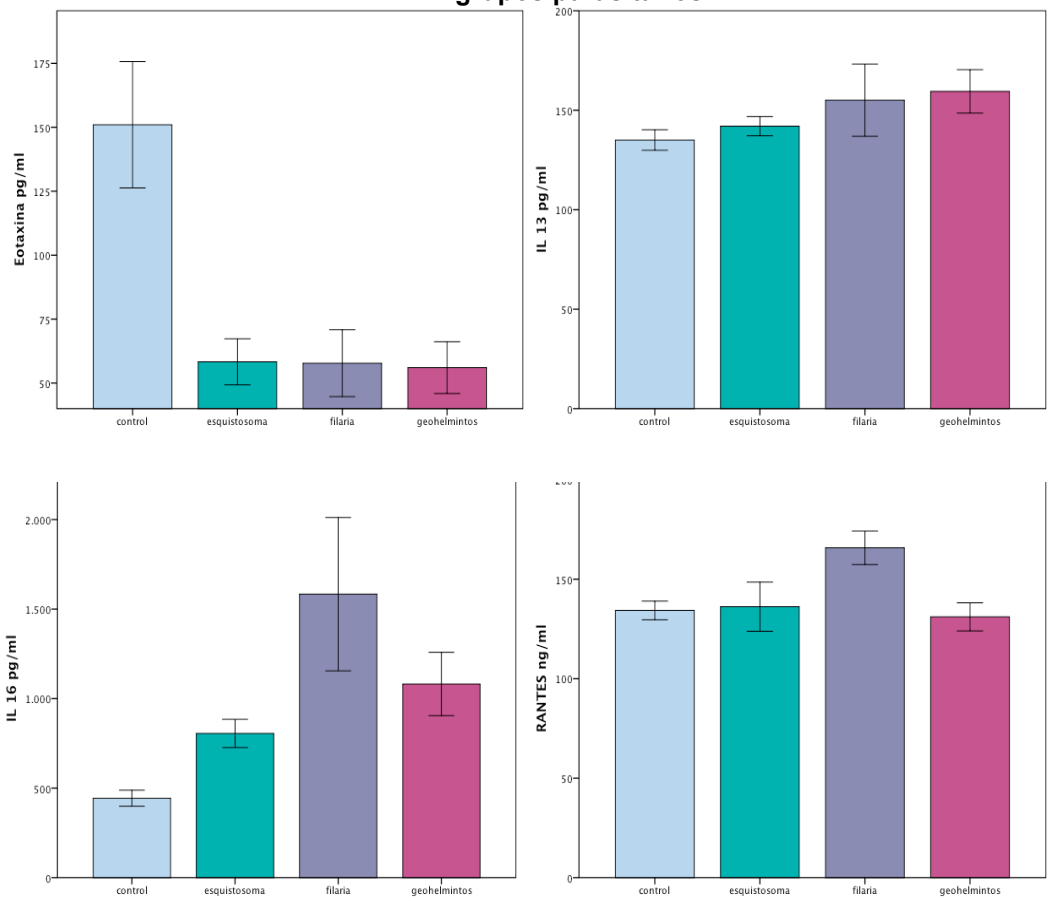
Tabla 4.21. Valores medios de las diferentes citocinas según el grupo de parasitos

	Grupo Control n= 45	Esquistosomas n= 23	Filarias n= 11	Geohelmintos n=42
Sexo Varón/Mujer	37/8	22/1	8 /3	36 /6
Edad (media ± DT)	27,5 ± 5,6	24,9 ± 5,2	28,2 ± 12	25,8 ± 6,6
Eosinofilia absoluta (media ± DT)	156,8 ± 79,5	689,6 ± 497	1341,8 ± 744	546,4 ± 469
Citocinas (media ± DT)				
Eotaxina	150,9 ± 165,7	58,3 ± 43,2	57,7 ± 43,2	56 ± 65,5

IL-13	135 ± 33,5	142 ± 23,1	155 ± 60,1	159,4 ± 70,7
IL-16	443,6 ± 290,9	805,7 ± 3795	1583,2 ± 1419	1081 ± 1145
RANTES	134,3 ± 31,3	136,2 ± 59,2	165,7 ± 27,9	131 ± 45,8

El análisis comparativo entre el grupo control y los tres grupos de parásitos aportó los siguientes resultados en la determinación de **Eotaxina** y **IL-16** se observan diferencias significativas entre el grupo control y el resto de los grupos de parásitos ($p< 0,05$). En **IL-13** hay diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de geohelmintos ($p= 0,005$). Finalmente en **RANTES** no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos ($p= 0,122$).

Figura 4.21: Valores medios de diferentes citocinas entre grupo control y los diferentes grupos parasitarios



4.4.4. Determinación de citocinas (Eotaxina, IL-13, IL-16 y RANTES) según la especie parasitaria

Comparamos las concentraciones de cada citocina con cada especie parasitaria de forma aislada y los resultados obtenidos se indican en la **tabla 4.22**, **tabla 4.23** y **figura 4.22**.

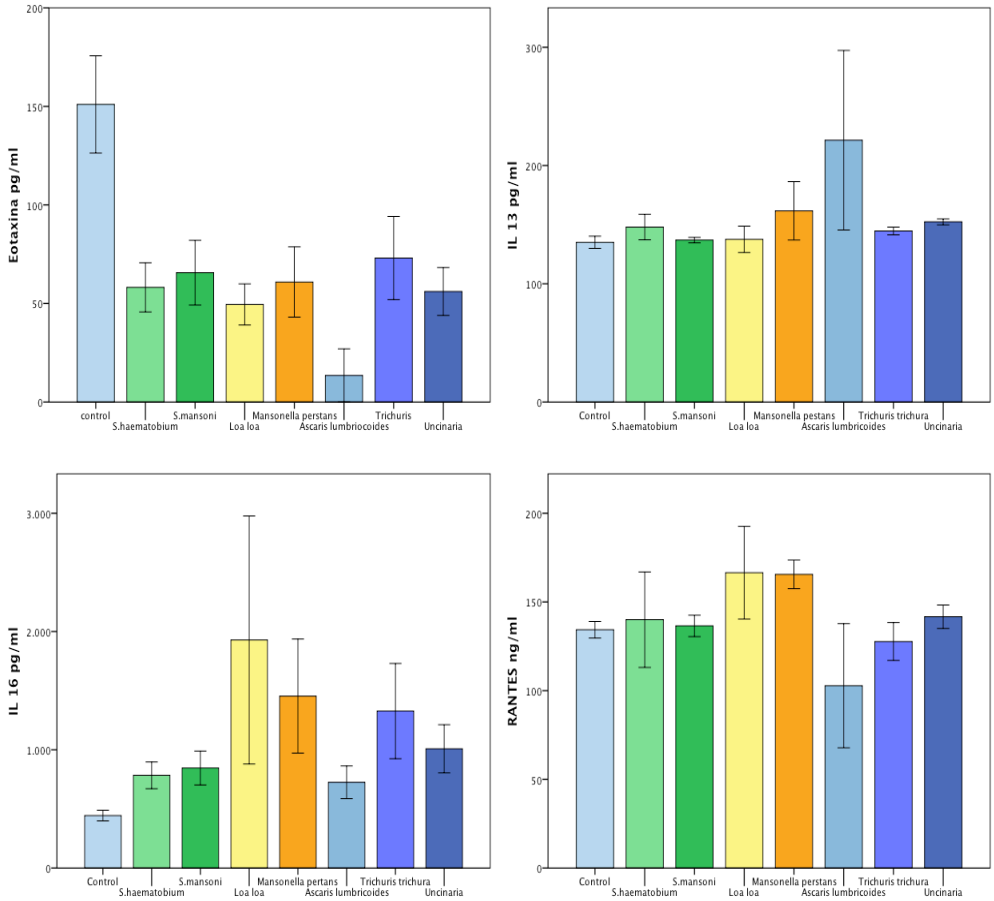
Tabla 4.22. Valores medios de cada citocina (IL-16, IL-13, RANTES, Eotaxina) respecto a las diferentes parasitosis

Estadísticos				
Parásitos (Media ± DT)	IL 16 pg/ml	IL 13 pg/ml	RANTES ng/ml	Eotaxina pg/ml
Control N= 45	443,7± 290,9	135,0 ± 33,5	134,3 ± 31,4	151,0 ± 165,7
S.haematobium N= 10	783,9 ± 357,4	147,9 ± 34,1	140,0 ± 85,2	58,2 ± 39,4
S.mansoni N= 10	845,6 ± 452,4	136,9 ± 7,2	136,5 ± 19,1	65,6 ± 51,9
Loa loa N= 3	1928,4 1817	137,6 ± 19,3	166,5 ± 45,2	49,5 ±18,1
Mansonella perstans N= 8	1453,8 ± 1365,5	161,6 ± 69,9	165,5 ± 22,9	60,9 ± 50,4
Ascaris lumbricoides N= 6	725 ± 338,6	221,4 ± 186	102,7 ± 85,7	13,5 ± 33
Trichuris trichura N= 15	1327,1± 1559,4	144,6 ± 12,7	127,7 ± 41,3	73 ± 81,7
Uncinaria N=21	1008,3 ± 933,8	152,4 ± 11,7	141,6 ± 30,3	56,1±55,7

Tabla 4.23. Significación estadística de cada citocina frente a los diferentes parásitos

	N	Eotaxina	IL-13	IL-16	RANTES
Control *vs*		Sig.	Sig.	Sig.	Sig.
S.haematobium	10	0,269	1,000	0,020	NS
S.mansoni	10	0,813	1,000	0,018	NS
Mansonella pestans	8	0,155	1,000	0,000	NS
Loa loa	3	1,000	1,000	0,035	NS
Ascaris lumbricoides	6	0,001	1,000	0,759	NS
Trichuris trichura	15	0,208	1,000	0,000	NS
Uncinaria	21	0,002	0,017	0,000	NS
NS: no significación					

Figura 4.22: Valores medios de cada citocina (Eotaxina, IL-13, IL-16, RANTES) frente a los diferentes parásitos



Las concentraciones de Eotaxina fueron bajas de forma significativa tanto en los infectados por *Ascaris lumbricoides* como por Uncinarias. En Il-13 exclusivamente existieron diferencias significativas en sujetos infectados por Uncinarias. Para IL-16 en todas las especies parasitarias la concentración fue elevada de forma significativa excepto para los sujetos infectados por *Ascaris lumbricoides.* En RANTES no existían diferencias en ninguna de las especies parasitarias.

4.4.5. Relación de la concentración de cada citocina (Eotaxina, IL-13, IL-16 y RANTES) y el número de eosinofilos en el grupo de estudio

Se estudió sólo en los pacientes con eosinofilia y helmintosis (grupo estudio) la concentración de cada citocina con relación a los valores de eosinofilos mediante el

coeficiente de correlación lineal de *Pearson* y se observó que había una correlación entre ambas variables en el caso de la citocina, IL-16 (*r= 0,320,* p=0,005) y en RANTES (*r= 0,359,* p=0,01). **Tabla 4.24** y **Tabla 4.25**

Tabla 4.24. Valores medios y desviación típica de IL-16 , RANTES y eosinofilos

Estadísticos descriptivos

	Media	Desviación típica	N
IL 16 pg/ml	1070,7	1043,4	76
RANTES ng/ml	137,6	49,3	76
Valor Eosinofilia	704,9	583,7	76

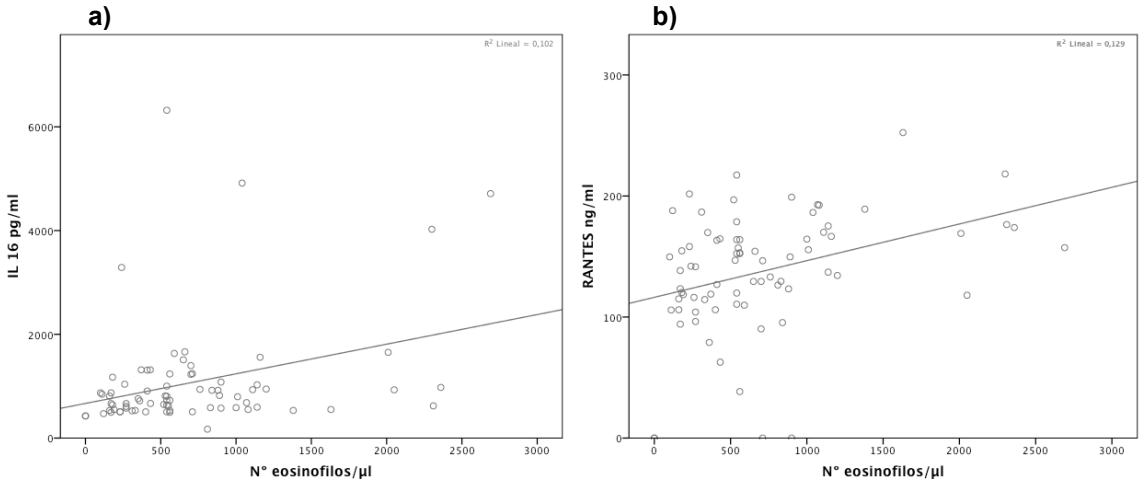
Tabla 4.25 Correlaciones ente IL-16, RANTES y eosinofilia

		IL-16 (pg/mL)	**Valor eosinofilos**
IL-16 (pg/mL)	**Correlación de Pearson**	1	,320**
	Sig. (bilateral)		**,005**
	N	76	76
Valor eosinofilos	**Correlación de Pearson**	,320**	1
	Sig. (bilateral)	,005	
	N	76	76

		RANTES (ng/mL)	**Valor eosinofilos**
RANTES (ng/mL)	**Correlación de Pearson**	1	,359**
	Sig. (bilateral)		**,001**
	N	76	76
Valor eosinofilos	**Correlación de Pearson**	,359**	1
	Sig. (bilateral)	,001	
	N	76	76

*. La correlación es significante al nivel 0,01 (bilateral).

Figura 4.23: Correlación a) IL-16 y eosinofilos, b) Rantes y eosinofilos



4.5. Objetivo 5. Mecanismos de lesión: lesiones subclínicas.

4.5.1. Características generales de los sujetos del estudio

Se incluyeron en este estudio 52 inmigrantes procedentes de África subsahariana, en concreto del Oeste de África, que cumplían los criterios de inclusión descritos en el apartado Materiales y Métodos (página 113). Se excluyeron dos pacientes debido a la presencia de afectación reumática valvular mitral en un caso y prolapso valvular mitral asociado a insuficiencia valvular mitral ligera en el otro.

Atendiendo a estos criterios se clasificaron en dos grupos: el **grupo de estudio** formado por 37 inmigrantes y el **grupo control** por 13 sujetos. Las características generales de estos sujetos se detallan en la **tabla 4.25**.

Tabla 4.26. Características generales de los pacientes del objetivo 5

Características	Grupo estudio (Eosinofilos >450/µl)	Grupo control (Eosinofilos <450/µl)
Sexo		
Varón/Mujer	34/3	13/0
Edad		
Media ± DT	25,9 ± 9,4	25,6 ± 3,5
Países* (*por orden alfabético)*		
Camerún	5 (13,5)	1 (7,7)
Ghana	8 (21,6)	2 (8,6)
Mali	5 (13,5)	4 (30,8)
Sierra Leona	11 (29,7)	3 (23)
Eosinofilia absoluta		
(media ± DT)	932,1 ± 443,8	218,3 ± 108,9
Leve (450-999/µl)	26 (70,3)	-
Moderada (1000-2999/µl)	7 (19)	-
Intensa (≥ 3000/µl)	4 (10,8)	-
Infección por Parásitos		
Esquistosomas	8 (21,6)	-
Filarias	13 (35,1)	-
Geohelmintos	7 (18,9)	-
Coparasitados	4 (10,8)	-

**No se especifican los países con frecuencias de <2*

La edad media era de 25,8 años (15-67) y la relación varones/mujeres era de 47/3. Los principales países de donde proceden son del oeste de África [Sierra Leona (28%), Ghana (20%), Mali (18%), Camerún (12%)]. En el grupo de estudio el valor medio de eosinofilia es 932/µl ± 443,8 y el grado de eosinofilia era leve en el 70,3% de los pacientes, moderado en el 19% e intenso en el 10,8%. En lo que respecta al diagnóstico etiológico, en 8 casos

fue una esquistosomosis (1 *S.haematobium,* 1 *S.mansoni,* 6 *Schistosoma spp.*), en 13 casos una filariosis (2 *Mansonella perstans,* 1 *Loa loa,* 1 *Wuchereria bancrofti*, 3 coinfectados por *Mansonella perstans. y Loa* loa y 6 *Filaria spp.*), en 7 casos una geohelmintosis [(2) Uncinaria, (2) estrongiloides, (1) *Ascaris lumbricoides,* (1) *Trichuris trichura* y 1 coinfectado por Uncinaria, *Ascaris sp.* y *Trichuris sp.*) y en 4 casos coexistían diferentes entidades.

4.5.2. Estudio ecocardiográfico

El estudio ecocardiográfico se realizó en régimen ambulatorio en todos los casos y, fueron medidos *a posteriori,* por un solo observador, con desconocimiento del valor de eosinófilos en sangre.

La relación entre el grado de eosinofilia y el diagnóstico causal se expresa en la **tabla 4.27a** y **tabla 4.27b.** No existía una asociación estadística entre el grado de eosinofilia y la presencia de afectación de las válvulas aurículo ventriculares (p =0,91 y p=0,782)

Tabla 4.27a. Asociación de afectación valvular mitral y grado de eosinofilia

Recuento

		Afectación valvular mitral		Total
		SI	NO	
Grado eosinofilia	Leve	7	14	21
	Moderada	4	2	6
	Intensa	0	4	4
Total		11	20	31

Tabla 4.27b. Asociación de afectación valvular tricúspide y grado de eosinofilia

Recuento

		Afectación valvular tricúspide		Total
		SI	NO	
Grado eosinofilia	Leve	1	20	21
	Moderada	0	6	6
	Intensa	0	4	4
Total		1	30	31

Todos los sujetos estudiados presentaban una imagen ecocardiográfica adecuada, y se encontraban en ritmo sinusal con una frecuencia cardiaca media de 69 (SD: 11) latidos/minuto. Las cifras de tensión arterial media fueron 125/75 (SD 130/70) mm Hg.

En las **tabla 4.28a** y **tabla 4.28b** se indican los resultados cualitativos y cuantitativos de las magnitudes ecocardiográficas así como su análisis estadístico.

Tabla 4.28a: Hallazgos ecocardiográficos cualitativos

	Grupo estudio (Eosinofilos >450/µl)	Grupo control (Eosinofilos <450/µl)	p-valor
Hallazgos clásicos			
Engrosamiento endocárdico	2/37	0/13	> 0,05
Trombo apical ventrículo izquierdo	1/37	0/13	> 0,05
Trombo apical ventrículo derecho	0/37	0/13	**< 0,05**
Velos mitrales engrosados	18/37	0/13	> 0,05
Velos tricúspides engrosados	7/37	0/13	> 0,05
Velos aórticos engrosados	2/37	0/13	**< 0,05**
Insuficiencia tricúspide (ligera)	15/37	4/13	> 0,05
Hallazgos no clásicos			
Hipertrofia ventricular izquierda	3/37	0/13	> 0,05
Derrame pericárdico	0/37	0/13	> 0,05
Ventrículo izquierdo hiperdinámico	1/37	0/13	> 0,05
Hipertensión pulmonar	0/37	0/13	> 0,05
Disfunción diastólica severa	0/37	0/13	> 0,05
Insuficiencia mitral (leve)	1/37	1/13	> 0,05

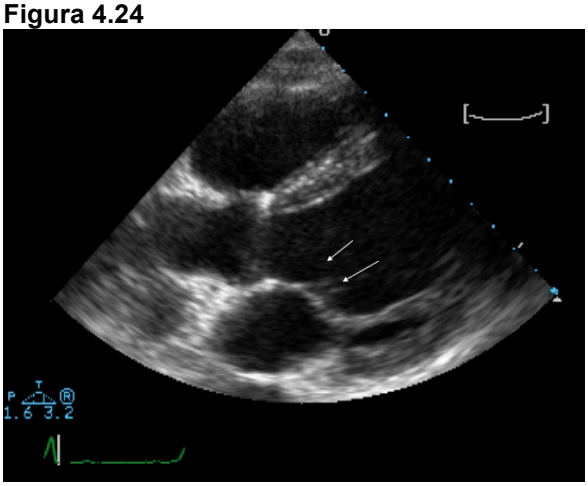
Tabla 4.28b: Hallazgos ecocardiográficos cuantitativos. Expresado como Media (DT)

	Grupo estudio (Eosinofilos >450/µl)	Grupo control (Eosinofilos <450/µl)	p-valor
Engrosamiento mitral	2,98 (0,67) mm	2,47 (0,39) mm	**0,002**
Engrosamiento tricúspide	2,37 (0,69) mm	2,04 (0,49) mm	0,079
Engrosamiento aórtico	1,89 (0,56) mm	1,75 (0,31) mm	0,32
FEVI (Simpson)	56,67 (4,91) %	56,38 (3,93) %	0,83
DTI (e/a) anillo mitral	2,02 (0,55) mm	2,12 (0,73) mm	0,64
Flujo vena pulmonar (S/D)	1,13 (0,31)	1,11 (0,38)	0,86
Relación E/A mitral	1,72 (0,59)	1,76 (0,52)	0,81
DTI (e/a) septo basal	1,57 (0,38)	1,46 (0,32)	0,38
Relación E/A tricúspide	1,92 (0,48)	1,80 (0,43)	0,45
DTI (e/a) latero medio-distal	1,84 (0,46)	1,90 (0,28)	0,59
TRIV	1,64 (0,43)	1,60 (0,31)	0,77
Veloc Propagación (M-color)	74,61 (13,63) ms	74,07 (11,95) ms	0,89
Flujo vena pulmonar (S/D)	56,32 (18,06) cm/s	50,11(12,12)cm/s	0,19

FEVI: Fracción eyección ventricular izquierda

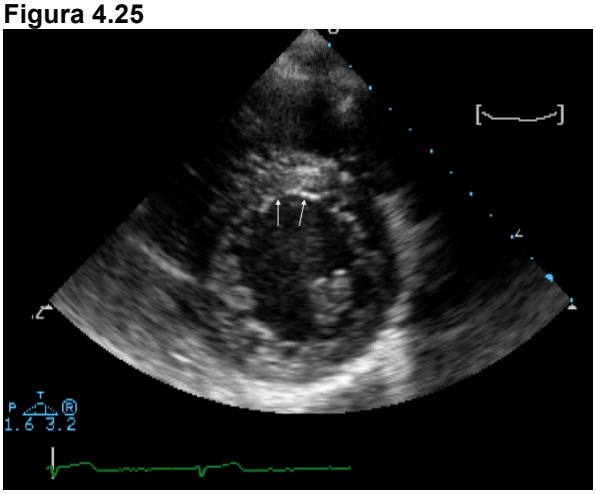
En las figuras siguientes **(figura 4.24, figura 4.25, figura 4.26)** se muestran imágenes características de algunos pacientes

Figura 4.24



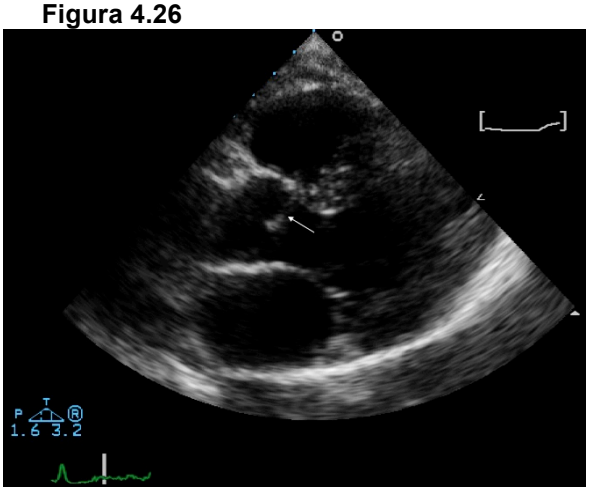
En esta imagen de plano paresternal eje largo, del ventrículo izquierdo, se muestra engrosamiento ligero de los velos mitrales (flechas), sin duda el hallazgo mas frecuente en este estudio.

Figura 4.25



En esta imagen de plano paresternal eje corto, a nivel de los músculos papilares del ventrículo izquierdo, se muestra un engrosamiento ligero con aumento de la ecogenicidad (flechas) a nivel del endocardio ventricular, especialmente visible sobre el septo interventricular.

Figura 4.26



En esta imagen de eco 2D, eje largo paraesternal , se muestra un engrosamiento de las sigmoideas aorticas (flecha), sin alteración en su función.

4.5.3. Relación con el tipo de parasitosis y la intensidad de la misma

No existía asociación entre la presencia de afectación valvular y el tipo de helminto responsable de la eosinofilia tal y como se expresa en la **tabla 4.29**.

Tabla 4.29 Asociación entre afectación valvular y el tipo de helminto

Afectación valvular	Esquistosomas	Filarias	Total
SI	8 (72%)	6 (40%)	14
NO	3 (28%)	9 (60%)	12
Total	11	15	26

Test exacto de Fisher p= 0,13

4.6. Objetivo 6. Mecanismos de lesión: proteínas citotóxicas derivadas de los eosinofilos (ECP y EDN)

Se determinaron los valores de las proteínas ECP y EDN tanto en muestras de suero como en orina de 126 inmigrantes subsaharianos con las características que se mencionan previamente en el apartado materiales y métodos (páginas 116-117). Se excluyeron los individuos que: *i)* no fueran recién llegados a España, *ii)* que no fueran Africanos Subsaharianos, o que, *iii)* no quisieran participar en el trabajo.

4.6.1. Tipo de muestras utilizadas

El número de pacientes que se utilizó para la determinación de cada proteína dependió de si la determinación se realizaba en suero y/o orina. Se muestra en la siguiente tabla **(tabla 4.30)**

Tabla 4.30: Nº de muestras utilizados para cada determinación (ECP y EDN)

Proteínas ECP/EDN			Frecuencia	Porcentaje
ECP	Válidos	Suero	52	98,1
		Orina	32	60,4
EDN	Válidos	Suero	73	100,0
		Orina	41	56,2

4.6.2. Características generales de los participantes del estudio

Se dividieron los sujetos en dos grupos; el **grupo de estudio** para la determinación de **ECP en suero** estaba constituido por 31 inmigrantes subsaharianos con eosinofilia (> 450eosinofilos/µl) y la detección de un único helminto. 16 estaban infectados por esquistosomas (11 *S.haematobium,* 5 *S.mansoni*), 11 por geohelmintos (uncinarias) y 5 por filarias (4 *M. perstans,* 1 *Loa loa*). Se determinó de **ECP en orina** en 11 inmigrantes infectados por *Schistosoma haematobium.*

Para la determinación de **EDN** se procesaron las muestras de suero de 52 inmigrantes con las mismas características que para el grupo de ECP. Los pacientes presentaron una infección helmíntica por : 20 esquistosomas (8 *S.haematobium,* 5

S.mansoni, 7 Schistosoma spp.), 14 por geohelmintos (9 Uncinarias, 5 *Strongyloides sp.*) y 18 filarias (7 *M. perstans,* 1 *Loa loa,* 1 *W.bancrofti,* 9 *Filaria sp.*). Se determinó **EDN en orina** en 21 inmigrantes infectados por 11 esquistosomas (8 *S.haematobium,* 3 *S.mansoni*), 5 filarias (4 *Mansonella perstans* y 1 *Loa loa*) y 5 geohelmintos (uncinarias)

El **grupo control** estaba formado por 21 inmigrantes de las mismas áreas geográficas y sin eosinofilia ni infección parasitaria en el caso de ambas proteínas tanto cuando la determinación fue en suero como en orina. Las características de ambos grupos se recogen en la **tabla 4.31**.

Tabla 4.31. Características generales de los inmigrantes que forman parte del estudio de las proteínas ECP y EDN

	ECP		EDN	
Características	**Grupo estudio**	**Grupo control**	**Grupo estudio**	**Grupo control**
Sexo				
Varón/Mujer	30/2	18/3	49/3	19/2
Edad				
Media ± DT	26,3 ± 7,9	27,8 ± 5,8	26,8 ± 7,3	27,7 ± 5,8
Países* *(por orden alfabético)*				
Ghana	8 (25)	5 (23,8)	11 (21,2)	5 (23,8)
Mali	7 (21,9)	1 (4,8)	11 (21,2)	1 (4,8)
Mauritania	0	6 (28,6)	0	5 (23,8)
Nigeria	7 (21,9)	7 (33,4)	5 (9,6)	7 (33,3)
Sierra Leona	4 (12,5)	0	9 (17,3)	1 (4,8)
Eosinofilia absoluta (media ± DT)	880,3 ± 547,8	127,1 ± 50,7	878,5 ± 424,2	123,8 ± 52,1
Tipo de muestra analizada				
Suero	31	21	52	21
Orina	11	21	21	20
Infección por helmintos				
Esquistosomas	16 (50)		20 (38,5)	
Filarias	5 (15,6)	Ninguno	18 (34,6)	Ninguno
Geohelmintos	11 (34,4)		14 (26,9)	
Clínica				
Asintomático	22 (68,8)	21(100)	36 (69,2)	21 (100)
Lesiones cutáneas	2 (6,2)		3 (5,8)	
Urinarias	7 (21,9)		7 (13,5)	
Otras	1 (3,1)		6 (11,5)	

**no se describen los países con frecuencias de <2*

4.6.3. Determinación de ECP y EDN en la población de estudio

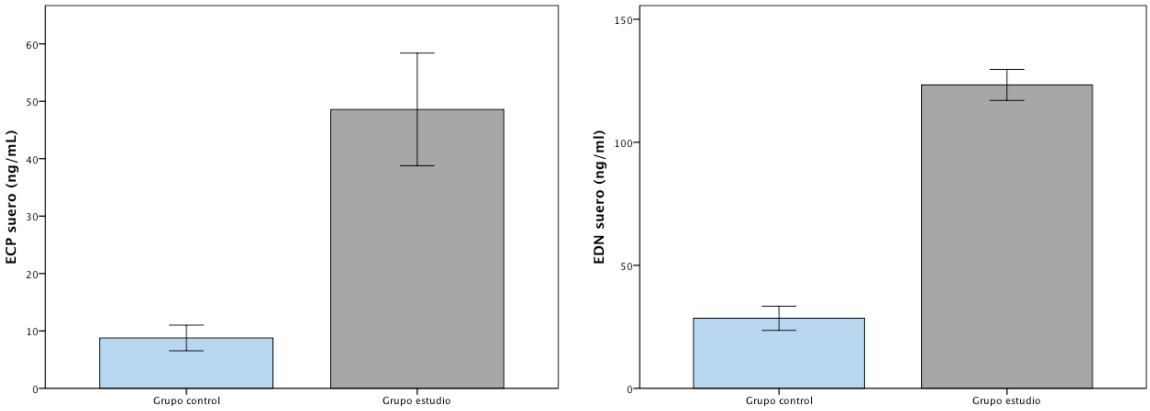
Cuantificamos la concentración de ECP y EDN en suero comparando el grupo control con el grupo de estudio y encontramos diferencias significativas entre ambos grupos en las dos proteínas (p-valor < 0,005) como muestra la **tabla 4.32 y figura 4.27**.

Tabla 4.32 : Valores de ECP y EDN entre grupo control y grupo de estudio

		N	Media	Desviación típ.	p-valor
ECP suero (ng/ml)	**Grupo control**	21	8,7	10,2	0,000*
	Grupo estudio	31	48,5	55,4	

		N	Media	Desviación típ.	p-valor
EDN suero (ng/ml)	**Grupo control**	21	28,4	22,5	0,000*
	Grupo estudio	52	123,3	45,4	

Figura 4.27 : Valores de ECP y EDN entre grupo control y grupo de estudio



4.6.4. Determinación de ECP en suero dependiendo del tipo de parásito

Al dividir el grupo de estudio en tres según el tipo de parasito causante de infección (esquistosomas, filarias y geohelmintos) y cuantificar ECP, los tres grupos presentaron valores medios más altos que el grupo control siendo significativa esta diferencia entre el grupo control y los pacientes infectados por geohelmintos (p-valor < 0,005) como se muestra en la **tabla 4.33** y **tabla 4.34** donde se ha utilizado el test de Student-Newman-Keuls y se representa en la **figura 4.28**.

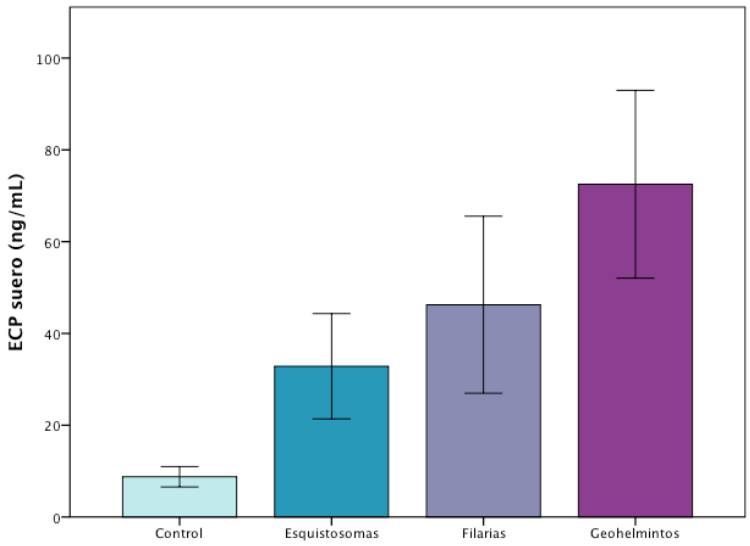
Tabla 4.33 y Figura 4.28. Determinación de ECP en el suero (ng/ml) de los sujetos infectados por diferentes helmintos

	N	Media	Desviación típica
Control	21	8,8	10,2
Esquistosomas	15	32,9	45,9
Filarias	5	46,3	43,1
Geohelmintos	11	72,5	67,9

Tabla 4.34 Comparaciones múltiples de los valores de ECP en suero entre los grupos de helmintos

	Grupo	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
S-N-K[a]	**Control**	21	8,8	
	Esquistosomas	16	32,9	32,9
	Filarias	5	46,3	46,3
	Geohelmintos	11		72,5
	Sig.		,127	,100

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 9,974.



Por otro lado, al analizar las concentraciones de ECP por parásito específico, únicamente los pacientes infectados por Uncinarias tienen diferencias significativas frente al grupo control (p-valor < 0,05). Hay que tener en cuenta que todas las infecciones por geohelmintos fueron en todos los casos por Uncinarias. **(tabla 4.35, figura 4.29)**

Tabla 4.35. Comparaciones múltiples entre grupo control y los diferentes parásitos

ECP suero (ng/mL)

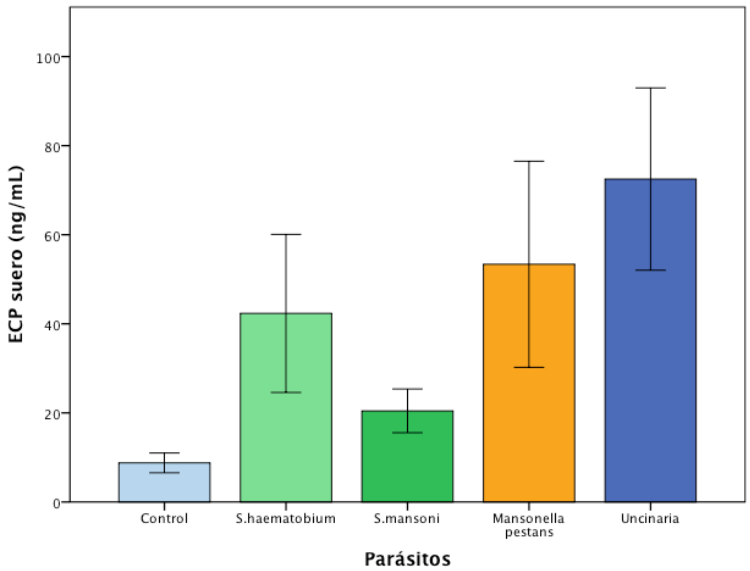
	Parasitos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
S-N-K[a,b]	Control	21	8,7762	
	S.mansoni	5	20,4600	20,4600
	S.haematobium	10	42,3400	42,3400
	Mansonella	4	53,3750	53,3750
	Uncinaria	11		72,5000
	Sig.		,204	,106

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos .

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 7,262.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Figura 4.29. Valores de ECP en los diferentes parásitos



4.6.5. Relación entre ECP y eosinofilia en el grupo estudio

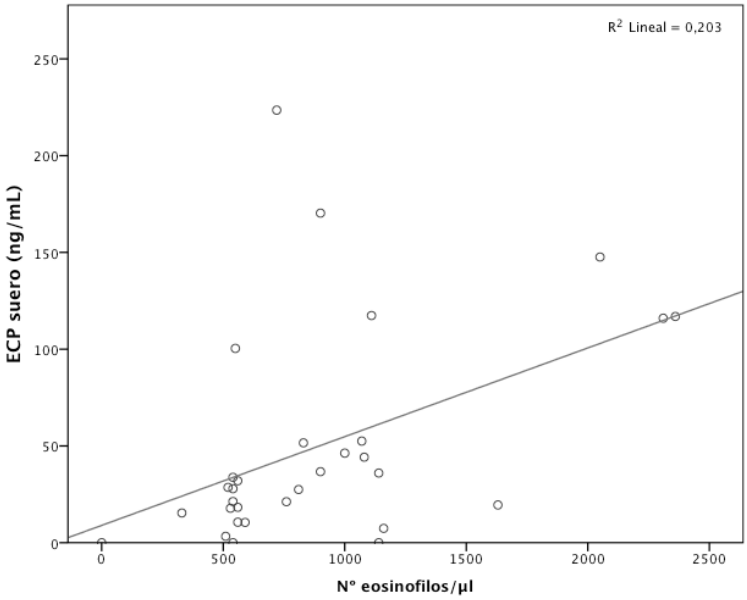
Cuando se estudió sólo en los pacientes con eosinofilia y helmintosis (grupo estudio) la relación de los valores de ECP con el número de eosinofilos mediante el coeficiente de correlación de *Pearson*, observamos que existía una asociación lineal entre ambas variables (p = 0,011). **(tabla 4.36, figura 4.30)**

Tabla 4.36 Correlacion entre los niveles de ECP y los eosinofilos

		ECP suero (ng/mL)	Valor eosinofilos
ECP suero (ng/mL)	**Correlación de Pearson**	1	,451*
	Sig. (bilateral)		**,011**
	N	31	31
Valor eosinofilos	**Correlación de Pearson**	,451*	1
	Sig. (bilateral)	,011	
	N	31	32

*. La correlación es significante al nivel 0,05 (bilateral).

Figura 4.30 Correlacion entre los niveles de ECP y los eosinofilos



4.6.6. Asociación entre los valores de ECP y la eosinofilia

Categorizamos los niveles de ECP si eran normales o elevados para nuestra población tomando como referencia la media ± 3 DT de nuestros sujetos controles. Mediante la prueba de Chi- cuadrado valoramos si existía una asociación entre los pacientes con o sin eosinofilia y los valores de ECP (normales o elevados) y vimos que sí había asociación estadísticamente significativa entre ambas variables (p< 0,002)

Tabla 4.37. Tabla de contingencia Eosinofilia (si/no) * ECP normal o elevado

		ECP		Total
		Normal	Elevado	
Eosinofilia	SI	18	11	29
	NO	23	0	24
Total		41	11	53

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	12,247[a]	2	,002
Razón de verosimilitudes	16,774	2	,000
N de casos válidos	53		

4.6.7. Determinación de EDN en suero según el tipo de parásito

Si dividimos el grupo de estudio en tres según el parasito causante de infección (esquistosomas, filarias y geohelmintos) y cuantificamos EDN para cada grupo, los resultados demuestran la presencia de diferencias significativas entre el grupo control y el resto de los grupos (p-valor < 0,005) como se muestra en la **tabla 4.38**, **4.39** y **figura 4.31.**

Tabla 4.38 Determinación de EDN en el suero (ng/ml) de los sujetos infectados por diferentes helmintos

	N	Media	Desviación típica
Grupo control	21	28,5	22,5
Esquistosomas	20	121,8	44,8
Filarias	18	144,1	42,9
Geohelmintos	14	98,7	39,0

Tabla 4.39 Comparaciones múltiples de los valores de EDN en suero entre los grupos de helmintos

EDN suero (ng/ml)

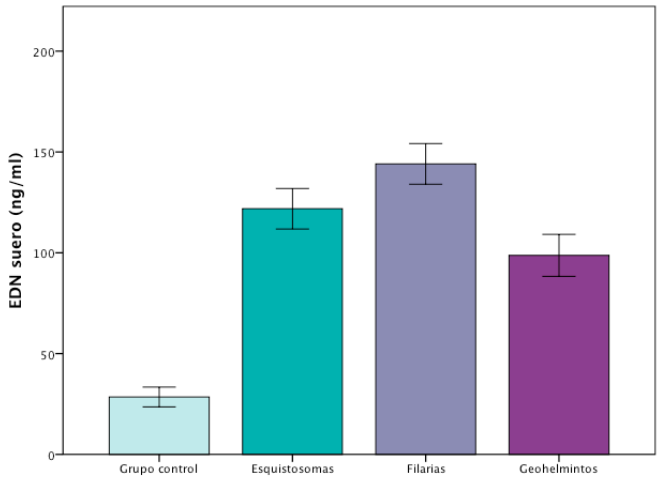
	Grupo parasitos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
S-N-K[a,b]	**Grupo control**	21	28,4876		
	Geohelmintos	14		98,7214	
	Esquistosomas	20		121,8450	121,8450
	Filarias	18			144,0889
	Sig.		1,000	,073	,085

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 17,809.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos.

Figura 4.31 Determinación de EDN en el suero (ng/ml) de los sujetos infectados por diferentes helmintos



Si este análisis lo realizamos por especies de parásitos, todos los pacientes infectados presentaron diferencias significativas frente al grupo control como se observa en la **tabla 4.40** y en la **figura 4.32**.

Tabla 4.40 Comparaciones múltiples de los valores de EDN en suero entre los grupos de parásitos

EDN suero (ng/ml)

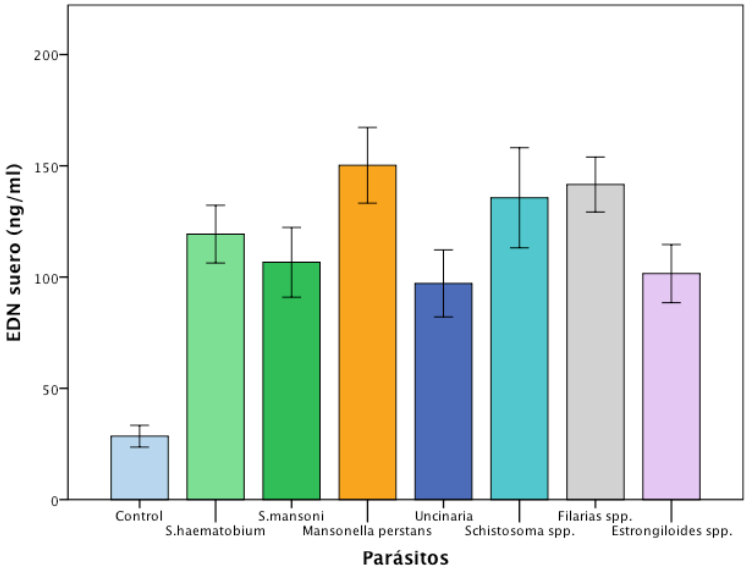
	Parasitos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
S-N-K[a,b]	**Control**	21	28,4876	
	Uncinaria	9		97,1333
	Strongyloides sp.	5		101,5800
	S.mansoni	5		106,6400
	S.haematobium	8		119,3000
	Schistosoma sp.	7		135,6143
	Filarias sp.	9		141,6111
	Mansonella perstans	7		150,2429
	Sig.		1,000	,109

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 7,404.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Figura 4.32. Valores de EDN en los diferentes parásitos

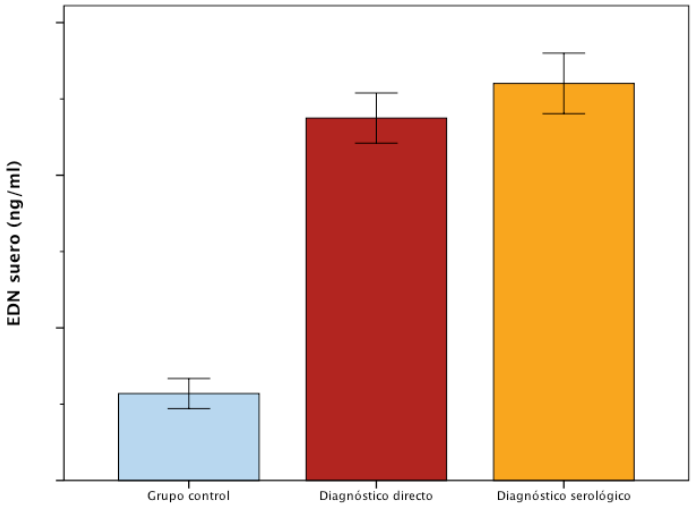


En el grupo de los esquistosomas tanto los pacientes infectados por *S.haematobium (*n=8) como los pacientes infectados por *S.mansoni* (n=5) como los pacientes diagnósticados por serología frente a *Schistosoma spp.* (n=7) tienen diferencias significativas frente al grupo control (p-valor < 0,005). En el grupo de las filarias los resultados también muestran diferencias significativas (p < 0,005) entre los pacientes con diferentes especies de filarias (n=9) y los pacientes con diagnóstico por serología frente a filarias (n=9).

4.6.8. Determinación de EDN en suero según el método de diagnóstico parasitario.

La determinación de EDN se cuantificó tanto en pacientes con diagnóstico parasitario por métodos directos (n=31, 118,7 ± 45,7) como por métodos serológicos (n= 21, 130,1 ± 45,3) y, al compararlos ambos con el grupo control, encontramos diferencias significativas (p< 0,005).

Figura 4.33 Valores de EDN según el método diagnóstico



4.6.7. Relación entre EDN y eosinofilia en el grupo estudio

Cuando estudiamos exclusivamente en los pacientes con eosinofilia y helmintosis (grupo estudio) los valores de EDN en relación al número de eosinofilos mediante el coeficiente de correlación de *Pearson*, obsevamos que existe una asociación lineal entre ambas variables (p = 0,000). **(tabla 4.41)**

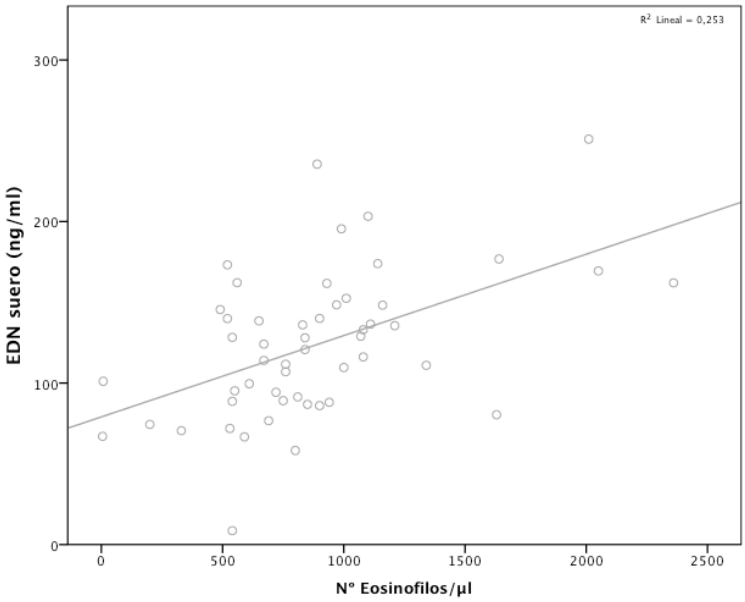
Tabla 4.41 Correlación entre los niveles de EDN y los eosinofilos

Correlaciones

		EDN suero (ng/mL)	Valor eosinofilos
ECP suero (ng/mL)	**Correlación de Pearson**	1	,503**
	Sig. (bilateral)		**,000**
	N	52	52
Valor eosinofilos	**Correlación de Pearson**	,503**	1
	Sig. (bilateral)	,000	
	N	52	52

*. La correlación es significante al nivel 0,05 (bilateral).

Figura 4.34 Correlación entre los niveles de EDN y los eosinofilos



4.6.8. Cuantificación de ECP y EDN en muestras de orina

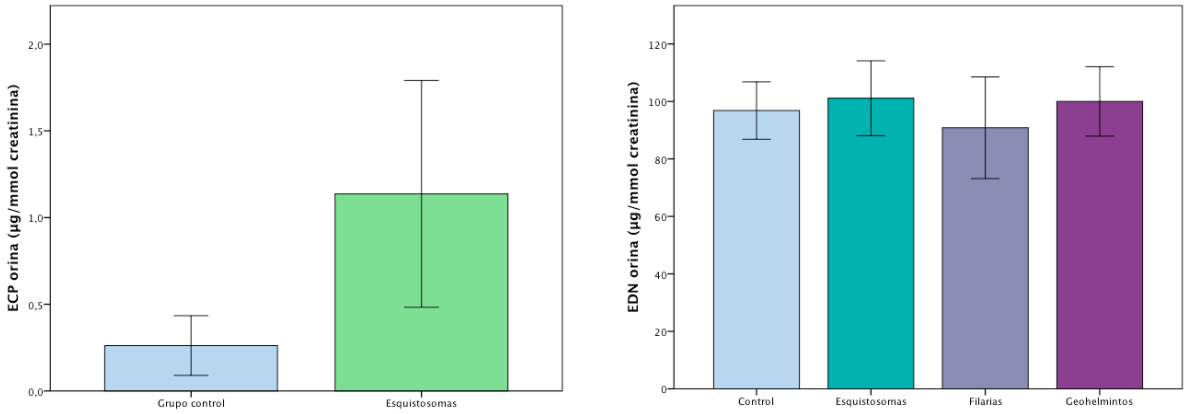
La determinación de ECP en orina se midió tanto en pacientes infectados por *S.haematobium (*n=11) como en el grupo control, mientras que EDN se midió además en pacientes infectados por filarias y geohelmintos (n= 21). Los valores medios obtenidos indican en la siguiente tabla **(tabla 4.42)**. No se encontraron resultados significativamente diferentes entre los grupos (*t Student,* p=0,222 para ECP y p=0,904 para EDN), aunque los pacientes infectados por esquistosomas presentaban valores medios más altos que el grupo control.

Tabla 4.42. Valores de ECP y EDN en orina en el grupo control y en el grupo estudi

	Grupo	N	Media	Desviación típ.
ECP orina (µg/mmol creatinina)	Control	21	0,3	0,8
	Esquistosomas	11	1,1	2,2

	Grupo	N	Media	Desviación típ.
EDN orina (µg/mmol creatinina)	Grupo control	20	96,8	44,7
	Grupo estudio	21	98,4	37,6
	Esquistosomas	11	101,1	43,2
	Filarias	5	90,8	39,5
	Geohelmintos	5	100	26,9

Figura 4.35 Valores de ECP y EDN en el grupo control y en el grupo de estudio



4.7. Objetivo 7. Mecanismos de lesión: factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

4.7.1. Características generales de los participantes del estudio

La determinación en suero de VEGF se llevo a cabo en 79 inmigrantes subsaharianos que cumplían los criterios que se especifican en el apartado de materiales y métodos (página 118).

Los sujetos se clasificaron para evaluar los resultados en dos grupos: *i)* **grupo de estudio** constituido por 55 inmigrantes subsaharianos con eosinofilia (> 450 eosinofilos/µl) y la detección de un único helminto. De ellos 27 estaban infectados por esquistosomas (17 *S.haematobium,* 10 *S.mansoni*), 15 por geohelmintos (uncinarias) y 13 por filarias (9 *M. perstans,* 2 *Loa loa* y 1 *Wuchereria bancrofti*) lo que se representa en la **figura 4.36** y **tabla 4.43** por sectores , *ii)* **grupo control** estaba formado por 18 inmigrantes sanos de las mismas áreas que los inmigrantes del grupo de estudio, sin eosinofilia y sin infección parasitaria.

Las características de los dos grupos se especifican en la **tabla 4.44**.

Figura 4.36 Número de infecciones parasitarias que forman el grupo de estudio

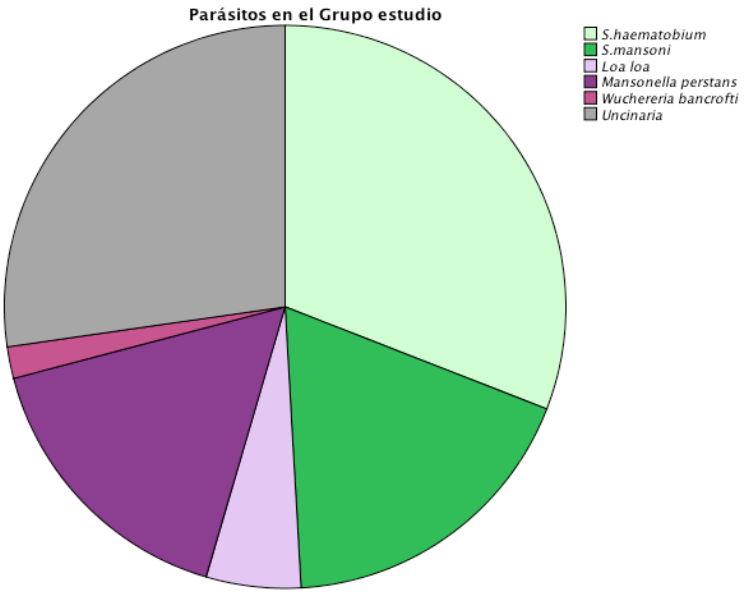


Tabla 4.43 Número de infecciones parasitarias que forman el grupo estudio

	Frecuencia	Porcentaje
S.haematobium	17	30,9
S.mansoni	10	18,2
Loa loa	3	5,5
Mansonellla perstans	9	16,4
Wuchereria bancrofti	1	1,8
Uncinaria	15	27,3
Total	**55**	**100**

Tabla 4.44. Características generales de los inmigrantes que forman parte del estudio de VEGF

Características	Grupo estudio	Grupo control
Sexo		
Varón/Mujer	49/6	17/1
Edad		
Media ± DT	23,3 ± 8,9	28,9 ± 8,5
Países*		
Ghana	5 (9,1)	4 (22,2)
Guinea-Bissau	5 (9,1)	0
Mali	21(38,2)	2 (11,1)
Nigeria	8 (14,5)	5 (27,8)
Sierra Leona	5 (9,1)	2 (11,1)
Eosinofilia absoluta (media ± DT)	965 ± 625,7	176,1 ± 107
Infección por helmintos		
Esquistosomas	27 (49)	Ninguno
Filarias	13 (23,7)	
Geohelmintos	15 (27,3)	
Clínica		
Asintomático	28 (50,1)	24 (100)
Adenopatias perifericas	8 (14,5)	
Lesiones cutáneas	7 (12,7)	
Urinaria	5 (9)	

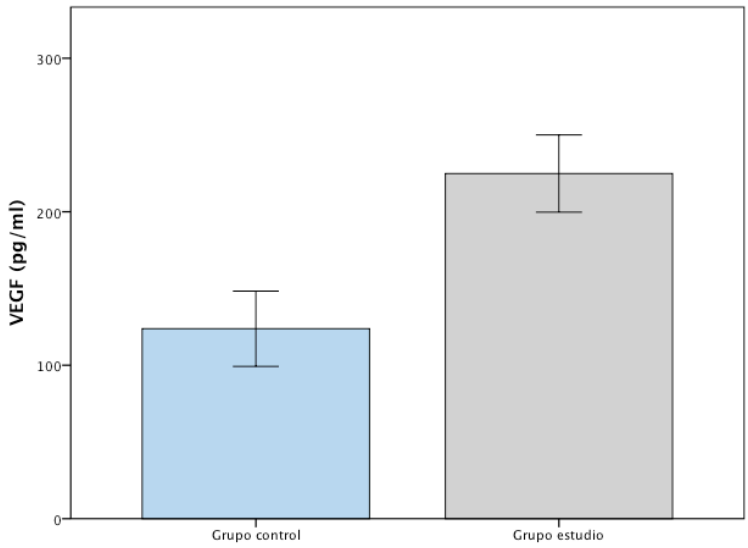
**no se describen los países con frecuencias de <3*

4.7.2. Determinación de VEGF en los sujetos del estudio

Se realizó la determinación de VEGF en todos los pacientes y se indica en la **tabla 4.45** y **figura 4.37**. Se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de estudio ya que el correspondiente p-valor es < 0,05.

Tabla 4.45 y Figura 4.38: Valores de VEGF entre grupo control y grupo de estudio

		N	Media	Desviación típ.	p-valor
VEGF (pg/ml)	**Grupo control**	18	123,8	104,0	0,006*
	Grupo estudio	54	224,9	185,1	



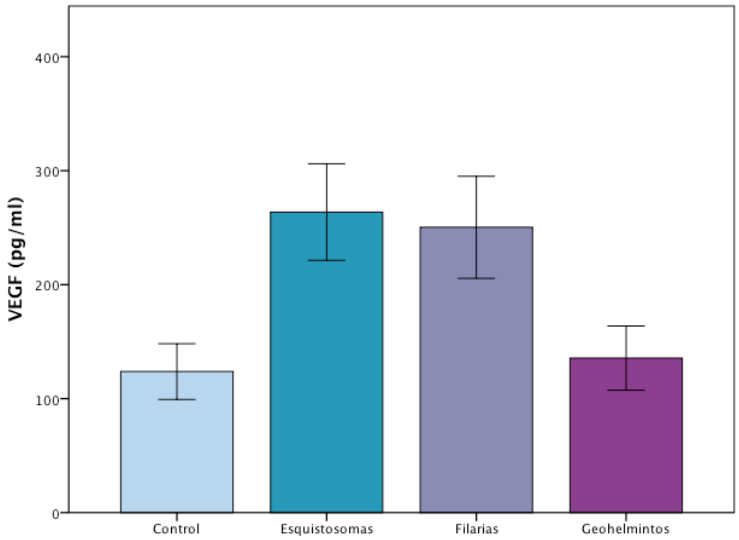
4.7.3. Determinación de VEGF según el tipo de parásito

Si se comparan los valores medios de VEGF entre el grupo control y los pacientes infectados por diferentes parásitos (esquistosomas, filarias y geohelmitos) se observaron que hay diferencias significativas entre el grupo control con el grupo de esquistosomas y filarias (p-valor < 0,05). (**tabla 4.46 y figura 4.38)**

Tabla 4.46 y Figura 4.39: Valores de VEGF entre pacientes control y pacientes infectados por diferentes parásitos

Variable dependiente: VEGF (pg/ml)

	Grupo	Grupo	Diferencia de medias	Error típico	Sig.
DMS	Control	Esquistosomas	-139,9*	50,33501	**,007**
		Filarias	-126,5*	59,75024	**,038**
		Geohelmintos	-11,8	57,39074	,837



4.7.4. Determinación de VEGF en pacientes infectados por esquistosomas

Si nos centramos en el grupo de pacientes infectados por esquistosomas y analizamos los datos en referencia a la especie causante de la infección (*Schistosoma haematobium, Schistosoma mansoni*) las diferencias significativas se aprecian entre el grupo control y los pacientes infectados por *S.haematobium* (p-valor < 0,05). **(tabla 4.47 y tabla 4.48)**

Tabla 4.47 Valores medios de VEGF en los diferentes especies de esquistosomas

	N	Media	Desviación típica
Grupo control	18	123,7	104,0
S.haematobium	17	345,8	314,9
S.mansoni	10	213,6	164,8
Total	45	227,6	235,9

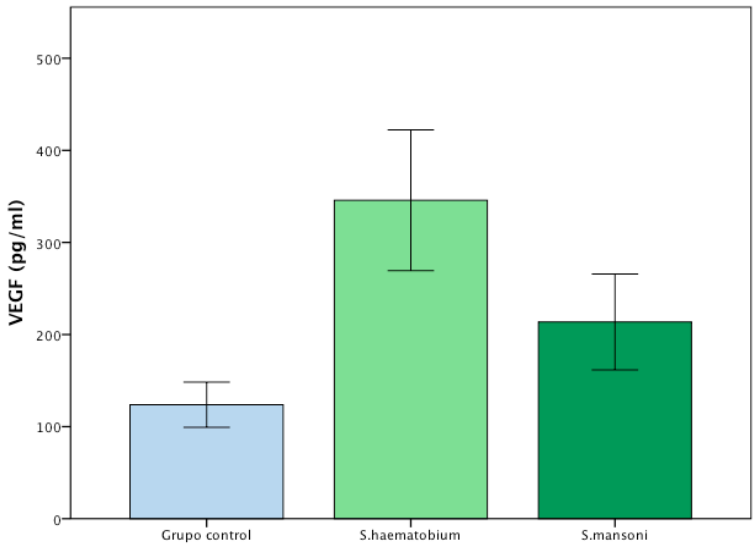
Tabla 4.48 Comparaciones múltiples entre grupo control y las especies de esquistosomas

Variable dependiente: VEGF (pg/ml)

	(I) esquisto	(J) esquisto	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
DMS	**Grupo control**	***S.haematobium***	-222,0*	74	**,005**
		S.mansoni	-89,8	86,4	,304
	S.haematobium	**Grupo control**	222,0*	74	**,005**
		S.mansoni	132,1	87,3	,138
	S.mansoni	**Grupo control**	89,8	86,4	,304
		S.haematobium	-132,1	87,3	,138

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Figura 4.39 Valores medios de VEGF en los diferentes especies de esquistosomas



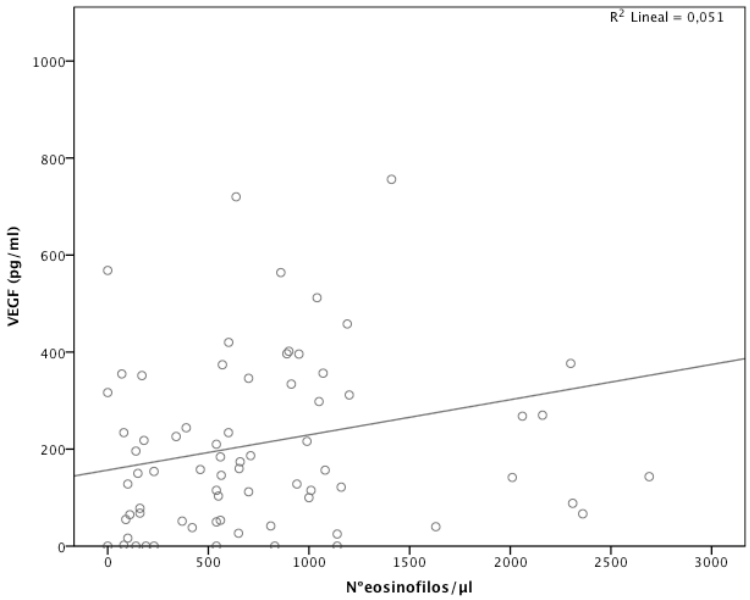
4.7.5. Relación entre VEGF y eosinofilos

Cuando analizamos los valores de VEGF en relación al número de eosinofilos mediante el coeficiente de correlación de *Spearman* se observo que existe una correlación positiva entre ambas variables (p= 0,046).

Tabla 4.49 y Figura 4.40: Correlación entre VEGF y eosinofilos

Correlaciones			
		VEGF (pg/ml)	Valor eosinofilos
VEGF (pg/ml)	Coeficiente de correlación	1,000	,234*
	Sig. (bilateral)	.	,046
	N	73	73
Valor eosinofilos	Coeficiente de correlación	,234*	1,000
	Sig. (bilateral)	,046	.
	N	73	73

*. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).



5. Discusión

V. DISCUSIÓN

El planteamiento inicial de este Proyecto Doctoral se basó en varios aspectos:

i) El fenómeno de la inmigración en España, que siguió un crecimiento exponencial desde la década de los años 90 hasta el año 2010, momento en el que se estabilizó. La Comunidad Canaria fue una de las regiones más afectadas y presentó además una característica especial: el gran porcentaje de inmigración irregular procedente del África subsahariana (más de 62.000 inmigrantes en patera desde 2005) (**221**).

ii) En inmigrantes que proceden de áreas tropicales la eosinofilia es un hallazgo frecuente y está relacionada a menudo con infecciones parasitarias, fundamentalmente las causadas por helmintos.

iii) Los mecanismos, causas y consecuencias de la presencia de eosinofilia importada son poco conocidos, por lo que su identificación reviste un gran interés.

Este Proyecto Doctoral consistió en un estudio prospectivo que se llevó a cabo en inmigrantes, principalmente de origen africano que residían en Gran Canaria. Inicialmente, cabe destacar las dificultades que hemos encontrado a la hora de realizar el estudio, debido a las singulares características del colectivo objeto del mismo: *i)* las *dificultades idiomáticas* y las *diferencias culturales*, que limitan la recogida de datos, la exactitud de los mismos y que generan distancia entre los profesionales de la salud y los inmigrantes (**222, 223**). *ii)* la situación de *irregularidad*, que conlleva a una gran movilidad de este colectivo y que limita concluir estudios diagnósticos, o realizar un seguimiento de los pacientes tras su tratamiento (**223**) y *iii)* el *temor a la repatriación*, que en muchos casos evita el acceso a la atención sanitaria o promueve la falsificación de datos como el país de procedencia (**224**).

Este estudio se ha realizado en 2420 inmigrantes, diferenciando entre los recién llegados y los de estancia superior a seis meses en nuestro país. En su mayoría eran varones, con una edad comprendida fundamentalmente entre 19-29 años, procedían mayoritariamente de África subsahariana y la forma de entrada en Gran Canaria ha sido principalmente por medio de pateras o cayucos. Se trata por lo tanto de una población con

unas características bastante homogéneas. Este hecho ha facilitado en manera el estudio y comparativa del grupo.

El primer objetivo de este trabajo doctoral es un estudio prospectivo de la ***prevalencia de eosinofilia*** en población inmigrante recién llegada a Gran Canaria.

Si se observan las series publicadas sobre prevalencia de eosinofilia importada, se comprueba que los datos obtenidos son bastante variables, oscilando entre el 10% y el 50% (**225-236**). Estas grandes diferencias se deben a varios factores: el punto de corte a la hora de establecer eosinofilia, ya que dependiendo de los autores oscila entre 350/µl y 700/µl (**237, 238**), el origen de los pacientes participantes en el estudio (**238**), el tipo de pacientes (la eosinofilia es más frecuente en inmigrantes que en viajeros) y el diseño del estudio (prospectivo o retrospectivo). En nuestro trabajo la *prevalencia de eosinofilia absoluta* es del 27,2% y entra en el rango que acabamos de describir. Por otro lado, se ha observado una *prevalencia de eosinofilia relativa* del 14%. Este dato analítico no ha sido estudiado en otras series de inmigrantes, excepto en un trabajo previo de nuestro grupo, en el que se demostraba el valor diagnóstico de esta variable (**239**), hecho por el que se decidió incluirlo en el presente trabajo.

Las características de los sujetos con eosinofilia absoluta y relativa eran similares, se trataba principalmente de varones con un rango de edad entre 19-29 años y con procedencia del continente africano, mayoritariamente del área subsahariana. Un tercio de los sujetos eran estudiantes o se dedicaban a la agricultura-ganadería. La mayoría eran asintomáticos aunque encontramos un mayor número de manifestaciones clínicas leves en los pacientes con eosinofilia absoluta que en aquellos que presentaban eosinofilia relativa (20,5% *vs* 7,6%), probablemente por los diferentes tipos de helmintos causantes de la parasitosis (**232, 239**).

Analizando de forma más concreta las dos principales áreas de origen de los inmigrantes (África subsahariana y África del Norte), tanto la prevalencia de eosinofilia absoluta como de relativa es mayor en la zona subsahariana, aspecto similar al observado por otros autores (**227-229**).

Los valores medios de eosinofilia más elevados se observaron en inmigrantes procedentes de Guinea Ecuatorial (1.452/µl), hecho que probablemente esté relacionado

con la alta prevalencia de helmintosis que presenta este país, sobre todo de filarias, que son además las especies que más se asocian a la eosinofilia (**229, 240**).

El segundo objetivo de este trabajo fue la evaluación de las ***causas de eosinofilia absoluta*** en población inmigrante, diferenciando los inmigrantes recién llegados de los de estancia superior a 6 meses, para poder realizar estudios comparativos.

Aplicando una metodología diagnóstica previamente validada (**232, 239, 220**), encontramos que el 72,4% de los sujetos con eosinofilia presentaban una infección parasitaria, principalmente por helmintos. Estos datos son similares a los publicados por nuestro grupo de investigación en anteriores trabajos (75,6%) (**232**), pero significativamente superiores a los publicados por otros autores, en los que se logra únicamente llegar al diagnóstico etiológico entre el 15% y el 64% de los pacientes. Este rango tan amplio depende en gran medida de la naturaleza de la población de estudio pero, sobre todo, de la metodología aplicada para el diagnóstico (**57,58**,**225-229**).

Este elevado tanto por ciento varió entre los inmigrantes recién llegados y los de estancia superior a 6 meses, siendo algo menor en los primeros (69,6%) y bastante mayor en los segundos (83,4%). En general, la prevalencia de helmintos en inmigrantes disminuye con el tiempo de estancia en nuestro país (**229**), pero en nuestro grupo se dan una serie de circunstancias que invierten esta tendencia: *i)* la estancia de estos sujetos en España (> 6 meses) no es considerada de largo plazo (**229**), *ii)* presentan un mayor número de manifestaciones clínicas (66%) lo que facilita la orientación diagnóstica, y *iii)* el seguimiento de estos pacientes fue alto, facilitando así el éxito diagnóstico.

De la metodología analizada, la prueba diagnóstica más sensible fue EIA frente a *Strongyloides stercolaris* (36,2%), dato similar a otros autores (**230**) pero sensiblemente más bajo que los obtenidos por Belhassen et al. (53,2%) (**241**). Este hecho puede deberse a que únicamente se realizó la serología en sujetos en los que previamente no se había determinado la causa de la eosinofilia o en aquellos en los que había una alta sospecha clínica, para evitar falsos positivos, ya que se trata de una población con alta probabilidad de poliparasitación. Dentro de las técnicas parasitarias directas, el estudio coproparasitario fue la más sensible (34,6%).

Cabe destacar que la combinación diagnóstica de métodos directos y serológicos nos permitió detectar otra infección parasitaria (principalmente filarias o esquistosomas) en

un 7,8% de los inmigrantes en los que previamente habíamos identificado un helminto, lo cual sugiere que esta estrategia diagnóstica complementaria es especialmente útil en esta población.

Las causas más frecuentes de eosinofilia absoluta en nuestro estudio fueron los esquistosomas, las filarias y los geohelmintos, es decir, parásitos relacionados con el origen geográfico de los pacientes, principalmente de África subsahariana. Cabe destacar que solo el 34,9% de los pacientes diagnosticados presentaban algún tipo de sintomatología, por tanto el adecuado estudio en este tipo de pacientes permite detectar un elevado número de infecciones asintomáticas. En la gran mayoría de los casos diagnosticados solo fue posible detectar la presencia de una especie parasitaria, por lo que hemos obtenido porcentajes más bajos de co-parasitación que los referidos en otros estudios (**241**), una causa probable es que en nuestro caso el diagnóstico serológico fue realizado de una forma más dirigida en cada paciente, con el fin de evitar falsos positivos.

En el trabajo encontramos una correlación lineal entre los niveles de eosinofilia y las coinfecciones. La detección de dos o más parásitos se asoció con mayores valores de eosinofilia. Por otro lado, también presentaban valores más altos de eosinofilia el grupo de pacientes parasitados por filarias, datos similares a los publicados por otros autores (**230, 232**). Finalmente, si se comparan los tres principales grupos de parásitos (esquistosomas, filarias, geohelmintos) atendiendo al método por el que fueron diagnosticados (métodos directos *vs* serológicos), en todos los casos, los valores de eosinofilia son más altos cuando el diagnóstico fue directo, lo cual podría indicar que en muchos diagnósticos serológicos el parásito causante ya no está presente o que la carga parasitaria es menor, causando una eosinofilia menos intensa.

El tercer objetivo de este proyecto doctoral fue la evaluación del ***significado de la eosinofilia relativa*** en este colectivo, aspecto que no ha sido considerado en la literatura.

Por ello, procedimos a evaluar la presencia de infección parasitaria mediante la metodología que previamente habíamos validado y utilizado en el objetivo previo (**232, 239, 220**), tanto en inmigrantes recién llegados como en los de estancia superior a seis meses, que presentaran además eosinofilia relativa. Se comprobó que en el 45,3% existía al menos una infección parasitaria, principalmente una helmintosis. Este valor es más alto que lo publicado en un trabajo previo de nuestro grupo (20,8%) (**239**). Estas discrepancias

se pueden deber a varias causas: *i)* la selección de la muestra poblacional, ya que en el anterior trabajo se habían incluido únicamente inmigrantes recién llegados subsaharianos asintomáticos, mientras que en el presente se ha aumentado la muestra al incluir inmigrantes de otras procedencias, principalmente de África del Norte; *ii)* Otra de las razones es la ampliación de la selección atendiendo al intervalo entre la llegada y el momento de estudio, incluyendo en esta ocasión a aquellos con estancias de corto a medio plazo (> 6 meses), mientras que en el trabajo inicial solo se tuvo en cuenta a los inmigrantes recién llegados; *iii)* En tercer lugar, y relacionado con el aspecto anterior, hasta un 30% de los inmigrantes presentaban algún tipo de sintomatología clínica. *iv)* Finalmente, el estudio serológico se ha ampliado al incorporar la detección de anticuerpos frente a *Stongyloides spp.* y a *Toxocara canis*, no disponibles en el estudio previo.

Ambas técnicas serológicas resultaron ser las pruebas diagnósticas más sensibles analizadas en esta población (30%), seguidas del estudio coproparasitario (20,2%). Cabe destacar que la combinación de métodos directos e indirectos permitió ampliar el rendimiento diagnóstico en los sujetos con eosinofilia relativa en un 26,7%. Por ello, esta estrategia es adecuada en este colectivo, en el que la detección de eosinofilia relativa debe considerarse como un dato de sospecha de helmintosis críptica.

Las principales causas de eosinofilia relativa en este estudio fueron, en este orden, las infecciones por esquistosomas, geohelmintos y estrongiloides. El 14% de los sujetos a los que se diagnosticó al menos un parásito no eran de origen subsahariano, sino principalmente de África del Norte, predominando en éstos la infección por *Strongyloides* sp. y *Toxocara* sp. Este perfil parasitario muestra claras diferencias respecto al de los sujetos con eosinofilia absoluta, en los que es mayor la infección por filarias. Una posible explicación a esta diferencia es la asociación de filariosis con niveles más altos de eosinofilia (**232**).

Las infecciones se detectaron mayoritariamente en los inmigrantes recién llegados (90%), y aunque, en general, son sujetos infectados por un único parásito, hay que destacar que el 5,5% presentaban co-infecciones. Todos estos datos corroboran la importancia de realizar en esta población el cribado en busca de una causa parasitaria cuando presenten eosinofilia relativa.

El cuarto objetivo de este proyecto doctoral fue el estudio de los ***mecanismos implicados en la aparición de eosinofilia importada***. Para ello, se comparó la concentración plasmática de cuatro citocinas involucradas en el reclutamiento y activación de eosinófilos (citocinas "eosinofílicas") en el suero de sujetos con eosinofilia y con helmintosis bien definidas, es decir, pacientes infectados por un solo parásito.

En la literatura existe una escasa información acerca de la relación entre las citocinas "eosinofílicas" y helmintosis. Además, gran parte de los trabajos se basan en modelos experimentales en ratones que no siempre pueden ser extrapolados a la infección en humanos (**245, 246**). Por otro lado, en las últimas décadas se han realizado interesantes estudios en infecciones experimentales en humanos que han arrojado luz sobre los mecanismos que intervienen en los primeros momentos de la infección (**247, 248**). Sin embargo, las referencias a los mecanismos de eosinofilia en pacientes con infección crónica en áreas endémicas son prácticamente inexistentes. Por todo ello, al disponer de una serie sujetos con eosinofilia, con un origen geográfico común e infectados con una única especie parasitaria, evaluamos los valores de cuatro de las citocinas "eosinofílicas" menos estudiadas: eotaxina, IL-13, IL-16 y RANTES. Estas determinaciones se realizaron en el suero de los pacientes monoinfectados (grupo de estudio) y en sujetos endémicos del área subsahariana sin datos de infección (grupo control).

Los resultados más relevantes obtenidos fueron los siguientes. Por un lado, se observó un aumento significativo de la concentración sérica de *IL-16* en el grupo de estudio con respecto al grupo control. Este aumento se observó en personas con todos los tipos de helmintos estudiados (esquistosomas, filarias y geohelmintos) y era independiente de la especies parasitaria presente. No hemos encontrado trabajos comparables en los que se haya medido esta citocina en pacientes con helmintosis por lo que es imposible poner en contexto estos resultados. No obstante, en algunos estudios se ha indicado que IL-16 podría tener un papel activo, al promover la liberación de RANTES y eotaxina por los eosinófilos (**249**).

Por el contrario, la concentración plasmática de *eotaxina* era significativamente menor en el grupo de estudio con respecto al del grupo control. Este hecho se observó en pacientes infectados por los tres grupos de parásitos señalados y era independiente de la especie parasitaria presente. Nuestros datos son compatibles con estudios experimentales

en los que los se demuestra que los helmintos utilizan la liberación de proteasas que degradan a la eotaxina para inhibir el reclutamiento de eosinófilos (**250-252)**.

La concentración plasmática de IL-13, otra de las citocinas involucradas en el reclutamiento y activación de los eosinófilos, está también aumentada en pacientes con helmintosis, aunque este aumento no es significativo estadísticamente, excepto en la infección por uncinarias. Existe una explicación plausible para estos resultados, ya que en estudios experimentales en humanos, se ha observado que una vez producida la infección aumenta la concentración plasmática de IL-13, hasta alcanzar un máximo y, a partir ese momento, va descendiendo hasta alcanzar valores casi basales (**247**). Por ello, parece lógico que en pacientes crónicos, los valores de IL-13 se van a ir normalizando hasta ser similares a los basales.

Finalmente RANTES es, dentro de las citocinas medidas, la que muestra valores más similares entre el grupo control y el grupo de estudio, observándose solo un pequeño aumento en el grupo de pacientes con filariosis, pero sin presentar diferencias significativas desde un punto de vista estadístico. Estos datos son coherentes con los obtenidos en algunos estudios experimentales, en los que no se observa una producción de RANTES en respuesta a antígenos parasitarios (**253**, **254**). De hecho, en estos trabajos se ha llegado a sugerir que RANTES actuaría en el reclutamiento de eosinófilos en enfermedades alérgicas pero no en helmintosis.

Desde un punto de vista patogénico, nuestros resultados coinciden con la sugerencia de algunos autores en el sentido de que las citocinas implicadas en el reclutamiento de eosinófilos estarían relacionadas definiendo circuitos de regulación cruzada (**253**). Así, ante la inactivación que sufre la eotaxina como mecanismo que los helmintos han desarrollado para evitar o inhibir la activación y reclutamiento de eosinófilos por parte del hospedador, su importante acción quimioatractante ha sido asumida por otras citocinas, principalmente IL-16 e IL-13. Esto podría explicar como el valor especialmente bajo de eotaxina en *Ascaris lumbricoides* es “compensado” con valores muy elevados de IL-13.

Finalmente, además de la importancia de estos datos en la comprensión de los mecanismos patogénicos implicados en la aparición de eosinofilia relacionada con las helmintosis, la medida de citocinas plasmáticas puede ser útil en la práctica clínica. De esta forma, en un paciente con eosinofilia en el que no se ha llegado a un diagnóstico definitivo,

la detección de concentraciones elevadas de IL-6 y disminuidas de eotaxina sugeriría una helmintosis mientras que la elevación de RANTES apoyaría el diagnóstico de una enfermedad alérgica. Evidentemente, esta hipótesis debe ser comprobada con estudios diseñados de forma específica.

El quinto objetivo de este proyecto doctoral fue el estudio de las ***consecuencias patológicas*** de la eosinofilia importada. Este aspecto es relevante ya que una elevación mantenida y prolongada de los eosinófilos y su desgranulación progresiva se ha asociado a lesiones tisulares, particularmente de estructuras cardíacas.

La fibrosis endomiocardica (FEM) es una enfermedad que se caracteriza por fibrosis del endocardio apical del ventrículo izquierdo, derecho o ambos. Las manifestaciones clínicas son las relacionadas con una miocardiopatía restrictiva, incluyendo insuficiencia cardiaca.

Los estudios epidemiológicos de la FEM muestran un predominio en regiones tropicales (15º en torno al Ecuador), afectando a personas jóvenes (con un pico bimodal a los 10 y 30 años) y con predominio de varones **(255)**. En este sentido, nuestra serie es similar a la de los pacientes con FEM en lo que respecta a la edad y sexo, aunque con un mayor numero de personas procedentes del Oeste de África. En algunas series, hasta el 19,8% de la población estudiada mediante ecocardiografía presentaba datos de FEM y, de ellos, sólo un 22,7% presentaban sintomatología. Estos datos sugieren que las series clínicas de FEM incluyen principalmente pacientes con estadios avanzados de enfermedad.

La patogenia de la FEM no está completamente aclarada, aunque se han señalado varios tipos de factores. Uno de los factores más importantes es la presencia de eosinofilia, relacionada con infecciones por helmintos o de otra causa (p. ej. síndrome hipereosinofilico, enfermedad de Churg Strauss, reacciones a fármacos o neoplasias) (**256-258)**. La asociación entre la presencia de eosinofilia y FEM es muy variable dependiendo de la región geográfica (p. ej. es más elevada en Uganda [**259**] y escasa en la India[**259**]). Otros factores involucrados en la patogenia de la FEM son los nutricionales (dieta pobre en proteínas, consumo de mandioca) (**262)**, ambientales (aumento del cesio) (**260)** , genéticos **(255)** e inmunológicos **(261).**

Para evaluar la afectación cardiaca en pacientes con eosinofilia absoluta, se realizó un estudio ecocardiográfico en inmigrantes subsaharianos asintomáticos procedentes del

Oeste de África con eosinofilia y su comparación con un grupo de controles de las mismas regiones y edad equivalente. Nuestros resultados indican que existe una asociación entre la eosinofilia y las alteraciones estructurales, en ausencia de manifestaciones clínicas evidentes. Así, el engrosamiento valvular mitral (exclusivo de los pacientes con eosinofilia) sugiere que existe una afectación precoz, independiente de las características raciales y de otros factores controlados en el estudio (p. ej. edad o sexo). Los valores obtenidos mostraron diferencias significativas en la estructura de los velos de la valvula mitral, con un grosor medio superior en los casos con eosinofilia. Estos datos pueden tener relevancia clínica, ya que la afectación predominante de la válvula mitral en pacientes con FEM y eosinofilia ha sido demostrada en otros trabajos (**263-267)**. Por otro lado, tiene interés destacar que la eosinofilia y/o presencia de parasitosis en este contexto no dan lugar a alteraciones de la función contráctil ventricular izquierda (expresada en forma de % de FE), ni alteran las magnitudes de función diastólica global y regional del lado izquierdo o derecho del corazón.

Aunque por los datos de nuestro estudio y los referidos en la literatura previamente indicados la eosinofilia desempeña un papel importante en la patogenia de la FEM, no existe una relación estricta entre ambos datos. Así, en nuestra serie observamos por un lado que un importante porcentaje de pacientes con eosinofilia no presenta ningún dato de afectación cardiaca y, por otro, que no existía una asociación entre el grado de eosinofilia y la afectación valvular cardíaca. La explicación más plausible de estos datos es que no solo es preciso para lesionar el endocardio el aumento de los eosinófilos circulantes sino su activación y liberación de mediadores inflama-torios (**268)**. Por otro lado, en un número importante de pacientes con FEM no se detecta eosinofilia (**269)**. Este hecho puede ser debido a dos circunstancias: la existencia de una fase "quemada" **(270)** o a la intervención de otros factores (específicamente los nutricionales) **(260)**.

En nuestra serie, se identificó mediante técnicas directas o indirectas la causa de la eosinofilia en un 86,5 %. En todos los casos fue una helmintosis, específicamente una filariosis o una esquistosomosis. Varios tipos de helmintos se han relacionados con la FEM, aunque los principales son las filarias (**262, 263, 271-273)**. También en nuestra serie, se comprueba que las filariosis son de las principales infecciones asociadas a lesión endocárdica. Sin embargo, también se encuentra un número de casos de afectación valvular relacionados con la infección por *Schistosoma* spp., escasamente indicada en la

bibliografía. Por ello, parece que el principal factor, en nuestra serie, relacionado con la FEM es la eosinofilia, mas que el tipo de parásito responsable.

La liberación de mediadores inflamatorios por los eosinófilos, como la proteína catiónica eosinofílica (ECP) y la neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN), son elementos clave en la respuesta inmune del hospedador frente a helmintos (**242, 243**). Ambas moléculas, en colaboración con otros mediadores inflamatorios son capaces de lesionar la membrana de los helmintos, ocasionando la muerte y desintegración de helmintos (**274-276**). Por ello, el sexto objetivo de este proyecto doctoral fue la ***medida de ECP y EDN en el suero y la orina de pacientes con eosinofilia e infección helmíntica bien definida*** y su comparación con sujetos sanos procedentes de las mismas áreas geográficas (grupo control).

Nuestros resultados indican que los valores de ECP y EDN en el suero de pacientes con helmintosis estaban significativamente elevados cuando se compararon con los obtenidos en el grupo control. Este hecho sugiere tanto el estado de activación de los eosinófilos (**244**) como la participación de ambas proteínas en la destrucción de los helmintos (**277, 278**). Específicamente, cuando se evaluó la concentración plasmática de EDN se observó la presencia de diferencias significativas entre los pacientes con todos los tipos de parasitosis (esquistosomosis, filariosis y geohelmintosis) y el grupo control. Sin embargo, sólo existían diferencias significativas entre el grupo de personas con geohelmintosis (constituido en su totalidad por uncinarias) y el resto de grupos. Estos datos son similares a los encontrados por otros autores, quienes observan niveles de ECP y EDN elevados en el suero de pacientes con diferentes infecciones parasitarias (oncocercosis, filariosis linfáticas, esquistosomosis, y geohelmintosis) y encuentran los máximos valores séricos de ECP en pacientes infectados por uncinarias (**279-281**). Además, existía una correlación positiva entre el número de eosinófilos en sangre y la concentración sérica de ECP y EDN en pacientes con helmintosis. Estos datos sugieren que los eosinófilos están involucrados en la eliminación de los parásitos en pacientes con helmintosis.

Otro aspecto de interés encontrado en nuestro trabajo es la ausencia de diferencias significativas en la medida de las concentraciones séricas de EDN cuando el diagnóstico se realizó por métodos directos o indirectos. Por ello, la elevación de EDN en suero es un

posible marcador de infección especialmente útil en aquellas helmintosis ocultas que solo son diagnosticadas mediante serología.

Estas proteínas también han sido detectadas por varios autores en otros líquidos biológicos como la orina, hecho que se explica por la presencia de eosinófilos en las vías urinarias de pacientes con algunas helmintosis, como por ejemplo en la esquistosomosis urinaria (**282**). Por ello, evaluamos la excreción en orina de ambas proteínas granulares, ECP y EDN. Nuestros resultados demuestran que los valores de ECP estaban significativamente incrementados en pacientes infectados por *Schistosoma haematobium* cuando se comparaban con el grupo control. Estos datos son similares a los observados por otros autores, que encuentran una elevación de la concentración urinaria de ECP en parasitosis urinarias en asociación con eosinofiluria, como es el caso de la infección por *Schistosoma haematobium* (**283, 284**) y, por tanto, se puede utilizar como marcador indirecto de infección (**285**). Sin embargo, detectamos niveles altos de EDN en orina de pacientes del grupo control, lo que demuestra que esta ribonucleasa no es liberada de manera específica por los eosinófilos, sino también por otras estirpes celulares (**286**), por lo que no resulta demasiado útil como marcador de eosinofiluria y tampoco, por tanto, de helmintosis.

El último objetivo de este Proyecto Doctoral fue el análisis de ***factores angiogénicos (específicamente VEGF) en pacientes con eosinofilia importada***. Para ello se midió la concentración sérica de VEGF en inmigrantes con eosinofilia y diagnóstico de helmintosis definida, comparándolo con pacientes sanos de las mismas áreas geográficas (grupo control). De forma global, los pacientes diagnosticados de helmintosis presentaban valores elevados significativos de VEGF en suero con respecto al grupo control. Cuando se estudió la relación entre los niveles de VEGF con el tipo de helmintosis, se observó una elevación significativa de esta molécula en los pacientes infectados por esquistosomas y filarias, pero no en geohelmintosis.

Los estudios sobre el papel de la angiogénesis en helmintosis son escasos y se limitan casi exclusivamente a esquistosomosis y filariosis. Nuestros resultados son análogos a los observados por otros autores, tanto en infecciones por esquistosomas (**287,288**) como por filarias (**289-291**). En ambas infecciones la angiogénesis parece jugar un papel importante en su patogenia. Así, en la esquistosomosis, el VEGF interviene en el

desarrollo de granulomas (**292**) y de fibrosis hepática, mientras que, por el contrario, en la cirrosis los niveles de VEGF están reducidos (**293**). En las filariosis la alteración de la angiogénesis se ha descrito en dos formas principales: formas linfáticas y oncocercosis. En las filariosis linfáticas el VEGF parece relacionado con una evolución más agresiva de la enfermedad (**290**), mientras que en la oncocercosis los factores angiogénicos intervienen en la formación de oncocercomas, estimulando el crecimiento de las células endoteliales linfáticas (**294**).

Por otro lado, el aumento de los niveles de VEGF solo es significativo en el caso del *S. haematobium*, no existiendo diferencias significativas entre *S. mansoni* y el grupo control. Este hecho puede tener relevancia patogénica, ya que VEGF desempeña un papel importante en la patogenia del cáncer de vejiga asociado a las infecciones por *S. haematobium*, tal como describen varios autores (**295-298**).

Finalmente, la correlación positiva entre los niveles de eosinófilos sanguíneos y la concentración sérica de VEGF sugieren que el origen de este factor angiogénico en las helmintosis son los eosinófilos. Otros trabajos corroboran el importante papel que parecen ejercer los eosinófilos en las enfermedades asociadas a la angiogénesis (**299, 300**).

6. Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

• La prevalencia de eosinofilia importada (absoluta o relativa) es muy elevada, especialmente en personas procedentes de África subsahariana.

• La infección helmíntica (geohelmintos, esquistosomas o filarias) es el agente principal de la eosinofilia absoluta en inmigrantes.

• La detección de eosinofilia relativa importada es frecuente y se asocia en un alto porcentaje a geohelmitosis o esquistosomosis.

• En las principales helmintosis importadas, el patrón de citocinas circulantes demuestra una elevación de IL-16, un descenso de eotaxina, con valores normales de RANTES y concentraciones variables de IL-13.

• La eosinofilia importada se asocia con la presencia de lesiones endomiocárdicas, principalmente mitrales, no relacionadas con el grado de la misma ni con el tipo de helminto responsable.

• En todas las helmintosis importadas existe una elevación de la concentración sérica de EDN (*eosinophil derived neurotoxine)* y en las geohelmintosis una elevación de ECP (*eosinophil cationic protein*), lo que sugiere la activación de los eosinófilos en estas entidades. Únicamente en las esquistosomosis urinarias existe un aumento significativo de ECP en orina.

• En las helmintosis sistémicas importadas con eosinofilia (esquistosomosis y filariosis) existe un aumento de la concentración sérica de VEGF (*vascular endotelial growth factor*), lo que sugiere su importancia patogénica en estas entidades.

7. Bibliografía

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Engl J Med* **1998**; 338: 1592-1600
2. Brigden ML. A practical workup for eosinophilia. You can investigate the most likely causes right in your office. *Postgrad Med* **1999**;105; 193-210
3. Keystone JS, Philpott J. Eosinophilia in travelers and immigrants. En *Strickland GT (ed) : Hunter´s Tropical Medicine* (7ª ed) Philadelphia, WB Saunders **1991**; 1038-1042
4. Leder K, Weller PF. Eosinophilia and helminthic infections. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* **2000**; 13:301-317
5. Maidment I, William C. Drug-induced eosinophilia. *Pharmac J* **2000**; 264: 71-76
6. Myers RP, McLaughlin K, Hollomby DJ. Acute interstitial nephritis due to omeprazole. *Am J Gastroenterol* **2001**;96:3428-31
7. Kanny G, Renaudin JM, Lecompte T, Moneret-Vautrin DA. Chloroquine hyper-sensitivity syndrome. *Eur J Intern Med* **2002**;13:75-76
8. Mathias S, Schaaf LW, Sonntag A. Eosinophilia associated with olanzapine. *J Clin Psychiatry* **2002** ; 63:246-7
9. Voutsadakis IA. Fludarabine-induced eosinophilia: case report. *Ann Hematol* **2002**; 81:292-3
10. Mofredj A, Boudjema H, Cadranel JF. Norfloxacin-induced eosinophilia in a cirrhotic patient. *Ann Pharmacother* **2002** ;36:1107-8
11. Vlahakis NE, Aksamit TR. Diagnosis and treatment of allergic broncho-pulmonary aspergillosis. *Mayo Clin Proc* **2001**;76:930-8
12. Conron M, Beynon HLC. Churg-Strauss syndrome. *Thorax* **2000**;55:870–877
13. Masi AT, Hunder GG, Lie JT, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Churg-Strauss syndrome (allergic granulomatosis and angiitis). *Arthritis Rheum* **1990**;33:1094–100.
14. Doyle JA, Ginsburg WW. Eosinophilic fasciitis. *Med Clin North Am* **1989**; 73: 1157-66.
15. Jederlinic PJ, Sicilian L, Gaensler EA. Chronic eosinophilic pneumonia. A report of 19 cases and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* **1988**; 67:154-62

16. Losa Garcia JE, Mateos Rodriguez F, de la Calle B, Rodriguez Encinas A, Sanchez Sanchez R, Perez Arellano JL. Neumonía eosinófila aguda en una gestante. *Arch Bronconeumol* **1997**; 33:306-8
17. Zhang JZ, Zhang CG, Chen JM. Thirty-five cases of Kimura's disease (eosinophilic lymphogranuloma). *Br J Dermatol* **1998** ;13:542-3
18. Seregard S. Angiolymphoid hyperplasia with eosinophilia should not be confused with Kimura's disease. *Acta Ophthalmol Scand* **2001**;79:91-3
19. Weiss G, Shemer A, Confino Y, Kaplan B, Trau H. Wells' syndrome: report of a case and review of the literature. *Int J Dermatol* **2001**;40:148-52
20. Chikama R, Hosokawa M, Miyazawa T, Miura R, Suzuki T, Tagami H Nonepisodic angioedema associated with eosinophilia: report of 4 cases and review of 33 young female patients reported in Japan. *Dermatology* **1998**;197:321-5
21. Butterfield JH, Leiferman KM, Gleich GJ. Nodules, eosinophilia, rheumatism, dermatitis and swelling (NERDS): a novel eosinophilic disorder. *Clin Exp Allergy* **1993**; 23:571-80
22. Mazanec DJ. Eosinophilic fasciitis and pernicious anemia with thyroid antibodies. *J Rheumatol* **1982**; 9:742-3
23. Remacha Tomey B, Palau A, Colom J, Ripolles V. Gastroenteritis eosinofilica. *An Med Interna* **1998** ;15:554-9
24. Walsh RE, Gaginella TS. The eosinophil in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* **1991**; 26:1217-24
25. Weller PF. Eosinophilic meningitis. *Am J Med* **1993**;95:250-3
26. Itano NM, Malek RS. Eosinophilic cystitis in adults. *J Urol* **2001**;165:805-7
27. Vanherweghem JL, Leon M, Goldman M, Lietar N, Gamar N, Thayse C. Membrane-related eosinophilia in hemodialysis. *Kidney Int Suppl* **1988**; 24:S73-4
28. Ejaz AA, Fitzpatrick PM, Durkin AJ, et al. Pathophysiology of peritoneal fluid eosinophilia in peritoneal dialysis patients. *Nephron* **1999**; 81:125-30
29. Grimbacher B, Holland SM, Gallin JI et al. Hyper-IgE syndrome with recurrent infections- an autosomal dominant multisystem disorder. *N Engl J Med* **1999**; 340: 692-702
30. Aleman K, Noordzij JG,de Groot R, van Dongen JJ, Hartwig NG. Reviewing Omenn syndrome. *Eur J Pediatr* **2001**;160:718-25

31. Samoszuk M. Eosinophils and human cancer. *Histol Histopathol* **1997**;12:807-12
32. Beishuizen A, Vermes I, Hylkema BS, Haanen C. Relative eosinophilia and functional adrenal insufficiency in critically ill patients. *Lancet* **1999**;353:1675-6
33. Thadhani RI, Camargo CA Jr, Xavier RJ, Fang LS, Bazari H. Atheroembolic renal failure after invasive procedures. Natural history based on 52 histologically proven cases. *Medicine (Baltimore)* **1995**;74:350-8
34. López Vélez R. Protocolo diagnóstico de las eosinofilias causadas por parásitos. *Medicine (Madrid)* **1998**; 7:3783-3786
35. Elcuaz R, Bolaños M, Guerra L, de Fuentes I, Lafarga B. Eosinofilia persistente y hallazgo parasitológico en un adulto. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **1998**; 16: 245-246
36. Fauci AS, Harley JB, Roberts WC et al. The idiopathic hypereosinophilic syndrome. Clinical, pathophysiologic and therapeutic considerations. *Ann Intern Med* **1982**; 97:78-92
37. Lin AY, Nutman TB, Kaslow D et al. Familial eosinophilia: clinical and laboratory results on a U.S. kindred. *Am J Med Genet* **1998**;76:229-237
38. Brito-Babapulle F. The eosinophilias including the idiopathic hypereosinophilic síndrome. *Br J Haematol* **2003**; 121:203-223
39. Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, et al. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med* **2003**; 348, 1201–1214.
40. Cohen AJ, Steigbigel RT. Eosinophilia in patients infected with human immuno-deficiency virus. *J Infect Dis* **1996**;174:615-8
41. Tietz A, Sponagel L, Erb P, Bucher H, Battegay M, Zimmerli W. Eosinophilia in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1997** ;16:675-7
42. Skiest DJ, Keiser P. Clinical significance of eosinophilia in HIV-infected individuals. *Am J Med* **1997**;102:449-53.
43. Claudio GA, Martin AF, de Dios Perrino S, Velasco AA. DRESS syndrome associated with nevirapine therapy.. *Arch Intern Med* **2001**;161:2501-2
44. Verdon R, Six M, Rousselot P, Bazin C. Efavirenz-induced acute eosinophilic hepatitis. *J Hepatol* **2001**;34:783-5

45. Patey O, Lacheheb A, Dellion S, Zanditenas D, Jungfer-Bouvier F, Lafaix C . A rare case of cotrimoxazole-induced eosinophilic aseptic meningitis in an HIV-infected patient. *Scand J Infect Dis* **1998**;30:530-1
46. Casado JL, Piedrola G. Adrenal insufficiency in patients with AIDS: when to suspect it and how to diagnose it. *AIDS Patient Care STDS* **1997**;11:339-43
47. Simpson-Dent S, Fearfield LA, Staughton RC. HIV associated eosinophilic folliculitis--differential diagnosis and management. *Sex Transm Infect* **1999**; 75: 291-3
48. Harley WB, Blaser MJ. Disseminated coccidioidomycosis associated with extreme eosinophilia. *Clin Infect Dis* **1994**;18:627-9
49. DeHovitz JA, Pape JW, Boncy M et al. Clinical manifestations and therapy of *Isospora belli* infection in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* **1986**; 315: 87-90
50. Cuffari C, Oligny L, Seidman EC. *Dientamoeba fragilis* masquerading as allergic colitis. *J Pediatr Gatroenterol Nutr* **1998**; 26:16-20
51. van der Enden E, Praet M, Joos R et al. Eosinophilic myositis resulting from sarcocystosis. *J Trop Med Hyg* **1995**; 98:273-276
52. Zaki M, Daoud AS, Pugh RN, al-Ali F, al-Mutairi G, al-Saleh Q. Clinical report of *Blastocystis hominis* infection in children. *J Trop Med Hyg* **1991**;94:118-22
53. Wilson ME, Weller PF. Eosinophilia. En *Guerrant RL, Walker DH, Weller PF (eds): Tropical infectious diseases. Principles, pathogens and practice* (1ª ed) Philadelphia, Churchill Livingstone **1999**; 1400-1419
54. Sato YJ, Kobayashi J, Toma H, Shiroma Y. Efficacy of stool examination for detection of *Strongyloides* infection. *Am J Trop Med Hyg* **1995**; 53:248-250
55. Sanford CE, Jong EC. The eosinophilic patient with suspected parasitic infection. En: *Jong EC, McMullen R. The travel and tropical medicine manual.* 5ª ed. WB Saunders **2003**: 592-603
56. Wolfe MS. Eosinophilia in the returning traveler. *Med Clin North Am* **1999**; 83: 1019-32
57. Libman MD, McLean JD, Gyorkos TW. Screening for schistosomosis, filariasis and strongyloidiasis among expatriates returning from the tropics. *Clin Infect Dis* **1993**; 17:353-359

58. Nutman TB, Ottesen EA, Ieng S, et al. Eosinophilia in Southeast Asian refugees: Evaluation at a referal center. *J Infect Dis* **1987**; 155:309-312
59. Milder J, Walzer P, Kilgore D, Rutheford I, Klein M. Clinical features of *Strongyloides stercoralis* in a endemic area of the United States. *Gastroenterology* **1981**; 80:1481-1488
60. Liu LX, Weller PW. Antiparasitic drugs. *N Engl J Med* **1996**;334:1178-1184
61. de Silva N, Guyatt H, Bundy D. Anthelmintics. A comparative review of their clinical pharmacology. *Drugs.* **1997**;53:769-88.
62. Stephenson I, Wiselka M. Drug treatment of tropical parasitic infections: recent achievements and developments. *Drugs*. **2000** ;60:985-95.
63. Pérez-Arellano JL, Hernández-Cabrera M, Pisos-Álamo E, Carranza-Rodriguez C, Castillo-de Vera M, Aparicio-Azcárraga P. Tratamiento de las enfermedades parasitarias (I): Protozoosis. *Inf Ter Sist Nac Salud* **2007**; 31: 3-16
64. Pérez-Arellano JL, Pisos-Álamo E, Castillo-de Vera M, Hernández-Cabrera M, Carranza-Rodriguez C, Aparicio-Azcárraga P. Tratamiento de las enfermedades parasitarias (II): Helmintosis y Ectoparasitosis. *Inf Ter Sist Nac Salud* **2007**;31: 55-64
65. Pérez Arellano JL, Carranza Rodríguez C, Mateos Rodríguez F. Anti-parasitarios. Revisión de los fármacos útiles en el tratamiento de parasitosis clásicas y emergentes. *Rev Esp Quimioter* **2009**;22:93-105
66. Venkatesan. Albendazole. *J Antimicrob Chemother* **1998**; 41,145–147
67. Luchi S, Vincenti A, Messina F, Parenti M, Scasso A, Campatelli A. Albendazole treatment of human hydatid tissue. *Scand J Infect Dis* **1997**; 29, 165–7.
68. Carpio A. Neurocysticercosis: un update. *Lancet Infect Dis* **2002**; 2: 751–62
69. García HH, Evans CAW, Nash TE et al. Current consensus guidelines for treatment of neurocysticercosis. *Clin Microbiol Rev* **2002**; 15: 747–756
70. Cowden J, Hotez P. Mebendazole and albendazole treatment of geohelminth infections in children and pregnant women. *Pediatr Infect Dis J* **2000**;19: 659–660.
71. Pawlowski Z. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. *J Helminthol* **2001** ;75:299-305.
72. Capo V, Despommier DD. Clinical aspects of infection with *Trichinella* spp. *Clin Microbiol Rev* **1996** ;9:47-54.

73. Caumes E. Treatment of Cutaneous Larva Migrans. *Clin Infect Dis* **2000**; 30: 811–14
74. Melrose WD. Lymphatic filariasis: new insights into an old disease. *Int J Parasitol* **2002** ;32:947-60.
75. Hoerauf A, Buttner DW, Adjei O, Pearlman E. Onchocerciasis. *BMJ* **2003**; 326:207-10.
76. Ottesen EA, Campbell WC. Ivermectin in human medicine. *J Antimicrob Chemother* **1994**;34:195-203.
77. Zaha O, Hirata T, Kinjo F, Saito A. Strongyloidiasis. Progress in diagnosis and treatment. *Intern Med*. 2000 ;39:695-700.
78. Arjona R, Riancho JA, Aguado JM, Salesa R, Gonzalez-Macias J. Fascioliasis in developed countries: a review of classic and aberrant forms of the disease. *Medicine (Baltimore)*. **1995** ;74:13-23
79. Moliner S, Chaudier B, Kraemer P et al. Diagnostic and treatment of hypereosinophilia upon return from the tropics; 102 patients. *Medecine Tropicale: Revue Du Corps de Sante Colonial* **1998**; 58: 499–502.
80. Schwartz RS. The hypereosinophilic síndrome and the biology of cancer. *N Engl J Med* **2003**; 348:1199-1200
81. Bockenstedt, PL, Santinga, JT, Bolling, SF. Alpha-interferon treatment for idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Am J Hematol* **1994**; 45:248-251
82. Canonica, GW, Passalacqua, G, Pronzato, C, et al. Effective long-term alpha-interferon treatment for hypereosinophilic syndrome. *J Allergy Clin Immunol* **1995**; 96:131-133
83. Nadarajah S, Krafchik B, Roifman C, Horgan-Bell C. Treatment of hypereosinophilic syndrome in a child using cyclosporine: Implication for a primary T-cell abnormality. *Pediatrics* **1997**; 99: 630-636
84. Esteva-Lorenzo, FJ, Meehan, KR, Spitzer, TR, Mazumder, A. Allogeneic bone marrow transplantation in a patient with hypereosinophilic syndrome. *Am J Hematol* **1996**; 51:164-165
85. Sigmund, DA, Flessa, HC. Hypereosinophilic syndrome: Successful allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* **1995**; 15:647-648

86. Fukushima, T, Kuriyama, K, Ito, H, et al. Successful bone marrow transplantation for idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Br J Haematol* **1995**; 90: 213-215
87. Giembycz MA, Lindsay MA. Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacol Rev* **1999**; 51: 213-339
88. Rothemberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol* **2006**. 24:147–74
89. Chihara J, Nakajima S.Induction of hypodense eosinophils and nuclear hypersegmentation of eosinophils by various chemotactic factors and lymphokines in vitro. *Allergy Proc* **1989** ;10:27-32
90. Nutman TB. Evaluation and differential diagnosis of marked, persistent eosinophilia. *Immunol Allergy Clin North Am* **2007**; 27: 529–549.
91. http://mpr.nci.nih.gov/prow/
92. Boyce JA, Friend D, Matsumoto R, Austen KF, Owen WF. Differentiation in vitro of hybrid eosinophil/basophil granulocytes: autocrine function of an eosinophil developmental intermediate. *J Exp Med* **1995** 182:49–57
93. Yu C, Cantor AB, Yang H, Browne C, Wells RA, Fujiwara Y,Orkin SH. Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. *J Exp Med* **2002**; 195:1387–95
94. Behm CA, Ovington KS. The role of eosinophils in parasitic helminth infections: Insights from genetically modified mice. *Parasitol Today* **2000**; 16: 202-209
95. Broide D, Sriramao P. Eosinophil trafficking to sites of allergic inflammation. *Immunol Rev* **2001**; 179:163-172
96. Bochner BS, Schleimer RP. Mast cells, basophils, and eosinophils: distinct but overlapping pathways for recruitment. *Immunol Rev* **2001**;179: 5–15
97. Bochud PY, Bochud M, Telenti A, Calandra T. Innate immunogenetics: a tool for exploring new frontiers of host defence. *Lancet Infect Dis* **2007**; 7:531–42
98. Wong CK, Cheung PF, Ip WK, Lam CW. Intracellular signaling mechanisms regulating toll-like receptor-mediated activation of eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2007**;37:85-96
99. Padigel UM, Lee JJ, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. Eosinophils can function as antigen-presenting cells to induce primary and secondary immune responses to *Strongyloides stercoralis*. *Infect Immun* **2006** ;74:3232-8

100. Throsby M, Herbelin A, Pleau JM, Dardenne M. CD11c+ eosinophils in the murine thymus: developmental regulation and recruitment upon MHC class I-restricted thymocyte deletion. *J Immunol* **2000**; 165:1965–75

101. Odemuyiwa SO, Ghahary A, Li Y, Puttagunta L, Lee JE, et al. Human eosinophils regulate T cell subset selection through indoleamine 2,3-dioxyenase. *J Immunol* **2004**; 173:5909–13

102. Zhang J, Lathbury LJ, Salamonsen LA. Expression of the chemokine eotaxin and its receptor, CCR3, in human endometrium. *Biol Reprod* **2000**; 62:404–11

103. Gouon-Evans V, Lin EY, Pollard JW. Requirement of macrophages and eosinophils and their cytokines/chemokines for mammary gland development. *Breast Cancer Res* **2002**; 4:155–64

104. Campbell HD, Tucker WQ, Hort Y, Martinson ME, Mayo G, Clutterbuck EJ, Sanderson CJ, Young IG. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene encoding human eosinophil differentiation factor (interleukin 5). *Proc Natl Acad Sci USA* **1987**;84:6629-33

105. Sanderson CJ.Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* **1992**;79:3101-9

106. van Leeuwen BH, Martinson ME, Webb GC, Young IG. Molecular organization of the cytokine gene cluster, involving the human IL-3, IL-4, IL-5, and GM-CSF genes, on human chromosome 5. *Blood* **1989**; 73:1142-1148.

107. Geijsen N,Koenderman L, Coffer PJ. Specificity in cytokine signal trans-duction: lessons learned from the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family. *Cytokine Growth Factor Rev* **2001**;12:19-25.

108. Martinez-Moczygemba M, Huston DP. Biology of common beta receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF. *J Allergy Clin Immunol* **2003**; 112: 653-665.

109. Yoshimura-Uchiyama C, Yamaguchi M, Nagase H, Fujisawa T, Ra C, Matsushima K, Iwata T, Igarashi T, Yamamoto K, Hirai K. Comparative effects of basophil-directed growth factors. *Biochem Biophys Res Commun* **2003**; 302: 201-6.

110. Miura K, Saini SS, Gauvreau G, MacGlashan DW Jr. Differences in functional consequences and signal transduction induced by IL-3, IL-5, and nerve growth factor in human basophils. *J Immunol* **2001**;167:2282-91.

111. Lie WJ, Mul FP, Roos D, Verhoeven AJ, Knol EF. Degranulation of human basophils by picomolar concentrations of IL-3, IL-5, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Allergy Clin Immunol* **1998** ;101:683-90
112. Robinson DS.Th-2 cytokines in allergic disease. *Br Med Bull* **2000**;56:956-68.
113. Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Rossi AG, Jose PJ, Williams TJ. The chemokine, eotaxin, activates guinea-pig eosinophils *in vitro*, and causes their accumulation into the lung *in vivo. Biochem Biophys Res Commun* **1993**; 197, 1167–1172
114. Jose PJ, Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Walsh DT, Mogbel R, Totty NF, Truong O, Hsuan JJ, Williams TJ. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea-pig model of allergic airways inflammation *J Exp Med* **1994**; 179, 881–887
115. Conroy DM, Williams TJ.Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung. *Respir Res* **2001**;2:150-6
116. Rankin SM, Conroy DM, Williams TJ. Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease. *Mol Med Today* **2000** ;6:20-7
117. Rothenberg ME. Eotaxin. An essential mediator of eosinophil trafficking into mucosal tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol* **1999**;21:291-5
118. MacLean JA, Ownbey R, Luster AD. T cell-dependent regulation of eotaxin in antigen-induced pulmonary eosinophila. *J Exp Med* **1996**;184:1461-9
119. Baggiolini M. Reflections on chemokines. *Immunol Rev* **2000** ;177:5-7
120. Crump MP, Rajarathnam K,Kim KS,Clark-Lewis I,Sykes BD. Structure of eotaxin, a chemokine that selectively recruits eosinophils in allergic inflammation. *J Biol Chem* **1998**;273: 22471–22479
121. Costa GG, Silva RM, Franco-Penteado CF, Antunes E, Ferreira HH.Interactions between eotaxin and interleukin-5 in the chemotaxis of primed and non-primed human eosinophils. *Eur J Pharmacol* **2007**;566:200-5
122. Honda K,Chihara J. Eosinophil activation by eotaxin--eotaxin primes the production of reactive oxygen species from eosinophils. *Allergy* **1999**;54:1262-9.
123. Hershey GK. IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. *J Allergy Clin Immunol* **2003**;111:677-90
124. Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol* **2003**; 21:425–56

125. Cruikshank WW, Kornfeld H, Center DM. Interleukin-16. *J Leukoc Biol* **2000**; 67: 757-66.

126. Center DM, Kornfeld H, Cruikshank WW. Interleukin-16. *Int J Biochem Cell Biol* **1997**; 29:1231-4.

127. Schall TJ, Jongstra J, Dyer BJ, Jorgensen J, Clayberger C, Davis MM, Krensky AM. A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *J Immunol* **1988**;141:1018-25.

128. Rollins BJ. Chemokines. *Blood* **1997**; 90:909–28

129. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* **2000**; 18:217-242

130. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: An update. *Annu Rev Immunol* **1997**; 15:675–705

131. Donlon TA, Krensky AM, Wallace MR, Collins FS, Lovett M, Clayberger C. Localization of a human T-cell-specific gene, CCL5 (D17S136E), to chromosome 17q11.2-q12. *Genomics* **1990**; 5: 548-553

132. Appay V, Rowland-Jones SL. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol* **2001**; 22: 83-87

133. Dairaghi DJ, Soo KS, Oldham ER, Premack BA, Kitamura T, Bacon KB, Schall TJ. RANTES-induced T cell activation correlates with CD3 expression. *J Immunol* **1998**;160:426-33

134. Foster PS. Allergic networks regulating eosinophilia. *Am J Respir Cell Mol Biol* **1999**; 21,451–454

135. Foster PS, Mould AW, Yang M, Mackenzie J, Mattes J, Hogan SP, Mahalingam S, Mckenzie AN, Rothenberg ME, Young IG, Matthaei KI, Webb DC. Elemental signals regulating eosinophil accumulation in the lung. *Immunol Rev* **2001**;179:173-81

136. Lampinen M,Carlson M,Håkansson LD, Venge P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy* **2004**;59:793-805

137. Isogai S, Miyata S, Taha R, Yoshizawa Y, Martin JG, Hamid Q. CD4+ T cells migrate from airway to bone marrow after antigen inhalation in rats. *J Allergy Clin Immunol* **2004**;113:455-61

138. Sterk PJ, Hiemstra PS. Eosinophil progenitors in sputum: throwing out the baby with the bath water?. *Am J Respir Crit Care Med* **2004**;169:549-50.
139. Simon HU, Blaser K. Inhibition of programmed eosinophil death: a key pathogenic event for eosinophilia?. *Immunol Today* **1995**; 16: 53-55
140. Simon HU. Regulation of eosinophils and neutrophil apoptosis. Similarities and differences. *Immunol Rev* **2001**; 179: 156-162
141. Simon HU. Eosinophil apoptosis. Pathophysiologic and therapeutic implica-tions. *Allergy* **2000**; 55:910-915
142. Zangrilli JG. Regulation of eosinophil variability by cytokines. *Am J Resp Cell Mol Biol* **2002**; 26: 388-390
143. Walsh GM. Eosinophil apoptosis: Mechanisms and clinical relevance in asthmatic and allergic inflammation. *Br J Haematol* **2000**; 111:61-67
144. Shinagawa K, Trifilieff A, Anderson GP. Involvement of CCR3-reactive chemokines in eosinophil survival. *Int Arch Allergy Immunol* **2003**;130:150-7
145. Venge P, Byström J, Carlson M, Hâkansson L, Karawacjzyk M, Peterson C, Sevéus L,Trulson A. Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. *Clin Exp Allergy* **1999**; 29:1172-86.
146. Venge P, Byström J. Eosinophil cationic protein (ECP). *Int J Biochem Cell Biol* **1998**; 30:433-7.
147. Eriksson J, Reimert CM, Kabatereine NB, Kazibwe F, Ireri E, Kadzo H, Eltahir HB, Mohamed AO, Vennervald BJ, Venge P. The 434(G>C) polymorphism within the coding sequence of Eosinophil Cationic Protein (ECP) correlates with the natural course of *Schistosoma mansoni* infection. *Int J Parasitol* **2007**; 37: 1359-66.
148. Trulson A, Byström J, Engström A, Larsson R, Venge P. The functional heterogeneity of eosinophil cationic protein is determined by a gene polymorphism and post-translational modifications. *Clin Exp Allergy* **2007**; 37:208-18
149. Noguchi E, Iwama A, Takeda K, Takeda T, Kamioka M, Ichikawa K, Akiba T, Arinami T, Shibasaki M. The promoter polymorphism in the eosinophil cationic protein gene and its influence on the serum eosinophil cationic protein level. *Am J Respir Crit Care Med* **2003**;167:180-4.

150. Kim YJ, Kumaraswami V, Choi E, Mu J, Follmann DA, Zimmerman P, Nutman TB. Genetic polymorphisms of eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein in tropical pulmonary eosinophilia. *Am J Trop Med Hyg* **2005** ;73:125-30.

151. Rosenberg HF, Domachowske JB. Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. *J Leukoc Biol* **2001**;70:691-8.

152. Hohlfeld JM, Schmiedl A, Erpenbeck VJ, Venge P, Krug N. Eosinophil cationic protein alters pulmonary surfactant structure and function in asthma. *J Allergy Clin Immunol* **2004**;113:496-502.

153. Boomars KA, van Velzen-Blad H, Mulder PG, Koenderman L, Lammers JW, van den Bosch JM. Eosinophil cationic protein and immunoglobulin levels in bronchoalveolar lavage fluid obtained from patients with chronic eosinophilic pneumonia. *Eur Respir J* **1996** ;9:2488-93.

154. Metso T, Venge P, Haahtela T, Peterson CGB, Sevéus L. Cell specific markers for eosinophils and neutrophils in sputum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with respiratory conditions and healthy subjects. *Thorax* **2002**; 57; 449-451

155. Schmekel B, Hörnblad Y, Hvatum M, Norlund AL, Venge P. Kinetic retrieval of eosinophil cationic protein, hyaluronan, secretory IgA, albumin, and urea during BAL in healthy subjects. *Chest* **1995** ;108:62-7.

156. Koller DY. Sampling methods. *Am J Respir Crit Care Med* **2000**; 162 (supl) S31–S33

157. Durack DT, Ackerman SJ, Loegering DA, Gleich GJ. Purification of human eosinophil-derived neurotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* **1981**; 78: 5165-5169.

158. Rosenberg HF, Tenen DG, Ackerman SJ. Molecular cloning of human eosinophil-derived neurotoxin: a member of the ribonuclease gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* **1989**; 86:4460-4464.

159. Mosimann SC, Newton DL, Youle RJ, James MN. X-ray crystallographic structure of recombinant eosinophil-derived neurotoxin at 1.83 A resolution. *J Mol Biol* **1996**;26:540-552.

160. Gleich GJ, Loegering DA, Bell MP, Checkel JL, Ackerman SJ, McKean DJ. Biochemical and functional similarities between human eosinophil-derived

neurotoxin and eosinophil cationic protein: homology with ribonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA* **1986** ;83:3146-50.

161. Peterson CG, Venge P. Purification and characterization of a new cationic protein--eosinophil protein-X (EPX)--from granules of human eosinophils. *Immunology* **1983** ;50:19-26.
162. Newton DL, Rybak SM. Unique recombinant human ribonuclease and inhibition of Kaposi's sarcoma cell growth. *J Natl Cancer Inst* **1998**;90:1787-1791.
163. Wang HY, Chang HT, Pai TW, Wu CI, Lee YH, Chang YH, Tai HL, Tang CY, Chou WY, Chang MD. Transcriptional regulation of human eosinophil RNases by an evolutionary- conserved sequence motif in primate genome.BMC Mol Biol. **2007** Oct 11;8:89.
164. Walsh GM. Advances in the immunobiology of eosinophils and their role in disease. Crit Rev Clin Lab Sci. **1999** Oct;36(5):453-96.
165. Ackerman SJ, Gleich GJ, Loegering DA, Richardson BA, Butterworth AE. Comparative toxicity of purified human eosinophil granule cationic proteins for schistosomula of *Schistosoma mansoni*. Am J Trop Med Hyg. **1985**; 34(4):735-45.Click here to read Links
166. Yang D, Rosenberg HF, Chen Q, Dyer KD, Kurosaka K, Oppenheim JJ. Eosinophil-derived neurotoxin (EDN), an antimicrobial protein with chemotactic activities for dendritic cells. Blood. **2003**;102(9):3396-403
167. Yang D, Chen Q, Rosenberg HF, Rybak SM, Newton DL, Wang ZY, Fu Q, Tchernev VT, Wang M, Schweitzer B, Kingsmore SF, Patel DD, Oppenheim JJ, Howard OM. Human ribonuclease A superfamily members, eosinophil-derived neurotoxin and pancreatic ribonuclease, induce dendritic cell maturation and activation. J Immunol. **2004** Nov 15;173(10):6134-42.
168. Yang D, Chen Q, Su SB, Zhang P, Kurosaka K, Caspi RR, Michalek SM, Rosenberg HF, Zhang N, Oppenheim JJ. Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses. J Exp Med. **2008**;205(1):79-90
169. Weiler JM, Edens RE, Bell CS, Gleich GJ. Eosinophil granule cationic proteins regulate the classical pathway of complement. Immunology. **1995** Feb;84(2):213-9.

170. Lundgren JD, Davey RT Jr, Lundgren B, Mullol J, Marom Z, Logun C, Baraniuk J, Kaliner MA, Shelhamer JH. Eosinophil cationic protein stimulates and major basic protein inhibits airway mucus secretion. J Allergy Clin Immunol. **1991**;87(3):689-98.
171. Patella V, de Crescenzo G, Marino I, Genovese A, Adt M, Gleich GJ, Marone G. Eosinophil granule proteins are selective activators of human heart mast cells. Int Arch Allergy Immunol. **1997**;113(1-3):200-2
172. Horiuchi T, Weller PF. Expression of vascular endothelial growth factor by human eosinophils: upregulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5. Am J Respir Cell Mol Biol. **1997**;17:70-7.
173. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. Science. **1983** Feb 25;219(4587):983-5.
174. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science. **1989**; 246(4935):1306-9.
175. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. Cell Struct Funct. **2001** ;26(1):25-35
176. Ribatti D. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. Br J Haematol. **2005** Feb;128(3):303-9.
177. Otrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. Blood Cells Mol Dis. **2007**; 38(3):258-68.
178. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. N Engl J Med. **2008**; 358(19): 2039-49.
179. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-2: its unique signaling and specific ligand, VEGF-E. Cancer Sci. **2003** ;94(9):751-6.
180. Tokunaga Y, Yamazaki Y, Morita T. Specific distribution of VEGF-F in Viperinae snake venoms: isolation and characterization of a VGEF-F from the venom of Daboia russelli siamensis. Arch Biochem Biophys. **2005** Jul 15;439(2):241-7.
181. Ladomery MR, Harper SJ, Bates DO. Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm. Cancer Lett. **2007** ;249(2):133-42.

182. Zachary I, G. Gliki G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family, Cardiovasc Res **2001**;49: 568–581.
183. Klagsbrun M, Takashima S, Mamluk R. The role of neuropilin in vascular and tumor biology. Adv Exp Med Biol. **2002**;515:33-48.
184. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB J. **1999**;13(1):9-22.
185. Liao D, Johnson RS. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. Cancer Metastasis Rev. **2007**;26(2):281-90
186. Dantz D, Bewersdorf J, Fruehwald-Schultes B, Kern W, Jelkmann W, Born J, Fehm HL, Peters A.Vascular endothelial growth factor: a novel endocrine defensive response to hypoglycemia. J Clin Endocrinol Metab. **2002**; 87(2): 835-40.
187. Hyder SM, Stancel GM. Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins. Mol Endocrinol. **1999**;13(6):806-11.
188. Brauchle M, Funk JO, Kind P, Werner S. Ultraviolet B and H2O2 are potent inducers of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. . J Biol Chem. **1996** ;271(36):21793-7.
189. Chin K, Kurashima Y, Ogura T, Tajiri H, Yoshida S, Esumi H. Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. Oncogene. **1997** ;15(4):437-42.
190. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell **2000**; 103:211-25.
191. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature **2000**; 407:249-57.
192. Carvalho J, Blank M, Shoenfeld Y, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Autoimmune Diseases. J Clin Immunol **2007**; 27: 246-256
193. Crawford TN, Alfaro DV, Kerrison JB, Jablon EP. Diabetic retinopathy and angiogenesis. Curr Diabetes Rev **2009**; 5: 8-13.
194. Nishi J, Maruyama I. Increased expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in Castleman's disease: proposed pathomechanism of vascular proliferation in the affected lymph node. Leuk Lymphoma **2000**;38:387-94

195. Bressler SB. Understanding the role of angiogenesis and antiangiogenic agents in age-related macular degeneration. Ophthalmology **2009**;116 (10 Suppl):S1-7

196. Carmeliet P, Storkebaum E. Vascular and neuronal effects of VEGF in the nervous system: implications for neurological disorders. Semin Cell Dev Biol **2002**; 13:39-53

197. Richter AG, Maughan EO, Perkins GD, Nathani N, Thickett DR. VEGF levels in pulmonary fibrosis. Thorax **2005**; 60:171

198. Foster RR. The importance of cellular VEGF bioactivity in the development of glomerular disease. Nephron Exp Nephrol. **2009**;113(1):e8-e15.

199. Jacobsen EA, Helmers RA, Lee JJ, Lee NA. The expanding role(s) of eosinophils in health and disease. Blood. **2012** Nov 8;120(19):3882-90.

200. Furuta GT, Atkins FD, Lee NA, Lee JJ. Changing roles of eosinophils in health and disease. Ann Allergy Asthma Immunol. **2014** Jul;113(1):3-8.

201. Meusen ENT, Balic A. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites?. Parasitol Today **2000**; 16: 95-101

202. O'Connell AE, Hess JA, Santiago GA, Nolan TJ, Lok JB, Lee JJ, Abraham D. Major basic protein from eosinophils and myeloperoxidase from neutrophils are required for protective immunity to Strongyloides stercoralis in mice. Infect Immun. **2011** Jul;79(7):2770-8.

203. McCormick ML, Metwali A, Railsback MA, Weinstock JV, Britigan BE. Eosinophils from schistosome-induced hepatic granulomas produce superoxide and hydroxyl radical. J Immunol. **1996** Dec 1;157(11):5009-15.

204. Humbles AA, Lloyd CM, McMillan SJ, Friend DS, Xanthou G, McKenna EE, Ghiran S, Gerard NP, Yu C, Orkin SH, Gerard C. A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. Science. **2004** Sep 17;305(5691):1776-9.

205. Lee JB, Matsumoto T, Shin YO, Yang HM, Min YK, Timothy O, Bae SJ, Quan FS. The role of RANTES in a murine model of food allergy. Immunol Invest. **2004** Feb;33(1):27-38.

206. Swartz JM[1], Dyer KD, Cheever AW, Ramalingam T, Pesnicak L, Domachowske JB, Lee JJ, Lee NA, Foster PS, Wynn TA, Rosenberg HF. Schistosoma mansoni infection in eosinophil lineage-ablated mice. Blood. **2006** Oct 1;108(7):2420-7.

207. Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF Jr, Stadecker MJ, Gause WC. Protective immune mechanisms in helminth infection. Nat Rev Immunol. **2007** Dec;7(12):975-87.

208. Fabre V, Beiting DP, Bliss SK, Gebreselassie NG, Gagliardo LF, Lee NA, Lee JJ, Appleton JA.J Eosinophil deficiency compromises parasite survival in chronic nematode infection. Immunol. **2009** Feb 1;182(3):1577-83.

209. Gebreselassie NG, Moorhead AR, Fabre V, Gagliardo LF, Lee NA, Lee JJ, Appleton JA. J Eosinophils preserve parasitic nematode larvae by regulating local immunity. Immunol. **2012** Jan 1;188(1):417-25.

210. Austen KF. Homeostasis of effector systems which can also be recruited for immunologic reactions. J Immunol. **1978** Sep;121(3):793-805.

211. Stolarski B, Kurowska-Stolarska M, Kewin P, Xu D, Liew FY. IL-33 exacerbates eosinophil-mediated airway inflammation. J Immunol. **2010** Sep 15;185(6):3472-80.

212. Shinkai K, Mohrs M, Locksley RM. Helper T cells regulate type-2 innate immunity in vivo.Nature. **2002**;420:825–829.

213. Helmby H[1]. Helminths and our immune system: friend or foe? Parasitol Int. **2009** Jun;58(2):121-7.

214. Touze JE, Fourcade L, Heno P, Mafart B, Mourot S. [The heart and the eosinophil]. Med Trop (Mars). **1998**;58(4 Suppl):459-64.

215. Rutakingirwa M, Ziegler JL, Newton R, Freers J. Poverty and eosinophilia are risk factors for endomyocardial fibrosis (EMF) in Uganda. Trop Med Int Health **1999**; 4:229-235

216. Andy JJ, Ogunowo PO, Akpan NA, Odigwe CO, Ekanem IA, Esin RA. Helminth associated hypereosinophilia and tropical endomyocardial fibrosis (EMF) in Nigeria. Acta Trop **1998**; 69:127-140

217. Paolocci N, Sironi M, Bettini M, et al. Immunopathological mechanisms underlying the time-course of *Trichinella spiralis* cardiomyopathy in rats. *Virchows Arch* **1998**; 432: 261-266

218. Arima M, Kanoh T. Eosinophilic myocarditis associated with dense deposits of eosinophil cationic protein (ECP) in endomyocardium with high serum ECP. *Heart* **1999**; 81: 669-671

219. Pardo J, Carranza C, Turrientes MC, Pérez Arellano JL, Lopez Velez R, Ramajo V, Muro A. Utility Of Schistosoma Bovis adult worm antigens for diagnosis of human schistosomiasis by enzyme-linked immunosorbent assay and electroimmunotransfer blot techniques. Clin Diagn Lab Immunol **2004**;11(6):1165–70.

220. Pardo J, Pérez Arellano JL, Lopez-Velez R, Carranza C, Cordero M, Muro A. Application Of an ELISA Test using *Schistosoma bovis* adult worm antigens in travellers and immigrants from a schistosomiasis endemic area and its correlation with clinical findings. Scand J Infect Dis **2007**;39(5):435–40.

221. Gobierno central. Boletín oficial de las cortes

222. de la Morena Fernández J, Valero Garcés C. Comunicación médica con la población inmigrante sin fluidez en la lengua de contacto. Rev Clin Esp **2005**;205(6):287-9.

223. Martín Laso M. El paciente inmigrante en atención primaria. ¿Estamos preparados? Aten Primaria **2001**;28(2):89-90.

224. García Galan, Rafael (coordinador). Manual de atención sanitaria a inmigrantes: gúia para profesionales de la salud. Consejeria de Salud **2007**

225. Harries AD, Myers B, Bhattacharrya D Eosinophilia in Caucasians returning from the tropics. Trans R Soc Trop Med Hyg. **1986**;80:327–8

226. Whitty CJ, Carroll B, Armstrong M, Dow C, Snashall D, Marshall T, Chiodini PL. Utility of history, examination and laboratory tests in screening those returning to Europe from the tropics for parasitic infection. Trop Med Int Health. 2000;5:818-23.

227. Schulte C, Krebs B, Jelinek T, Nothdurft HD, von Sonnenburg F, Loscher T Diagnostic significance of blood eosinophilia in returning travelers. Clin Infect Dis. **2002**;34:407–11

228. Whetham J, Day JN, Armstrong M, Chiodini PL, Whitty CJ Investigation of tropical eosinophilia; assessing a strategy based on geographical area. J Infect. **2003**;46:180–5

229. Lopez-Velez R, Huerga H, Turrientes MC Infectious diseases in immigrants from the perspective of a tropical medicine referral unit. Am J Trop Med Hyg. **2003**;69:115–21

230. Seybolt LM, Christiansen D, Barnett ED Diagnostic evaluation of newly arrived asymptomatic refugees with eosinophilia. Clin Infect Dis. **2006**;42:363–7
231. Caruana SR, Kelly HA, Ngeow JY, et al. Undiagnosed and potentially lethal parasite infections among immigrants and refugees in Australia. J Travel Med **2006**;13:233-9.
232. Pardo J, Carranza C, Muro A, Angel-Moreno A, Martín AM, Martín T et al. Helminth-related Eosinophilia in African immigrants, Gran Canaria. Emerg Infect Dis **2006**;12:1587-9.
233. Meltzer E, Percik R, Shatzkes J, Sidi Y, Schwartz E. Eosinophilia among returning travelers: a practical approach. Am J Trop Med Hyg. **2008**;78:702-9.
234. Díaz-Menéndez M, Pérez-Molina JA, Serre N, Treviño B, Torrús D, Matarranz M, Martín E, Rojo-Marcos G, Aguilera P, Rico A, Suárez-García I, López-Vélez R. Imported diseases by immigrants and travellers: Results from the Cooperative Network for the study of Imported Diseases by Immigrants and Travellers +Redivi. Enferm Infecc Microbiol Clin. **2012**;30(9):528-34
235. Barnett ED, Weld LH, McCarthy AE, So H, Walker PF, Stauffer W, Cetron M. Spectrum of illness in international migrants seen at GeoSentinel clinics in 1997–2009, part 1: US-bound migrants evaluated by comprehensive protocol-based health assessment. Clin. Infect. Dis. **2013**;56:913-924.
236. Salas-Coronas J, Cabezas-Fernández T, Vázquez-Villegas J, Soriano-Pérez MJ, Lozano-Serrano AB, Cabeza-Barrera MI, Pérez-Camacho I, Cobo F. Evaluation of eosinophilia in immigrants in Southern Spain using tailored screening and treatment protocols: a prospective study. Trav Med Inf Dis. **2015** Jul-Aug;13(4):315-21
237. Rothenberg ME. Eosinophilia. N Eng J Med **1998**;338:1592-600
238. Brigden ML. A pratical workup for eosinophilia. You can investigate the most likely causes right in your office. Postgrad Med **1999**;105:193-210
239. Carranza Rodríguez C, Pardo-Lledias J, Muro Alvarez A, Pérez-Arellano JL. Cryptic Parasite Infection in Recent West African Immigrants with Relative Eosinophilia. Clin Infect Dis **2008**;46(6):e48–e50.
240. Mas J, Sima A, Untoria D, Post R, Limiñana C, Ncogo PR et al. Onchocerciasis and its control in Equatorial Guinea: 1990-1996. Res Rev Parasitol **1996**;56:147-

155.

241. Belhassen-García M, Pardo-Lledías J, Pérez del Villar L, Muro A, Velasco-Tirado V, Blázquez de Castro A et al. Relevance of Eosinophilia and Hyper-IgE in Immigrant Children. Medicine (Baltimore). **2014** Jul;93(6):e43.
242. Kazura, JW and Aiwaka M. Host defense mechanisms against *Trichinella spiralis* infection in the mouse:eosinophil-mediated destruction of newborn larvae in vitro. J Immunol. **1980**;124:355-61
243. Lee TD. Heminthotoxic responses of intestinal eosinophils to Trichinella spiralis newborn larvae. Infect Immunol. **1991**;59:4405-4411
244. Venge P, Byström J, Carlson M, Hâkansson L, Karawacjzyk M, Peterson C, Sevéus L, Trulson A. Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. Clin Exp Allergy. **1999** Sep; 29(9):1172-86.
245. Gentil K[1], Lentz CS, Rai R, Muhsin M, Kamath AD, Mutluer O, Specht S, Hübner MP, Hoerauf A. Eotaxin-1 is involved in parasite clearance during chronic filarial infection. Parasite Immunol. **2014** Feb;36(2):60-77.
246. Finkelman FD, Shea-Donohue T, Morris SC, Gildea L, Strait R, Madden KB, Schopf L, Urban JF Jr. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. Immunol Rev. **2004** Oct;201:139-55.
247. Wright V, Bickle Q. Immune responses following experimental human hookworm infection. Clin Exp Immunol. **2005** Nov;142(2):398-403
248. Gaze S, Bethony JM, Periago MV. Immunology of experimental and natural human hookworm infection. Parasite Immunol. **2014** Aug;36(8):358-66.
249. Bandeira-Melo C, Sugiyama K, Woods LJ, Phoofolo M, Center DM, Cruikshank WW, Weller PF.IL-16 promotes leukotriene C(4) and IL-4 release from human eosinophils via CD4- and autocrine CCR3-chemokine-mediated signaling. J Immunol. **2002** May 1;168(9):4756-63.
250. Rzepecka J, Donskow-Schmelter K, Doligalska M. Heligmosomoides polygyrus infection down-regulates eotaxin concentration and CCR3expression on lung eosinophils in murine allergic pulmonary inflammation. Parasite Immunol. **2007** Oct;29(10):539.

251. Culley FJ, Brown A, Conroy DM, Sabroe I, Pritchard DI, Williams TJ. Eotaxin is specifically cleaved by hookworm metalloproteases preventing its action in vitro and in vivo. J Immunol. **2000** Dec 1;165(11):6447-53
252. Shin MH, Lee YA, Min DY. Eosinophil-mediated tissue inflammatory responses in helminth infection. Korean J Parasitol. **2009** Oct;47 Suppl:S125-31
253. Chensue SW, Warmington KS, Allenspach EJ, Lu B, Gerard C, Kunkel SL, Lukacs NW. Differential expression and cross-regulatory function of RANTES during mycobacterial (type 1) and schistosomal (type 2) antigen-elicited granulomatous inflammation. J Immunol. **1999** Jul 1;163(1):165-73.
254. Schrum S, Probst P, Fleischer B, Zipfel PF. Synthesis of the CC-chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, and RANTES is associated with a type 1 immune response. J Immunol. **1996** Oct 15;157(8):3598-604.
255. Mocumbi AO, Ferreira MB, Sidi D, Yacoub MH. A population study of endomyocardial fibrosis in a rural area of Mozambique. N Engl J Med. **2008**;359:43-9.
256. Spry CJ, Take M, Tai PC. Eosinophilic disorders affecting the myocardium and endocardium: a review. Heart Vessels Suppl. **1985**;1:240-2.
257. Pinar-Sopena J, Candell-Riera J, San-José-Laporte A, Bosch Gil J, García del Castillo H, Vilardell Tarres M, et al. Manifestaciones ecocardiográficas en pacientes con hiperreosinofilia. Rev Esp Cardiol **1990**; 43:450-6.
258. Yalonetsky S, Mishaly D, Ben-Barak A, Lorber A. Mitral valve destruction by Hodgkin's lymphoma-associated Loefler endocarditis. Pediatr Cardiol. **2008**;29:983-5
259. Freers J, Masembe V, Schmauz R, Mayanja-Kizza H. Endomyocardial fibrosis syndrome in Uganda. Lancet. **2000**; 355:1994-5.
260. Valiathan SM, Kartha CC. Endomyocardial fibrosis--the possible connexion with myocardial levels of magnesium and cerium. Int J Cardiol. **1990**;28:1-5.
261. Mocumbi AO, Latif N, Yacoub MH. Presence of circulating anti-myosin antibodies in endomyocardial fibrosis. PLoS Negl Trop Dis **2010**; 4:e661.
262. Rutakingirwa M, Ziegler JL, Newton R, Freers J. Poverty and eosinophilia are risk factors for endomyocardial fibrosis (EMF) in Uganda. Trop Med Int Health **1999**; 4: 229-235

263. Pavlovic M, Berdat P, Holzer B, Aebi C, Carrel T, Pfammatter JP. Severe mitral valve involvement in a child with hypereosinophilia secondary to parasitic infection. J Heart Valve Dis. **2003**;12:649-51.

264. Jánoskuti L, Förhécz Z, Lengyel M. Unique presentation of hypereosinophilic syndrome: recurrent mitral prosthetic valve thrombosis without endomyocardial disease. J Heart Valve Dis. **2006**;15:726-9.

265. Madhwal S, Goldberg J, Barcena J, Guha A, Gogate P, Cmolik B, et al. Unusual cause of acute mitral regurgitation: idiopathic hypereosinophilic syndrome. Ann Thorac Surg. **2012**;93:974-7.

266. Fang Q, Gu TX, Xiu ZY, Zhang ZW. Bioprosthetic valve replacement in idiopathic hypereosinophilic syndrome with mitral valve involvement. J Thorac Cardiovasc Surg. **2013**; 146:e45-7.

267. Zakhama L, Slama I, Boussabah E, Harbegue B, Mimouni M, Abdelaali N, et al. Recurrent native and prosthetic mitral valve thrombosis in idiopathic hypereosinophilic syndrome. J Heart Valve Dis. **2014**;23:168-70.

268. Tai PC, Ackerman SJ, Spry CJ, Dunnette S, Olsen EG, Gleich GJ. Deposits of eosinophil granule proteins in cardiac tissues of patients with eosinophilic endomyocardial disease. Lancet. **1987**;1:643-7.

269. Patel AK, D'Arbela PG, Somers K. Endomyocardial fibrosis and eosinophilia. Br Heart J. **1977**;39:238-41.

270. Acquatella H., Schiller NB., Puigbo JJ, Gomez-Mancebo JR., Suarez C., Acquatella G. Value of two dimensional echocardiography in endomyocardial disease with and without eosinophilia. A clinical and pathologic study. Circulation **1993**; 67: 1219-26.

271. Berenguer A, Plancha E, Muñoz Gil J. Right ventricular endomyocardial fibrosis and microfilarial infection. Int J Cardiol. **2003**;87:287-9.

272. Thaden J, Cassar A, Vaa B, Phillips S, Burkhart H, Aubry M, Nishimura R. Eosinophilic endocarditis and *Strongyloides stercoralis*. Am J Cardiol. **2013**; 112: 461-2.

273. Fux CA, Chappuis B, Holzer B, Aebi C, Bordmann G, Marti H, et al. *Mansonella perstans* causing symptomatic hypereosinophilia in a missionary family. Travel Med Infect Dis. **2006**;4:275-80.

274. McLaren DJ,McKean JR, Olsson I, Venge P and Kay AB. Morphological studies on the killing of schistosomula of Schistosoma mansoni by eosinophil and neutrophil catitonic proteins in vitro. Parasite Immunology **1981**;3:359-373
275. Ackerman SJ, Gleich GJ, Loegering DA, Richardson BA and Butterworth AE. Comparative toxicity of purified human eosinophil granule cationic proteins fro schistosomula of Schistosoma mansoni. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **1985**; 34:735-745
276. Hamann KJ, Gleich GJ, Checkel JL, Loegering DA, McCall JW and Barker RL. In vitro killing of microfilariae of Brugia pahangi and Brugia malayi by eosinophil granule proteins. Journal of Immunology **1990**;144:3166-3173
277. Venge P, Hakansson L and Petersen CGB. Eosinophil activation in allergic disease. International Archives of Allergy and Applied Immunology **1987**; 82: 333-337
278. Sugai T, Sakiyama Y and Matumoto S. Eosinophil cationic protein in peripheral blood of pediatric patients with allergic diseases. Clin Exp Allergy **1992**:22; 275-281
279. Tischendorf FW, Brattig NW, Büttner DW, Pieper A, Lintzel M. Serum levels of eosinophil cationic protein, eosinophil-derived neurotoxin and myeloperoxidase in infections with filariae and schistosomes. Acta Tropica **1996**; 62: 171-182
280. Tischendorf FW, Brattig NW, Burchard GD, Kubica T, Kreuzpaintner G, Lintzel M. Eosinophils, eosinophil cationic protein and eosinophil-derived neurotin in serum and urine of patients with onchocerciasis coinfected with intestinal nematodos and in urinary schistosomiasis. Acta Tropica **1999**; 72:157-173
281. Tischendorf FW, Brattig NW, Lintzel M, Büttner DW, Burchard GD, Bork K and Müller M. Eosinophil granule proteins in serum and urine of patients with helminth infections and atopic dermatitis. Tropical Medicine and International Health **2000**; 5(12): 898-905
282. Eltoum IA, Galib HW, Sualaiman S, Kordofani A, Mustafa MD and Homeida M. Significance of eosinophiluria in urinary schistosomiasis. A study using Hansel´s stain and electron microscopy. Am J Clin Path **1989**; 92;329-388
283. Reimert CM, Ouma JH, Mwanfe MT, Magak P, Poulsen LK, Vennervald BJ et al. Indirect assesssment of eosinophiluria in urinary schistosomiasis using eosinophil

cationic protein (ECP) and eosinophil protein X (EPX). Acta Tropica **1993**; 54: 1-12

284. Leutscher PD, Reimert CM, Vennervald BJ, Ravaoalimala VE, Ramarokoto ChE, Serieye J, et al. Morbidity assessment in urinary schistosomiasis infection through ultrasonography and measurement of eosinophil cationic protein (ECP) in urine. Tropical Medicine and International Health **2000**; 5 (2):88-93
285. Reimert CM, Mshinda HM, Hatz CF, Kombe Y, Nikulila T, Poulsen LK et al. Quantitative assessment of eosinophiluria in Schistosoma haematobium infections: a new marker of infection and bladder morbidity. Am J Trop Med Hyg **2000**; 62(1):19-28
286. Böhm HR, Tischendorf FW. Quantitative estimation of cationic leukocyte antigen (cla) and lysozyme in leukaemic leukocytes (author's transl). Klin Wochenschr. **1978** Jan 15;56(2):61-7.
287. Tawfeek, G.M., A.M. Alafifi, and M.F. Azmy, Immunological indicators of morbidity in human schistosomiasis mansoni: role of vascular endothelial growth factor and antisoluble egg antigen IgG4 in disease progression. J Egypt Soc Parasitol, **2003**. **33**(2): p. 597-614.
288. de Toledo CF, Carvente CT, Shigueoka DC, Borges DR. Endothelial markers in schistosomiasis patients with or without portal hypertension. Dig Dis Sci **2009**;54:1331-1336.
289. Bennuru S, Maldarelli G, Kumaraswami V, Klion AD, Nutman TB. Elevated levels of plasma angiogenic factors are associated with human lymphatic filarial infections. Am J Trop Med Hyg. **2010** Oct;83(4):884-90.
290. Debrah AY, Mand S, Specht S et al. Doxycycline reduces plasma VEGF-C/SVEGFR-3 and improves pathology in lymphatic filariasis. PLoS Pathog **2006**; 2: e92.
291. Debrah AY, Mand S, Toliat MR et al. Plasma vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and VEGF-A gene polymorphism are associated with hydrocele development in lymphatic filariasis. Am J Trop Med Hyg **2007**; 77: 601–608.
292. Shariati F, Pérez-Arellano JL, Carranza C, López-Abán J, Vicente B, Arefi M, Muro A. Evaluation of the role of angiogenic factors in the pathogenesis of schistosomiasis. Exp Parasitol. **2011** May;128(1):44-9

293. Shi,B.,Wang,X.,Yang,Z.Vascular endotelial growt factor sand liver diseases. Hepatogroenterology **2001**.;48, 1145–114

294. Attout T, Hoerauf A, Dénécé G, Debrah AY, Marfo-Debrekyei Y, Boussinesq M, Wanji S, Martinez V, Mand S, Adjei O, Bain O, Specht S, Martin C. Lymphatic vascularisation and involvement of Lyve-1+ macrophages in the human onchocerca nodule. PLoS One. **2009** Dec 9;4(12):e8234

295. Fu CL[1], Odegaard JI, Herbert DR, Hsieh MH. A novel mouse model of Schistosoma haematobium egg-induced immunopathology. PLoS Pathog. **2012**;8(3):e1002605.

296. Ray D, Nelson TA, Fu CL, Patel S, Gong DN, Odegaard JI, Hsieh MH. Trnscriptional profiling of the bladder in urogenital schistosomiasis reveals pathway of inflammatory fibrosis and urothelial compromiso. PLoS Negl Trop Dis. **2012**;6(11):e1912.

297. Yosry A. Schistosomiasis and neoplasia. Contrib Microbiol **2006**; 13: 81-100.

298. El-Chennawi F A, Auf F A, Metwally SS, Mosaad Y M, Shaaban A A, El-Baz M A, Tawhid Z E, Lotfy Z F. Vascular endotelial growth factor, p53, and the H-ras oncogene in egyptian patients with bladder cancer. World Gastrointest Oncol **2009**; 15: 62-68

299. Puxeddu I, Alian A, Piliponsky AM, Ribatti D, Panet A, Levi-Schaffer F. Human peripheral blood eosinophils induce angiogenesis. Int J Biochem Cell Biol. **2005** Mar;37(3):628-36.

300. Asai, K., Kanazawa, H., Kamoi, H., Shiraishi, S., Hirata, K., &Yoshikawa, J. Increased levels of vascular endotelial growth factor in induced sputum in asthmatic patients. Clinical and Experimental Allergy **2003**;33:595–599.

8. Anexos

ANEXO 1: CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

Título del estudio: *Factores de riesgo asociados a fracturas por fragilidad*

Centro: Hospital Universitario Insular de Gran Canaria. Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno Infantil.

Yo:……
(nombre y apellidos del paciente que acepta participar en el estudio)

□ He leído la hoja de información que me han dado.
□ He podido hacer preguntas sobre el estudio.
□ He recibido suficiente información sobre el estudio.
□ He hablado con el **Dr**.....
(nombre y apellidos del investigador)

□ Comprendo que mi participación es voluntaria.
□ Comprendo que puedo retirarme del estudio:
1- Cuando quiera.
2- Sin dar explicaciones.
3- Sin que esto repercuta en mi atención médica.

□ Doy libremente mi conformidad para **PARTICIPAR** en el estudio: *Factores de riesgo asociados a fracturas por fragilidad.*

□ Doy libremente mi conformidad para que utilicen los datos clínicos de mi proceso que estimen oportunos en el Hospital Universitario Insular de Gran Canaria.

Nombre y apellidos de la persona que acepta participar en el estudio. DNI	Nombre y apellidos el investigador. DNI
Lugar y Fecha:	Lugar y Fecha:
Firma	Firma