



Evaluación de los efectos inmunomoduladores de la cistatina de *Ascaris lumbricoides* sobre poblaciones celulares humanas

Trabajo de grado para optar el título de Magister en Inmunología

Ana Milena Lozano Mendoza, MD.

Josefina Zakzuk, MD, PhD.

Tutora

Maestría en Inmunología

Instituto de Investigaciones Inmunológicas

Universidad de Cartagena

18 de octubre de 2019

Contenido

1. Resumen ejecutivo.....	4
2. Introducción	6
3. Marco teórico.....	8
3.1. Efectos de los helmintos en la respuesta inmune.....	8
3.2.Poblaciones celulares asociadas con inmunoregulación por helmintos.....	9
3.2.1. Modulación de la función de las células dendríticas	9
3.2.2. Modulación de los monocitos	11
3.3.Cistatinas de helmintos	12
4. Metodología	14
4.1. Hipótesis	14
4.2.Objetivos.....	14
4.2.1. Objetivo General	14
4.2.2. Objetivos Específicos	14
4.3.Diseño general de estudio	14
4.3.1. Criterios de selección de la población de estudio	15
4.4.Metodología específica	15
4.4.1. Producción de rAI-CPI.....	15
4.4.2. Evaluación de las propiedades bioquímicas de la rAI-CPI.....	17
4.4.3. Identificación de rAI-CPI con sueros policlonales de rAI-CPI/pQE30 mediante Western Blot	18

4.4.4. Experimentos con células humanas	19
4.5. Análisis estadístico	25
4.6. Consideraciones Éticas.....	25
5. Resultados.....	27
5.2.5.1. Producción de rAI-CPI y evaluación de las propiedades bioquímicas.....	27
5.3. Efecto en células del Sistema inmune.....	30
5.3.1. Células dendríticas derivadas de monocitos	30
5.3.2. Monocitos.....	35
5.3.3. Células mononucleares de sangre periférica.....	39
6. Discusión.....	44
7. Conclusiones.....	48
8. Perspectivas futuras	48
9. Financiamiento.....	48
10. Referencias.....	49
11. Anexos	52

1. Resumen ejecutivo

Los helmintos modulan el sistema inmunológico del hospedero infectado de diversas maneras, incluyendo mecanismos inmunomoduladores que disminuyen la respuesta inflamatoria y aumentan la longevidad del parásito [1]. Se han aislado varias moléculas inmunomoduladoras derivadas de helmintos que han mostrado ser agentes antiinflamatorios prometedores. Dentro de estas se encuentra la cistatina de *A. lumbricoides* (AI-CPI), una molécula que reduce en ratones la colitis experimental [2] y la inflamación bronquial en un modelo de alergia inducido por *Blomia tropicalis* [3]. De forma general se observaron efectos preventivos de la inflamación, acompañados por una alta producción de IL-10 y TGF- β y aumento de los linfocitos T reguladores Foxp3+ [2]. También se publicaron experimentos en células dendríticas humanas que sustentan la generación de un perfil tolerogénico [3], en esta población de gran importancia en la modulación de la respuesta inmune tanto de forma fisiológica como en la patogénesis del asma y otras condiciones. Dentro de las preocupaciones actuales en esta línea de investigación, estaba la necesidad de tener un producto recombinante que se obtuviera en mayores cantidades y libre de endotoxina. También mejorar su estabilidad y optimizar su purificación, dado que todos estos aspectos (contaminantes, aminoácidos extras) pudieran influir en la evaluación inmunológica de sus propiedades. Teniendo en cuenta que uno de los propósitos finales de esta investigación es generar un producto de utilidad clínica para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, especialmente el asma, se buscó a través de este trabajo de grado contribuir a la optimización de la producción de una cistatina recombinante de *Ascaris* y a evaluar su efectos en la activación de varias poblaciones celulares que participan en el desarrollo de la respuesta alérgica y que se predice que pueden ser blanco de la cistatina de acuerdo a otros hallazgos con moléculas similares [4, 5]. Siguiendo esta línea, en primer lugar, se expresó una nueva recombinante de rAI-CPI, la cual no posee el péptido señal y presenta pocos aminoácidos, en la cepa de *E. coli* BL21(DE3). La proteína se obtuvo con un buen rendimiento (4.5 mg por cada 100 mL de cultivo), además, se purificó de manera eficiente mediante la técnica de intercambio aniónico obteniéndose una pureza del 99% y niveles de endotoxina por debajo de 0.1 EU/mL, después de tratada con polimixina B. Posteriormente, se evaluó el efecto de rAI-CPI sobre células dendríticas derivadas de monocitos (CDmo) y monocitos a nivel de marcadores de superficie y producción de citoquinas; y segundo los efectos de esta molécula

en la respuesta de los linfocitos T CD4+ ante *B. tropicalis* y un estímulo policlonal (anti-CD2/3/28). Para esto, se realizó un estudio experimental, en el cual se extrajeron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) provenientes de controles no alérgicos, no parasitados y de pacientes alérgicos a *B. tropicalis*, siguiendo estándares éticos. Los resultados muestran que rAI-CPI puede inhibir la maduración inducida por LPS de las CDmo y los monocitos, además, de disminuir la producción de citoquinas inflamatorias. Estos efectos variaron de acuerdo con la dosis utilizada de rAI-CPI en CDmo, mientras que a la dosis de 1 μ M hubo una reducción significativa de los marcadores HLA-DR, PD-L1 y CD86, fue a la dosis de 0.1 μ M donde se pudo obtener resultados significativos en la reducción de citoquinas inflamatorias (IL-6, IL-8 y TNF). En monocitos, la reducción en la expresión de los marcadores HLA-DR y PD-L1 y los niveles de las citoquinas IL-1 β e IL-10 inducida por LPS se observó a la dosis de 1 μ M de rAI-CPI. Los efectos inmunomoduladores de rAI-CPI también se pudieron apreciar en la respuesta de los linfocitos T CD4+. En cultivos de PBMC provenientes de pacientes y controles, rAI-CPI inhibió la proliferación de los linfocitos T CD3+CD4+ estimulados con anti-CD2/3/28 acompañado de una disminución en la producción de IL-5 y un aumento de IFN- γ , sin cambios en los niveles de IL-10. Este resultado fue independiente del efecto que tiene rAI-CPI en monocitos y células dendríticas, dado que un efecto similar se observó en linfocitos T CD3+CD4+ purificados. Asimismo, rAI-CPI disminuyó significativamente la producción de IL-5 e IL-10 inducida por *B. tropicalis* en PBMC de pacientes alérgicos. En conclusión, rAI-CPI tiene efectos inmunomoduladores en células dendríticas derivadas de monocitos, en monocitos de sangre periférica y en la respuesta inmune de linfocitos T CD4+ hacia *B. tropicalis* y estímulos policlonales que podrían reducir la intensidad de la respuesta inflamatoria de tipo alérgico, posiblemente por mecanismos independientes de la IL-10.

2. Introducción

La prevalencia de las enfermedades crónicas no transmisibles está aumentando en los países industrializados y en desarrollo. Se han planteado varias hipótesis para explicar este fenómeno, la mayoría de ellas relacionadas con la mejora en las condiciones de higiene y el control de enfermedades infecciosas, incluidas las helmintiasis [1]. Los helmintos modulan el sistema inmunológico del hospedero infectado, incluyendo el humano, de diversas maneras; pudiendo en algunos casos conllevar a la inmunosupresión. Esta respuesta va a depender de varios factores, como la intensidad y la cronicidad de la infección, la especie infectante y el trasfondo genético del huésped. Se ha encontrado que los efectos inmunosupresores de las infecciones crónicas y graves por helmintos son más fuertes que cualquier fenómeno inmunomodulador descrito que acompañe a las infecciones bacterianas o virales, excepto por el virus de la inmunodeficiencia humana [1]. Este efecto de los helmintos se ha aprovechado para beneficio de los humanos hasta el punto de que actualmente existen estrategias antiinflamatorias terapéuticas con el uso de helmintos vivos para tratar las alergias y otras enfermedades inflamatorias [6, 7]. Sin embargo, se reconoce el inconveniente de los efectos adversos que ocasiona la terapia con parásitos vivos por su impacto sobre la nutrición y desenlaces clínicos asociados a morbi-mortalidad. Por esta razón, se ha reforzado la búsqueda de moléculas con propiedades inmunomoduladoras.

Actualmente se han descubierto y purificado varias moléculas de helmintos con propiedades antiinflamatorias que pretenden reemplazar los enfoques terapéuticos de helmintos vivos [7, 8]. Estas moléculas son esenciales para evadir la inmunidad del huésped por el parásito como resultado de un largo proceso de adaptación durante su evolución conjunta con vertebrados infectados; en consecuencia, tienen diferentes mecanismos de acción [7], así como menos reacciones adversas potenciales. Dentro de las moléculas inmunomoduladoras aisladas, se encuentra la cistatina de *Ascaris lumbricoides* (AI-CPI). Las cistatinas, una familia de inhibidores de la cisteína proteasa, se han aislado de diferentes helmintos y algunas de ellas también han mostrado tener propiedades inmunomoduladoras [5].

Investigaciones adelantadas en el grupo de Alergología Experimental e Inmunogenética de la Universidad de Cartagena demostraron que la recombinante AI-CPI, en un modelo de colitis experimental, puede reducir significativamente el índice de actividad de la enfermedad, la actividad de la mieloperoxidasa y el puntaje de inflamación sin efectos tóxicos. Esto

acompañado de una sobreexpresión de los genes *IL10* y *TGFB* junto con una reducción de la expresión de *IL-6* y *TNFA* [2]. En relación a los efectos de la AI-CPI sobre la respuesta alérgica se observó, en un modelo murino de asma inducido por *B. tropicalis*, que el tratamiento con la proteína recombinante puede prevenir la inflamación de las vías aéreas [3], asociado con un alta producción de IL-10 y TGF- β , así como por un mayor número de células T reguladoras [2]. Por su parte, en humanos, se demostró que aunque la rAI-CPI une IgE no posee actividad alérgica, dado que no tiene la capacidad de activar basófilos, entre otras razones. Además, en células dendríticas derivadas de monocitos humanos la rAI-CPI inhibió la maduración de estas células e indujo la producción de IL-10 [3]. Por lo que es posible que a través de estas células u otras células presentadoras de antígeno, la AI-CPI ejerza sus efectos inmunomoduladores. Así, teniendo en cuenta este contexto, en este trabajo nos propusimos evaluar los efectos inmunomoduladores de rAI-CPI en distintas poblaciones celulares humanas involucradas en la presentación antigénica, así como el efecto de esta molécula en el contexto de la respuesta alérgica.

3. Marco teórico

3.1. Efectos de los helmintos en la respuesta inmune

Los helmintos ejercen una respuesta dual sobre el sistema inmune. Por un lado, pueden inducir una fuerte respuesta inmune de tipo 2 similar a la observada en las alergias y por el otro, pueden ejercer una fuerte inmunosupresión [1]. Estas propiedades, especialmente la inmunosupresión ha sido extensamente estudiada en modelos animales. Estos efectos predominan en una población humana en particular, y dependen de la coocurrencia de varios factores, dentro de los que se encuentran la intensidad de la infección, lo que a su vez está determinado por el trasfondo genético del individuo, así como también de la especie infectante [9]. Así, la inmunoregulación inducida por los helmintos es más notoria en las infecciones crónicas [9] y se manifiesta a través de supresión o desviación de la respuesta inmune del hospedero, resultando en un ambiente antiinflamatorio que prolonga la supervivencia del parásito. Algunos de los mecanismos descritos son: la modulación en la producción de citoquinas, la alteración de las vías de transducción de señales de procesos inmunológicos o la inhibición de actividad enzimática [10]. El estudio de distintas moléculas proveniente de helmintos ha permitido conocer más a fondo los efectos inmunomoduladores que tienen estos organismos [11]. Sin embargo, todavía hay mucho por conocer sobre estas moléculas y como sus efectos se integran en el contexto natural de infección.

Los helmintos que han permitido un mejor estudio de la actividad inmunosupresora sobre el organismo son las filarias y los esquistosomas. Estas helmintiasis afectan principalmente al continente africano, mientras que la ascariasis posee una amplia distribución global, siendo así una de las geohelmintiasis más prevalente. Aunque, los efectos en la salud de la ascariasis no son tan deletéreos como las arriba mencionadas, si representan una carga de morbilidad en la población humana considerable. *Ascaris* es un género que comprende dos especies casi idénticas, *A. lumbricoides* y *A. suum*, que probablemente son variantes de subespecies que infectan preferentemente a humanos y cerdos, respectivamente. Los mecanismos de los efectos reguladores de la respuesta inmunitaria inducidos por *A. suum* se han explorado recientemente en un modelo murino de inflamación inducido por LPS [12], encontrando que la infección suprime la secreción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α y IL-6) e induce altos niveles de IL-10 y TGF- β , así como linfocitos T CD4⁺ CD25^{high}Foxp3⁺ en los ganglios linfáticos mesentéricos. Mediante el uso del análisis transcriptómico en cerdos, se observó

que la infección crónica por *A. suum* suprime las vías inflamatorias en la mucosa intestinal, regulando a la baja los genes que codifican para citoquinas y moléculas involucradas en el procesamiento antigénico y moléculas co-estimuladoras. Este efecto fue reproducido utilizando el fluido corporal de *A. suum* (ABF) en CD humanas *in vitro* [13].

3.2. Poblaciones celulares asociadas con inmunoregulación por helmintos

En la respuesta inmune contra los helmintos participan células tanto de la inmunidad innata como adaptativa. Esta respuesta está enfocada en la eliminación del parásito, sin embargo, dada la relación evolutiva de los helmintos con su hospedador, estos han desarrollado mecanismos de evasión dentro de los que se encuentra la inducción de poblaciones celulares reguladoras como lo son los linfocitos T reguladores (Tregs). Actualmente, existe una gran cantidad de evidencia científica que respalda el efecto inductor de linfocitos Tregs que poseen varios helmintos, proveniente tanto de estudios en humanos infectados naturalmente como de modelos animales [14-16]. Otra de las poblaciones recientemente descrita, son los linfocitos B reguladores [17], aunque, faltan más estudios que respalden el efecto general que puedan tener estas poblaciones celulares en relación con las helmintiasis. De esta misma forma, los helmintos pueden inducir cambios en las células del sistema inmune innato, como las CD y los monocitos, las que su vez se articulan con las células del sistema inmune adaptativo para inducir una respuesta reguladora.

3.2.1. Modulación de la función de las células dendríticas

Las CD constituyen una población celular heterogénea que juega un papel importante en la interacción entre la respuesta inmune innata y adaptativa. Son células presentadoras de antígenos especializadas en conducir la activación y diferenciación de los linfocitos T (i.e. Th1, Th2, Th17). La captura del antígeno en un contexto de inflamación activa los procesos de maduración de las CD, lo que resulta en un aumento de las moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80, CD86, MHC) y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, permitiendo la activación de los linfocitos efectores [18, 19]. Las CD también presentan funciones reguladoras para mantener la tolerancia central y periférica; se les conoce como CD

tolerogénicas. Estas células se encuentran en un estado de maduración parcial, así la presentación de antígenos a los linfocitos T, con una inadecuada co-estimulación y producción de citoquinas, resulta en el silenciamiento o depleción de los linfocitos T efectores o la inducción de Tregs [20, 21].

La respuesta de las CD4 a los antígenos helmínticos, generalmente, es dirigida hacia un perfil de tipo 2. Incluso, en modelos murinos se ha observado que las CD4 son necesarias para la inducción de una respuesta Th2 hacia la infección por helmintos [22]. Sin embargo, los helmintos o sus productos también pueden inducir un perfil tolerogénico en las CD4. Esto puede estar determinado tanto por las poblaciones de CD4 como por la naturaleza del antígeno helmíntico [23]. En modelos animales, se ha observado que la infección por helmintos induce CD4 tolerogénicas, caracterizadas por presentar bajos niveles de expresión de moléculas co-estimuladoras, como el CD40, CD80, CD86 y MHC-II. Además, el trasplante de estas células ha demostrado tener la capacidad de proteger a los ratones en modelos de inflamación [24, 25].

Existen diferentes estudios en modelos animales que demuestran el potente efecto inmunomodulador que tienen los helmintos sobre las CD4. En estos estudios, se aprecia como el estímulo *ex vivo* con extracto de helmintos pueden generar CD4 tolerogénicas al igual que la infección por estos organismos. Por ejemplo, en el estudio realizado por Matisz *et al.* se observó como la transferencia de CD4 derivadas de la médula ósea de ratón estimuladas con extracto de *Hymenolepis diminuta* (un parásito de la rata) tenía la capacidad de proteger al ratón en un modelo de colitis inducido por DNBS. Esta respuesta, estuvo acompañada por un aumento de las citoquinas Th2 y producción de IL-10 [26]. Igualmente, en un modelo de inflamación alérgica de las vías aéreas, la transferencia adoptiva de CD4 de ratones infectados con *Schistosoma japonicum* tuvo la capacidad de proteger contra el desarrollo de la inflamación alérgica de las vías respiratorias inducida por OVA [27].

En los humanos se ha descrito un panorama similar, en el cual las personas infectadas con el *S. hematobium* presentan un menor número de CD4 de la línea mieloide y plasmocitoide, además, de presentar una menor expresión de moléculas de superficie como el HLA-DR, CD80, CD86, CD40 y CCR7 [28]. En este estudio, esta respuesta estuvo asociada con una menor capacidad de activación de los linfocitos T por parte de las CD4 estimuladas con LPS provenientes de sujetos infectados, probablemente como resultado de una expresión reducida

del HLA-DR. En conjunto, estos datos muestran que la infección por *S. haematobium* se asocia con un deterioro funcional de las CD humanas *in vivo* y proporciona nuevos conocimientos sobre los mecanismos subyacentes de la hiporrespuesta de los linfocitos T durante la esquistosomiasis crónica [28].

Los productos de excreción secreción de los helmintos también han demostrado tener un efecto inmunomodulador sobre las CDs [29-31]. De particular intereses para este proyecto es la cistatina de helmintos. En el estudio de Sun *et al.* se observó que la estimulación de las CDs de la médula ósea de ratón con la cistatina recombinante de *Heligmosomoides polygirus* (rHp-CPI) durante su maduración producía un fenotipo concordante con las CDs tolerogénicas, caracterizado por una baja expresión de CD40, CD86 y una menor producción de IL-6 y TNF- α posterior al estímulo con ligandos del TLR. Además, estas células indujeron una respuesta de proliferación más débil en linfocitos T CD4+ OVA-específicos en comparación con las CDs no tratadas con rHp-CPI y su transferencia adoptiva tuvo la capacidad de proteger a los ratones en un modelo de sensibilización a OVA disminuyendo la respuesta de anticuerpos OVA específicos [32]. En CDs derivadas de monocitos humanos (CDmo), también se ha observado que la AI-CPI induce un estado parcial de maduración de estas células, con una baja expresión de marcadores de activación como CD80, CD86 y HLA-DR y un aumento en la expresión de IL-10 [3].

3.2.2. Modulación de los monocitos

Los monocitos son también un blanco celular de la infección por helmintos. En un estudio realizado por Araújo *et al.* observaron que la infección natural por anquilostoma induce una alta frecuencia de monocitos circulantes que presentan un perfil regulador y promueven la baja modulación de la respuesta proinflamatoria, lo que puede contribuir a la supervivencia prolongada del parásito en el huésped [33]. Igualmente, los productos derivados de helmintos han mostrado tener un efecto sobre los monocitos. El antígeno B (AgB) y el fluido hidatídico de oveja (SHF) son dos componentes principales a través de los cuales el *Echinococcus granulosus* suprime la maduración de las células dendríticas y la diferenciación de monocitos, lo que resulta en respuestas antiparasitarias reducidas.

Las cistatinas de helmintos, que son de importancia para este trabajo, también han demostrado tener un efecto inmunomodulador prometedor en monocitos. En un estudio realizado por Schonemeyer *et al.* se demostró que la cistatina de *Onchocerca volvulus* inducía una respuesta temprana de TNF- α en PBMC humanas, seguida de una regulación negativa de la producción de IL-12 y un aumento masivo en la producción de IL-10 [34]. Esta última fue producida principalmente por monocitos, la cual a su vez regulaba la expresión de proteínas como CD86 y HLA-DR en estas células. Esto fue confirmado al observar que el uso de anticuerpos bloqueadores de IL-10 restauraba la expresión de CD86 y HLA-DR [34]. En trabajos realizados por Venogupal *et al.* se demostró también que la inducción de IL-10, pero no de IL-8 e IL-6 en monocitos por el extracto de microfilaria dependía de la presencia de cistatina [5], al igual que la expresión de marcadores de superficie reguladores como PD-L1 y PD-L2. Estos estudios nos demuestran la importancia de los monocitos en los efectos inducidos por los helmintos, así como de los productos inmunomoduladores derivados de estos.

3.3. Cistatinas de helmintos

Las cistatinas son una familia de inhibidores de proteasas de cisteína altamente conservadas en la naturaleza [35]. Se han aislado de diferentes helmintos que incluyen *O. volvulus*, *Acanthocheilonema viteae*, *Brugia malayi*, *Nippostrongylus brasiliensis* y *A. lumbricoides* [5]. Son secretadas en varios estadios de desarrollo y participan en distintos procesos fisiológicos del parásito. Las cistatinas de helmintos se consideran candidatos potenciales para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, dada su capacidad de inhibir proteasas relacionadas con el procesamiento y presentación antigénica así como de estimular la liberación de citoquinas antiinflamatorias y otros reguladores del sistema inmune [35, 36]. Dos cistatinas de helmintos se han estudiado en modelos de colitis inducida por DSS, una derivada de *A. vitae* y otra de *C. sinensis*. Ambas disminuyen la inflamación intestinal a través de la inducción de IL-10 por el macrófago, induciendo Tregs y disminución de citoquinas proinflamatorias [36, 37]. Además, la transferencia de macrófagos pulsados con la cistatina de *A. vitae* disminuye significativamente la colitis inducida en un modelo murino [37].

La cistatina recombinante de *A. lumbricoides* (rAl-CPI) ha demostrado tener un fuerte componente inmunomodulador tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*. En un modelo murino

de inflamación inducido por DSS, rAI-CPI fue capaz de mejorar la inflamación, conllevando a una reducción significativa en el índice de actividad de la enfermedad, la actividad de la mieloperoxidasa y el puntaje de inflamación sin efectos tóxicos. Además, se observó la sobreexpresión de los genes *IL10* y *TGFB* junto con una reducción de la expresión de *IL6* y *TNFA*. En un modelo murino de inflamación alérgica de las vías aéreas con *B. tropicalis*, los ratones sensibilizados y retados con el extracto presentaron una gran respuesta inflamatoria de las vías aéreas que se redujo significativamente después del tratamiento con rAI-CPI antes de la sensibilización [3]. Este efecto estuvo acompañado de una disminución significativa de citoquinas de tipo Th2, de IgE total y específica y un aumento de los linfocitos T reguladores en el bazo y de IL-10 en los sobrenadantes de cultivo del lavado broncoalveolar y esplenocitos, que se vio parcialmente afectado por el bloqueo de la IL-10. *In vitro*, rAI-CPI mostró un efecto modulador sobre las CDmo, disminuyendo la expresión de HLA-DR, CD83 y CD86, al tiempo que indujo la producción de IL-10 e IL-6 [3]. Estos resultados nos sugieren, que la AI-CPI puede ser una molécula con un efecto inmunomodulador importante.

4. Metodología

4.1. Hipótesis

AI-CPI ejerce efectos inmunomoduladores sobre la respuesta alérgica al inducir un fenotipo tolerogénico en células presentadoras de antígeno.

4.2. Objetivos

4.2.1. Objetivo General

Investigar el efecto inmunomodulador de AI-CPI en la activación de monocitos, células dendríticas y linfocitos T ayudadores

4.2.2. Objetivos Específicos

- Optimizar el diseño de la cistatina recombinante de *A. lumbricoides* (rAI-CPI) y su producción.
- Evaluar el efecto de la rAI-CPI en la expresión de marcadores de superficie de monocitos y células dendríticas derivadas de monocitos
- Evaluar el efecto de la rAI-CPI en la producción de citoquinas inflamatorias de monocitos y células dendríticas derivadas de monocitos
- Estudiar el efecto de la rAI-CPI en la respuesta inmune de los linfocitos T CD4+ a *B. tropicalis* y un estímulo policlonal.

4.3. Diseño general de estudio

Se realizó un estudio experimental de tipo laboratorio controlado. La unidad experimental fueron las CDs derivadas de monocitos humanos, los monocitos de sangre periférica y los linfocitos T CD3+CD4+. Las células fueron aisladas de PBMC humanos, los criterios de selección se definen a continuación. No se realizó ningún método estadístico para determinar

el tamaño de la muestra, sino a conveniencia. Los experimentos no fueron aleatorizados y los investigadores conocían los estímulos y sus resultados.

4.3.1. Criterios de selección de la población de estudio

Criterios de inclusión: Sujetos con diagnóstico previo de rinitis alérgica y/o asma con prueba cutánea positiva a extracto de *B. tropicalis*, edad entre 20 – 40 años, residentes en Colombia.

Criterios de exclusión: Pacientes con infección por helmintos determinado por coprológico.

Definición de caso

Pacientes diagnosticados con rinitis alérgica y/o asma por médico con prueba cutánea positiva a extracto de *B. tropicalis* (> 3mm sobre el control negativo).

Definición de control

Individuos sanos que no tengan diagnóstico de rinitis alérgica, atopia y/o asma y que por historia clínica no se tenga sospecha de estas enfermedades.

4.4. Metodología específica

4.4.1. Producción de rAI-CPI

4.4.1.1. Expresión y purificación de rAI-CPI sin etiquetas

La cistatina de *A. lumbricoides* se venía produciendo en un sistema pQE30 que agrega una etiqueta de 6 histidinas y varios aminoácidos adicionales. Estudios previos han demostrado que la etiqueta de histidina tiene efectos en la estabilidad de las proteínas, además, de presentar una mayor unión a endotoxina [38, 39]. De esta forma, con el fin de obtener una proteína más adecuada para los experimentos celulares se produjo una AI-CPI recombinante sin el péptido señal y la etiqueta de histidina. La secuencia de AI-CPI sin el péptido señal (número de acceso GenBank: ADR51550.1) se clonó en el vector pET15b utilizando los sitios de restricción *NcoI* y *BamHI*. Esto permitió obtener una proteína recombinante sin etiqueta de histidina y con pocos aminoácidos adicionales. Este plásmido fue sintetizado por GenScript

(Estados Unidos). Posteriormente, el plásmido se utilizó para transformar *Escherichia coli* de la cepa BL21 (DE3) mediante electroporación. Las bacterias transformadas se cultivaron durante la noche en medio Luria Bertani (LB) con ampicilina a 100 µg/mL (medio LBA), a 37°C y 250 rpm. Al día siguiente se realizó una dilución 1:20 de cada cultivo en medio LBA y se incubó hasta alcanzar una OD₆₀₀ entre 0.5 y 0.8. La expresión de la proteína fue inducida con Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.1 mM durante 5 horas a 37°C. Las bacterias se recolectaron por centrifugación y se lisaron mediante congelación a -80°C durante dos horas, descongelación a 37°C y re-suspensión en Tris-HCl 20 mM, NaCl 200 mM e imidazol 10 mM, pH 8.0. Una vez re-suspendidos los pellets se sonicaron en el equipo Sonic Dismembrator modelo 705 (Fisher Scientific, Estados Unidos) realizando 5 ciclos con una amplitud de 50 durante 20 segundos en intervalos de 1 minuto. La muestra se centrifugó por 30 minutos a 4500 rpm a 4°C y se recolectó el sobrenadante correspondiente al lisado nativo. Posteriormente, la rAI-CPI se purificó por cromatografía de intercambio aniónico utilizando la columna UNO Q1 (Cat. 720-0001, Bio-Rad) adaptada a un sistema de cromatografía líquida de rendimiento rápido, FPLC (BiologicDuoFlow™, Bio-Rad Laboratories Inc., Estados Unidos). El lisado nativo de rAI-CPI se dializó en Tris-HCl 20 mM pH 8.6 y se filtró por una malla de 0.2 µM. La columna se equilibró con Tris-HCl 20 mM pH 8.6 y se procedió a la purificación de rAI-CPI en un gradiente lineal de 0 a 100% de Tris 20 mM pH 8.6 y NaCl 1M. La elución se controló a 280 nm. Por último, la proteína purificada se dializó contra PBS pH: 7.4. Cada uno de los pasos en el proceso de expresión y purificación fue verificado mediante SDS-PAGE 15%. La pureza de la proteína se verificó mediante una SDS-PAGE con tinción de plata. La concentración de la rAI-CPI fue determinada mediante densitometría, utilizando como estándar albúmina de suero bovino (BSA).

4.4.1.2. Remoción de endotoxina

La endotoxina fue removida utilizando el estuche de eliminación de endotoxinas ToxinEraser™ (GenScript, Estados Unidos) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este sistema se basa en una matriz de afinidad a la polimixina B modificada que permite la eliminación de las endotoxinas de una manera eficiente. En primer lugar, la columna se lavó con 5 mL de Buffer de regeneración contenido en el estuche a una velocidad de 0.25 mL/min. Este proceso se repitió 2 veces más. Luego, la columna se equilibró con 6 mL del "Equilibrium

Buffer" (receta del fabricante) a una velocidad de 0.5 mL/min, esto se repitió 3 veces. Posteriormente, se colocó 5 mL de rAI-CPI en la columna y se ajustó la velocidad a 0.25 mL/min. La proteína recolectada se guardó a 4°C para la posterior medición de la endotoxina.

4.4.1.3. Cuantificación de endotoxina

La medición de la endotoxina se realizó utilizando el estuche ToxinSensor™ Chromogenic LAL (GenScript, Estados Unidos). Este método utiliza un lisado de amebocitos de *Limulus* modificado (LAL) y un sustrato sintético que permite detectar las concentraciones de endotoxinas de las muestras a través de la generación de color, el cual se detecta a una longitud de onda de 545 nm. Los estándares de *E. coli* se utilizaron en un rango de 1 – 0.1 EU/mL. El procedimiento se realizó de la siguiente manera: se colocaron 100 µl de estándar, rAI-CPI o blanco (agua libre de endotoxina) en viales libres de endotoxinas. Se agregaron 100 µl de LAL reconstituido a cada vial y las muestras se incubaron por 10 minutos a 37°C ± 1°C. Después, se agregaron 100 µl del sustrato cromogénico reconstituido a cada vial y se incubaron a 37°C ± 1°C durante 6 minutos. Por último, se agregaron 500 µL de cada estabilizador de color y se mezclaron con vortex. Para la medición de la endotoxina, se colocaron 200 µL de cada muestra por duplicado en una placa enzimática de 96 pozos y se midió la densidad óptica a 545 nm en el espectrofotómetro Multiskan™ (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

4.4.2. Evaluación de las propiedades bioquímicas de la rAI-CPI

Con el fin de evaluar la preservación de la actividad biológica de la rAI-CPI, se realizó un ensayo de inhibición de una proteasa de cisteína (papaína, Sigma-Aldrich, N° Cat. P41762) sobre su sustrato colorimétrico específico (Glu-Phe-leu-p-nitroanilida diluido en agua). La activación de la papaína (50 µg/reacción) se realizó incubando en buffer Tris-HCl 50 mM, cisteína 10 mM y EDTA 0.1 mM, pH 6.5 durante 30 minutos a 40°C. La papaína activada se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos con PBS, rAI-CPI/pQE30 (control positivo, evaluada en estudios anteriores) o rAI-CPI/pET15b a diferentes concentraciones. Posteriormente, se adicionó 200 µL del sustrato diluido en buffer Tris 50 mM pH: 7.0, para

una concentración final de 0.2 μ M. La absorbancia de los productos liberados se determinó en un espectrofotómetro (MultiSkan GO, Thermo Scientific) a 410 nm cada minuto durante 15 minutos a 40°C. Las muestras se evaluaron por duplicado. La actividad inhibitoria de los compuestos se expresó como un porcentaje de la actividad total detectada en ausencia de esta.

4.4.3. Identificación de rAI-CPI con sueros policlonales de rAI-CPI/pQE30 mediante Western Blot

Se realizó una electroforesis de acrilamida SDS-PAGE al 15% con rAI-CPI/pQE30 y la nueva versión de rAI-CPI/pET15b. Las proteínas fueron transferidas desde el gel de electroforesis a una membrana de nitrocelulosa con poro de 0.45 μ m, en buffer de transferencia pH 8.3 (trizma 0.25mM, glicina 192 mM, metanol 20% y SDS 0.1%) a 180 mA constantes durante 90 minutos. La eficiencia de la transferencia se evaluó mediante tinción de Ponceau S. La membrana con las proteínas transferidas se bloqueó con leche descremada al 5% en PBS durante una hora en agitación constante.

Posteriormente, la membrana se cortó en 2 partes, dejando en cada mitad cada una de las condiciones. Estas fracciones se marcaron y una de ellas se incubó con un pool de sueros policlonales de ratón anti-rAI-CPI/pQE30 (anti-rAI-CPI pAb), y la otra con pool de sueros policlonales de ratón control, inmunizados con PBS (PBS pAb) obtenidos en nuestro laboratorio. Los policlonales se diluyeron 1:1000 en buffer de bloqueo (leche 5 % en PBS) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente bajo agitación constante. Se realizaron 2 enjuagues y 3 lavados cada uno de 10 minutos con PBS-Tween 0.05%. Posteriormente, las membranas se incubaron con anticuerpo anti-IgG1 de ratón conjugado con peroxidasa (dilución 1:50000 en PBS-BSA 1%) durante una hora y se lavaron 3 veces más por 10 minutos con PBS-Tween 0.05%. Para el revelado se empleó el estuche SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el revelado, se mezclaron cantidades iguales de Reactivo A (Luminol Enhacer Solution) y Reactivo B (Peroxide Solution). Se cubrió la membrana con esta mezcla y tras incubar en oscuridad durante 5 minutos se detectó la señal luminosa usando el equipo G:Box (Syngene, Reino Unido) que cuenta con una cámara CCD.

4.4.4. Experimentos con células humanas

4.4.4.1. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron utilizando la técnica de Ficoll. La sangre periférica de los participantes del estudio se extrajo en tubos heparinizados. Posteriormente, las muestras fueron diluidas en PBS y Ficoll Histopaque (Sigma-Aldrich, N° Cat. 10771) en una relación 1:1:1 y centrifugadas por 20 minutos a 800 g con el fin de visualizar y extraer la capa de células mononucleares. Las células fueron lavadas 2 veces con 25 mL de PBS/EDTA, y se resuspendieron en 20 mL de PBS/EDTA para proceder al conteo en una cámara de Neubauer con tinción de azul de tripano. Luego, se continuó con cada uno de los experimentos que se detalla a continuación.

4.4.4.2. Purificación de monocitos

Se extrajeron monocitos de 6 controles no parasitados, no atópicos. La purificación de los monocitos se realizó mediante separación magnética utilizando microperlas anti-CD14 (Miltenyi Biotec, Alemania) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, con ligeras modificaciones. Brevemente, se centrifugó la suspensión celular a 300 g por 10 minutos y se aspiró el sobrenadante completamente. El pellet se resuspendió en 500 μ L en Buffer de equilibrio (PBS EDTA 2 mM BSA 0.5%) por cada 10^8 células, este volumen se ajustó de acuerdo con el número de células aisladas. Posteriormente, se añadió 30 μ L de microperlas anti-CD14 por cada 10^8 células y se incubó por 15 minutos a 4°C. Las células se lavaron añadiendo 1-2 mL de buffer de equilibrio por cada 10^7 células y se centrifugó a 300 g por 10 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 500 μ L de buffer de equilibrio por cada 10^8 células. Esta suspensión se colocó en una columna LS (Miltenyi Biotec, Alemania) situada en el campo de separación magnética MidiMACS™ (Miltenyi Biotec, Alemania), equilibrada previamente con 3 mL de buffer de equilibrio. Se realizaron 3 lavados de 3 mL con el buffer de equilibrio, aquí se recolectaron las células no marcadas. Luego, se removió la columna del separador y se colocó en un tubo Falcon, se adicionaron 5 mL de buffer de equilibrio y se empujó el embolo firmemente hacia la columna para recoger las células marcadas magnéticamente que correspondían a los monocitos. Se tomó una alícuota de 10 μ L para realizar el conteo de las células en la cámara de Neubauer con tinción de azul

de tripano. Adicionalmente, se verificó la pureza de los monocitos mediante citometría utilizando los marcadores PE-Cy7 anti-CD14 y BV510 anti-CD45, obteniéndose valores superiores al 99%.

Estimulación de monocitos

Los monocitos aislados se estimularon con las siguientes condiciones: 1) Solo medio; 2) LPS (100 ng/mL); 3) rAl-CPI 0.1 μ M; 4) rAl-CPI 0.1 μ M + LPS (100 ng/mL); 5) rAl-CPI 1 μ M; 6) rAl-CPI 1 μ M + LPS (100 ng/mL). El estímulo de rAl-CPI se colocó media hora antes del LPS. Esto se realizó en unas placas de cultivo de 96 pozos (Corning® Costar®, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ en el equipo Forma™ Series II 3110 Water-Jacketed CO₂ Incubator (Thermo Scientific™, Estados Unidos). Después de 18 horas de cultivo se recolectaron los monocitos estimulados para analizar los marcadores de superficie APC anti-HLA-DR, PE-CF594 anti-CD86, FITC anti-CD83, PE anti-PDL1 y un marcador de viabilidad [Fixable Viability Dye eFluor™ 780, eBioscience™] mediante citometría de flujo. Los sobrenadantes se recolectaron y se almacenaron a -80°C para posteriormente analizar la producción de citoquinas (IL- 8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF e IL-12p70) utilizando un sistema multiplex denominado BD™ Cytometric Bead Array (CBA). Las lecturas de citometría de flujo se realizaron en un sistema FACS-ARIA III (BD, Estados Unidos) y los resultados se analizaron utilizando el Software de análisis Kaluza (Beckman Coulter).

4.4.4.3. Generación de las células dendríticas derivadas de monocitos (CDmo)

Para generar las CDmo, los monocitos se estimularon con las proteínas recombinante humanas, factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF, eBioscience™ N° Cat. 68-8777-63) y la Interleucina- 4 (IL-4, eBioscience™ N° Cat. 68-8780-63) a una concentración de 100 ng/mL. Los cultivos se realizaron a una concentración de 2x10⁶ monocitos por pozo en un volumen final de 2 mL de RPMI en placas de cultivo de 24 pozos fondo plano (Corning® Costar®, Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Los monocitos se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ en el equipo Forma™ Series II 3110 Water-Jacketed CO₂ Incubator (Thermo Scientific™, Estados Unidos). Después de 6 días, se recolectó una fracción

de las CDmo inmaduras para verificar la expresión de marcadores de superficie: PERCP y5.5 anti-CD1c y BV510 anti-CD45, para confirmar la transformación exitosa de los monocitos en CDmo.

La transformación también se verificó por microscopía óptica, visualizando los cambios morfológicos esperados (**Figura 1**)

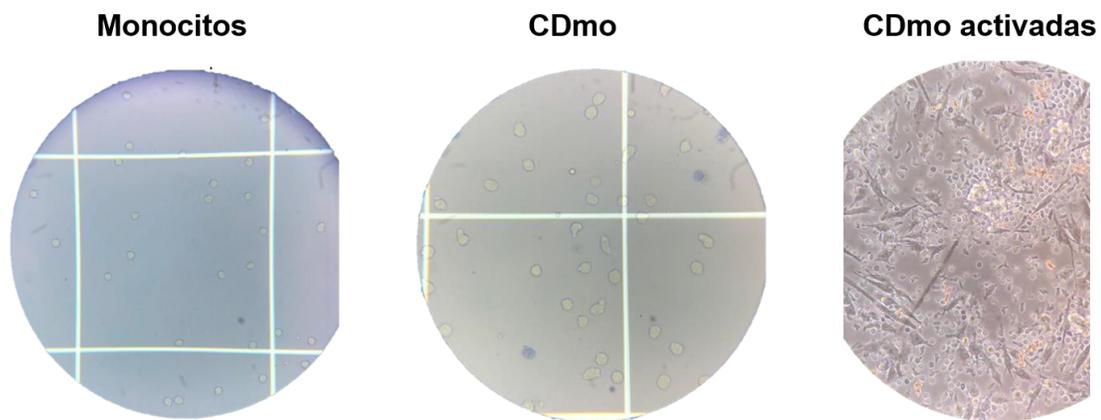


Figura 1 Generación de células dendríticas a partir de monocitos humanos. La imagen muestra monocitos recién purificados con las perlas anti-CD14 (izquierda), después de 6 días de tratamiento con IL-4 y GM-CSF (centro) y 18 horas después de estimuladas con LPS (derecha). Imagen tomada a 40X.

Estimulación de las CDmo

Pasados los 6 días, y después de verificar la transformación, las CDmo se lavaron una vez con RPMI y se procedió a contar las células en cámara de Neubauer y tinción de azul de tripano. Posteriormente, se colocó el mismo número de CDmo en cada condición. Se hizo un experimento de titulación de la rAI-CPI con las siguientes concentraciones: 1 μM , 0.1 μM , 0.01 μM y 0.001 μM y se determinó que las concentraciones a trabajar subsiguientemente serían

las dos más altas. El esquema que se utilizó para estimular las CDmo fue el siguiente: 1) Solo medio; 2) LPS (100 ng/mL); 3) rAI-CPI 0.1 μ M; 4) rAI-CPI 0.1 μ M + LPS (100 ng/mL); 5) rAI-CPI 1 μ M; 6) rAI-CPI 1 μ M + LPS (100 ng/mL). El estímulo de rAI-CPI se colocó media hora antes del LPS. Las CDmo se colocaron en unas placas de cultivo de 96 pozos (Corning® Costar®, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y se procedió a incubar las CDmo estimuladas a 37°C y 5% de CO₂ en el equipo Forma™ Series II 3110 Water-Jacketed CO₂ Incubator (Thermo Scientific™, Estados Unidos). Después de 18 horas de cultivo, se recolectaron las CDmo estimuladas, para analizar los marcadores de superficie APC anti-HLA-DR, PE-CF594 anti-CD86, FITC anti-CD83, PE anti-PDL1 y PerCP Cy5.5 anti-CD1c mediante citometría de flujo y un marcador de viabilidad [Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (eBioscience™)]. Los sobrenadantes se recolectaron y se almacenaron a -80 °C para posteriormente analizar la producción de citoquinas (IL- 8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF e IL-12p70) utilizando un sistema multiplex denominado BD™ Cytometric Bead Array (CBA). Las lecturas de citometría de flujo se realizaron en un sistema FACS-ARIA III (BD, Estados Unidos) y los resultados se analizaron utilizando el Software de análisis Kaluza (Beckman Coulter).

Determinación de citoquinas de sobrenadantes de CDmo y monocitos

La determinación de citoquinas de los sobrenadantes de las CDmo y los monocitos se realizó utilizando el estuche BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1 Cytokine [Interleuquina-8 (IL-8), IL-12p70, IL-1 β , IL-6, IL-10, Factor de necrosis tumoral (TNF)] (N° Cat. 551811). El procedimiento se realizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Durante el procedimiento, se mezclaron las perlas de captura de las citoquinas con los estándares recombinantes, los sobrenadantes de las CDmo o los monocitos estimulados con cada condición y se incubaron con los anticuerpos de detección conjugados con PE para formar los complejos sándwich. La intensidad de la fluorescencia de PE de cada complejo sándwich revela la concentración de esa citoquina. Después de adquirir los resultados utilizando el sistema FACS-ARIA III (BD, Estados Unidos), los resultados se analizaron en el programa FCAP Array™ Software versión 3.0.

4.4.4.4. Evaluación del efecto de rAI-CPI en células mononucleares periféricas y linfocitos T CD3+ CD4+

Ensayos de linfoproliferación

Con el fin de evaluar la inmunomodulación de rAI-CPI sobre las células mononucleares periféricas se realizaron experimentos de linfoproliferación y medición de citoquinas en sobrenadante de células estimuladas con rAI-CPI y *B. tropicalis* o un estímulo policlonal (anti-CD2/3/28). En primer lugar, se extrajo PBMC de sangre periférica de pacientes alérgicos a *B. tropicalis* y controles, como se describió anteriormente. Las células se tiñeron con un colorante violeta, CellTrace™ Violet Cell Proliferation (Nº Cat: C34557, Thermo Scientific), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para esto, las células aisladas se contaron en la cámara de Neubauer y se llevaron a una dilución de 10^6 células por mililitro en PBS. Posteriormente, se agregó 20 μ L de DMSO a un vial de CellTrace™, para una concentración final 5 mM y se añadió 1 μ L de esta solución a cada mililitro de suspensión celular en PBS para una solución de trabajo final de 5 μ M. Las células se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente, protegidas de la luz. Se agregó RPMI completo cinco veces el volumen de tinción original y se incubó durante 5 minutos. Se centrifugaron las células a 300 g durante 5 min y el pellet se resuspendió en un 1 mL de RPMI completo recién precalentado. Las células se contaron nuevamente utilizando la cámara de Neubauer y se estimularon con las siguientes condiciones: 1) Control negativo (solo medio); 2) Control positivo, CD2/3/28; 3) CD2/3/28 + rAI-CPI 1 μ M; 4) *B. tropicalis* 50 μ g/mL; 5) *B. tropicalis* + rAI-CPI 1 μ M; 6) *B. tropicalis* + rAI-CPI 0.1 μ M; 7) rAI-CPI 1 μ M; 8) rAI-CPI 0.1 μ M. Al día 3 tras la estimulación se recolectaron los sobrenadantes de las células estimuladas con CD2/3/28 y un pozo de control negativo, para evaluar la proliferación celular. Al día 6 del experimento, se re-estimularon las células con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) e ionomicina 4 horas antes de recolectar los sobrenadantes, lo cuales fueron posteriormente rotulados y almacenados a -80°C para la subsiguiente determinación de citoquinas, mientras que el pellet fue resuspendido para analizar la proliferación de linfocitos T en respuesta a cada estímulo teniendo en cuenta el grado de dilución del colorante violeta. Para esto, se marcaron las células con PE-Cy5 anti-CD3, FITC anti-CD4 y en las poblaciones identificadas se evaluó la intensidad de fluorescencia del violeta en el canal BV421, descartando la población de células muertas con el marcador de viabilidad Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (eBioscience™). Las lecturas fueron hechas en el sistema FACS ARIA III (BD, Estados Unidos).

Sorting de los linfocitos T CD3+CD4+

El aislamiento de los linfocitos T CD3+CD4+ se realizó mediante sorting utilizando el equipo FACS-ARIA III (BD, Estados Unidos). Se aislaron PBMC de tres donantes utilizando la técnica de gradiente de Ficoll, como se describió anteriormente. Luego de contadas las células, se extrajo completamente el sobrenadante y en un volumen final de 50 µl de PBS BSA 0.5% se adicionó el coctel de anticuerpos monoclonales (PE-Cy5 anti-CD3 y FITC anti-CD4). Las células se incubaron durante 20 minutos a 4°C en la oscuridad. Se lavaron con 1 mL de PBS BSA 0.5%, se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos y se aspiró por completo el sobrenadante. Se resuspendieron nuevamente las células en PBS EDTA 2mM BSA 0.5% para una concentración final de 2×10^6 células/mL y se colocaron en tubos de poliestireno de fondo redondo para citometría. Los tubos de recolección se prepararon pipeteando 1-2 ml de PBS EDTA 2mM BSA 0.5%. Una vez realizado el sorting, las células se lavaron con PBS, se centrifugaron a 300xg durante 5 minutos y se resuspendieron en PBS a una concentración de 10^6 células/mL para proceder con la tinción con el marcador de proliferación, como se describió anteriormente. Estas células fueron posteriormente estimuladas con las siguientes condiciones: 1) Control negativo (solo medio); 2) Control positivo, CD2/3/28; 3) CD2/3/28 + rAl-CPI 1 µM.

Determinación de citoquinas en sobrenadante de cultivos de PBMC

La técnica de ELISA se utilizó para determinar las concentraciones de citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos de PBMC. Para la determinación de IL-5 en los sobrenadantes se utilizó el estuche de *IL-5 Human Uncoated ELISA* (Thermo, Estados Unidos), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La medición de la IL-10 y el IFN-γ se realizó siguiendo un protocolo similar, el cual se detalla a continuación. En primer lugar, se tapizó una placa de 96 pozos Nunc MaxiSorp™ (Thermo, Estados Unidos) con una dilución en PBS de 1 µg/mL de anticuerpo de captura de IL-10 (N° Cat: 12-7108-41) o con 2 µg/mL del anticuerpo de captura de IFN-γ (N° Cat: 14-7318-81) y se incubó durante la noche en cámara húmeda a 4 °C. Al día siguiente, se realizaron 5 lavados con PBS-Tween 20 0.05% y se bloquearon las placas con PBS – BSA 2% durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0.05% y se colocaron 50 µL de sobrenadantes y de la respectiva curva estándar, cada uno por duplicado. Luego de transcurridas dos horas, las

placas se lavaron 5 veces con el PBS-Tween 20 0.05%, se colocó el anticuerpo de detección respectivo marcado con biotina a una dilución de 1 µg/mL en PBS – BSA 1% y se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Nuevamente se lavaron las placas 5 veces y se adicionó la ExtraVidin® Fosfatasa alcalina diluida 1:4000 en buffer conjugado (Tris 50mM BSA 1% MgCl₂ 1mM azida de sodio al 0.02% pH: 8.0) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por último, se lavaron las placas 6 veces con PBS-Tween 20 0.05% y se adicionó el sustrato, *p*-Nitrofenil Fosfato disuelto en dietanolamina al 10% pH 9.8 a una concentración final de 1 mg/ml durante 50 minutos. La reacción se detuvo con NaOH 3N y se midió la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro (MultiSkan GO, Thermo Scientific).

4.5. Análisis estadístico

Los datos que se recolectaron fueron: las frecuencias absolutas, relativas y la intensidad de fluorescencia media (MFI) de las poblaciones celulares de acuerdo con la expresión de los marcadores de superficie determinados por citometría de flujo; y de la producción de citoquinas por parte de las células dendríticas, monocitos y linfocitos T CD4⁺. Se calculó la media, la desviación y el error estándar de la media de los datos.

Con el fin de determinar las diferencias entre las distintas condiciones a analizar, se realizó la prueba de Wilcoxon para datos pareados, la prueba de Friedman en análisis pareado de más de dos muestras y prueba de Dunn para los análisis post-hoc. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico GraphPad Prism versión 8.

4.6. Consideraciones Éticas

Se consideró la normatividad nacional vigente en materia de investigación en salud para el diseño del presente proyecto. A continuación, se realizan algunas consideraciones pertinentes:

De acuerdo con el artículo 11 de la resolución 8430 de 1993 expedida por el Ministerio de Salud "Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en Salud", este trabajo se clasifica como investigación con riesgo mínimo al

realizar registro de datos a través de procedimientos comunes, que consiste en la extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud. Esto fue realizado por personas entrenadas especialmente para llevar a cabo este proceso. Todos los datos de los pacientes recolectados fueron tratados de forma anónima, sólo utilizada con fines académicos y fueron revisados solo por el equipo de investigación como datos grupales, sin entrar a identificar sujetos puntuales. Además, se adhirió a las normas científicas internacionales, protocolo de Helsinki y principios de Belmont.

Todos los sujetos de estudio firmaron un consentimiento informado detallado en el **anexo 1**. Esta investigación ha sido aprobada por el Comité de Ética de la Universidad de Cartagena (Proyecto: *Identificación y caracterización de proteínas de Ascaris lumbricoides con propiedades inmunomoduladoras de potencial utilidad en inmunoterapia de enfermedades alérgicas*. Investigador Principal: Luis Caraballo. Código: 1107-54531403. Contrato: 406-2011).

5. Resultados

5.2. 5.1. Producción de rAI-CPI y evaluación de las propiedades bioquímicas

Como se describió en la metodología, la secuencia madura de rAI-CPI fue insertada en un vector recombinante que permitiese obtenerla con pocos aminoácidos adicionales a su secuencia y sin etiquetas de histidina. En la **Figura 1a**, se muestra la expresión de la proteína, observándose con un peso molecular de 12.2 kDa, el cual es menor que la versión anterior de rAI-CPI. El proceso de producción fue más rápido que con rAI-CPI/pQE30 dado que pudo obtenerse bajo el protocolo tradicional de inducción a 37°C y 5 horas. También se optimizó el proceso de lisado, eliminando la adición de lisozima. La proteína rAI-CPI pudo obtenerse en forma soluble bajo condiciones de purificación nativas. La purificación por intercambio aniónico en el sistema FPLC fue exitoso. La proteína se obtuvo en mayor proporción en los lavados de la resina, dada su baja afinidad a la misma (**Figura 2b y 2c**). El porcentaje de pureza de rAI-CPI purificada fue mayor al 99% (**Figura 2d**). En la **Figura 2e**, se muestra que esta nueva versión de la rAI-CPI reacciona con intensidad a la IgG1 de suero policlonal de ratones previamente inmunizados con rAI-CPI/pQE30. En relación con el rendimiento del proceso teniendo en cuenta todos los pasos anteriores, se logró obtener 4.5 mg del recombinante por cada 100 mL de cultivo.

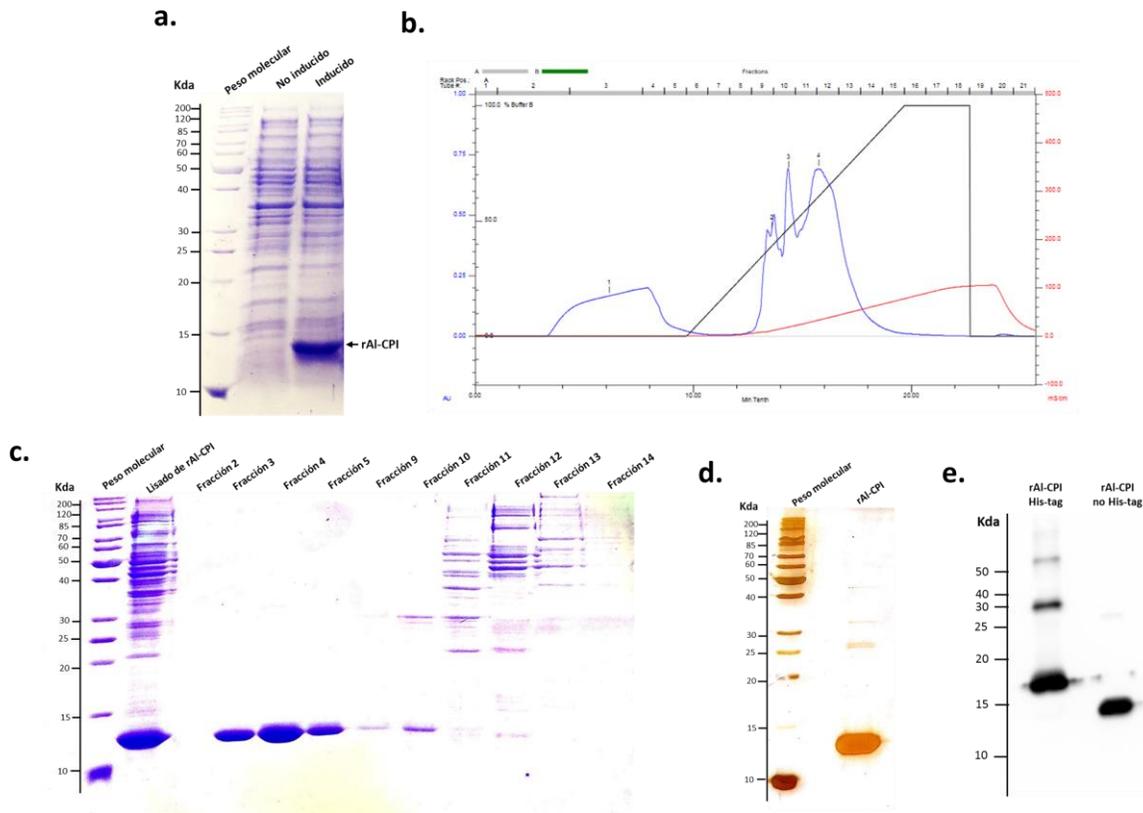


Figura 2 Producción de la recombinante de AI-CPI. a. SDS-PAGE 15% de la expresión de rAI-CPI en *E. coli* BL21 (DE3); b. Cromatograma de la purificación de rAI-CPI mediante intercambio aniónico; c. SDS-PAGE 15% de la purificación de rAI-CPI; d. Tinción de plata de la rAI-CPI purificada; e. Western blot de la rAI-CPI utilizando pAb de rAI-CPI/pQE30

Con la versión pasada de la rAI-CPI se observaba una alta unión a la resina de remoción de endotoxina, lo cual ocasionaba más del 80% de pérdida de su concentración. La evaluación de este aspecto fue más favorable para el nuevo recombinante (**Figura 3**). Después de la purificación por FPLC y diálisis, la concentración de endotoxina fue superior a 1 EU/mL. Luego de incubarse con la resina de polimixina B, la concentración obtenida estuvo por fuera del límite de detección inferior del estuche, el cual es de 0.1 EU/mL. Adicionalmente, no se disminuyó la concentración final de la proteína después de este paso.

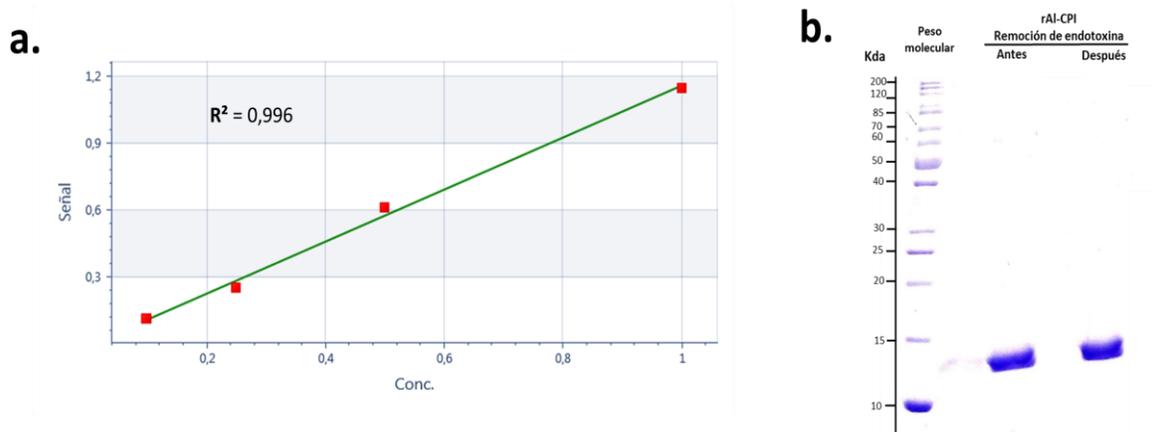


Figura 3 Remoción de endotoxina con la columna de polimixina B. a. Curva estándar de *E.coli* a diluciones de 1 a 0.1 EU/mL; b. SDS-PAGE 15% de rAI-CPI antes y después de pasada por la columna de endotoxina ambas con concentraciones de aproximadamente 285 µg/mL.

También se confirmó la actividad biológica de inhibición de la actividad proteasa, utilizando como sustrato la papaína (**Figura 4**).

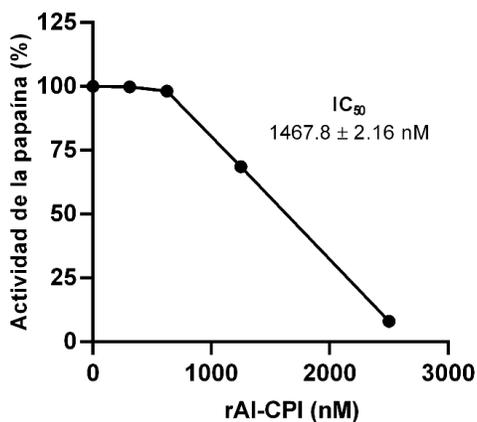


Figura 4 Actividad inhibitoria de rAI-CPI de la papaína sobre su sustrato. La actividad inhibitoria de rAI-CPI se expresó como un porcentaje de la actividad total detectada en ausencia de esta.

5.3. Efecto en células del Sistema inmune

5.3.1. Células dendríticas derivadas de monocitos

Se compararon los niveles de expresión de marcadores como HLA-DR, CD86, CD83 y PD-L1 en células dendríticas derivadas de monocitos obtenidas de 6 donadores sanos no parasitados (edad media: $22.8 \pm \text{DE: } 2.4$). La estrategia de gating que se utilizó para identificar la expresión de estos marcadores se muestra en la **Figura S1**. Como se muestra en la figura los marcadores se analizaron a partir de las células totales vivas, siguiendo lo realizado en otras publicaciones [40]. Se decidió no hacer el gating a partir de las células CD1c+ positivas dado que su expresión cambia ante el estímulo con LPS. Además, en las células no estimuladas se observó una gran variabilidad entre pacientes posiblemente reflejando variaciones en la conversión de los monocitos a CDmo.

Para HLA-DR se observó en la mayoría de los sujetos (5 de 6) una reducción en su expresión a la dosis de rAI-CPI de $0.1 \mu\text{M}$ que en promedio fue de 64%. Por el contrario, a la dosis de rAI-CPI $1 \mu\text{M}$, la mayor parte de los sujetos mostró una tendencia al aumento. Para las moléculas co-estimuladoras, no se observaron diferencias significativas en su expresión después de agregarle rAI-CPI a 0.1 o $1 \mu\text{M}$. Para CD86, con excepción del sujeto 1, rAI-CPI a $0.1 \mu\text{M}$ redujo su expresión en aproximadamente 50%. Por el contrario, la molécula PD-L1 aumentó casi 2 veces su expresión a la dosis de $1 \mu\text{M}$ de rAI-CPI (**Figura 5**).

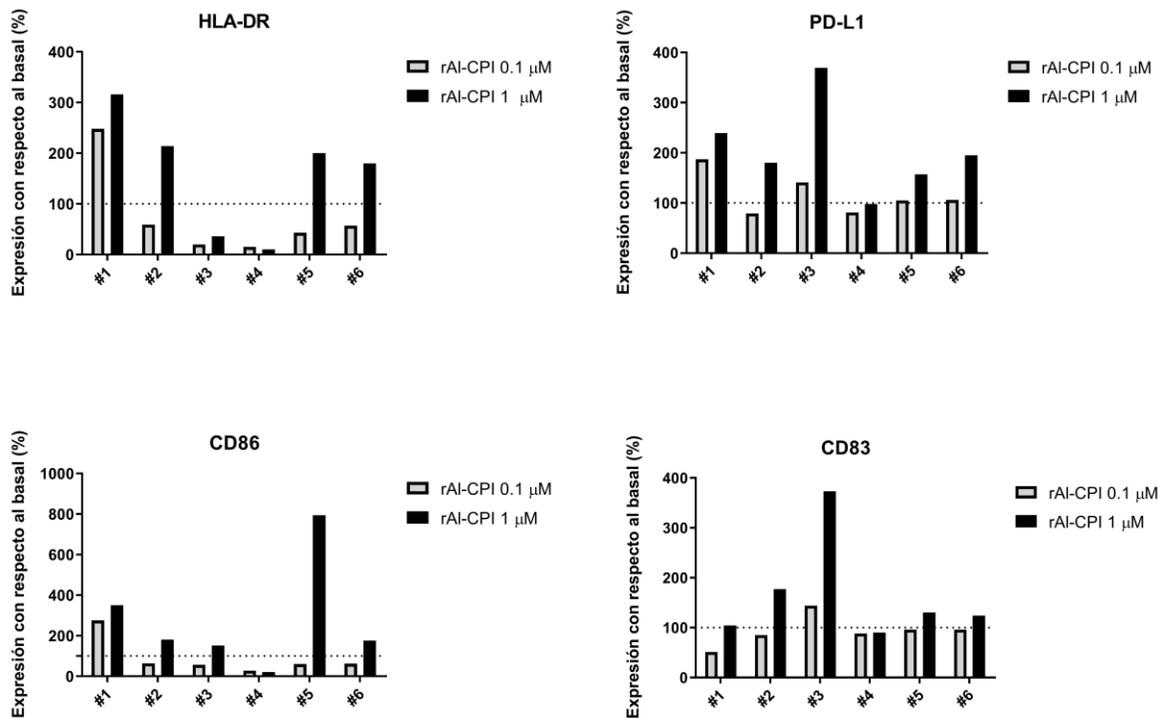


Figura 5 Cambios en la expresión de marcadores de superficie de células dendríticas estimuladas con rAI-CPI. Los datos se muestran como el porcentaje relativo de cambio de la MFI de las condiciones tratadas con rAI-CPI con respecto a la condición no estimulada. Los números en el eje x corresponden a cada sujeto evaluado. La línea punteada corresponde al 100%.

El tratamiento con rAI-CPI a 0.1 μM no estimuló la producción de citoquinas del perfil inflamatorio o IL-10. Sin embargo, la dosis más alta de 1 μM aumentó significativamente los niveles de estas citoquinas en comparación con la condición no estimulada (**Figura 6**).

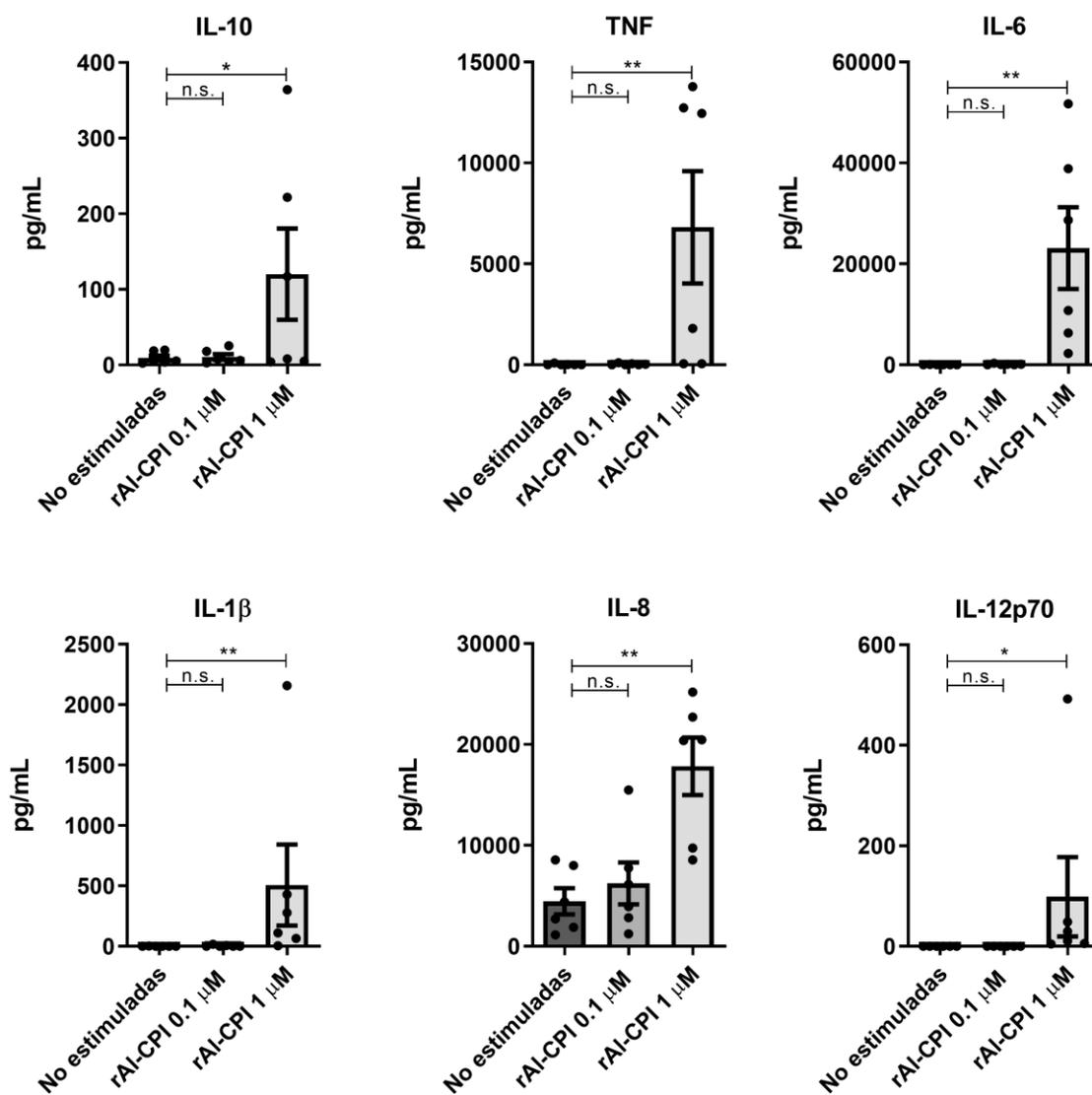


Figura 6 Producción de citoquinas inflamatorias e IL-10 en CDmo estimuladas con rAI-CPI. Los datos se compararon mediante la prueba Friedman y prueba de Dunn para los análisis post-hoc teniendo como referencia la condición no estimulada versus cada condición de rAI-CPI. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, n.s.= no significativo. Las barras de error representan el error estándar de la media (SE).

Para evaluar el efecto inhibitorio de rAI-CPI en la activación de la CDmo, se co-estimularon las células con LPS en presencia o ausencia de rAI-CPI. Se observó una disminución

significativa de la expresión de HLA-DR, CD86 y PD-L1 con la dosis de 1 μ M de rAI-CPI (**Figura 7**). Los cambios en la molécula CD83 no fueron significativos.

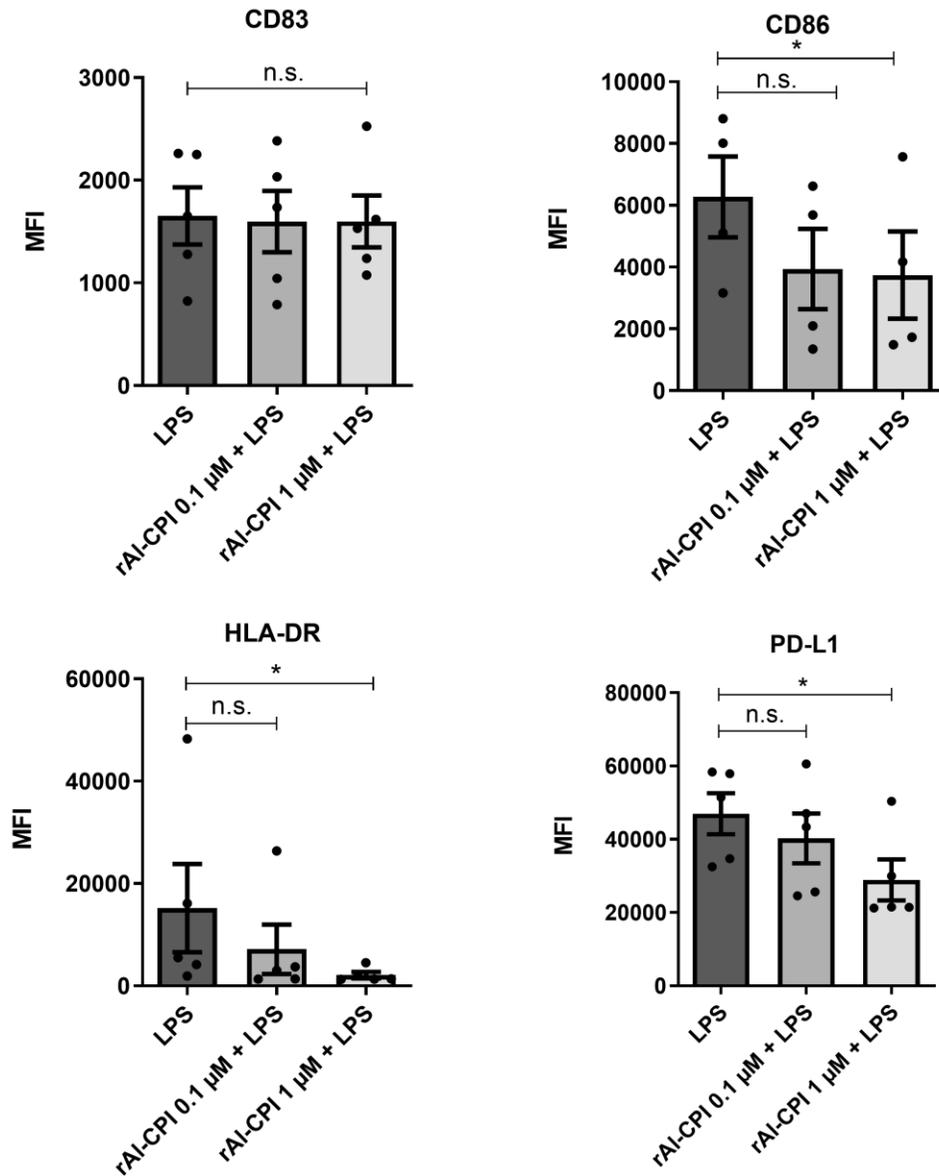


Figura 7 Efecto de rAI-CPI a distintas dosis en la activación de CDmo con LPS. Los datos se compararon mediante la prueba Friedman y prueba de Dunn para los análisis post-hoc, teniendo como columna control la condición LPS. MFI: Intensidad media de fluorescencia. * $p < 0.05$, n.s.= no significativo. Las barras de error representan el SE.

El pretratamiento con rAI-CPI a 0.1 μM redujo significativamente la producción de TNF, IL-6 e IL-8 en respuesta al LPS. A la dosis mayor de rAI-CPI 1 μM no se observa un efecto en la producción de citoquinas inflamatorias, pero si reduce la producción de IL-10 (**Figura 8**).

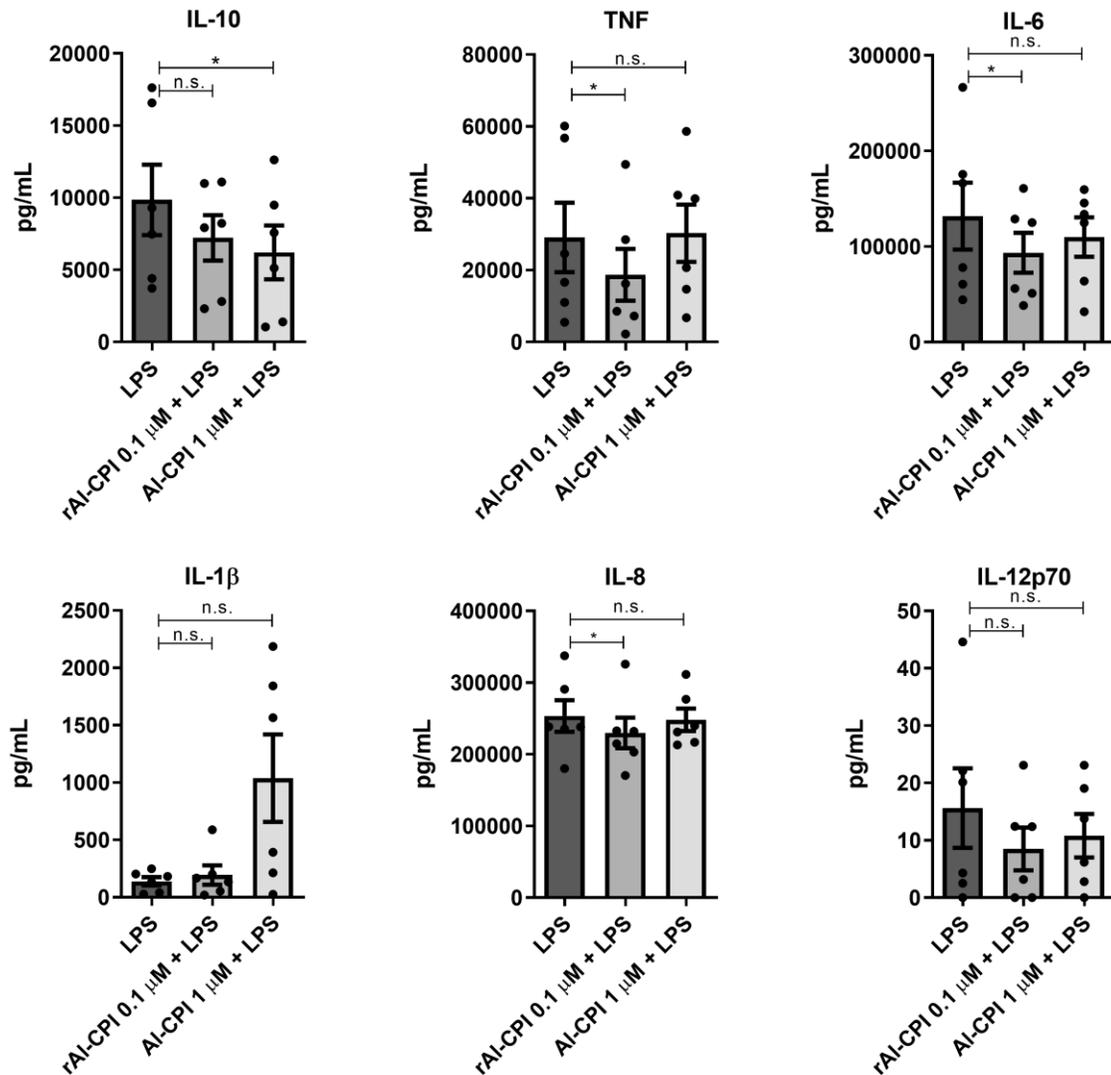


Figura 8 Efecto del tratamiento con rAI-CPI en la producción de citoquinas por CDmo activadas con LPS. Los datos se compararon mediante la prueba Friedman y prueba de Dunn para los análisis post-hoc, teniendo como columna control la condición LPS. * $p < 0.05$, n.s.= no significativo. Las barras de error representan el SE.

5.3.2. Monocitos

Se evaluó la expresión de los marcadores de superficie HLA-DR, CD86, CD83 y PD-L1 en monocitos estimulados con rAI-CPI. Aunque no se observaron diferencias significativas en la expresión de los marcadores de superficie comparado con la condición no estimulada, si se pudo ver una disminución en la intensidad de fluorescencia media del HLA-DR, CD86 y PD-L1 (**Figura 9**). En relación con las citoquinas evaluadas, los valores de IL-10, IL-1 β , IL-12 y TNF fueron indetectables para todos los pacientes tanto en la condición no estimulada como en aquellas tratadas con rAI-CPI a 0.1 y 1 μ M. No se detectaron diferencias significativas en la producción de IL-6, ni IL-8 entre las células tratadas con rAI-CPI y la condición no estimulada (**Figura 10**).

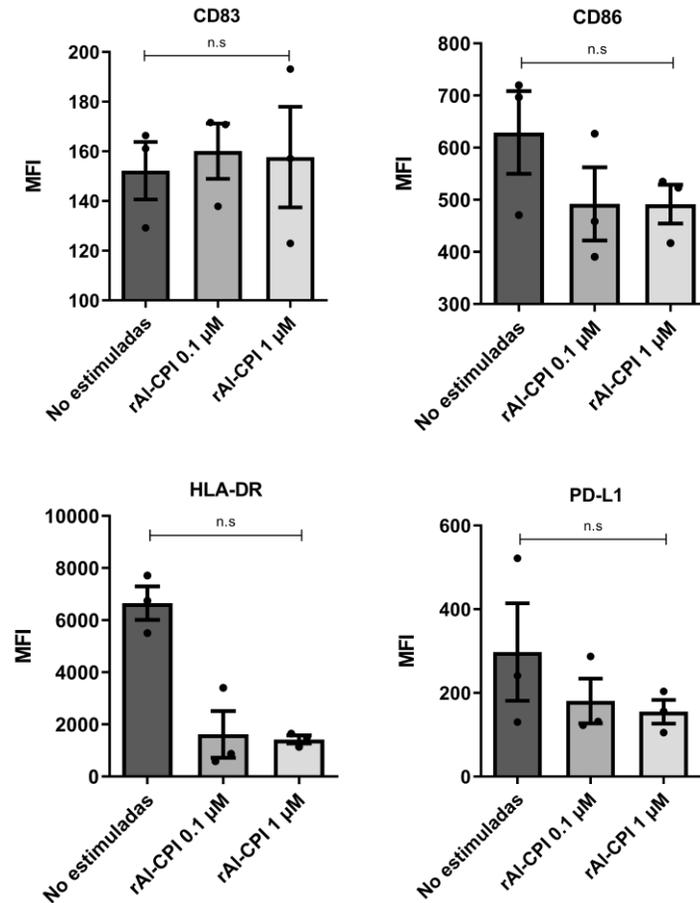


Figura 9 Expresión de marcadores de superficie en monocitos estimulados con rAI-CPI. Los datos se compararon mediante la prueba Friedman ($n=3$). n.s.= no significativo. Las barras de error representan el SE.

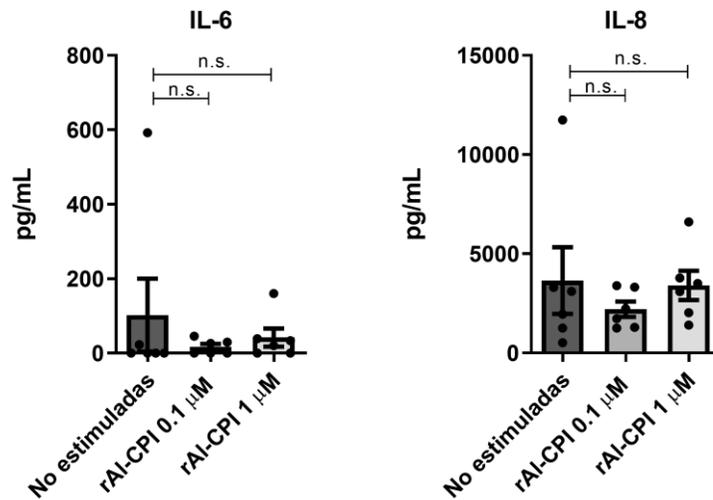


Figura 10 Producción de citoquinas inflamatorias en monocitos estimulados con rAI-CPI. Se presentan los niveles de citoquinas detectables en sobrenadantes de cultivos de monocitos purificados tras ser estimulados por 18 horas con rAI-CPI ($n=6$). Los datos se compararon mediante la prueba Friedman y prueba de Dunn para los análisis post-hoc, teniendo como columna control la condición No estimuladas. n.s.= no significativo. Las barras de error representan el SE.

Para evaluar el efecto inhibitorio de rAI-CPI en la activación de los monocitos purificados de sangre periférica, se co-estimularon las células con LPS en presencia o ausencia de rAI-CPI. Se observó una disminución significativa de la expresión de HLA-DR y PD-L1 a la concentración de rAI-CPI 1 μ M. No se observaron cambios significativos para la expresión de CD83 y CD86 (**Figura 11**).

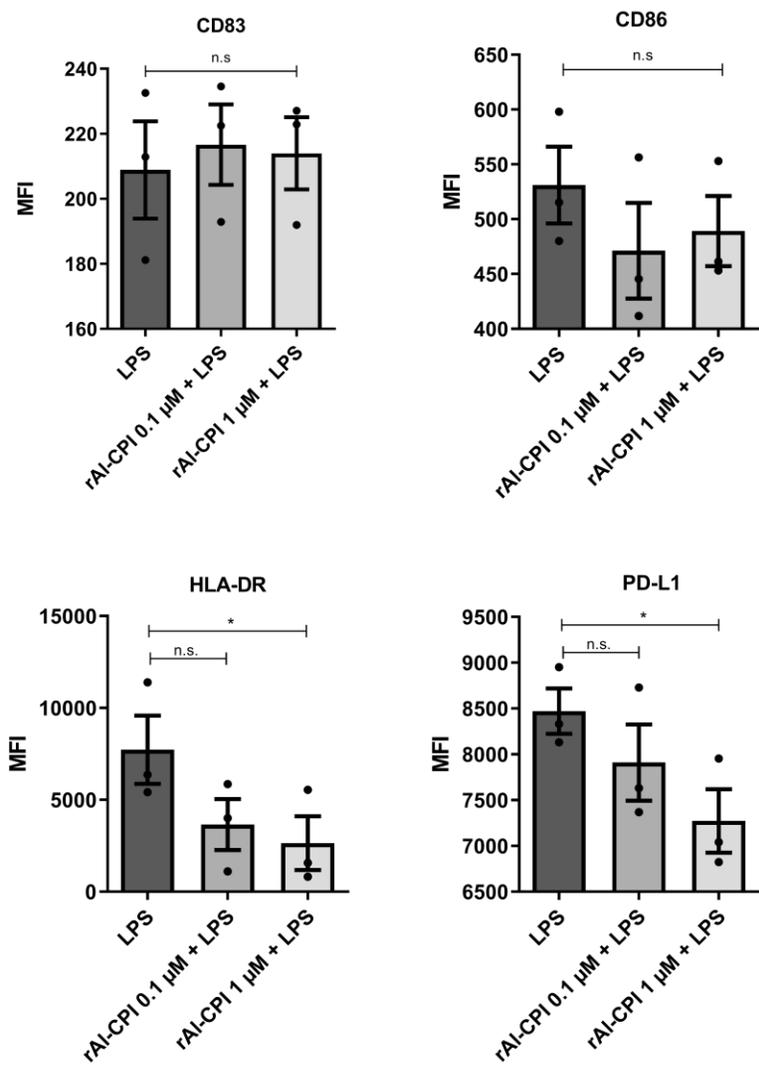


Figura 11 Efecto de rAI-CPI en la activación de monocitos CD14+ a distintas dosis. Los datos se compararon mediante la prueba Friedman y prueba de Dunn para los análisis post-hoc, teniendo como columna control la condición LPS (n=3). MFI: Intensidad media de fluorescencia. *p<0.05, n.s.= no significativo. Las barras de error representan el SE.

Con respecto a las citoquinas producidas por monocitos activados con LPS se observó que el tratamiento con rAI-CPI a 1 μM disminuyó significativamente la producción de IL-10 e IL-1β (**Figura 12**). Los cambios en la producción de IL-6 y TNF observados para las CDmo no se

reprodujeron en los experimentos realizados con monocitos. Los niveles de IL-12 no se detectaron en las muestras por lo que no fue posible hacer los análisis.

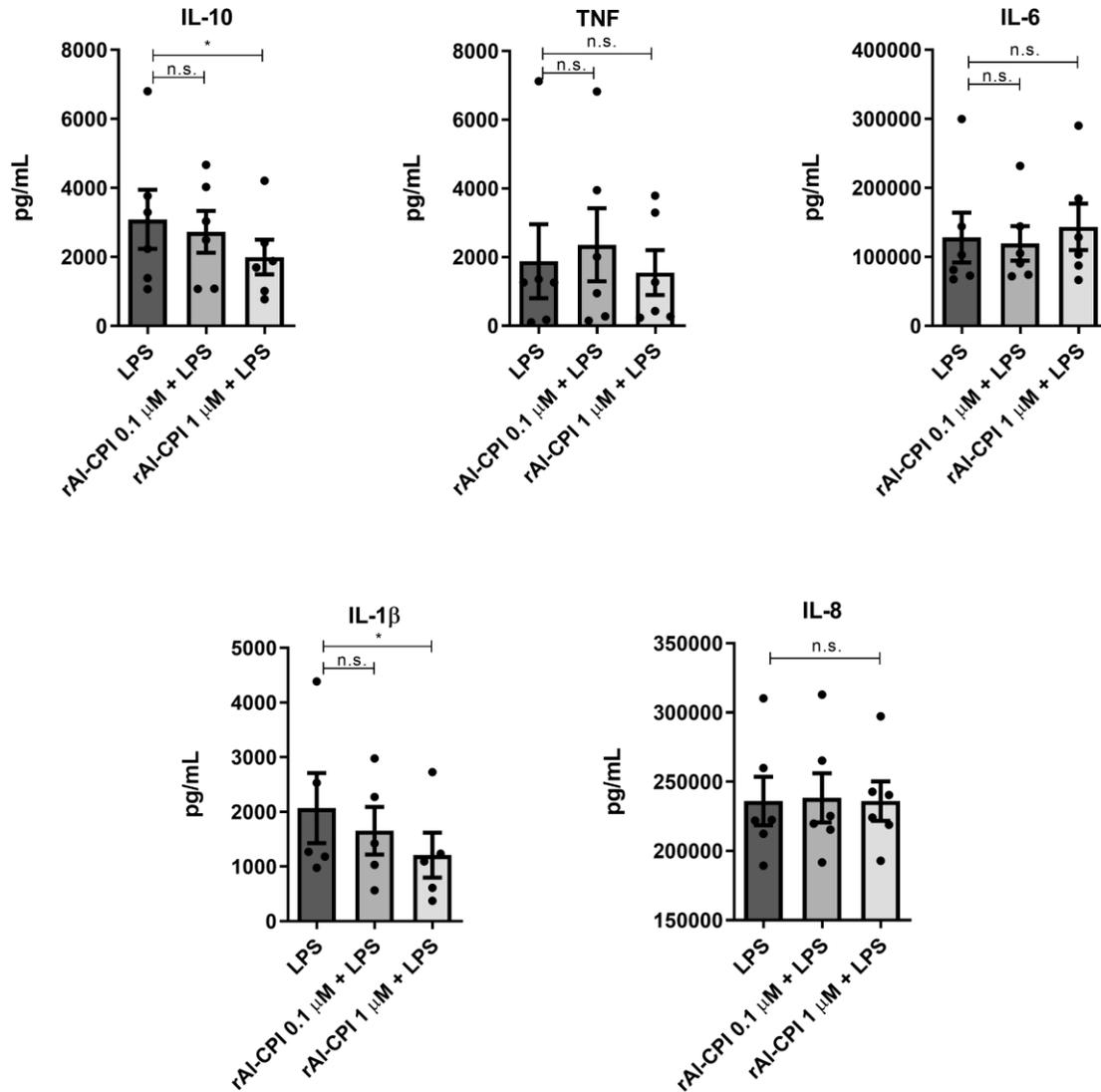


Figura 12 Efecto de rAI-CPI en citoquinas producidas por monocitos activados con LPS. Se presentan los niveles de citoquinas detectables en sobrenadantes de cultivos de monocitos purificados tras ser estimulados por 18 horas con LPS en presencia o ausencia de rAI-CPI (n=6). Las barras de error representan el SE. Los datos se compararon mediante la prueba Friedman y prueba de Dunn para los análisis post-hoc, teniendo como columna control la condición LPS. * $p < 0.05$, n.s. = no significativo.

5.3.3. Células mononucleares de sangre periférica

El efecto de rAI-CPI en la respuesta de los linfocitos T ayudadores fue evaluado mediante cultivos de PBMC estimulados de forma policlonal con una mezcla de anticuerpos activadores de CD3, CD2 Y CD28 y con extracto de *B. tropicalis* en 7 pacientes alérgicos a este ácaro con síntomas de rinitis alérgica y/o asma y prueba cutánea positiva al extracto y 3 controles sanos no atópicos (**Tabla 1**) midiendo la proliferación con colorante violeta y la producción de citoquinas en los sobrenadantes mediante ELISA.

Tabla 1 Características de los pacientes evaluados

Código	Edad	Diagnóstico	Prueba cutánea a <i>B. tropicalis</i> *
BT1	33	RA	12
BT2	25	RA	12
BT3	25	RA	10
BT4	24	RA	11
BT5	31	RA	10
BT6	33	RA/Asma	9
BT7	37	RA	9
C1	25	NA	0
C2	23	NA	0
C3	20	NA	0

*Tamaño de la pápula en mm

RA = Rinitis alérgica

5.3.3.1. Efecto de rAI-CPI en Linfocitos T CD3+CD4+ estimulados con CD2/3/28

En los cultivos de PBMC estimulados de forma policlonal, se observó que rAI-CPI reduce significativamente la proliferación de linfocitos T CD3+CD4+ en un 16.7% (DE±9.3%) (**Figura 13**).

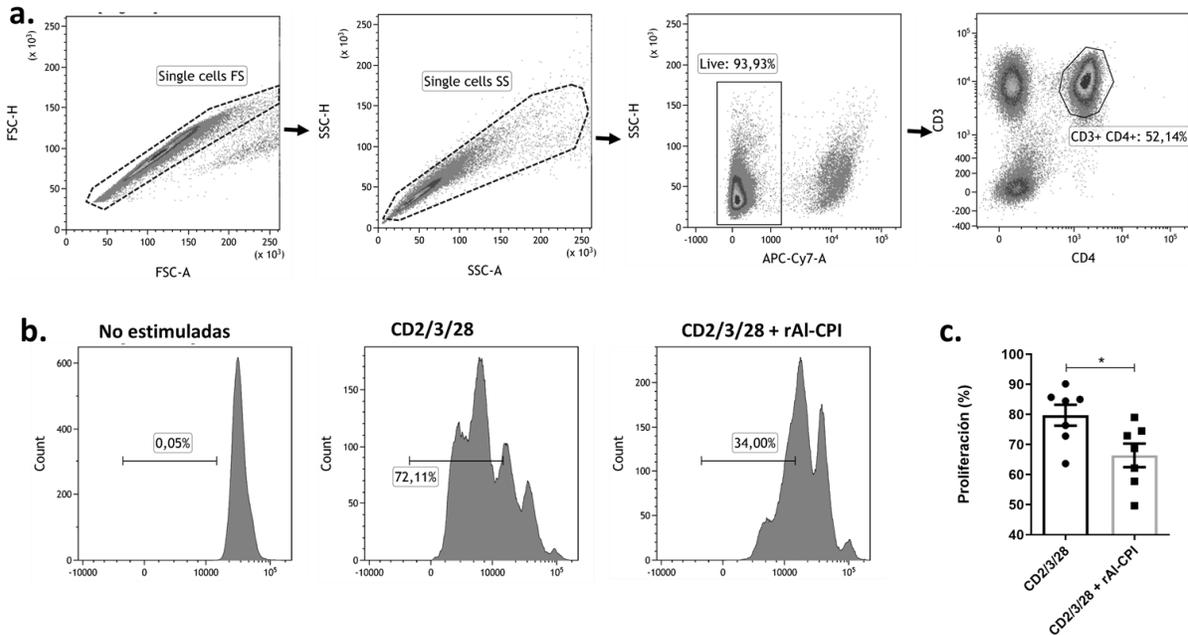


Figura 13 Efecto de rAI-CPI en la proliferación policlonal de linfocitos CD3+CD4+. a. Estrategia de selección de linfocitos T para evaluar proliferación celular con colorante violeta. b. Histograma representativo de los resultados de linfoproliferación en un paciente. c. Comparación de la proliferación de Linfocitos T CD3+CD4+ en cultivos de PBMCs estimulados o no con rAI-CPI 1 μ M (n=6). Prueba de Wilcoxon. * $p<0.05$

La evaluación del perfil de citoquinas de estos cultivos fue evaluada mediante ELISA. Como se muestra en la **Figura 14**, la estimulación con rAI-CPI 1 μ M aumenta significativamente la producción de IFN- γ y reduce la de IL-5. No se observaron diferencias significativas en los niveles de IL-10 en presencia o ausencia de rAI-CPI.

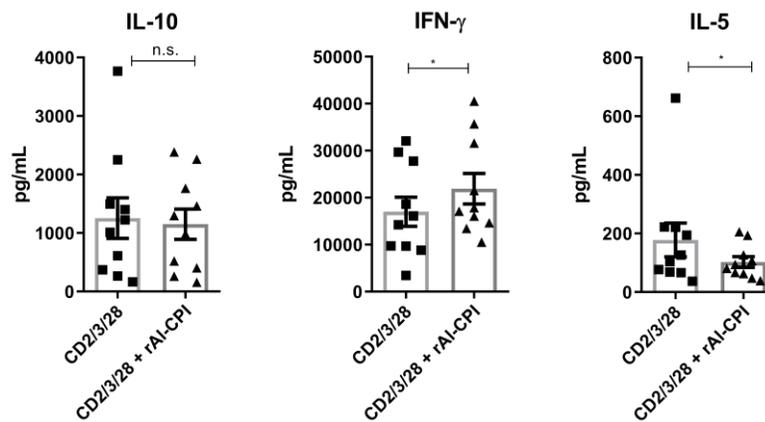


Figura 14 Efecto de rAI-CPI en la producción de citoquinas por PBMC estimulados con CD2/3/28. Se presentan los niveles de citoquinas detectables en sobrenadantes de cultivos de PBMC tras ser estimulados durante 3 días con CD2/3/28 en presencia o ausencia de rAI-CPI 1 μ M ($n = 10$). Prueba de Wilcoxon. * $p < 0.05$, n.s. = no significativo.

Dado que la inmunosupresión de los linfocitos T por rAI-CPI puede estar mediado por otras células blanco (CD o monocitos), se purificaron células CD3+CD4+ por sorting (pureza de 97.8%) y se estimularon directamente con la cistatina y el CD2/3/28. Lo observado fue similar a los cultivos de mononucleares completos. Aunque la tasa de proliferación fue globalmente menor en los CD3+CD4+ purificados, se sigue observando que rAI-CPI inhibe significativamente su proliferación (**Figura 15**).

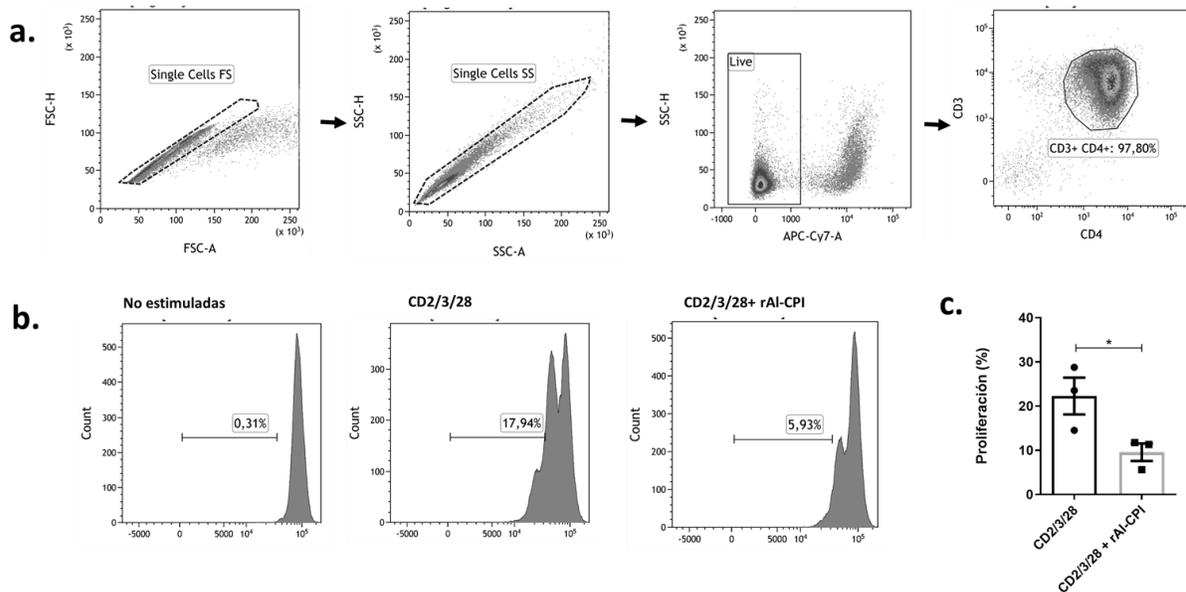


Figura 15 Efecto de rAI-CPI en la proliferación policlonal de linfocitos CD3+CD4+ purificados por sorting. a. Estrategia de selección de linfocitos T para evaluar proliferación celular con colorante violeta. b. Histograma representativo de los resultados de linfoproliferación en un paciente. c. Comparación de la proliferación de Linfocitos T CD3+CD4+ purificados estimulados o no con rAI-CPI 1 μ M (n=3). Prueba de Wilcoxon. * $p < 0.05$

5.3.3.2. Efecto de rAI-CPI sobre los Linfocitos T CD3+CD4+ estimulados con *B. tropicalis*

En primer lugar, se decidió evaluar el efecto de rAI-CPI en la proliferación de los linfocitos T CD3+ CD4+ estimulados con el extracto de *B. tropicalis*. Sin embargo, solo dos pacientes proliferaron con el extracto por lo que no fue posible realizar estos análisis. Los sobrenadantes de estas células se guardaron para su posterior análisis mediante ELISA.

En pacientes alérgicos a *B. tropicalis*, la co-estimulación de PBMC con rAI-CPI 1 μ M y extracto de *B. tropicalis* redujo significativamente los niveles de IL-10 e IL-5 en comparación con el extracto solo (**Figura 16**). Aunque el resultado no fue significativo, también se observó una media más alta de IFN- γ en los cultivos estimulados con rAI-CPI 1 μ M más extracto de *B. tropicalis*. En los controles, no se observó una inducción de IL-5 por el extracto de *B. tropicalis*, ni efecto de rAI-CPI sobre esta citoquina.

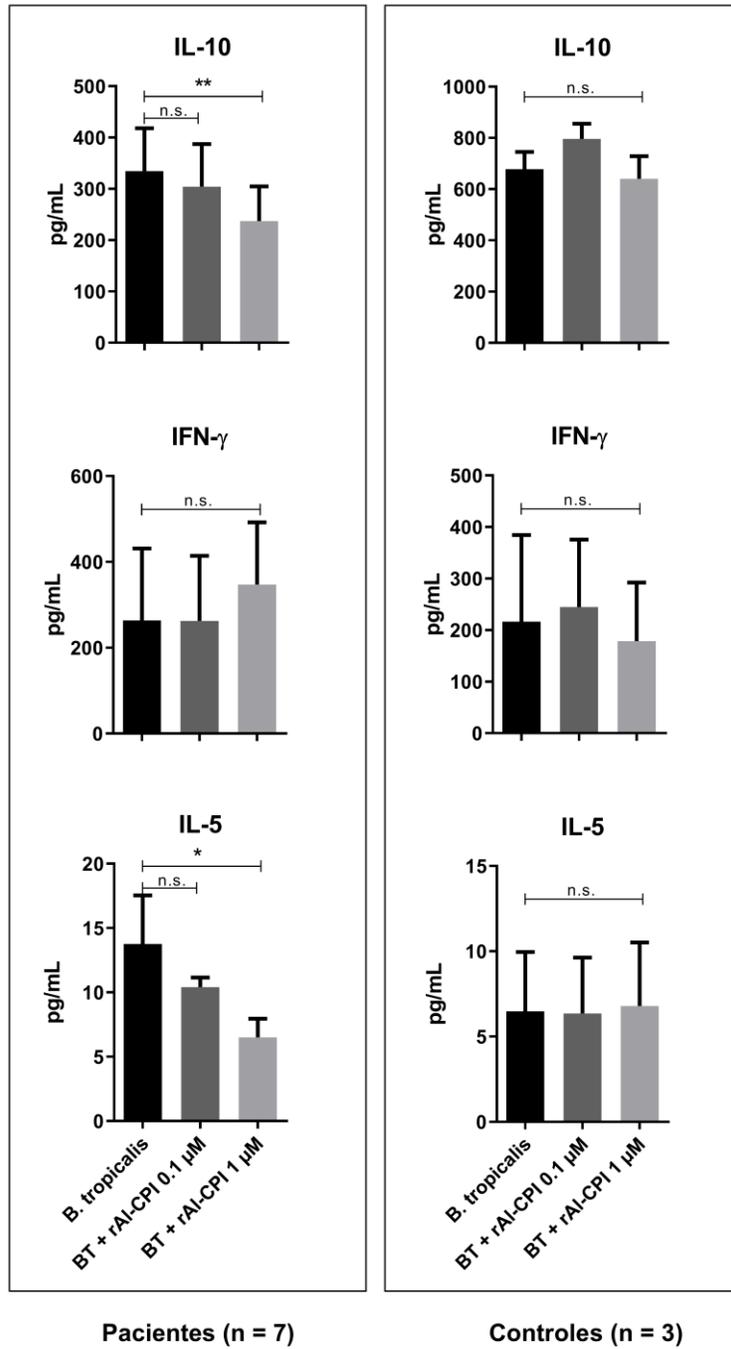


Figura 16 Efecto de rAI-CPI en la inducción de citoquinas por PBMC estimuladas con *B. tropicalis*. Las barras de error representan el SE. Los datos se compararon mediante la prueba Friedman y prueba de Dunn para los análisis post-hoc, teniendo como columna control la condición *B. tropicalis* (BT). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. = no significativo.

6. Discusión

Los resultados de los experimentos realizados en el marco de este trabajo de tesis muestran que la cistatina de *A. lumbricoides* tiene efectos inmunomoduladores en CDmo, en monocitos purificados de sangre periférica y en la respuesta inmune de linfocitos T hacia *B. tropicalis* y estímulos policlonales. El tratamiento previo con rAI-CPI tuvo la capacidad de inhibir la activación de las CDmo y los monocitos estimulados con LPS. En ambas poblaciones celulares a la dosis más alta de rAI-CPI se observó una reducción significativa de la expresión de HLA-DR y PD-L1 y disminución de la molécula co-estimuladora CD86 en el caso de las células dendríticas. A esta dosis también se presentó una disminución en la producción de IL-10. Una posible explicación para estos efectos observados ha sido planteada desde los hallazgos observados en otras cistatinas. La actividad de inhibición de proteasa, demostrada para rAI-CPI, puede dirigirse hacia las catepsinas necesarias para el procesamiento del HLA-DR, como se ha descrito previamente con cistatinas de otros parásitos como *BmCPI* de *B. malayi* [41], rHCcyst-3 de *H. contortus* [42] y rNbCys de *N. brasiliensis* [43]. En este trabajo se demostró que rAI-CPI tiene la capacidad de inhibir una proteasa de cisteína, en este caso la papaína y en un estudio previo, se demostró que la rAI-CPI/pQE30 inhibía la catepsina B humana [2]. Falta comprobar su capacidad de inhibición sobre otras catepsinas humanas y si este efecto es el responsable de los hallazgos observados.

Un aspecto para resaltar de los logros de este trabajo de grado fue la obtención de un producto recombinante que se produce con buen rendimiento y alta pureza; además, se logró remover la endotoxina sin perder la proteína de interés durante el proceso. El producto rAI-CPI/pET15b presentó niveles inferiores a 0.03 pg/μg de endotoxina por cada μg de proteína. Estas son unas mejoras importantes con respecto a la proteína recombinante que se producía anteriormente (rAI-CPI/pQE30) dado que el protocolo de producción utilizado era más extenso y el rendimiento inferior, además el proceso de remoción de endotoxina era menos eficiente con pérdidas del 80% de la proteína. De esta forma, rAI-CPI/pET15b es una proteína más adecuada para los experimentos con células humanas, incluyendo monocitos y células dendríticas [44].

Nuestros hallazgos en células dendríticas coinciden en algunos aspectos con los resultados de Coronado *et al* [3] en el sentido que se redujo la expresión de moléculas co-estimuladoras y la producción de citoquinas inflamatorias. Además, se aporta información nueva sobre la

reducción en las expresiones de HLA-DR y de PD-L1 en CDmo activadas por LPS. Sin embargo, resulta llamativo que en los experimentos actuales se observe que a pesar de que rAI-CPI induce una respuesta de IL-10 en las CDmo, el efecto es opuesto en la CDmo activadas con LPS. En la publicación de Coronado se había observado un efecto similar en ausencia de LPS (aumento de la IL-10) sin cambios significativos de esta citoquina en presencia de LPS [3].

En relación con los monocitos, no se logró detectar un aumento significativo de las citoquinas inflamatorias evaluadas, ni de la IL-10 al estimularse con rAI-CPI. Este resultado es una diferencia importante con respecto a otros estudios realizados en monocitos expuestos a cistatinas de helmintos, como la de *O. volvulus* [4] y la de *B. malayi* [5]. En el trabajo de Schonemeyer *et al.* se reportó que el efecto inmunosupresor de la cistatina de *O. volvulus* era dependiente de monocitos, dado que al depletar de las PBMCs esta población se perdía el efecto anti-proliferativo de la cistatina en linfocitos Th [4]. Aunque no precisan en qué cantidades, los autores mencionan que los monocitos producían IL-10. Sin embargo, debe considerarse que la contaminación con LPS pudo influir en los hallazgos ya que se sabe que este producto microbiano es un fuerte inductor de IL-10 en células mieloides. En este estudio [4] se describió que la concentración de endotoxina para la cistatina de *O. volvulus* fue de 0.23 – 0.76 pg/μg de proteína (10 a 25 veces mayor que el de rAI-CPI). Estas concentraciones de LPS han demostrado tener un efecto en la inducción de citoquinas inflamatorias en monocitos [44] y en células dendríticas, así como también de IL-10 [45]. En el trabajo de Venopugal *et al.* se evaluó el efecto en monocitos de la cistatina de *B. malayi* producida en un vector eucariota (que se espera sea libre de endotoxina) y se encontró una inducción baja de IL-10 que fueron significativamente mayores que el control no inducido solo cuando se usó una cantidad de cistatina mayor que la empleada en nuestros experimentos. Sería necesario realizar titulaciones de las dosis de rAI-CPI en monocitos, incluyendo concentraciones más altas, para poder evaluar de forma más precisa el potencial de esta molécula en la producción de citoquinas.

Hay evidencia científica de que varias cistatinas tienen la capacidad intrínseca de inducir IL-10 en algunas células mieloides, como lo que encontramos a nivel de las CDmo estimuladas con rAI-CPI. En macrófagos se ha descrito que algunas cistatinas de parásitos pueden activar la vía de las MAPKinasas tanto el p38 como el ERK [5, 46], la cual media la inducción de IL-10; mientras que en monocitos solo se activa la vía del p38 [5]. Esto nos sugiere que las

cistatinas pueden utilizar diferentes vías para estimular la producción de IL-10. Estas vías a su vez están involucradas en la inducción de IL-10 después del estímulo con LPS en macrófagos. Aunque se ha visto que otras moléculas inmunomoduladoras pueden interactuar directamente con el TLR4 [47], todavía no se ha demostrado si la cistatina tiene la capacidad de actuar a través de los receptores de la inmunidad innata. Sería importante conocer si las cistatinas (o algunas de ellas) tienen algún receptor que lleva a la activación de la vía, o si los resultados observados hasta el momento con varias cistatinas se deben a la contaminación con LPS o a un efecto de ambos. Para esto pueden utilizarse inhibidores de la vía de los receptores Toll-like (como del adaptador MyD88) para descartar el efecto del LPS, así como también proteínas controles con niveles de endotoxina similares al de nuestro recombinante.

En nuestros experimentos tampoco observamos una inducción significativa del PD-L1 en monocitos o en células dendríticas, lo que difiere de resultados previos con otras cistatinas de parásitos como el publicado por Venugopal *et al.* [5]. Esta molécula inhibitoria se ha relacionado con propiedades inmunomoduladoras en células dendríticas, así como con la inducción de linfocitos reguladores [48]. Sin embargo, no todas las células dendríticas tolerogénicas dependen de esta molécula para ejercer sus efectos inmunomoduladores [49]. Por lo que es posible que los efectos inmunomoduladores de rAI-CPI sean independientes de esta molécula.

Utilizando el estímulo policlonal, CD2/3/28, se demostró que rAI-CPI tiene la capacidad de inhibir la proliferación, independiente del procesamiento, la presentación antigénica y del efecto que tiene esta molécula sobre las células dendríticas y los monocitos. Resultados similares se reportaron con la cistatina de *A. vitae* (rAV17) en linfocitos T purificados de ratón [50], en los cuales se observó una disminución significativa en la proliferación inducida por anti-CD3, comprobando el papel directo que tiene la cistatina sobre estas células. Sin embargo, en un estudio realizado con PBMC humano se encontró que el efecto que tiene la cistatina de *O. volvulus* sobre la proliferación de los linfocitos T es dependiente de los monocitos [4]. Por lo que, es posible que las cistatinas de helmintos posean mecanismos reguladores diferentes, lo que reforzaría la importancia de estudiar las vías a través de las cuales actúa AI-CPI.

Los efectos inducidos por rAI-CPI en la proliferación de los linfocitos T estuvieron acompañados de cambios en la producción de citoquinas observándose un aumento

significativo en los niveles de IFN- γ y una disminución en la producción de IL-5. En células provenientes del bazo de ratón estimuladas con anti-CD3 y rAv17 se observó también una disminución de una citoquina de tipo Th2, la IL-4, sin cambios en los niveles de IFN- γ [50]. Mientras que en el caso de la rOv17 en PBMC humanos se reportó un aumento de la IL-10 y una disminución del IFN- γ , difiriendo de nuestros hallazgos [4].

Aunque no se observó un aumento de la IL-10, el IFN- γ también se ha relacionado con una respuesta reguladora que puede ser inducida por células dendríticas tolerogénicas. Se ha visto que las células dendríticas tolerogénicas inducidas con dexametaxona en los co-cultivos con linfocitos T CD4+ aumentan la producción de IFN- γ [49]. Además, se ha descrito que la inducción de IFN- γ es necesaria para la función de los linfocitos T reguladores, este efecto se ha evaluado principalmente asociado a la inmunidad en los trasplantes [51]. En el caso de las alergias, en un modelo murino de OVA, se observó que la disminución inducida por el extracto de *Caenorhabditis elegans* de las citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13 en los lavados broncoalveolares era dependiente del IFN- γ [52]. Sin embargo, estos niveles de IFN- γ también podrían representar una subpoblación de linfocitos T efectoras, por lo que se podría confirmar estos hallazgos realizando co-cultivos con linfocitos T purificados.

El tratamiento con rAI-CPI en células mononucleares estimuladas con *B. tropicalis* disminuyó significativamente la producción de IL-5. En modelos murinos se ha observado que la disminución en las citoquinas de tipo Th2 inducida por la cistatina está ligada a la inducción de IL-10 y linfocitos T reguladores [3]. Sin embargo, en nuestros experimentos realizados con células mononucleares de sangre periférica no se observó un aumento significativo de IL-10 cuando fueron estimuladas con rAI-CPI sola o en conjunto con *B. tropicalis*. Por lo que, es posible que el mecanismo a través del cual se esté modulando la respuesta alérgica sea independiente de la IL-10. Los experimentos en animales con rAI-CPI, usando un anticuerpo bloqueador de IL-10R, mostraron también que la vía de transducción de señal de la IL-10 no era necesaria para que la molécula inhibiera la inflamación pulmonar y la hiperreactividad en la vía aérea [3].

Dentro de las limitaciones de este trabajo se encuentra que desconocemos el impacto de las diferencias en la conversión de monocitos a células dendríticas (determinado por la expresión del marcador CD1c) entre pacientes. Una solución podría ser estandarizar nuevamente el protocolo de generación de células dendríticas a partir de monocitos con el fin de identificar

las condiciones donde se obtenga una mayor homogeneidad entre pacientes. También, se podría aislar de sangre periférica las células dendríticas y evaluar directamente el efecto de rAI-CPI sobre estas células. Esto evitaría tener que estimular previamente las células con IL-4 y GM-CSF y podríamos lograr una mayor uniformidad en los resultados.

7. Conclusiones

En este trabajo se demostró que rAI-CPI tiene efectos inmunomoduladores en las células dendríticas derivadas de monocitos y en monocitos de sangre periférica, dado que tiene la capacidad de inhibir la maduración inducida por LPS en estas células. Su efecto inmunomodulador también se observó en células mononucleares de sangre periférica dada su capacidad de disminuir la producción de IL-5 mediada por *B. tropicalis*, y la proliferación con el estímulo policlonal de los linfocitos T CD3+CD4+. Los efectos inducidos en estas poblaciones celulares evaluadas parecen ser independiente de la producción de IL-10. Estos hallazgos motivan la profundización en las vías moleculares de acción de la cistatina dado su potencial acción como agente antiinflamatorio en condiciones de tipo alérgico.

8. Perspectivas futuras

- Evaluar el efecto de monocitos y células dendríticas estimulados con rAI-CPI en la modulación de la respuesta de linfocitos T mediante co-cultivos.
- Evaluar más pacientes alérgicos a *B. tropicalis* dado que la respuesta al extracto es variable y es posible que se necesite una muestra más grande para detectar algunos efectos esperados y que mostraron cierta tendencia estadística, entre esta el aumento de la respuesta de linfocitos T específica a *B. tropicalis*.
- Estudiar las vías de señalización que se modifican en células dendríticas y monocitos en respuesta a rAI-CPI mediante métodos de rastreo global como secuenciación de ARN (RNA-seq) y su posterior validación funcional.

9. Financiamiento

Este trabajo fue financiado por un proyecto de Colciencias “*Evaluación de un producto recombinante de Ascaris lumbricoides con capacidad inmunomoduladora en el tratamiento de*

artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico”. Investigador principal: Josefina Zakzuk.
Contrato 699-2017

10. Referencias

1. Caraballo, L., *The tropics, helminth infections and hygiene hypotheses*. Expert Rev Clin Immunol, 2018. **14**(2): p. 99-102.
2. Coronado, S., et al., *A recombinant cystatin from Ascaris lumbricoides attenuates inflammation of DSS-induced colitis*. Parasite Immunol, 2017. **39**(4).
3. Coronado, S., et al., *Ascaris lumbricoides Cystatin Prevents Development of Allergic Airway Inflammation in a Mouse Model*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2280.
4. Schonemeyer, A., et al., *Modulation of human T cell responses and macrophage functions by onchocystatin, a secreted protein of the filarial nematode Onchocerca volvulus*. J Immunol, 2001. **167**(6): p. 3207-15.
5. Venugopal, G., et al., *Differential immunomodulation in human monocytes versus macrophages by filarial cystatin*. PLoS One, 2017. **12**(11): p. e0188138.
6. Elliott, D.E. and J.V. Weinstock, *Nematodes and human therapeutic trials for inflammatory disease*. Parasite Immunol, 2017. **39**(5).
7. Smallwood, T.B., et al., *Helminth Immunomodulation in Autoimmune Disease*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 453.
8. Caraballo, L., *Ascaris and Allergy*, in *Ascaris: the neglected parasite*, C.V. Holland, Editor. 2013, Elsevier. p. 21 - 50.
9. van Riet, E., F.C. Hartgers, and M. Yazdanbakhsh, *Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms*. Immunobiology, 2007. **212**(6): p. 475-90.
10. Moreau, E. and A. Chauvin, *Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 428593.
11. Maizels, R.M., H.H. Smits, and H.J. McSorley, *Modulation of Host Immunity by Helminths: The Expanding Repertoire of Parasite Effector Molecules*. Immunity, 2018. **49**(5): p. 801-818.
12. Titz, T.O., et al., *Ascaris suum infection modulates inflammation: Implication of CD4(+) CD25(high) Foxp3(+) T cells and IL-10*. Parasite Immunol, 2017. **39**(9).
13. Midttun, H.L.E., et al., *Ascaris Suum Infection Downregulates Inflammatory Pathways in the Pig Intestine In Vivo and in Human Dendritic Cells In Vitro*. J Infect Dis, 2018. **217**(2): p. 310-319.
14. McSorley, H.J., et al., *Expansion of Foxp3+ regulatory T cells in mice infected with the filarial parasite Brugia malayi*. J Immunol, 2008. **181**(9): p. 6456-66.
15. Metenou, S., et al., *At homeostasis filarial infections have expanded adaptive T regulatory but not classical Th2 cells*. J Immunol, 2010. **184**(9): p. 5375-82.
16. Ricci, N.D., et al., *Induction of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells during human hookworm infection modulates antigen-mediated lymphocyte proliferation*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(11): p. e1383.
17. Hussaarts, L., et al., *Regulatory B-cell induction by helminths: implications for allergic disease*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **128**(4): p. 733-9.
18. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. J Exp Med, 1973. **137**(5): p. 1142-62.

19. Kushwah, R. and J. Hu, *Dendritic cell apoptosis: regulation of tolerance versus immunity*. J Immunol, 2010. **185**(2): p. 795-802.
20. Ureta, G., et al., *Generation of dendritic cells with regulatory properties*. Transplant Proc, 2007. **39**(3): p. 633-7.
21. Li, X., et al., *Induction of type 2 T helper cell allergen tolerance by IL-10-differentiated regulatory dendritic cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010. **42**(2): p. 190-9.
22. Kumamoto, Y., et al., *CD301b(+) dermal dendritic cells drive T helper 2 cell-mediated immunity*. Immunity, 2013. **39**(4): p. 733-43.
23. Haque A., A.B., Mujić J., Glamočlija U., Akcesme F.B., *Helminth-Derived Product(S): Source for Potential Therapeutic*. PERIODICALS OF ENGINEERING AND NATURAL SCIENCES, 2013. **1**(1): p. 1-7
24. Blum, A., et al., *Heligmosomoides polygyrus bakeri Induces Tolerogenic Dendritic Cells that Block Colitis and Prevent Antigen-Specific Gut T Cell Responses*. The Journal of Immunology, 2012. **189**: p. 2512-20.
25. Hang, L., et al., *Heligmosomoides polygyrus bakeri Infection Activates Colonic Foxp3+ T Cells Enhancing Their Capacity To Prevent Colitis*. The Journal of Immunology, 2013. **191**: p. 1927-34.
26. Matisz, C.E., et al., *Adoptive transfer of helminth antigen-pulsed dendritic cells protects against the development of experimental colitis in mice*. Eur J Immunol, 2015. **45**(11): p. 3126-39.
27. Liu, J., et al., *Adoptive transfer of dendritic cells isolated from helminth-infected mice enhanced T regulatory cell responses in airway allergic inflammation*. Parasite Immunology, 2011. **33**.
28. Everts, B., et al., *Functional Impairment of Human Myeloid Dendritic Cells during Schistosoma haematobium Infection*. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2010. **4**(4): p. 1-10.
29. Wang, Y., et al., *Impairment of dendritic cell function and induction of CD4+CD25+Foxp3+ T cells by excretory-secretory products: a potential mechanism of immune evasion adopted by Echinococcus granulosus*. BMC Immunology 2015. **16**(44): p. 1-10.
30. Movsesijana, A., et al., *The impact of Trichinella spiralis excretory–secretory products on dendritic cells*. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 2011. **34**: p. 429- 439.
31. Aranzamendi, C., et al., *Trichinella spiralis-secreted products modulate DC functionality and expand regulatory T cells in vitro*. Parasite Immunolog 2012. **34**.
32. Sun, Y., et al., *Modulation of dendritic cell function and immune response by cysteine protease inhibitor from murine nematode parasite Heligmosomoides polygyrus*. Immunology, 2013. **138**: p. 370–381.
33. Passos, L.S., et al., *Regulatory monocytes in helminth infections: insights from the modulation during human hookworm infection*. BMC Infect Dis, 2017. **17**(1): p. 253.
34. Schonemeyer A., L.R., Sonnenburg B., Brattig N., Sabat R., Schilling K., Bradley J., Hartmann S., *Modulation of Human T Cell Responses and Macrophage Functions by Onchocystatin, a Secreted Protein of the Filarial Nematode Onchocerca volvulus*. The Journal of Immunology, 2001. **167**: p. 3207-3215.
35. Hartmann, S. and R. Lucius, *Modulation of host immune responses by nematode cystatins*. Int J Parasitol, 2003. **33**(11): p. 1291-302.

36. Schnoeller, C., et al., *A helminth immunomodulator reduces allergic and inflammatory responses by induction of IL-10-producing macrophages*. J Immunol, 2008. **180**(6): p. 4265-72.
37. Ziegler, T., et al., *A novel regulatory macrophage induced by a helminth molecule instructs IL-10 in CD4+ T cells and protects against mucosal inflammation*. J Immunol, 2015. **194**(4): p. 1555-64.
38. Booth, W.T., et al., *Impact of an N-terminal Polyhistidine Tag on Protein Thermal Stability*. ACS Omega, 2018. **3**(1): p. 760-768.
39. Mack, L., et al., *Endotoxin depletion of recombinant protein preparations through their preferential binding to histidine tags*. Analytical biochemistry, 2014. **466**: p. 83-88.
40. Sirvent, S., et al., *Novel vaccines targeting dendritic cells by coupling allergoids to nonoxidized mannan enhance allergen uptake and induce functional regulatory T cells through programmed death ligand 1*. J Allergy Clin Immunol, 2016. **138**(2): p. 558-567 e11.
41. Manoury, B., et al., *Bm-CPI-2, a cystatin homolog secreted by the filarial parasite Brugia malayi, inhibits class II MHC-restricted antigen processing*. Curr Biol, 2001. **11**(6): p. 447-51.
42. Wang, Y., et al., *Characterization of a secreted cystatin of the parasitic nematode Haemonchus contortus and its immune-modulatory effect on goat monocytes*. Parasit Vectors, 2017. **10**(1): p. 425.
43. Dainichi, T., et al., *Nippocystatin, a cysteine protease inhibitor from Nippostrongylus brasiliensis, inhibits antigen processing and modulates antigen-specific immune response*. Infect Immun, 2001. **69**(12): p. 7380-6.
44. Schwarz, H., et al., *Residual endotoxin contaminations in recombinant proteins are sufficient to activate human CD1c+ dendritic cells*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e113840.
45. Perdijk, O., et al., *Induction of human tolerogenic dendritic cells by 3'-sialyllactose via TLR4 is explained by LPS contamination*. Glycobiology, 2018. **28**(3): p. 126-130.
46. Klotz, C., et al., *A helminth immunomodulator exploits host signaling events to regulate cytokine production in macrophages*. PLoS Pathog, 2011. **7**(1): p. e1001248.
47. Goodridge, H.S., et al., *Immunomodulation via Novel Use of TLR4 by the Filarial Nematode Phosphorylcholine-Containing Secreted Product, ES-62*. The Journal of Immunology, 2005. **174**(1): p. 284-293.
48. Domogalla, M.P., et al., *Tolerance through Education: How Tolerogenic Dendritic Cells Shape Immunity*. Frontiers in immunology, 2017. **8**: p. 1764-1764.
49. Unger, W.W., et al., *Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D3 or dexamethasone: differential role for PD-L1*. Eur J Immunol, 2009. **39**(11): p. 3147-59.
50. Hartmann, S., et al., *A filarial cysteine protease inhibitor down-regulates T cell proliferation and enhances interleukin-10 production*. Eur J Immunol, 1997. **27**(9): p. 2253-60.
51. Sawitzki, B., et al., *IFN-gamma production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo*. J Exp Med, 2005. **201**(12): p. 1925-35.
52. Kim, S.E., et al., *Crude extracts of Caenorhabditis elegans suppress airway inflammation in a murine model of allergic asthma*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35447.

11. Anexos

Anexo 1. Consentimiento informado



UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES INMUNOLÓGICAS

CONSENTIMIENTO INFORMADO

En este documento expreso mi consentimiento para participar en el Proyecto “**Identificación y caracterización de proteínas de *Ascaris lumbricoides* con propiedades inmunomoduladoras de utilidad en inmunoterapia de enfermedades alérgicas**”, adelantado por el Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena y dirigido por el Dr. Luis Caraballo.

Se me han explicado los objetivos de esta investigación, los procedimientos y actividades que se necesitan para realizarla, los beneficios y los posibles riesgos. Sé que sus resultados ayudarán al conocimiento sobre cómo influye la infección por el parásito *Ascaris lumbricoides* en el desarrollo de las enfermedades alérgicas y el asma en nuestro medio, así como en el descubrimiento de nuevas formas de tratamiento para estas enfermedades. También se me ha informado que los exámenes y procedimientos serán realizados por personal experto, no tendrán ningún costo para mí y sus resultados serán confidenciales.

Tengo conocimiento que esta investigación es de riesgo mínimo, pero algunos procedimientos pueden generar molestias. Que la toma de sangre se realizará como se hace rutinariamente en los laboratorios clínicos, por una persona debidamente entrenada.

Se me ha garantizado que cualquier pregunta o duda que tenga sobre los procedimientos, riesgos,

beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación puedo preguntarlos a los teléfonos 6698491 y 310 352 7373 del Instituto de Investigaciones Inmunológicas, los investigadores han colocado a mi disposición toda la información disponible sobre otras investigaciones como esta que se han realizado en otros países y cualquier material educativo que me interese revisar. Se me ha explicado que puedo retirar mi consentimiento cuando desee y dejar de participar en el estudio sin que por ello tenga ningún perjuicio o se afecten mis derechos legales, mi reputación o mi acceso a los servicios de salud. De acuerdo a lo establecido por la ley, en caso que se generen daños a mi persona como consecuencia de los procedimientos realizados durante esta investigación, el tratamiento o la indemnización a la que legalmente tendría derecho será asumida por la institución responsable de la investigación.

De manera voluntaria y sin coacción alguna, manifiesto mi disposición a contribuir con las actividades necesarias para la realización de esta investigación y por lo tanto autorizo:

1. Que se me tome una muestra de sangre venosa, de donde después de recolectada se extraerán células del sistema inmune y se cultivarán para probar si moléculas del parásito *Ascaris* son capaces de suprimir la inflamación alérgica
2. Que la información obtenida sobre las características de mi enfermedad y los resultados de los exámenes de serología a alergenos se utilicen en esta investigación para el diseño de los experimentos.

Este proyecto fue revisado y aprobado por un comité de Ética Médica y todos sus protocolos se ajustan a las leyes internacionales y a las disposiciones vigentes en Colombia según la Resolución N° 008430 de 1993, que establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud.

ACEPTO Y FIRMO EN SEÑAL DE APROBACION:

Nombre: _____

CC: _____

Firma: _____

En caso de ser menor de edad:

Nombre de la madre o el padre: _____

CC: _____

Firma de la madre o el padre: _____

Nombre del Testigo # 1: _____ CC: _____

Firma del Testigo # 1: _____ Parentesco: _____

Nombre del Testigo # 2: _____ CC: _____

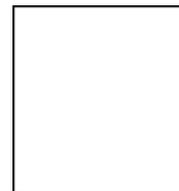
Firma del Testigo # 2: _____ Parentesco: _____

Coloque la huella digital de la madre o el padre si no puede escribir

Persona designada que escribe su nombre:

Nombre: _____ CC: _____

Firma: _____ Parentesco: _____



Índice Derecho

Nombre del investigador o delegado: _____

CC: _____ Firma: _____

Firmado en Cartagena de Indias, el día _ del mes ___ del año 20__

Anexo 2. Carta comité de ética



Universidad de Cartagena
Vice-Rectoría de Investigaciones

EL PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIONES DE LA UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

CERTIFICA QUE:

El proyecto **IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE ASCARIS LUMBRICOIDES CON PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS DE UTILIDAD EN INMUNOTERAPIA DE ENFERMEDADES ALÉRGICAS** presentado por el doctor **LUIS R. CARABALLO**, docente investigador del Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena, no presenta impedimentos éticos, de acuerdo a lo contemplado en la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y en el Reglamento de Ética de la Universidad de Cartagena, tal como consta en el Acta N° 36 del Comité de Ética en Investigaciones del 13 de octubre de 2011.

Para constancia se firma en la Ciudad de Cartagena, a los trece (13) días del mes de octubre del año dos mil once (2011).

ALVARO OLIVERA DIAZ, MD
Presidente

Mayra Martínez

Siempre a la altura de los tiempos!

Sede Claustro de la Merced, Centro, Plaza de la Merced, Cra. 4 N° 38-40, Segundo Piso. Telefax 6642663
E-mail: vicerectoriainvestigaciones@gmail.com - investigaciones@unicartagena.edu.co
Cartagena de Indias, D. T. H. y C.

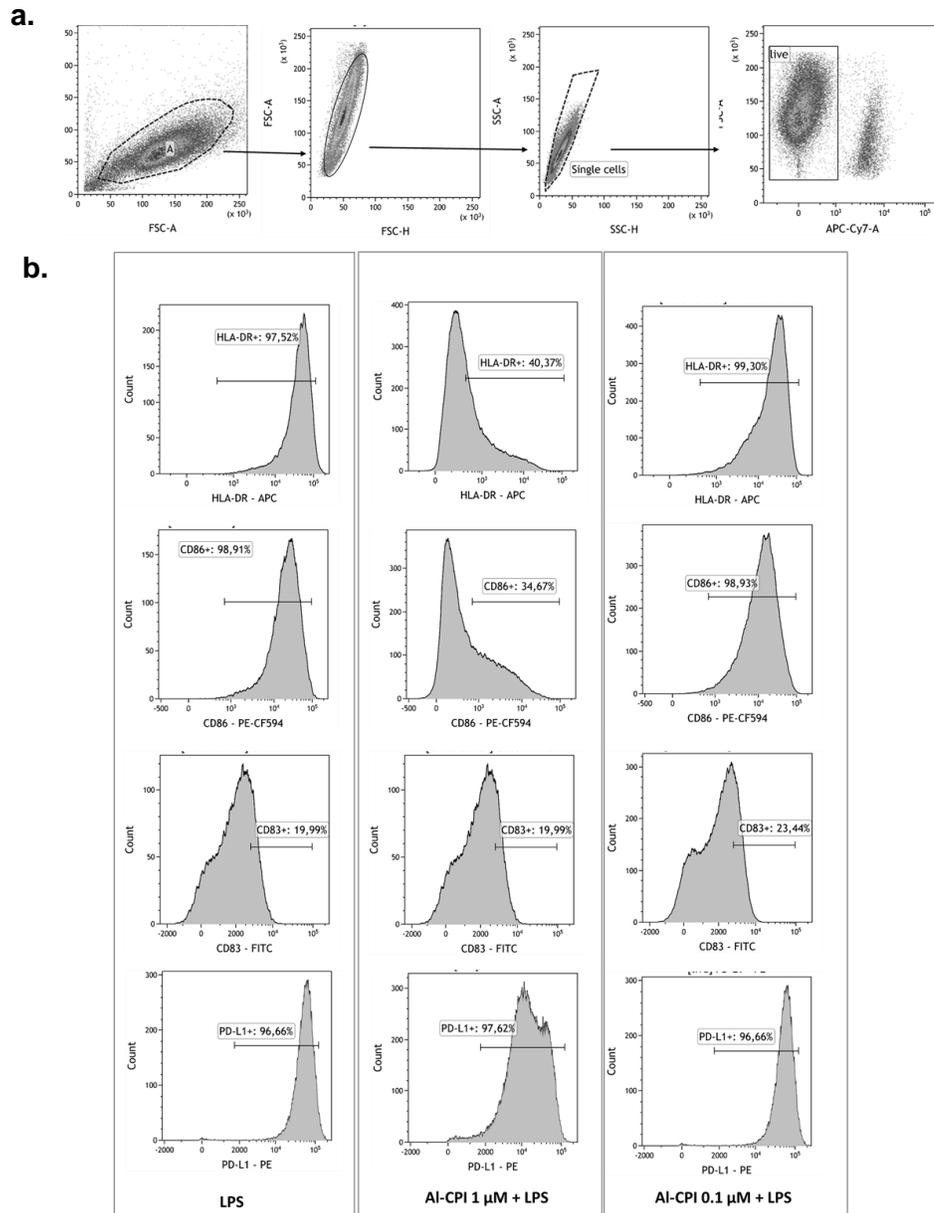


Figura S1. Estrategia de gating de células dendríticas derivadas de monocitos. *a.* Gating representativo de un paciente; *b.* Datos representativos de la inhibición de rAI-CPI en la maduración de las CDmo.

