



**Efecto de las parasitosis intestinales en la presentación y severidad de  
artritis reumatoide y su impacto en linfocitos T y B reguladores.**

**Trabajo de grado para optar al título de Magister en Inmunología**

**Candidato:**

Juan Felipe López Crespo, MD.

**Tutora**

Josefina Zakzuk Sierra, MD, PhD.

Maestría en Inmunología

Instituto de Investigaciones Inmunológicas

Universidad de Cartagena

9 de diciembre de 2019

*Este trabajo está dedicado a mis padres, que han sido mi apoyo incondicional, mi mayor ejemplo de superación, a quienes debo todo y por quienes he llevado todo esto a cabo.*

*A mis hermanos, con quienes tengo un compromiso desde su nacimiento el cual es enorgullecerlos siempre.*

*A mi familia, quienes han estado presente en todo momento durante este camino.*

*A mi tutora, mi gran amiga y probablemente la persona de quien más he aprendido en la vida.*

*A los miembros del Instituto, en especial Dilia, Ana y Daniel, quienes se han convertido en mi familia y me acompañaron durante todo este trabajo*

## Tabla de contenido

1. Resumen ejecutivo .....	6
2. Introducción.....	8
3. Marco conceptual.....	9
3.1. Tolerancia inmunológica y autoinmunidad .....	9
3.1    Poblaciones linfocitarias asociadas a inmunoregulación y tolerancia.....	10
3.1.1    Linfocitos T reguladores .....	10
3.1.2    Linfocitos B reguladores .....	10
3.2    Epidemiología de las enfermedades autoinmunes.....	13
3.3    Artritis reumatoide.....	14
3.5    Contexto de parasitosis y autoinmunidad.....	15
4. Metodología .....	18
4.1    Hipótesis .....	18
4.2. Objetivos.....	18
4.2.1. Objetivo general .....	18
4.2.2. Objetivos específicos.....	18
4.3.    Diseño general.....	19
4.4. Metodología específica .....	25
4.4.1. Coproanálisis .....	25
4.4.2. Estudios inmunológicos .....	25
4.5    Análisis estadístico.....	29
4.6    Consideraciones éticas.....	30
5. Resultados .....	31
5.1. Caracterización sociodemográfica de la población de estudio.....	31
5.2. Frecuencia e intensidad de respuesta al extracto de <i>Ascaris lumbricoides</i> ....	32
5.3. Evaluación de la respuesta inmunológica en pacientes con artritis reumatoide y controles sanos.....	34
5.3.1. Diferencias en el perfil de citoquinas inflamatorias en plasma de pacientes con artritis reumatoide frente a controles sanos .....	36
5.3.2. Identificación de poblaciones de linfocitos reguladores en pacientes con artritis reumatoide y controles sanos.....	38
5.3.3. Identificación de linfocitos T reguladores en casos y controles. ....	47
5.3.4. Determinación de citoquinas en cultivos de PBMC tratados con CpG .....	49

<b>6. Discusión.....</b>	<b>51</b>
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>58</b>
<b>8. Perspectivas futuras.....</b>	<b>58</b>
<b>9. Financiamiento.....</b>	<b>59</b>
<b>10. Agradecimientos .....</b>	<b>59</b>
<b>11. Referencias .....</b>	<b>60</b>
<b>12. Tablas y figuras suplementarias .....</b>	<b>65</b>
<b>13. Anexo .....</b>	<b>68</b>

## **Abreviaturas**

EA: Enfermedades autoinmunes

AR: Artritis reumatoide

LES: Lupus eritematoso sistémico

Bregs: Linfocitos B reguladores

Tregs: Linfocitos T reguladores

VAS: Escala visual análoga del dolor

VSG: Velocidad de sedimentación globular (eritrosedimentación)

HAQ: Health assessment questionnaire (evaluación de calidad de vida)

DAS-28: Disease activity score (Puntaje para actividad de la enfermedad basado en 28 articulaciones)

FARME: Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica.

LB: Linfocitos B

CSO: Corticoesteroides orales

GML: Modelo de lineal generalizado

## 1. Resumen ejecutivo

Las enfermedades autoinmunes son condiciones de difícil tratamiento asociadas a alta discapacidad, afectación de la calidad de vida y un alto costo para su manejo (1). La etiología de estas entidades aún es desconocida, pero se sabe que son resultado de la interacción entre factores genéticos, desequilibrio en la regulación del sistema inmune y detonantes medio ambientales(2). Se ha planteado que las parasitosis intestinales pueden ejercer un papel protector en el desarrollo de EA. El presente proyecto analizó el efecto de la infección por parásitos intestinales en la presentación y severidad de enfermedades autoinmunes de tipo sistémico. Además se estudiaron poblaciones celulares reguladoras asociadas a autoinmunidad y el impacto de las parasitosis sobre estas. Se llevó a cabo un estudio de casos (AR n=31; LES n=21) y controles (n=87) pareados por edad, sexo, zona de residencia y estrato socioeconómico para evaluar la relación entre la infección por parásitos intestinales y la presentación de dos enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico). El estado parasitario se determinó a través de un análisis coprológico. La fase epidemiológica, encontró un posible nexo inverso entre la condición de autoinmunidad y las parasitosis intestinales por protozoarios ( $OR_{ajustado}$ : 0,27; IC95%: 0,07 - 0,99,  $p = 0,049$ ). Debido a la baja frecuencia de helmintiasis, se evaluó la respuesta IgE frente a *Ascaris lumbricoides*, un helminto de alta prevalencia en el trópico. En contraste con el hallazgo inicial, la frecuencia e intensidad de la respuesta IgE determinada por ELISA frente al helminto fue mayor en casos que en controles, además la sensibilización a *Ascaris* estuvo asociada directamente con la AR ( $OR_{ajustado}$ : 3,9; IC95%: 0,16 – 12,05,  $p = 0,049$ ). En un subgrupo de participantes (AR: n = 25 y controles sanos: n = 24) se les solicitó una muestra de sangre para determinación de citoquinas, la frecuencia y actividad funcional de linfocitos B y T reguladores por citometría de flujo y se relacionaron estas variables con la presentación o severidad de la enfermedad. La actividad de la enfermedad fue evaluada a través de escalas clínicas (DAS-28 y HAQ). Se detectaron concentraciones séricas significativamente más altas de IL-8 (5,8 vs 4,7 pg/mL;  $p=0,037$ ) e IL-6 (8,6 vs 2,6 pg/mL;  $p=0,005$ ) en los pacientes con AR en

comparación con los controles. Las concentraciones de las citoquinas se relacionaron con uso de corticoides orales (Beta: 1,59; ES: 0,81;  $p = 0,049$ ) y agentes antirreumáticos modificadores de la enfermedad o FARME (Beta: 1,43; ES: 0,78;  $p = 0,067$ ) en el caso de la IL-8 y con la presentación de artritis reumatoide en el caso de la IL-6 (Beta: 0,81 ES: 0,40,  $p = 0,046$ ). La población de células B reguladoras CD19<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>CD73<sup>-</sup> presentaron mayor frecuencia en los controles sanos en comparación con los pacientes con AR (23,4% vs 15,8%,  $p=0,008$ ). No se encontraron diferencias en la funcionalidad de las poblaciones de linfocitos B productores de IL-10. Las poblaciones de Bregs se correlacionaron negativamente con los niveles séricos de citoquinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8) y con parámetros de severidad (HAQ y articulaciones inflamadas). Las frecuencias de CD19<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>CD73<sup>-</sup> fueron más altas en los infectados por protozoarios; sin embargo, un modelo multivariado se encontró que estas estaban más relacionadas con la condición de autoinmunidad (Beta=-6,4; ES: 0,78;  $p=0,042$ ). No hubo hallazgos del efecto de la severidad o el tratamiento sobre las Bregs. Las frecuencias de Tregs definidas por el fenotipo CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup><sup>-</sup> fueron mayores en los controles que en los casos y se correlacionan con la frecuencia de linfocitos B productores de IL-10 (B10). Finalmente, las citoquinas en los cultivos de PBMCs de pacientes y controles no exhibieron diferencias y la IL-10 se correlaciona positivamente el resto de las citoquinas inflamatorias. En conclusión, en este estudio se observó una relación inversa entre la presentación de enfermedades autoinmunes y la presentación de infección por protozoarios intestinales. Así mismo, se encontraron poblaciones celulares relacionadas con mecanismos de tolerancia (Bregs y Tregs) asociados con protección de artritis reumatoide. Es posible que la infección por parasitosis intestinales se asocie a una mayor frecuencia de Bregs, pero esto debe seguir estudiándose.

## 2. Introducción

Muchos aspectos de las EA son poco entendidos; entre ellos, sus determinantes genéticos y la interacción de estos con el medio ambiente. Es claro que algunos individuos tienen mayor riesgo de padecer algunas de estas enfermedades por portar variantes de riesgo (o carecer alelos protectores) en genes de susceptibilidad, pero es indiscutible que el ambiente confiere tanto factores protectores como de riesgo para su desarrollo. El cambio en las condiciones de vida de la humanidad ha llevado a cambios drásticos en el contacto con otros organismos con los que convivíamos y co-evolucionamos. Las infecciones microbianas y las parasitosis intestinales han disminuido en frecuencia, siendo estas últimas erradicadas en muchos países del mundo, especialmente los de mejores condiciones económicas. Paralelamente, se ha observado un aumento en la incidencia de las EA así como de otras condiciones inflamatorias tanto Th1/Th17 como la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn como Th2/IgE (las alergias); sobre todo en los países industrializados (3). Muchos han planteado que estas dos tendencias guardan una relación causal (4). Es poco lo que se conoce en los humanos sobre los efectos de las parasitosis sobre las enfermedades autoinmunes de tipo sistémico de presentación más común como son: la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico. Se sabe que las parasitosis, especialmente las helmintiasis, tienen efectos inmunorreguladores en el hospedero. Es posible que las infecciones por parásitos puedan inducir poblaciones de linfocitos B o T reguladores y a través de este mecanismo proteja de la presentación de EA o reduzca su severidad. Teniendo en cuenta este contexto, este trabajo buscó aportar soluciones a dilucidar cuál es la relación entre las parasitosis y la presentación o severidad de enfermedades autoinmunes sistémicas: el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoide y cómo influyen las parasitosis en poblaciones de linfocitos reguladores asociados a autoinmunidad.

### **3. Marco conceptual**

#### **3.1. Tolerancia inmunológica y autoinmunidad**

Se define como la ausencia de respuesta frente a un antígeno que ha sido previamente reconocido. El sistema inmune normal se mantiene tolerante frente a lo propio, eliminando o neutralizando los linfocitos que pudieran activarse. Las reacciones frente a estos antígenos se denomina autoinmunidad (5, 6) El proceso de tolerancia se presenta en los inicios de la vida y se da en órganos linfoides primarios, el timo y medula ósea. Se denomina tolerancia central al proceso de reconocimiento de auto-antígenos por linfocitos inmaduros y tolerancia periférica a los mecanismos donde se inactivan o eliminan los linfocitos maduros autorreactivos. Los mecanismos de tolerancia central son la primera línea de tolerancia inmunológica y consisten en delección clonal o edición de receptores de los linfocitos B y T inmaduros. Aquellos que escapen de este mecanismo serán eliminados o inactivados por mecanismos periféricos como son delección clonal (interacción del receptor *Fas*), anergia, supresión por células reguladoras (secreción de citoquinas inmunosupresoras o contacto célula-célula por moléculas de anclaje a superficie celular) e ignorancia (dependiente de barreras anatómicas y concentraciones de antígeno) (5, 7).

La autoinmunidad representa un proceso en el cual el sistema inmunológico responde frente a moléculas propias. Las enfermedades autoinmunes se refieren una serie de manifestaciones clínicas producto de esta respuesta descontrolada frente a lo propio, es decir, los autoantígenos (5, 7). El principal proceso para el desarrollo de la autoinmunidad es el fracaso de la tolerancia a lo propio y por ende la activación de los linfocitos autorreactivos, aunque también está claro el papel de la predisposición genética y los desencadenantes ambientales en la etiología de los desórdenes autoinmunes (5).

### **3.1 Poblaciones linfocitarias asociadas a inmunoregulación y tolerancia**

#### **3.1.1 Linfocitos T reguladores**

Una parte de las células T reguladoras hacen parte de mecanismos derivados de la tolerancia central donde LT CD4+ autorreactivos cambian su especificidad o pueden diferenciarse a nivel periférico a través de la presentación de antígenos por órganos linfáticos. Sus características fenotípicas principales son los marcadores de superficie CD25, CTLA-4, GITR, CD127 y están altamente relacionadas con la expresión del factor de transcripción FoxP3, fundamental para cumplir con su función reguladora junto a CD25, y se diferencian a partir de IL-2 y TGF- $\beta$ . Su mecanismo de acción está dado por la producción de citoquinas inhibitorias (IL-10, TGF- $\beta$ ) y la inhibición de las ACP de estimular a los LT(6, 8). También hay linfocitos T reguladores inducidos en la periferia; destacándose el hecho que la exposición a ciertos antígenos derivados de helmintos expanden poblaciones asociadas a este fenotipo(9).

#### **3.1.2 Linfocitos B reguladores**

El papel de los linfocitos B en la inmunidad se ha relacionado directamente con la respuesta humoral; sin embargo, los mecanismos efectores e inmunorreguladores han captado un gran interés en los últimos años, sobre todo en enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Algunos de estos mecanismos consisten en la producción de citoquinas y el contacto célula-célula. De los grupos de células B que regula negativamente la respuesta inmune, las productoras de IL-10 han sido las más estudiadas. La interleuquina 10 (IL-10) ha sido reconocida como una importante citoquina inmunorreguladora ya que tiene la capacidad de inhibir la producción de quemoquinas, de citoquinas proinflamatorias lo que resulta en una regulación a la baja de las moléculas co-estimuladoras en las células presentadoras de antígeno (APC) y actuar en muchos blancos celulares distintos limitando la respuesta inflamatoria(10). Sin embargo, se han reportado muchos otros mecanismos por los cuales las células B pudiesen regular la respuesta inmune.

Entonces, un linfocito B regulador (Breg) podría definirse como aquel con capacidad de inhibir la respuesta inflamatoria; por ejemplo, la proliferación de linfocitos T autorreactivos o específicos de alérgeno. El mecanismo más común hasta ahora

descrito es la producción de IL-10, pero también se han descrito Bregs productores de TGF- $\beta$ , IL-35 y un fenotipo que expresa Foxp3 (11-13). Los linfocitos B reguladores son poblaciones de estudio más reciente. Las células B se caracterizan fenotípicamente por la expresión de CD19 y se han clasificado en B1 y B2. Así mismo, las células B1 se subdividen en B1a (expresando CD5 en la superficie) y B1b (no expresando CD5), y las células B2 se subdividen en células de transición inmaduras (T1, T2 y T3), células B foliculares (FO) y zona marginal (MZ). Mientras que las células B1 se originan a partir de precursores hepáticos fetales y están enriquecidas en tejidos mucosos y cavidades pleurales y peritoneales, las células B2 se originan a partir de precursores derivados de la médula ósea y están enriquecidas en órganos linfoides secundarios. En humanos, las células Breg se han caracterizado en subconjuntos de memoria B que exhiben fenotipos CD19+CD24<sup>hi</sup>CD27+ (relacionados con células B10) y CD19+IgM+CD27+ y en células B de transición inmaduras (CD19+CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>) (9). La función reguladora de estos LB se ha adjudicado a la capacidad de producir IL-10 y de reducir la secreción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17 por parte de linfocitos T CD4+; además, las células Breg promueven la diferenciación de linfocitos T a un fenotipo regulador e inducen la remisión de manifestaciones autoinmunes en diferentes modelos murinos (14). Por lo tanto, es probable que muchos tipos de células B puedan diferenciarse en una célula Breg a través de mecanismos tales como señales inflamatorias e interacción de unión entre receptor-antígeno. Aunque las células Bregs expresan varios marcadores de superficie, que pueden ser compartidos comúnmente por distintas subpoblaciones celulares durante el curso de diversas enfermedades, no existe un marcador fenotípico para diferenciarlas de manera precisa. Por otro lado, las helmintiasis son capaces de modular la respuesta inmune por su influencia sobre distintos blancos inmunológicos. Recientemente se han descrito poblaciones de células B reguladoras asociadas a las infecciones parasitarias, y que por ocurrencia simultánea pudiesen tener un efecto sobre trastornos del sistema inmune (9).

Varias investigaciones apoyan la idea que existe una deficiencia funcional o numérica de linfocitos B reguladores en pacientes con LES y AR (15-17). Por

consiguiente, se sugiere que las células Breg tienen un papel importante en la inmunopatología de las enfermedades autoinmunes y podrían convertirse en blanco potencial para tratamientos futuros. (18) En algunos estudios se ha encontrado que la IL-10 se sobre-produce en pacientes con LES y que se correlaciona con la severidad de la enfermedad y la abundancia de las Bregs (19, 20). No obstante, esto parece deberse a una contra-regulación negativa en respuesta al aumento de citoquinas inflamatorias pues se ha observado que tanto la IL-10 como las Bregs, al igual que la población pro-inflamatoria de linfocitos T foliculares, se aumentan en las crisis y disminuyen luego en la remisión (21). Por otro lado, en pacientes con inicio reciente del lupus es más clara la deficiencia de IL-10 y de Bregs en comparación con sujetos sanos (22).

Las poblaciones de Bregs descritas tanto en humanos como ratones son bastante heterogéneas en cuanto a su inmunofenotipo (23) describiéndose algunas que expresan marcadores de diferenciación propios de LB inmaduros (CD24+ CD38+), otras de células de memoria IgM positivas o de poblaciones diferentes al linfocito B2 circulante célula T-dependiente. También se han descrito Bregs específicas de antígeno; Van de Veen et al. encontraron una importante proporción de los LB específicos para la fosfolipasa (un alérgeno de la abeja) que producían IL-10 y expresaban preferencialmente IgG4. La frecuencia de estas células en sangre periférica era mayor en criadores de abejas (un modelo de tolerancia bastante estudiado) y en pacientes alérgicos que reciben inmunoterapia específica de alérgeno (24). En la **Tabla 1** se resumen los fenotipos de poblaciones de células B reguladoras estudiadas en distintas enfermedades y los mecanismos por los cuales pudiesen actuar:

**Tabla 1 Fenotipos y mecanismos de acción de células B reguladoras.**

Denominación	Fenotipo	Mecanismo de supresión	Blanco de acción	Referencia
<b>Células B inmaduras,</b>	CD24hiCD38hi	IL-10, PD-L1, CD80, CD86, CD1d	Linfocitos T CD4+, CD8+, células dendríticas plasmocitoides y iNKT	(16, 25-27)
<b>B10</b>	CD24hiCD27+	IL-10	Monocitos	(28)
<b>Células B GZMB+</b>	CD38+ CD1d+ IgM+ CD147+	GZMB, IL-10,IDO	Linfocitos T CD4+	(29)
<b>Br1</b>	CD25hiCD71hiCD73lo	IL-10, IgG4	Linfocitos T CD4+	(24)
<b>Plasmablastos</b>	CD27intCD38hi	IL-10	-	(30)
<b>-</b>	CD39+ CD73+	Adenosina	Linfocitos T CD4+ y CD8+	(31)
<b>iBregs (inducidas)</b>	-	TGF- $\beta$ , IDO	Linfocitos T CD4+	(32)
<b>-</b>	CD19+ TIM1+	IL-10	Linfocitos T CD4+ y CD8+	(33)

Tomado de Mauri et al.(34)

### **3.2 Epidemiología de las enfermedades autoinmunes**

La información de incidencia y prevalencia de las enfermedades autoinmunes con la que se cuenta actualmente es muy incierta puesto que los estudios de cohorte que se han realizado son pocos. En el 2003, Cooper et al realizaron una revisión de la epidemiología de las enfermedades autoinmunes donde, además del estudio más amplio hecho en la población estadounidense por Jacobson et al en 1997 que incluyó ciertas enfermedades específicas, agregaron estudios de otras enfermedades hasta la fecha. Así estimaron un total en la incidencia cercana a 90

por 100000 personas-año y una prevalencia cercana al 3% en la población(35) Más adelante en 2009, al notar que la prevalencia variaba de acuerdo a la enfermedad específica en las distintas áreas geográficas, los mismos autores realizaron una nueva revisión donde hicieron el análisis por zonas y calcularon una prevalencia de 7.6 – 9.4%. Además confirmaron que este estimado puede aplicarse a diferentes partes del mundo. En este estudio, se tuvieron en cuenta estudios de prevalencia hechos en Colombia que midieron la tasa principalmente de miastenia gravis (3 de cada 100000) y esclerosis múltiple (4.41 de cada 100000) (36). El estudio realizado en Dinamarca por Eaton et al se estimó una prevalencia para esa región de 5.3% en 31 enfermedades autoinmunes, donde los datos para LES y AR fueron 0.32 y 3.81 respectivamente (37). En los factores demográficos se ha evidenciado su prevalencia en el sexo femenino y con respecto a la edad y la etnia, varía dependiendo la enfermedad específica (35).

En Colombia, un estudio realizado por Machado Alba et al evidencio una prevalencia estimada de la AR alrededor de 0.15%, con predominio en el sexo femenino, menor a la prevalencia de otros estudios realizados en diferentes países del mundo, en su mayoría desarrollados que es aproximadamente entre 0.5% y 1.0%(38). Igualmente se han reportado en nuestro país los factores asociados a poliautoinmunidad en LES. Se encontró que la prevalencia de poliautoinmunidad en LES fue del 41%, de los cuales 5.1% presentaron síndrome autoinmune múltiple. Los factores más asociados con poliautoinmunidad fueron: género femenino (OR: 2.30; IC95%: 1.03-5.15) y el compromiso articular (OR: 2.02; IC95%: 1.26-3.23) (39).

### **3.3 Artritis reumatoide**

Es una enfermedad de tipo inflamatorio sistémico, caracterizada por la afección de los componentes articulares que lleva consigo dolor, edema, enrojecimiento e incapacidad funcional. Se considera que su desarrollo depende de la interacción tanto de factores ambientales como genes específicos que promueven la pérdida de la tolerancia a los auto-anticuerpos que contienen un residuo de citrulina dejando una respuesta antagónica frente a esta molécula tanto por células T como B, las cuales tienen interacción con citoquinas inflamatorias que juegan un papel

fundamental en la patogenia de la enfermedad. La fisiopatología de la AR involucra varios tipos diferentes de células que incluyen macrófagos, linfocitos B, linfocitos T, condrocitos, osteoclastos y células sinoviales que contribuyen al proceso de destrucción articular (40) Es una de las enfermedades inflamatorias más frecuentes en el mundo occidental con una tasa de prevalencia de 1%, teniendo en cuenta que su incidencia aumenta junto a factores asociados como son sexo femenino (41).

La guía práctica clínica colombiana recomienda el uso de los criterios clasificatorios para Artritis Reumatoide ACR/EULAR 2010 en pacientes de 16 años o más que presenten signos y síntomas de inflamación articular reciente (seis o más semanas) en al menos una articulación y en quienes esta no pueda ser mejor explicada por otra etiología (trauma, osteoartritis).(42) Estos criterios consisten en los siguiente: Presentar al menos 1 articulación con sinovitis clínica (inflamada) y que dicha sinovitis no pueda explicarse por el padecimiento de otra enfermedad y tener una puntuación igual o superior a 6 en el sistema de puntuación de acuerdo la escala que considera la distribución de la afectación articular, serología del factor reumatoide (FR) y/o ACPA, aumento de los reactantes de fase aguda y la duración igual o superior a 6 semanas.

Aunque se han desarrollado innovadoras terapias biológicas con blancos terapéuticos específicos no todos los pacientes responden por lo que se requieren más alternativas (41).

### **3.5 Contexto de parasitosis y autoinmunidad**

Las infecciones parasitarias, en especial por macroparásitos como los helmintos, han demostrado tener un papel de impacto en la regulación de la inmunidad. Los helmintos son grandes organismos multicelulares que pueden ser de vida libre o parásitos. Estos comprenden varios grupos: gusanos redondos (nematodos), gusanos planos (platelmintos), tenias (cestodos) y con aberturas (trematodos), los cuales han existido por cientos de años en su naturaleza de parásitos(43). Las parasitosis se han sido un problema de salud pública el cual causa enfermedades graves como desnutrición, inmunosupresión e inclusive la muerte en algunos casos. Sin embargo, Loukas et al. han propuesto que una pequeña carga de gusanos

generalmente tiene un impacto sobre la salud limitado o nulo, e incluso se ha sugerido que sea comensal al huésped(44). Las helmintiasis puede alterar el sistema inmunitario del huésped induciendo mecanismos reguladores, que modulan la actividad de las células inmunitarias también durante la enfermedad autoinmune, lo que pudiese cambiar el progreso de la enfermedad sorprendentemente teniendo un efecto protector (45).

Como ya se había mencionado antes, se estima que las enfermedades autoinmunes afectan a casi el 10% de la población mundial y tienen gran impacto en las tasas de morbilidad mundial y la carga económica por sus tratamientos ya que la mayoría, por no decir todas, no tienen cura, y no existen estrategias de prevención para estas(36). No obstante, lo más alarmante es el aumento en su incidencia en el mundo desarrollado, viéndose como, entre más índices de desarrollo, mayor es la incidencia de estas enfermedades (46). Si bien es claro que constituyen enfermedades multifactoriales donde predisposición genética es un factor clave en la susceptibilidad (47), el aumento repentino de estas enfermedades durante un período de tiempo muy corto no puede explicarse solo por la genética, sino que apunta a variaciones en el entorno y/o el estilo de vida(48). Para esto se han generado dos hipótesis que han ayudado a dilucidar este fenómeno epidemiológico denominadas la "hipótesis de la higiene" por Strachan(49) y la hipótesis de los "viejos amigos" por Rook (50).

La hipótesis de la higiene, postulada en 1989, propuso que la baja prevalencia de infecciones durante la niñez temprana podía explicar la aparición de asma y rinitis más adelante en la vida. Se sugería que la disminución del tamaño de las familias, las mejoras en los servicios domésticos y los altos estándares de limpieza personal redujo la posibilidad de adquirir infecciones en las familias nacientes, lo que resultó en una expresión clínica más generalizada de las enfermedades atópicas(49). Con el tiempo, esta teoría se amplió para todas las enfermedades inflamatorias crónicas. De hecho, la migración urbana, el mayor acceso a agua limpia y el saneamiento mejorado han reducido la exposición a muchos agentes infecciosos, incluidos los parásitos y dentro de ellos los helmintos especialmente(51). Muchos estudios

epidemiológicos han demostrado una correlación inversa entre la exposición a microorganismos y el desarrollo enfermedades inflamatorias, en especial alérgicas(52-55), sin embargo muy pocos han logrado encontrarlo con autoinmunidad(56).

Acorde a lo anterior, la hipótesis de los “viejos amigos” sugiere que varios organismos, incluidos los helmintos y la microbiota, han co-evolucionado durante mucho tiempo con sus huéspedes mamíferos y actúan como inductores de circuitos inmunorreguladores. Esta hipótesis tiene un fundamento lógico dado que se sabe que los agentes infecciosos, incluidos los helmintos, son potentes moduladores de la función de las células T y que la desregulación de los subconjuntos de células T (Th1 y Th17) son fundamentales en los procesos de enfermedades autoinmunes (48, 50). Cabe resaltar que se ha observado una asociación inversa entre la prevalencia de ciertos helmintos y las enfermedades autoinmunes (48).

Cuando se propuso la hipótesis de la higiene, los investigadores propusieron que podía ser por una pérdida en lo que anteriormente se llamaba el balance Th1/Th2 ya que si los parásitos promovían la respuesta Th2, el perfil inflamatorio Th1 disminuiría. Sin embargo esto no coincidió con la inmunorregulación que se veía en algunos modelos de respuesta alérgica, donde la sintomatología e inflamación fue mejorada por la presencia de helmintiasis. Últimamente se han hecho hallazgos que sugieren el papel de muchos otros mecanismos efectores, principalmente las células T reguladoras y macrófagos activados alternativamente, estos últimos involucrados en la reparación de tejidos. Las helmintiasis cuentan con varios mecanismos inmunoreguladores ya que interactúan con varios blancos celulares como son los linfocitos B reguladores, linfocitos T reguladores, células linfoides y no linfoides innatas (57).

## **4. Metodología**

### **4.1 Hipótesis**

La inmunoregulación inducida por parásitos ejerce efectos protectores sobre la presentación de autoinmunidad

### **4.2. Objetivos**

#### **4.2.1. Objetivo general**

Analizar el efecto de la infección por parásitos intestinales en la presentación y severidad de enfermedades autoinmunes y su relación con linfocitos inmunorreguladores.

#### **4.2.2. Objetivos específicos**

1. Estudiar la relación entre infección por parásitos intestinales y enfermedades autoinmunes mediante un diseño observacional de casos y controles.
2. Comparar la producción de citoquinas inflamatorias entre pacientes con artritis reumatoide y controles.
3. Comparar entre pacientes con AR y controles sanos, la frecuencia y actividad funcional de poblaciones de células B reguladoras.
4. Comparar entre pacientes con AR y controles sanos la frecuencia de poblaciones de células T reguladoras.
5. Estudiar el efecto modificador de la infección por parásitos en la relación entre linfocitos reguladores (B o T) y artritis reumatoide

### **4.3. Diseño general**

Este estudio hace parte de un macroproyecto titulado “*Evaluación de un producto recombinante de Ascaris lumbricoides con capacidad inmunomoduladora en el tratamiento de artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico*” Contrato 699-2017, financiado por COLCIENCIAS. Los resultados expuestos en este trabajo de grado corresponden a una parte de los objetivos propuestos. Se realizó un estudio analítico de casos y controles, el cual contempló dos fases: una epidemiológica para evaluar la relación entre la infección por parásitos intestinales y la presentación de enfermedades autoinmunes de tipo sistémico (artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico) y una de estudios inmunológicos donde se evaluó en un sub-grupo a conveniencia de participantes, la relación entre citoquinas, linfocitos T y B reguladores con la presentación de artritis reumatoide, teniendo en cuenta la infección por parásitos intestinales como efecto modificador. Los participantes del estudio se reclutaron en el Departamento de Bolívar (donde se esperaba una alta frecuencia de parasitosis intestinales).

#### **4.3.1 Criterios de selección de la muestra de estudio**

- Criterios de inclusión: Sujetos entre 18 y 75 años, residentes en el Departamento de Bolívar.
- Criterios de exclusión: Pacientes que presentaban como comorbilidad otra enfermedad autoinmune distinta a artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico, mujeres embarazadas, pacientes con diagnóstico de otras poliartralgias inflamatorias, pacientes con otras enfermedades que causen artritis y pacientes que presenten complicaciones extra-articulares de la artritis reumatoide (vasculitis reumatoide, síndrome Felty, enfermedad pulmonar asociada y neoplasias, entre otras). Sujetos que hayan recibido tratamiento anti-helmíntico en los últimos 6 meses.

#### **4.3.1.1. Identificación de casos**

##### **Fuente de captación**

- Los pacientes con diagnóstico de LES o AR fueron reclutados en la consulta del reumatólogo colaborador del proyecto, Dr. Álvaro Moreno, la cual se lleva a cabo en el Hospital Universitario del Caribe que actualmente es la entidad de referencia más grande de Bolívar y la costa Caribe colombiana.

##### **Definición de caso**

- Individuos que residían en municipios del Departamento de Bolívar que fueron diagnosticados con artritis reumatoide (códigos CIE: M053, M058, M059, M060, M068 y M069) o lupus eritematoso sistémico (M321, M328, M329). Se verificó en la historia clínica que tuviesen un diagnóstico confirmado de alguna de estas dos condiciones y que cumplieran con los criterios médicos establecidos por el American College of Reumatology (ACR) para LES o el ACR/EULAR 2010 para AR.

#### **4.3.1.2. Selección de controles**

##### **Definición de control**

- Individuos sanos que no tuviesen diagnóstico de artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico ni alergia, a los cuales se les realizó una historia clínica para descartar sospecha de estas enfermedades.

Los controles del estudio fueron personas con similitud en edad, sexo, estrato socioeconómico y zona residencial de los casos seleccionados, los cuales no tenían relación familiar o vivan en el mismo lugar de residencia (pareados).

##### **Registro y participación en el proyecto**

Para la participación en el proyecto, tanto a los pacientes y controles se le solicitó firmar el consentimiento informado (**Anexo 1**), posteriormente se realizó una historia clínica de control interno, cuestionarios de severidad de la enfermedad,

calidad de vida y factores de riesgo para parasitosis y finalmente se procedió a la toma de las muestras biológicas.

#### **4.3.2. Obtención de muestras biológicas:**

Para el cumplimiento de los objetivos específicos del proyecto se solicitaron diferentes muestras biológicas a los participantes:

- a. Muestra de coprológico en un frasco estéril para determinar la presencia de parásitos intestinales en heces.
- b. Muestra de sangre total para separación de plasma usado para medición de anticuerpos

De un sub-grupo de participantes (AR: n = 24 y controles sanos: n = 25) se obtuvo una muestra de sangre para estudios de inmunológicos:

- a. Muestra de sangre total para separación de plasma usado para medición de citoquinas
- b. En el caso de pacientes con artritis, se tomó sangre total la medición de VSG (velocidad de sedimentación globular)
- c. Muestra de sangre total para extracción de PBMCs gradiente de Ficoll e identificación de poblaciones celulares (la descripción de los estudios inmunológicos celulares se explica con claridad más adelante).

La toma de cada una de las diferentes muestras fue realizada en simultáneo para poder realizar los análisis de correlación entre variables.

#### **4.3.3. Tamaño de la muestra**

El cálculo de tamaño de la muestra *a priori* para un estudio de casos y controles independientes se realizó en el software EpiDat 3.1 (OPS, Xunta de Galicia). Se tuvieron en cuenta como parámetros:

Proporción de casos expuestos:	30,0%
Proporción de controles expuestos:	60,0%
OR esperado:	0,286
Controles por caso:	2
Nivel de confianza:	95,0%

Esta se basó en la hipótesis de detectar diferencias en relación con infecciones helmínticas, usando datos de personas sanas resultados de una investigación que realizamos en el municipio de Santa Catalina, Bolívar en 2015, en donde encontramos que la frecuencia de ascariasis (la infección más frecuente) para el grupo de edad de 18 a 60 años es de 60% (58). De los estudios disponibles en la literatura que aportan datos de infección por helmintos en alguna de las dos EA estudiadas, uno, relaciona la presencia de la filaria *Oncocerca volvulus* con AR y encuentra que la frecuencia de infección en casos fue de 0% y en los controles de 40%(59) y, otro, publicado en Argentina, encuentra una prevalencia de ascariasis de 2% en pacientes con AR(60). Dado que la ascariasis es más frecuente en nuestra población que la reportada en estos países de donde se derivan los dos estudios, y que el efecto inmunosupresor de *Ascaris* es probablemente más leve, mantenemos la hipótesis de que la infección por *Ascaris* es menos frecuente en los casos, pero con una tasa más alta que los estudios referenciados. Según estos parámetros, el número de casos y controles necesarios son: 47 casos y 87 controles.

#### **4.3.4. Evaluación clínica**

##### **4.3.4.1. Diagnóstico de lupus eritematoso sistémico**

El diagnóstico de la enfermedad se realizó de acuerdo a los criterios establecidos por el American College of Reumatology (ACR) cuando se cumplen 4 de 11 (**Anexo 2**) (61).

#### **4.3.4.2. Diagnóstico de artritis reumatoide**

Se debe tener en cuenta que, en la guía de práctica clínica colombiana del Ministerio de la Salud, para hacer el diagnóstico de la enfermedad se deben cumplir los criterios de clasificación establecidos por el ACR/EULAR 2010, donde una calificación mayor o igual a 6 puntos en los dominios otorga un diagnóstico definitivo de AR (**Anexo 3**).

#### **4.3.4.3. Evaluación clínica de severidad de la enfermedad**

Los pacientes reclutados fueron evaluados por un médico entrenado en reumatología por el mismo médico reumatólogo vinculado al proyecto (Dr. Álvaro Moreno). Luego, se aplicaron otros cuestionarios por un médico general entrenado por reumatólogo, para evaluar el estado actual de la actividad de la enfermedad y la capacidad funcional.

#### **DAS-28 (Disease activity score)**

La escala de severidad para medir la actividad de la enfermedad empleada fue el DAS-28 (**Anexo 4**). Este se ha consolidado como variable fundamental para valorar la actividad de la artritis reumatoide y es el principal parámetro utilizado para establecer decisiones terapéuticas en esta enfermedad, incluidas el inicio y el cambio de tratamientos. El puntaje obtenido en cada paciente se calculó mediante el uso de una calculadora especial (<http://calc.artritis-il6.es/das28>) de la compañía Sanofi donde se ingresan los siguientes parámetros:

- Número de articulaciones inflamadas y número de articulaciones dolorosas teniendo en cuenta 28 articulaciones: muñecas, metacarpofalángicas, interfalángicas proximales, codos, hombros y rodillas
- VSG (mm/h)
- Evaluación general subjetiva de la actividad de la enfermedad realizada por el paciente mediante la escala analógica visual (VAS, rango 0-100).

De acuerdo con el cálculo, los pacientes se categorizaron de la siguiente manera:

Tabla 2 Clasificación de la severidad de la artritis reumatoide según la escala DAS28

Puntaje	Interpretación clínica
<b>DAS28 &lt; 2.6</b>	Remisión
<b>DAS28 ≥ 2.6 y ≤ 3.2</b>	Actividad de la enfermedad baja
<b>DAS28 &gt; 3.2 y ≤ 5.1</b>	Actividad de la enfermedad moderada
<b>DAS28 &gt; 5.1</b>	Actividad de la enfermedad alta

Para efectos de los análisis de actividad de la enfermedad se tomó como punto de corte para baja actividad un valor de 3.2 o menos en la escala de DAS28 y para **enfermedad activa** (sea moderada o severa) un valor mayor a este punto de corte.

### **HAQ (Health Assessment Questionnaire)**

El HAQ fue desarrollado inicialmente en 1978 por James F. Fries y cols en la Universidad de Stanford. Se ha convertido en un instrumento para la evaluación de la capacidad funcional del paciente. El cuestionario de discapacidad del HAQ consta de 20 ítems que evalúan el grado de dificultad (discapacidad física) auto-percibida para realizar 20 actividades de la vida diaria agrupadas en 8 áreas: vestirse y asearse, levantarse, comer, caminar/pasear, higiene personal, alcanzar, prensión y otras actividades. El resultado se obtuvo mediante el uso de una calculadora especial (<http://calc.artritis-il6.es/das28>) de la compañía Sanofi. La puntuación resultante del cálculo oscila entre 0 (min. incapacidad) y 3 (max. Incapacidad). (**Anexo 5**)

#### **4.4. Metodología específica**

##### **4.4.1. Coproanálisis**

Las muestras para coproanálisis se obtuvieron por evacuación espontánea, fueron recolectadas en viales de plástico, limpios y secos rotulados con el nombre del participante, almacenadas a 4°C y procesadas en un tiempo no mayor a las 12 horas después de recolectadas. Por frotis en fresco con solución salina al 0,85% y tinción con Lugol se identificaron los trofozoítos y quistes de protozoarios intestinales y por método Kato-Katz se identificaron las larvas y el conteo de huevos por gramo de heces de helmintos. El conteo de huevos de helmintos se realizó mediante el método Kato Katz utilizando un kit comercial (Copro Kit, C&M Medical, Campinas, Brasil). Los resultados se expresaron como huevo por gramo de heces (p. Ej.). La presencia de trofozoítos, quistes, larvas o huevos se consideró diagnóstico de infección activa.

##### **4.4.2. Estudios inmunológicos**

###### **4.4.2.1. Determinación de sensibilización a *Ascaris lumbricoides***

Los niveles específicos de IgE en plasma para el extracto de *A. lumbricoides* se detectaron por duplicado mediante el ensayo indirecto de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) ya estandarizado en el Instituto de Investigaciones Inmunológicas(62). Brevemente, cada pocillo se revistió con 1 µg de extracto diluido en buffer de Carbonato/Bicarbonato de sodio (pH 9,6). Las placas de microtitulación (IMMULON 4HBX, Thermo Fisher Scientific) se incubaron durante la noche a 4 ° C en una cámara húmeda, se lavaron cinco veces (PBS pH 7,4, Tween 20 al 0,1%) y se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% por 3 horas a temperatura ambiente (RT). Las placas se lavaron nuevamente y se agregaron muestras de plasma (diluidas 1: 5) y se incubaron durante la noche a RT en una cámara húmeda; luego se lavó y se incubó durante 2 horas con conjugado de IgE-fosfatasa alcalina anti-humana (Sigma) diluido 1: 500 y desarrollado con sustrato de fosfato de

nitrofenilo (1 mg/mL; Sigma) diluido en dietanolamina al 10%, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM. La reacción se leyó a los 30 minutos y se midió la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro (MultiSkan GO, Thermo Scientific). Se utilizaron plasmas de control positivo y negativo en cada experimento y PBS como control para la unión no específica del conjugado de anti-IgE humana con fosfatasa alcalina. Los valores de corte para definir respuestas de IgE positivas o negativas a al extracto se calcularon como la densidad óptica media (media OD) de 4 controles negativos (dos plasmas de Colombia y dos europeos) + 3 SD (desviación estándar).

#### **4.4.2.2. Determinación de concentraciones de citoquinas en sueros de casos y controles**

La determinación de citoquinas en los plasmas de las casos y controles se realizó utilizando el estuche BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit [Interleuquina-8 (IL-8), IL-12p70, IL-1β, IL-6, IL-10, Factor de necrosis tumoral (TNFα)] (N° Cat. 551811, BD, Estados Unidos). 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 plasmas de los sujetos del estudio 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 cada 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.

#### **4.4.2.3. Identificación de poblaciones celulares por citometría de flujo**

##### **4.4.2.3.1. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica, congelación y descongelación**

Se extrajeron las células mononucleares en sangre periférica para la caracterización de linfocitos T y B reguladores. La extracción de células mononucleares realizó usando un método de separación Ficoll por gradiente de densidad. Se extrajo

sangre periférica en tubos heparinizados. Posteriormente, las muestras se diluyeron en PBS y Ficoll Histopaque (Sigma Aldrich, Ref 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 resuspendidas en 2 mL de RPMI (Sigma Aldrich, Ref 8758) completado con Penicilina/Estroptomicina, Vitaminas y Piruvato (5ml , 10 ml y 50 ml para 500 ml de RPMI, respectivamente) y 1 mL de medio de congelación (80% suero bovino fetal inactivado y 20% dimetilsulfóxido DMSO). Las muestras fueron almacenadas en crioviales de 2 mL y refrigeradas a -70 grados con un contenedor de congelamiento (Thermo Scientific™ Mr. Frosty™ Freezing Container) para poder refrigerar las células a -1 grado °C/minuto. La descongelación de los viales almacenados se realizó a 37C<sup>0</sup> en baño de maría. Posteriormente fueron lavadas dos veces con medio RPMI completo y centrifugadas 10 min a 300g en 8°C. Después de ser acondicionadas, la suspensión celular fue puesta en movimiento rotacional 180 grados durante 30 minutos a 4°C. Finalmente se contaron las células en la cámara de Neubeur y se preparan para su tinción (identificación de Tregs) o cultivo (identificación de Bregs)

#### **4.4.2.3.2. Identificación de poblaciones de células B reguladoras**

Este trabajo logró la estandarización de este protocolo de identificación de células B reguladoras en sangre periférica. En breve, se sembraron en placas de 24 pozos (Corning ref. 3526) con las células a una concentración ( $1 \times 10^6$  cells/mL). Estas células fueron estimuladas con 0.5 uM de CpG (ODN 2006) (Ref. 130-100-105. Miltenyi Tech (Stock 100uM)) (el cuál estimula la producción de IL-10 en linfocitos B por medio del TLR-9) y como control negativo, las mismas células sin estimular. Se incubaron por 72 horas en CO<sub>2</sub> a 37°C. Cuatro horas antes de finalizar el periodo de estimulación, se agregaron los estímulos de PMA (SIGMA P8139) / Ionomicina (SIGMA IO634) para generar la producción de citoquinas y dos horas antes la Brefeldina A (SIGMA B6542) para inhibir la excreción de las mismas y así detectar intracelularmente las citoquinas generadas por las células.

#### **4.4.2.3.2. Tinción con anticuerpos monoclonales de superficie y citometría de flujo**

Para la caracterización de células B y T reguladoras, las células fueron teñidas con un panel de anticuerpos monoclonales unidos a fluorocromos contra los marcadores de superficie e intracelulares. Para determinar viabilidad las células se tiñeron con el marcador eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (cat: 65-0865-14) diluido 1uL (FVD): 4000 uL (PBS). Se incubaron durante 20 minutos a 2-8 ° C, protegidas de la luz. Las células fueron lavadas 1 vez con Stain Buffer (FBS) (BD, Biosciences, Ref 554657) y centrifugadas a 300g por 5 min a 4°C. Luego se agregó a la suspensión celular el mix de monoclonales de marcadores de superficie (cada panel descrito más adelante). Se incubaron por 20 min en oscuridad a 4°C. Se lavaron nuevamente con StainBuffer. Se añadió el buffer de Fixation/Permeabilization solución (Ref. 554722) y se dejó incubando por 20min a 4°C. Se lavaron las células con PermWash Buffer (1X) (Ref. 554723). Se agregó a la suspensión celular los monoclonales de marcadores intracelulares. La lectura de las células se realizó usando el equipo FACS Aria III (BD Biosciences). El análisis se realizó usando el software de análisis de citometría de flujo Kaluza (Beckman Coulter Inc). En el **Anexo 6**. se desglosan los paneles de anticuerpos de superficie e intracelulares evaluados.

#### **4.4.2.3.3. Determinación de citoquinas en sobrenadantes de cultivo de PBMCs**

Los sobrenadantes de los cultivos se recogieron para determinación de producción de citoquinas. Se determinaron las concentraciones de las citoquinas utilizando el estuche BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit [Interleuquina-8 (IL-8), IL-12p70, IL-1β, IL-6, IL-10, Factor de necrosis tumoral (TNFα)] (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 los cultivos de PBMCs de los sujetos del estudio 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 cada citoquina. Después de adquirir los resultados utilizando el sistema FACS-ARIA III (BD, Estados Unidos), los resultados se analizaron en el programa FCAP Array TM Software versión 3.0.

#### **4.5 Análisis estadístico**

A pesar que el estudio se realizó con casos y controles pareados por clásicas variables confusoras, el análisis de los datos se hizo como muestras independientes. La mayor parte de los análisis estadísticos se realizaron con SPSS versión 13.0 (Chicago, IL, EE. UU.). Dado que la mayor parte de las variables no guardaban una distribución gaussiana, se emplearon métodos no paramétricos para los análisis. Las pruebas bivariadas incluyeron el Chi-cuadrado de Pearson para comparar variables categóricas y la prueba de Mann Whitney o Kruskal Wallis para comparar variables continuas entre dos o más grupos, respectivamente. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ . La mayor parte de los gráficos se generaron con el software GraphPad Prism versión 8.

Los análisis de correlación se hicieron por Spearman entre variables continuas y se graficaron con el paquete *CorrPlot* con el software R. Para confirmar algunas asociaciones encontradas mediante análisis bivariados, se evaluaron, de acuerdo con la naturaleza de los datos, en modelos de regresión multivariados ajustados por potenciales agentes de confusión. Para variables dependientes de tipo categóricas, se empleó regresión logística con el fin de encontrar el efecto ajustado de las posibles co-variables modificadoras del efecto de interés basados en el análisis bivariado, con aquellos predictores con un valor  $p < 0,1$  en las pruebas de asociación, incluyendo siempre edad y género como posibles variables de confusión. Para las variables continuas dependientes, se emplearon modelos lineales generalizados (GLM), utilizando las distribuciones más apropiadas las cuales se seleccionaron a partir de su exploración con el paquete *fitdlist* en R y criterios de bondad de ajuste.

#### 4.6 Consideraciones éticas

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

De acuerdo al 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 en este caso es un examen coprológico y toma de una muestra de 30 mL sangre para hacer estudios in vitro de citometría de flujo por un médico entrenado.

Todos los sujetos fueron invitados a participar de forma voluntaria y se les informó que los datos recolectados serían tratados de forma anónima, sólo utilizados con fines académicos. Únicamente, el equipo de investigación tuvo acceso a la información registrada en las bases de datos creadas. Además, se adhirió a las normas científicas internacionales, protocolo de Helsinki y principios de Belmont. 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: *Evaluación de un producto recombinante de Ascaris lumbricoides con capacidad inmunomoduladora en el tratamiento de la artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico*. Investigador Principal: Josefina Zakzuk. Código: 1107-74455079. Contrato: 699-2017) (**Anexo 7**).

## 5. Resultados

### 5.1. Caracterización sociodemográfica de la población de estudio

En principio, para analizar si existía una relación entre la infección activa por helmintos y la presentación de enfermedades autoinmunes de tipo sistémico, se comparó la frecuencia de estas infecciones entre un grupo de pacientes con artritis reumatoide (n = 31) o lupus eritematoso sistémico (n=21), seleccionados en de la consulta externa de Reumatología y controles sanos escogidos de forma pareada (n=87). Los pacientes y controles sanos provenían de la zona urbana de Cartagena (52%) o de distintos municipios del Departamento de Bolívar. Como se indica en la **Tabla 3.**, no hay diferencias significativas entre las características sociodemográficas de los grupos de estudio.

**Tabla 3.** Caracterización sociodemográfica de la población de estudio

Variable	Casos (n=52)*	AR (n=31)	LES (n=21)	Controles (n=87)*	p- valor
Edad (media ± SD)	48,6 ± 13,7	55,8 ± 11,3	37,9 ± 9,1	49,5 ± 16,4	0,33
Sexo (F)	90,4%	87,1%	95,3%	93,1%	0,45
<b>Tipo de residencia</b>					
Urbano	52%	51,6%	52,4%	63,2%	0,43
Rural	48%	48,4%	47,6%	36,8%	
Parasitosis	4(7,6%)	3 (9,7%)	1 (4,8%)	15 (17,6%)	0,102*
Protozoarios	3(5,7%)	2 (6,5%)	1 (4,8%)	15 (17,6%)	0,046*
Helmintos	1(1,9%)	1 (3,2%)	0 (0%)	0	N.D.

(\*) El valor de p corresponde a la comparación entre casos y controles. Test empleado: Chi-cuadrado.

De forma general se observó una baja frecuencia de parasitosis intestinales (13,9%; IC95%: 7,6 – 19,7) siendo más frecuentes las causadas por protozoarios (13,3%). Los casos presentaron una menor frecuencia de parasitosis intestinal en comparación con los controles, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa (17,6% vs 7,6%; p=0,102). Al comparar las frecuencias de infecciones por protozoarios entre casos y controles, se halló una diferencia significativa (17,6%

vs 5,7%;  $p=0,046$ ). En un modelo de regresión logística, ajustado por potenciales agente de confusión, la infección por protozoarios se mantuvo asociada de manera inversa con la presentación de enfermedades autoinmunes ( $OR_{ajustado}$ : 0,27; IC95%: 0,07 -0,99,  $p = 0,049$ ) (Tabla 4). Como únicamente se detectó un caso de helmintiasis (*Strongyloides stercoralis*) en una paciente con artritis reumatoide no se realizaron análisis estadísticos de esta variable.

**Tabla 4.** Relación entre infección por protozoarios y enfermedades autoinmunes de tipo sistémico

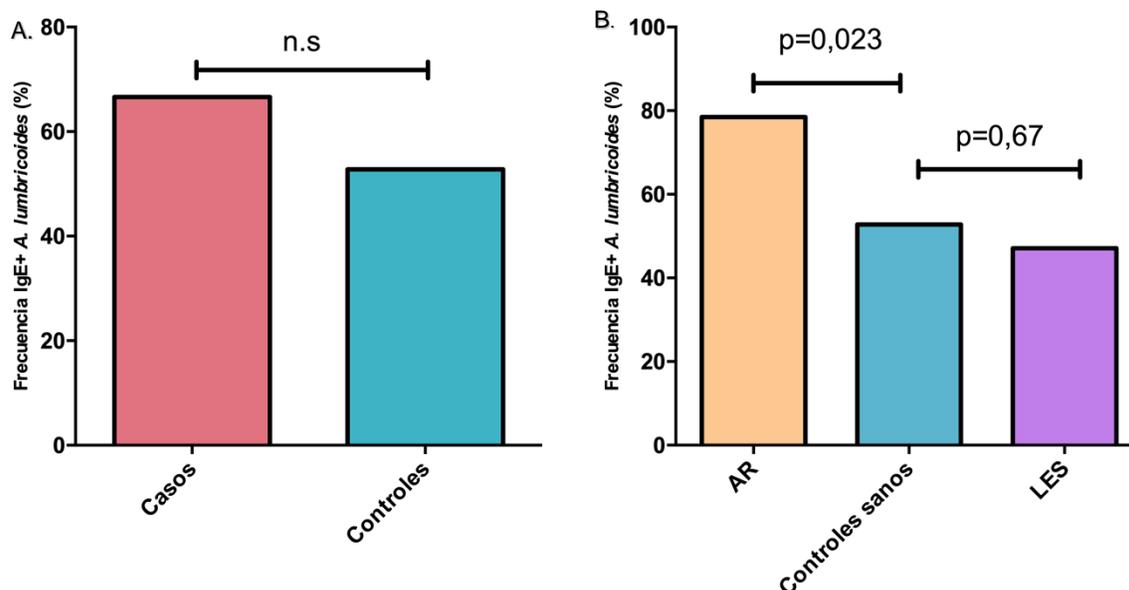
	O.R.	95% C.I. OR		p-valor
		Inferior	Superior	
<b>Infección por protozoo</b>	<b>0,271</b>	<b>0,074</b>	<b>0,994</b>	<b>0,049*</b>
<b>Edad en años</b>	0,990	0,967	1,014	0,408
<b>Ambiente (Rural)</b>	1,726	0,826	3,604	0,146
<b>Género (F)</b>	0,692	0,193	2,484	0,572

Modelo de regresión logística bivariada. Variable dependiente: diagnóstico de artritis reumatoide.

\*valor estadísticamente significativo

## 5.2. Frecuencia e intensidad de respuesta al extracto de *Ascaris lumbricoides*

Dada la baja presentación de helmintiasis, se decidió evaluar como marcador indirecto de infección pasada por *Ascaris lumbricoides*, el estado de sensibilización al helminto mediante prueba de IgE por ELISA. La frecuencia de sensibilización de la muestra fue 59,2%. La sensibilización para cada grupo pacientes con AR, LES y controles fue 78,5%, 47,1% y 52,8%, respectivamente. No se encontró asociación significativa entre sensibilización a *A. lumbricoides* y la condición de autoinmunidad ( $p=0,16$ ). Sin embargo cuando se realizó el análisis independiente por cada enfermedad se encontró una asociación directa entre la sensibilización y AR ( $p=0,023$ ). En contraste, no se encontró ninguna asociación cuando se compararon los pacientes con LES con los controles sanos ( $p=0,67$ ) (Figura 1).



**Figura 1. Frecuencia de sensibilización a *A. lumbricoides*.** Comparación de las frecuencias de sensibilización entre casos y controles (A) y comparación por grupos respecto a los controles (B). Chi-cuadrado. n.s = no significativo.

En un modelo de regresión logística, ajustado por potenciales agente de confusión, la sensibilización IgE a *Ascaris* se mantuvo asociada directamente con la presentación de AR ( $OR_{ajustado}$ : 3,9; IC95%: 0,16 – 12,05,  $p = 0,049$ ) (**Tabla 5.**)

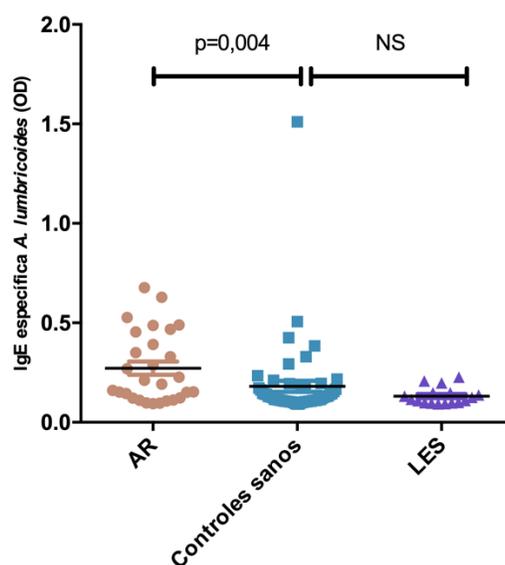
Igualmente se encontraron diferencias significativas en la intensidad de la respuesta IgE a *Ascaris*. Al comparar de los 3 grupos por la prueba de Kruskal Wallis se observó que existían diferencias entre ellos ( $p=0,003$ ). En un análisis post-hoc se determinó que las O.D de los pacientes con pacientes con AR eran mayores en comparación con los controles sanos ( $p=0,004$ ) pero no en los pacientes con LES (**Figura 2**).

**Tabla 5** Relación entre sensibilización a *Ascaris* y presentación de artritis reumatoide. (\*) valores de p significativos para el modelo.

Variable	O.R.	95% C.I. para O.R.		p-valor
		Inferior	Superior	
<b>Sensibilización a <i>Ascaris</i></b>	<b>3,893</b>	<b>1,257</b>	<b>12,054</b>	<b>0,018*</b>
<b>Edad</b>	<b>1,042</b>	<b>1,004</b>	<b>1,081</b>	<b>0,028*</b>
<b>Ambiente(R)</b>	0,601	0,214	1,689	0,334
<b>Género(F)</b>	0,558	0,089	3,512	0,534

Modelo de regresión logística bivariada. Variable dependiente: diagnóstico de artritis reumatoide.

\*valor estadísticamente significativo



**Figura 2. Intensidad de la respuesta a *A. lumbricoides* entre casos y controles.** Se realizó un análisis de los tres grupos por prueba de Kruskal-Wallis. Los valores de p representados corresponden al análisis post-hoc de las variables en comparación con el grupo control.

### 5.3. Evaluación de la respuesta inmunológica en pacientes con artritis reumatoide y controles sanos.

Para efectos de esta tesis de maestría, se estudió la relación entre la artritis reumatoide y poblaciones de linfocitos reguladores. Se seleccionó un sub-grupo de casos y controles, a quienes se le determinaron niveles de citoquinas en plasma y

cultivos de PBMC y se les identificaron poblaciones asociadas con regulación del sistema inmune y que pudiesen jugar un papel en la patogénesis de la enfermedad, que además pudiesen estar afectadas por la presencia de parasitosis por helmintos o protozoarios. En la **Tabla 6** se presentan el resumen de las características tanto demográficas como clínicas (en caso de los pacientes) del subgrupo. En el **Tabla suplementaria 1** se pueden observar las características clínicas detalladas de cada uno de los pacientes.

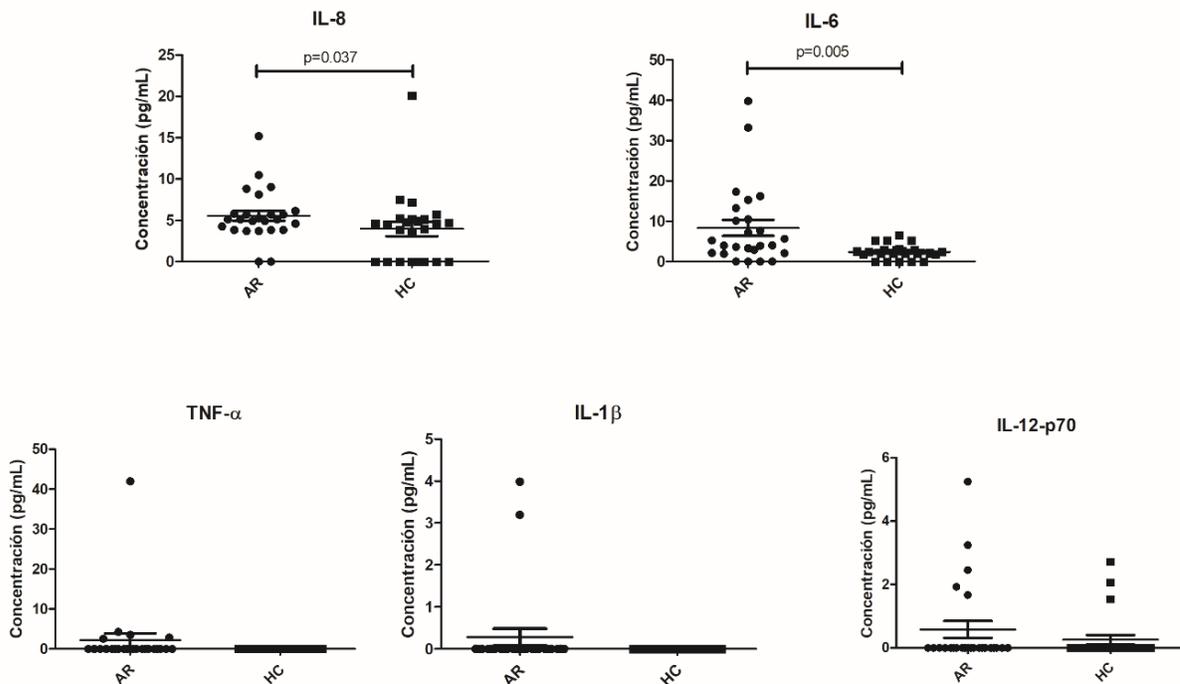
**Tabla 6. Características del subgrupo de análisis de variables inmunológicas**

Variable	AR (n=25)	Controles (n=24)
Edad en años (media $\pm$ SD)	56,8 ( $\pm$ 12,2)	47,3 ( $\pm$ 15,2)
Sexo (n, % F)	23 (88)	23 (95,8)
Residencia (% urbano)	13 (52)	13 (54)
Infección por parásitos (n, %)	2(8)	7(29)
Tratados (n, %)	20 (80)	N.A.
<b>FARMES</b>	19 (68)	N.A.
<b>Corticoide</b>	14 (58)	N.A.
<b>Anti-TNF<math>\alpha</math></b>	4 (13)	N.A.
DAS-28 (mediana, rango)	3,8 (1,46 - 6,53)	N.D
Enfermedad activa (DAS28>3.2)	17 (68%)	N.A
VSG (mediana, rango)	31 (8-114)	N.D
Dolor, VAS (mediana, rango)	10 (0-80)	N.D
HAQ (mediana, rango)	0,88 (0-2,38)	N.D

AR: artritis reumatoide; SD: desviación estándar; VSG: velocidad de sedimentación globular; VAS: escala visual análoga del dolor; HAQ: evaluador de la calidad de vida; FARMES: fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad; N.A: no aplica; N.D: no detectado.

### 5.3.1. Diferencias en el perfil de citoquinas inflamatorias en plasma de pacientes con artritis reumatoide frente a controles sanos

Para determinar el estado inflamatorio basal de los participantes del estudio se midieron en plasma citoquinas inflamatorias. Se observaron niveles significativamente más altos de IL-8 (5,8 vs 4,7 pg/mL;  $p=0,037$ ) e IL-6 (8,6 vs 2,6 pg/mL;  $p=0,005$ ) en los pacientes con AR que en los controles. Algunas citoquinas fueron detectables en pocos pacientes (TNF, IL-12p70 e IL-1 $\beta$ ) o completamente indetectables (IL-10) razón por la cual no pudieron ser comparadas. TNF- $\alpha$  no fue detectable en ningún control, pero si en 5 pacientes (**Figura 3**).



**Figura 3. Diferencias en el perfil de citoquinas inflamatorias entre pacientes con artritis reumatoide y controles.** AR: artritis reumatoide, HC: controles. Prueba de Mann-Whitney (AR:  $n=25$  vs controles:  $n=21$ ). Las citoquinas de la fila inferior no se compararon dada la gran cantidad de datos indetectables.

Las concentraciones séricas de IL-6 e IL-8 no se correlacionaron con parámetros clínicos de severidad. Sin embargo, al usar la categoría de actividad baja vs moderada/severa (determinado por DAS28) se encontraron asociaciones en direcciones opuestas con estas citoquinas. La IL-6 fue mayor en aquellos con enfermedad activa comparada con aquellos que tenían baja actividad ( $p=0,046$ ). Por el contrario, la IL-8 fue más alta en los que tenían la enfermedad leve ( $p=0,03$ ) (**Figura 4**). Dado que la actividad de la enfermedad define el uso de los medicamentos, es probable que estos influyan en los niveles basales de estas citoquinas. Por esta razón, se exploraron las diferencias en las mismas de acuerdo con el uso de terapia antirreumática. Los niveles séricos de IL-8 fueron mayores en aquellos que tomaban corticoides orales (5,6 pg/mL, IQR: 4,4 vs 4,9 pg/mL, IQR: 1,4;  $p=0,015$ ). El grupo de pacientes que recibía terapia con metotrexate presentaron menores concentraciones de IL-6 (3,3 pg/mL, IQR: 2,7 vs. 10,3 pg/mL, IQR: 11,8;  $p=0,046$ ). Para aclarar la relación entre estos factores, se corrió un modelo lineal generalizado (GLM), usando una distribución gamma, para definir las asociaciones de estos con los niveles de las citoquinas. Se encontró que los niveles séricos de IL-8 están asociados al uso de corticoides orales (Beta: -1,59; ES: 0,81;  $p = 0,049$ ) y FARMEcs (Beta: -1,43; ES: 0,78;  $p = 0,067$ ) y no a la severidad de la enfermedad (Beta: 0,83; ES: 0,79;  $p = 0,30$ ), mientras que la IL-6 se mantuvo positivamente asociada a la enfermedad (Beta: 0,81 ES: 0,40,  $p = 0,046$ ).

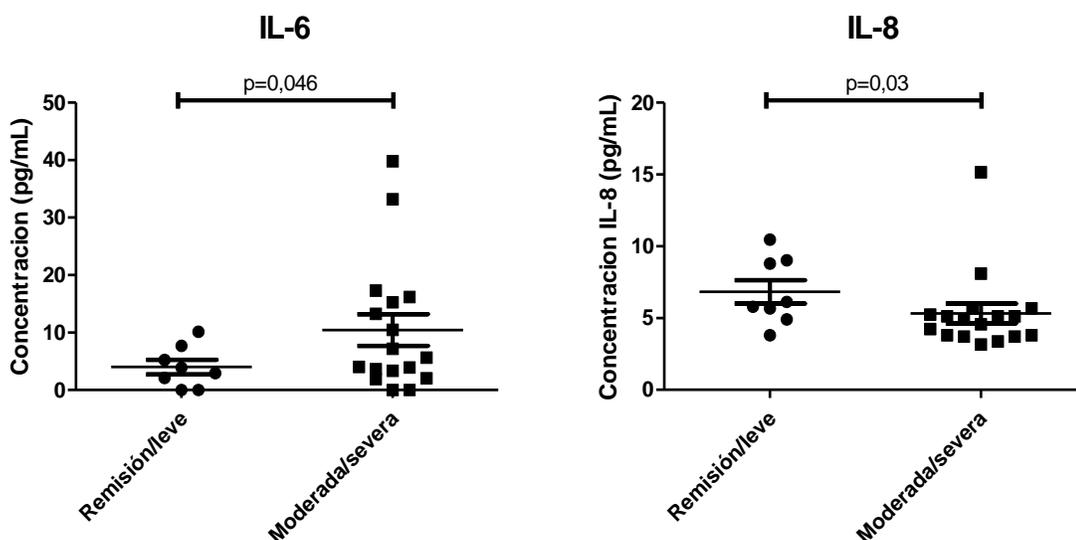


Figura 4. Diferencias los niveles de citoquinas séricas en pacientes con artritis reumatoide de acuerdo con el estado de actividad de la enfermedad. Prueba de Mann-withney (AR: n=25).

### 5.3.2. Identificación de poblaciones de linfocitos reguladores en pacientes con artritis reumatoide y controles sanos

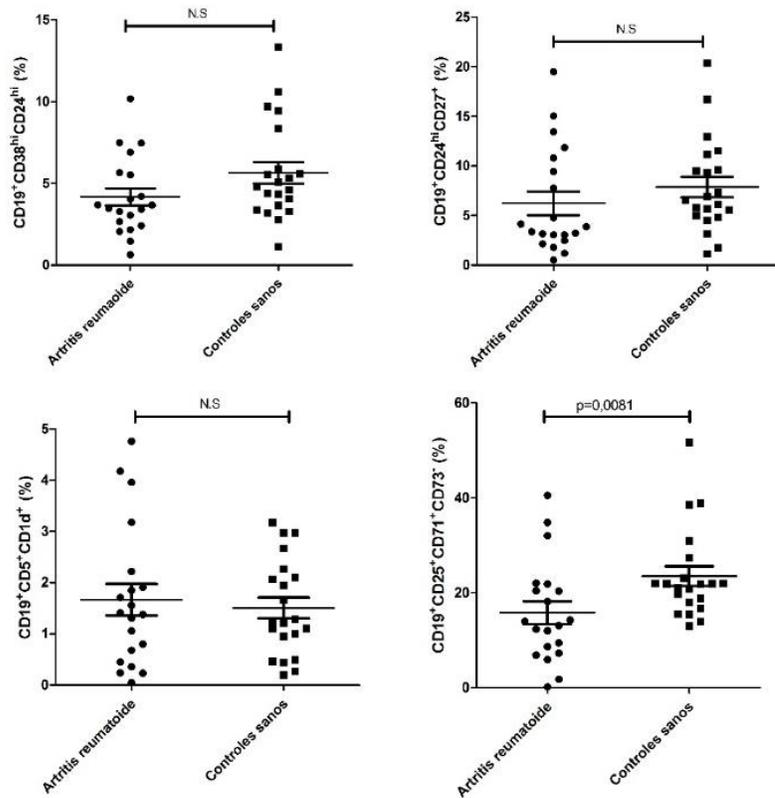
#### 5.3.2.1 Evaluación de linfocitos B reguladores productores de IL-10

Se determinaron las frecuencias de sub-poblaciones de linfocitos B reguladores por marcadores de superficie de membrana y además se evaluó la funcionalidad de estos en término de producción de la citoquina IL-10 después de ser estimulados con un agonista del TLR-9 (CpG). En la **Tabla 7** están descritos los fenotipos de las poblaciones a evaluar. La estrategia de selección de las poblaciones se muestra en el **Figura S1**.

**Tabla 7 Poblaciones de Bregs evaluadas en este estudio**

<b>Fenotipo</b>	<b>Marcadores</b>
B10	CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup> IL10 <sup>+</sup>
Inmaduras	CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD38 <sup>hi</sup>
B10/Pro-B10	CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD27 <sup>+</sup>
Br1	CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD71 <sup>+</sup> CD73 <sup>-</sup>
CD5 <sup>+</sup> CD1d <sup>+</sup>	CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> CD1d <sup>+</sup>

No se encontraron diferencias en la frecuencia relativa de linfocitos B (LB CD19<sup>+</sup>) entre los grupos. Cuando se compararon las frecuencias de LB CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup> (7,9% vs 6,2%), CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> (5,6% vs 4,2%) tendieron a ser mayores en los controles; sin embargo, únicamente la diferencia fue significativa para la población de LB CD19<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>CD73<sup>-</sup> (23,4% vs 15,8%, p=0,008) (**Figura 5**). En contraste, la población de células CD5<sup>+</sup>CD1d<sup>+</sup> presentó frecuencias mayores en los casos (1,7% vs 1,5%) sin ser significativa la diferencia.



**Figura 5.** Frecuencia de subpoblaciones de linfocitos B reguladores estimulados con CpG. Se compararon entre pacientes (n=20) y controles (n=21) las frecuencias relativas de estas. Comparacion por test de Mann-Withney

No se encontraron diferencias entre casos y controles cuando compararon los linfocitos B que producían IL-10 (B10; CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>). Sin embargo, se pudo observar una frecuencia un poco más elevada en los controles que en los casos. De igual forma se observó al analizar las subpoblaciones de CD19<sup>+</sup> con los fenotipos descritos como regulador (**Figura 6**).

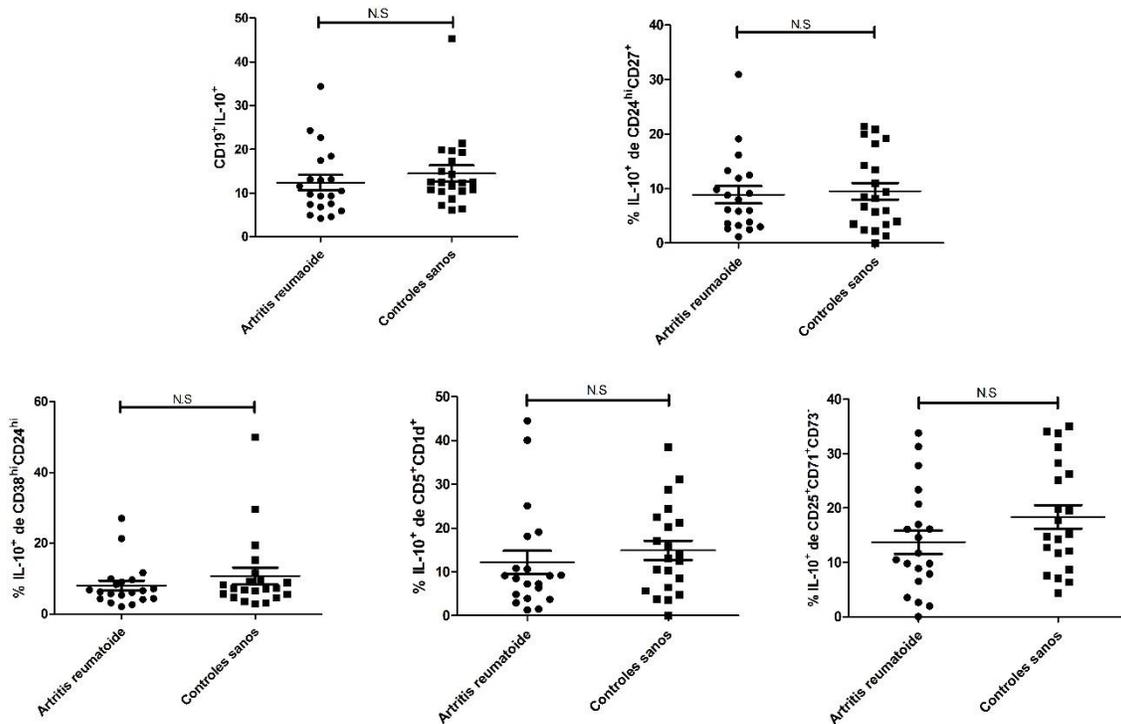
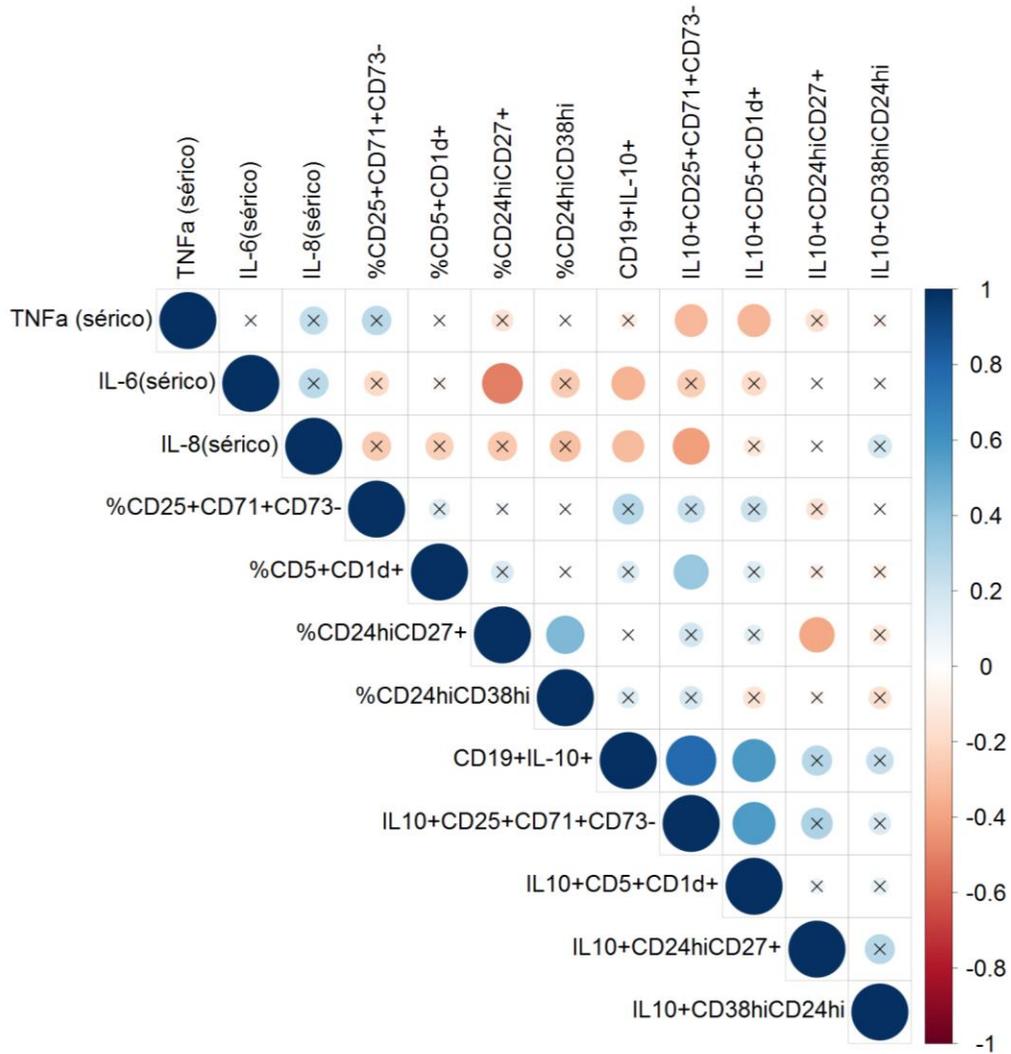


Figura 6. Evaluación de funcionalidad en la producción de IL-10 de linfocitos B. Se compararon entre pacientes ( $n=20$ ) y controles ( $n=21$ ) las frecuencias relativas de estas. Comparación por test de Mann-Whitney

### 5.3.2.2 Relación entre linfocitos B reguladores y citoquinas inflamatorias en plasma.

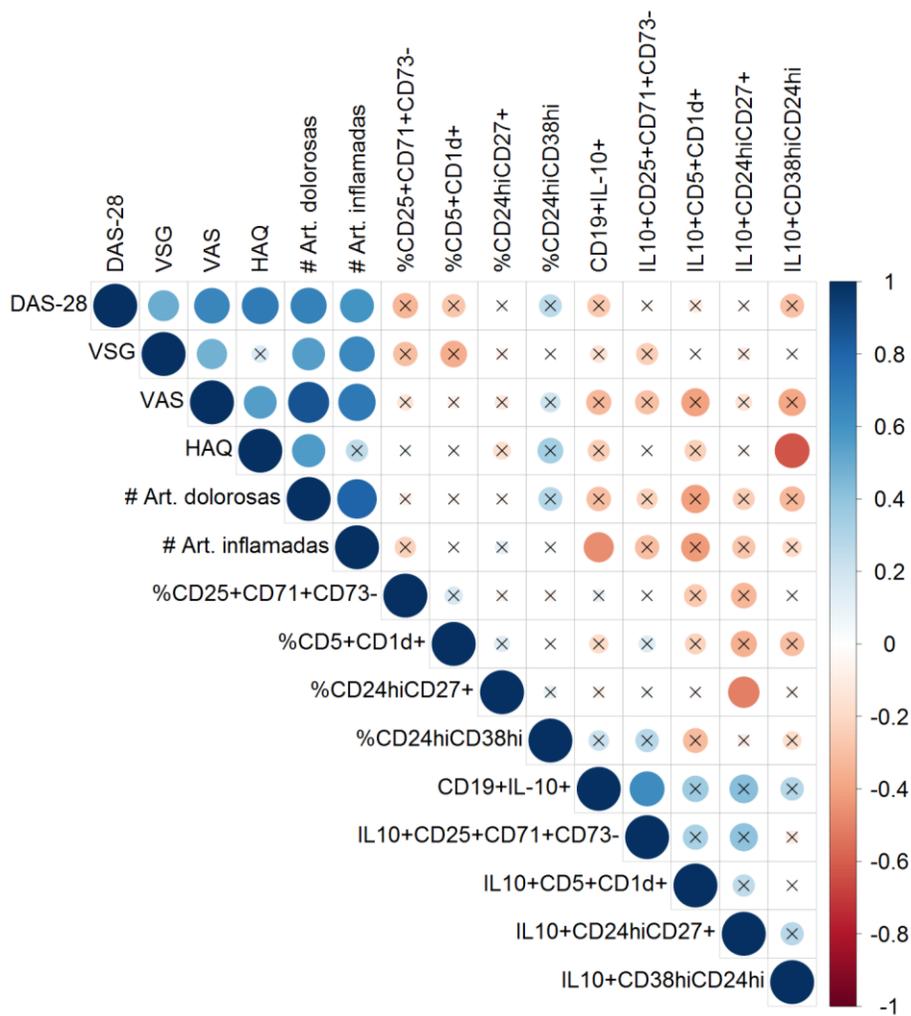
Al realizar estudios de correlación entre los niveles de citoquinas detectables en con las poblaciones de Bregs se encontró que la concentración de TNF- $\alpha$  se correlacionaron inversamente con las poblaciones de CD19+ productoras de IL-10 con los fenotipos CD25+CD71+CD73 $^-$  ( $r=-0,33$ ;  $p=0,036$ ) y CD5+CD1d $^+$  ( $r=-0,34$ ;  $p=0,034$ ). Por otro lado, la concentración IL-6 se correlacionó de manera inversa con la frecuencia de linfocitos B productoras de IL-10 (B10; CD19+IL-10+) ( $r=-0,35$ ;  $p=0,027$ ) y las frecuencias de CD19+CD24 $^{hi}$ CD27 $^+$  ( $r=-0,51$ ;  $p=0,001$ ). De igual forma, las concentraciones de IL-8 mostraron una relación inversa con las frecuencias de linfocitos B10 ( $r=-0,31$ ;  $p=0,046$ ) y con las frecuencias de IL10+CD25+CD71+CD73 $^-$  ( $r=-0,42$ ;  $p=0,007$ ).



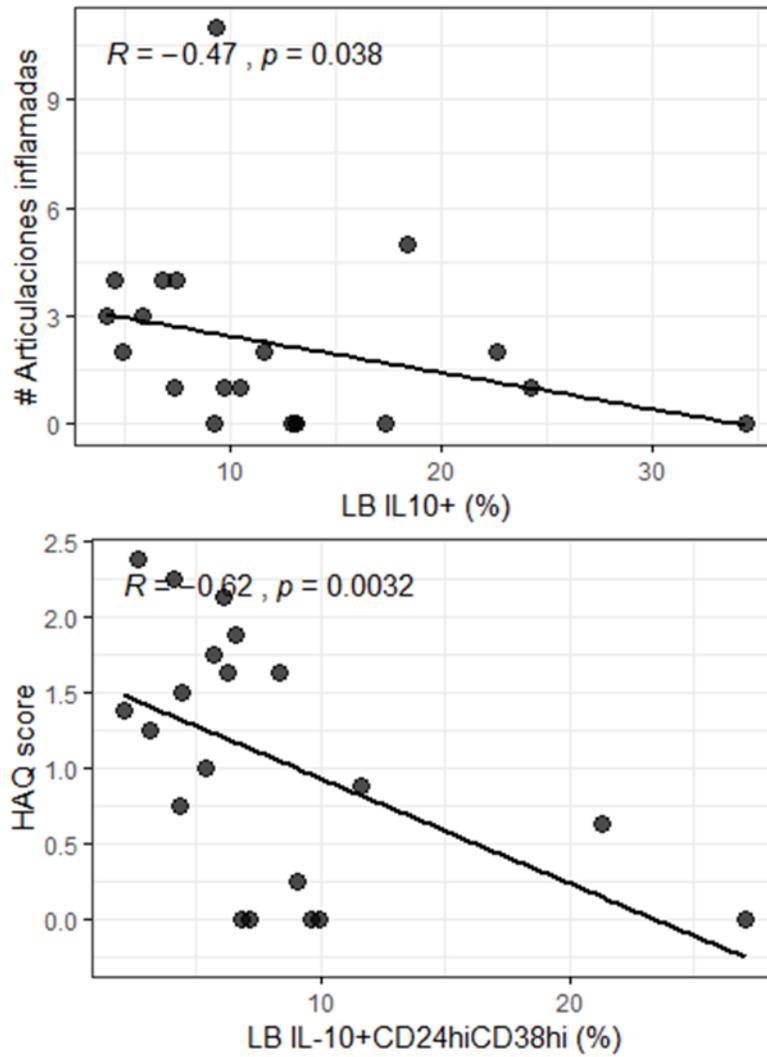
**Figura 7.** Correlación entre concentraciones de citoquinas en plasma vs. células B estimuladas con CpG (n=20). Los círculos marcados (x) indican las correlaciones **no significativas (p >0.05)**. Spearman test.

### 5.3.2.3 Relación entre linfocitos B reguladores y variables clínicas.

Se analizaron las correlaciones de los parámetros clínicos con las poblaciones de Bregs (Figura 8). Se encontró correlación negativa entre la capacidad funcional (medida por HAQ) con la frecuencia de LB IL-10<sup>+</sup>CD38<sup>hi</sup>CD24<sup>hi</sup> ( $\rho = -0,62$ ;  $p=0,003$ ) (Figura 9). De igual forma, el número de articulaciones inflamadas mostró la misma dirección en la relación con la frecuencia de células B10 ( $r = -0,47$ ;  $p=0,038$ ) (Figura 9).



**Figura 8.** Correlación entre variables clínicas y linfocitos B reguladores (n=20). Los círculos marcados (x) indican las correlaciones **no significativas** ( $p > 0.05$ ). Spearman test.



**Figura 9** Correlación entre linfocitos B reguladores y severidad de la artritis reumatoide Se muestran los gráficos de dispersión X-Y entre las variables que mostraron una relación significativa en los análisis de correlación (n=20). Spearman test.



El análisis multivariado indicó que el efecto principal en la frecuencia de Bregs estaba determinado por la condición de autoinmunidad. No obstante, la relación de la infección por protozoarios estuvo cercana a la significancia ( $p = 0,06$ ) (**Tabla 8**).

**Tabla 8 Modelo GLM:** Factores influyentes en la frecuencia de linfocitos B CD25+CD71+CD73+

Predictor	Beta	Error estándar	p-valor
<b>Diagnóstico de AR</b>	<b>-6,404</b>	<b>3,1553</b>	<b>,042*</b>
Ambiente rural (vs. Urbano)	,971	2,9997	,746
Infección por protozoarios	7,560	4,0010	,059
Edad (años)	,135	,1099	,219

*Modelo de GLM corrido con una distribución lineal de la variable independiente y un enlace de identidad.*

### 5.3.2.5. Efecto del tratamiento y actividad de la enfermedad en las poblaciones de linfocitos B reguladores

Se analizó el efecto del tratamiento en los pacientes sobre estas poblaciones celulares. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo de pacientes tratados y no tratados. Para saber si algún tratamiento específico pudiese tener este efecto en las poblaciones, los pacientes se categorizaron en los distintos grupos según el tratamiento que recibían; sin embargo, ninguna de las terapias tuvo diferencias en las frecuencias de linfocitos B reguladores o su producción de IL-10.

Los pacientes se categorizaron en relación a si tenían enfermedad activa (DAS-28 > 3,2). No se encontraron diferencias significativas entre estos dos grupos respecto a las poblaciones células B reguladoras.

### 5.3.3. Identificación de linfocitos T reguladores en casos y controles.

La detección de linfocitos T reguladores se hizo a través de marcadores de superficie (CD25, CD127) e intracelulares (FoxP3). Al comparar los pacientes con AR frente a los controles se encontraron diferencias significativas en las frecuencias de los linfocitos T reguladores identificados con los marcadores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low/-</sup> siendo menores en casos que en controles (1,8% vs 2,6%; p=0,029). No se encontraron diferencias significativas cuando se usó el marcador FoxP3 para identificar las distintas poblaciones (Figura 11).

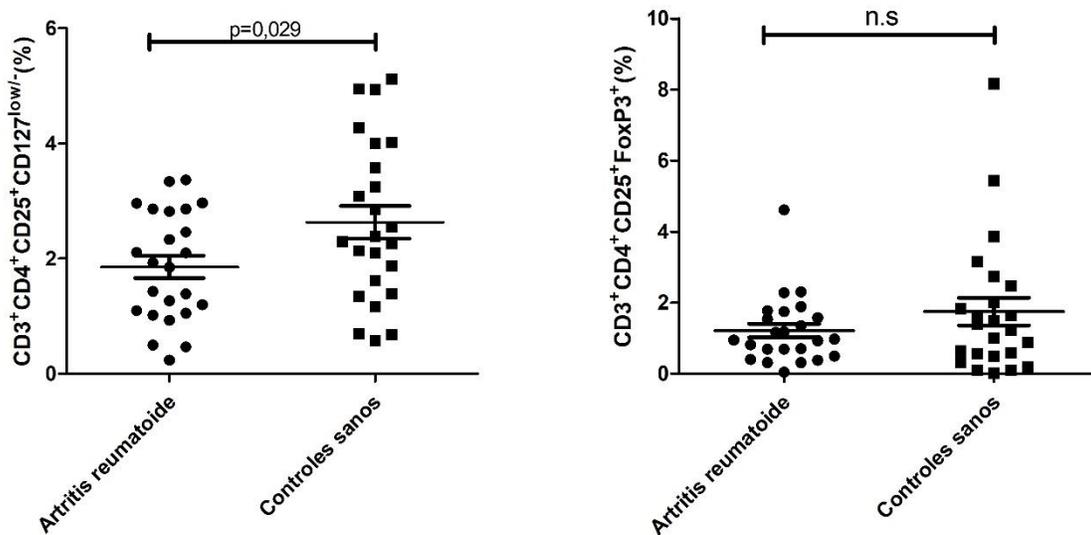


Figura 11. Frecuencia de linfocitos T reguladores en sangre periférica de casos y controles. Se compararon entre pacientes (n=25) y controles (n=24) las frecuencias relativas de estas poblaciones de Tregs calculadas a partir del total de linfocitos CD3+CD4+

No se encontró diferencias en las frecuencias cuando se categorizaron los sujetos de acuerdo con el estado parasitario. La condición de sensibilización tampoco mostró diferencias en la frecuencia de estas células

La condición de tratamiento evidenció tener un efecto sobre las células T reguladoras, donde los pacientes tratados presentaron mayor frecuencia de células CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (0,6% vs 1,3%; p=0,036). La diferencia en esta población no se mantuvo cuando se analizaron las categorías de terapias específicas, sin embargo con el uso de FARMES se encontraron diferencias en la población CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low/-</sup> siendo mayor la proporción en los que no tenían terapia con este tipo de medicamentos (2.6% vs 1.6%; p=0,015).

No se encontraron diferencias en los grupos donde los pacientes presentaban remisión o actividad leve en comparación con los de actividad moderada/alta.

La frecuencia de células CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low/-</sup>, se correlacionaron significativamente con las concentraciones de IL-8 en plasma (Spearman Rho=-0,30; p=0,04). En referencia a las variables clínicas, únicamente se encontró correlación entre el número de articulaciones inflamadas y los linfocitos CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>.

La correlación entre poblaciones de Bregs con Tregs evidenciaron una asociación entre las B10 (CD19<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup>) con las CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low/-</sup> (Rho=0,3; p=0,026) (Figura 12)

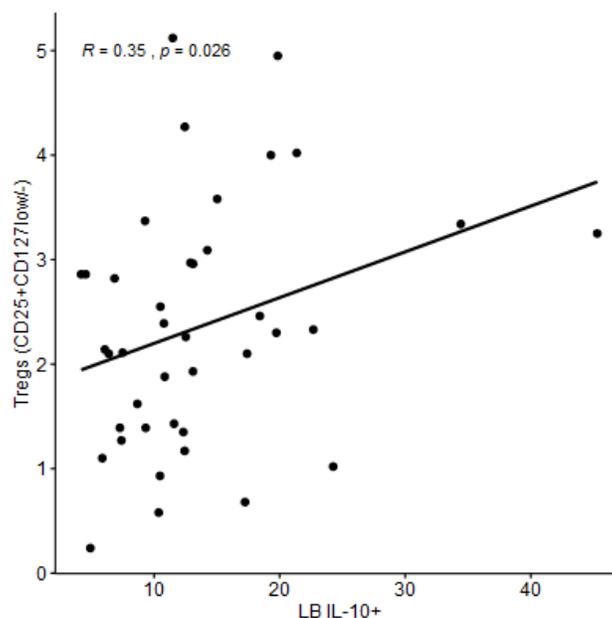


Figura 12. Correlación entre Tregs y Bregs (n=41). Spearman test.

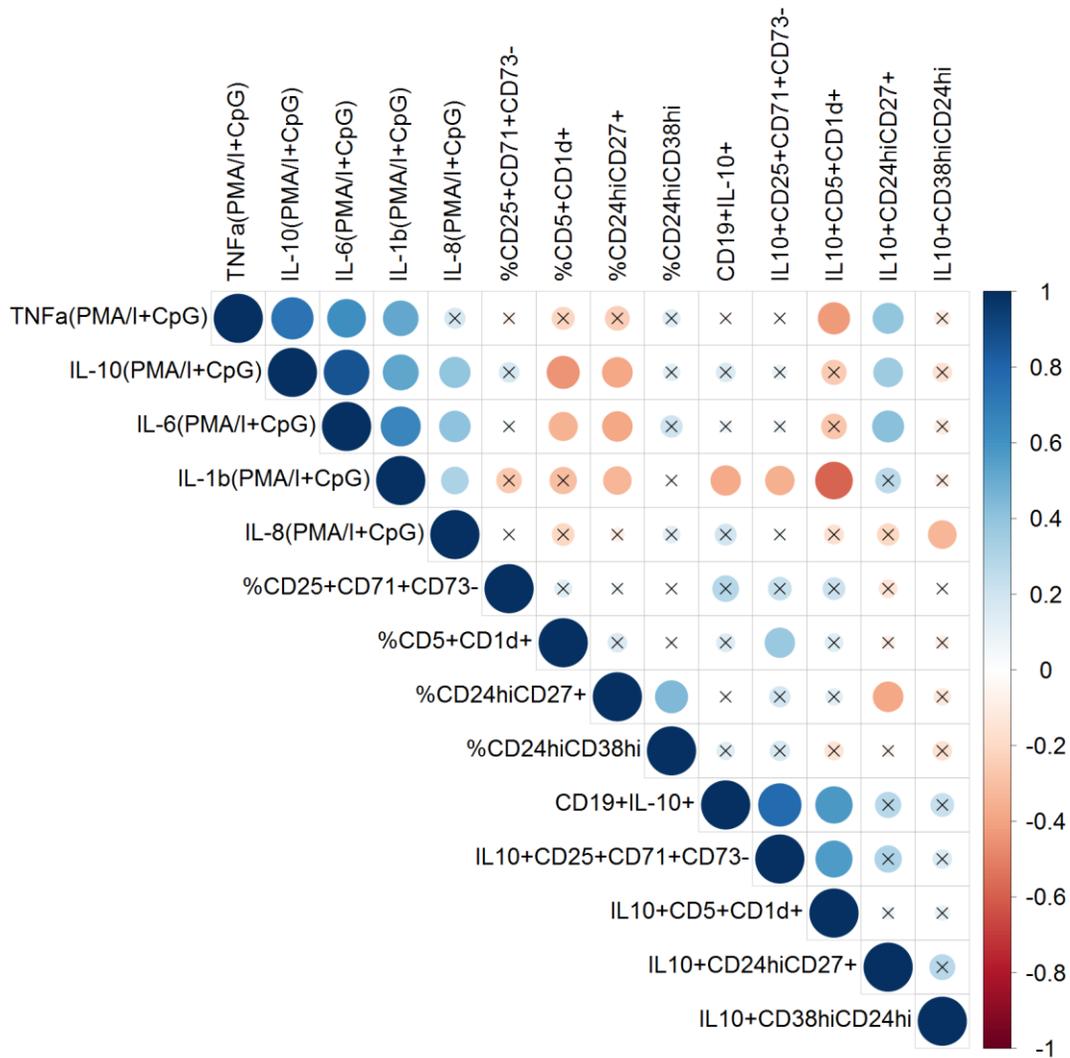
#### 5.3.4. Determinación de citoquinas en cultivos de PBMC tratados con CpG

No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de citoquinas de los sobrenadantes de casos y controles. La comparación entre parasitados y no parasitados tampoco exhibió diferencias significativas, ni la sensibilización a *Ascaris lumbricoides*. No se encontraron correlaciones significativas entre las concentraciones en plasma de las distintas citoquinas con las producidas por las células PBMC en los sobrenadantes.

Las correlaciones de las poblaciones de Bregs con las citoquinas detectadas en el sobrenadante se muestran en la **Figura 13**.

Las concentraciones de TNF- $\alpha$  se correlacionaron positivamente con la población IL10+CD24hiCD27hi (Rho=0,4; p=0,011) y negativamente con las IL10+CD5+CD1d+ (Rho=-0,43; p=0,006). La IL-1 $\beta$  presentó correlaciones negativas con casi todos los fenotipos de poblaciones de Bregs siendo significativas las encontradas con B10 (Rho=-0,38; p=0,015), CD24hiCD27 (Rho= -0,33; p=0,034), IL10+CD25+CD71+CD73- (Rho=-0,35; p= 0,023) y la más fuerte con IL10+CD5+CD1d+ (Rho=-0,58; p< 0,001). Finalmente, la IL-8 se correlacionó únicamente con la población IL10+CD38hiCD24hi (Rho=-0.34, p=0.03).

Los niveles de IL-10 se correlacionaron positivamente con el porcentaje de LB IL10+CD24hiCD27+ (Rho= 0,36; p=0,021), pero negativamente con las frecuencias de CD24hiCD27 (Rho= -0,39; p=0,013) y de CD5+CD1d+ (Rho= -0,45; p=0,003). Respecto a los niveles de IL-6 tuvieron el mismo comportamiento que la IL-10, estos mostraron una correlación positiva con la frecuencia de IL10+CD24hiCD27+ (Rho= 0,42; p=0,007) pero negativa con las frecuencias de CD24hiCD27 (Rho= -0,38; p=0,014) y de CD5+CD1d+ (Rho= -0,35; p=0,026).



**Figura 13.** Correlaciones entre concentración de citoquinas en sobrenadantes de PBMCs estimuladas con PMA/I + CpG y poblaciones de Bregs. (n=20). Los círculos marcados (x) indican las correlaciones no significativas ( $p > 0.05$ ). Spearman test.

## 5. Discusión

Los resultados expuestos en el marco de este trabajo proponen una posible asociación inversa entre la presentación de artritis reumatoide y poblaciones de linfocitos B y T reguladores, así como también con infecciones intestinales por protozoarios. Un resultado también llamativo fue la relación directa entre sensibilización a *Ascaris* con la presentación de artritis reumatoide. Aunque los resultados no fueron concluyentes, hay una tendencia de asociación entre la infección por protozoos y mayores números de linfocitos B CD73<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>. Sin embargo, dada la poca frecuencia de casos positivos esta relación no se puede sustentar con precisión.

En este estudio se encontraron frecuencias más bajas de parasitosis intestinales en pacientes que en controles, con lo cual se plantea que, en este caso dada su predominancia, las infecciones protozoarias pueden tener un efecto protector sobre el desarrollo de enfermedades autoinmunes. No obstante, dado el diseño del estudio no se puede hablar de una relación causal entre los factores. Otra posibilidad a los hallazgos es que el perfil de respuesta más intensa (tipo Th1/Th17) que pueden experimentar las personas con enfermedades autoinmunes tienda a polarizar la respuesta inflamatoria hacia tipos de respuesta más eficaces para la defensa contra estos patógenos. No obstante, también varios estudios epidemiológicos y experimentales respaldan algunas extensiones de la hipótesis de la higiene, que considera que las infecciones pueden proteger de enfermedades inflamatorias, tales como las enfermedades autoinmunes(3). Los factores propuestos que favorecen esta idea incluyen: primero, el hecho de que algunos agentes infecciosos pueden cambiar el equilibrio inmunológico hacia un estado inmunosupresión; segundo, la inflamación puede causar una hiperactivación celular autorreactiva masiva con la muerte celular inducida por la activación posterior y una disminución del número de células agresivas; tercero, las infecciones en otros sitios pueden evitar que las células autorreactivas lleguen al sitio de destrucción autoinmune; cuarto, pueden existir mecanismos competitivos entre las respuestas

antiinfecciosas y otras respuestas inmunes: a) competencia por el procesamiento de Ag por las células fagocíticas; b) competencia por la unión de antígenos a las moléculas de MHC; c) competencia por las citoquinas esenciales necesarias para la diferenciación de linfocitos y la homeostasis. Finalmente, la expresión de superantígenos por diferentes agentes infecciosos puede inducir la delección o activación de diferentes poblaciones de células T que expresan una región V $\beta$  de TCR particular (63).

Otro hallazgo importante de este trabajo fue que la frecuencia de sensibilización a *Ascaris lumbricoides* se relacionó positivamente con la presentación de artritis reumatoide. De manera general, la frecuencia de sensibilización a este helminto fue alta indicando que hay alta exposición en los individuos evaluados. Estos resultados se pueden comparar con antecedentes previos en el que se reportó que los pacientes con artritis reumatoide tienen mayores niveles de IgE total e IgE específica hacia un hongo, *Alternaria alternata* (64). Se ha descrito que los pacientes por su respuesta hiperreactiva *per se* pudiesen incrementar los niveles de IgE a la par de las otras inmunoglobulinas. Además se ha propuesto que esta pudiese jugar un papel en la respuesta inflamatoria por su rol en la degranulación de algunas células (64). El papel de la IgE en la autoinmunidad ha sido un tema de interés. Permin et al. descubrieron que el 60% de 20 pacientes con AR con neutropenia se detectaban anticuerpos IgE con especificidad para componentes nucleares de granulocitos (GS-ANA), mientras que solo el 16% de los pacientes con AR sin neutropenia tenían anticuerpos IgE de especificidad similar, considerando el posible papel patogénico de esta reactividad IgE a componentes propios (65). Los anticuerpos anti-proteínas citrulinadas son altamente específicos y predictivos para la AR y sustentan el diagnóstico como criterio serológico. En los últimos años, no se han publicado estudios válidos sobre el tema de la IgE en esta enfermedad (66). Para el caso de las entidades autoinmunes, las inmunoglobulinas tienen especificidad frente a antígenos propios (autoantígenos), muchos de ellos, proteínas celulares que se exponen como resultado del proceso inflamatorio y que son captadas y presentadas. Actualmente se reconoce que el lupus eritematoso sistémico y la urticaria crónica, tanto espontáneas como inducibles, tienen más probabilidades de

estar mediadas, al menos en parte, por autoanticuerpos IgE. La situación en otras afecciones, como la uveítis autoinmune, la artritis reumatoide, la enfermedad de Graves, la pancreatitis autoinmune e incluso el asma, es mucho menos clara, pero se acumula evidencia de auto-alergia (66). Es bien sabido que el fenómeno de mimetismo molecular se ha estudiado como una posible causa de las enfermedades autoinmunes (67) y que existen epítopes de proteínas conservadas evolutivamente entre especies. Pianta et al. a través de métodos basados en proteómica para detectar péptidos presentados por HLA-DR identificaron 2 autoantígenos, N-acetilglucosamina-6-sulfatasa (GNS) y filamina A (FLNA), a los cuales respondieron tanto células T y B en 52% y 56% de pacientes con AR, respectivamente. Estos autoantígenos se expresaban en el líquido sinovial. Además el GNS parecía estar citrulinado, y los valores de anticuerpos GNS se correlacionaron con los niveles de anticuerpos anti-proteína citrulinada (ACPA). El péptido GNS presentado por HLA-DR tiene una marcada homología de secuencia con epítopes de proteínas sulfatasa de *Prevotella sp.* y *Parabacteroides sp.*, mientras que el péptido FLNA presentado por HLA-DR tiene homología con epítopes de proteínas de *Prevotella sp.* y *Butyrivimonas sp.*, los cuales hacen parte de la microbiota comensal, sus conclusiones permitieron decir que la homología de secuencia entre epítopes de células T de 2 autoantígenos y una relación con microbios intestinales puede proporcionar un vínculo entre la inmunidad de la mucosa y la inmunidad en la articulación de pacientes con AR (68). Por lo tanto, nuestro hallazgo de encontrar mayor sensibilización e intensidad en la respuesta IgE pudiese deberse a componentes del extracto que pudiesen tener epítopes compartidos. Con este trabajo se reporta por primera vez, la relación entre frecuencia e intensidad de la IgE frente a *Ascaris* en pacientes con AR. Es necesario aumentar el tamaño de la muestra del estudio para tener más robustez en los resultados y conclusiones que se puedan emitir.

Un estudio por Permin y Wiik reportó la presencia de inmunocomplejos de IgE en 13 sueros de 21 con AR pacientes, mientras que en pacientes con LES y controles solo se detectó en 1 de 11 y 0 de 20, respectivamente. Además, los pacientes con AR con complicaciones extra-articulares tiene niveles más altos de IgE en suero en

comparación en los controles o pacientes con AR con enfermedad articular solamente, pero las diferencias no alcanzaron significación estadística(69).

La respuesta inflamatoria mediada por citoquinas ha sido ampliamente estudiada en pacientes con AR debido al desarrollo de novedosas estrategias terapéuticas dirigidas a bloquear las vías mediadas por estas (terapias anti-TNF, anti-IL-6) (70, 71). La gama de mecanismos que podrían alterar la homeostasis de las citoquinas para conferir riesgo de enfermedad está comenzando a entenderse, junto a esto se han planteado las mismas como biomarcadores tanto de pre-inicio de la enfermedad (alteraciones medibles en una serie de citoquinas circulantes que, con cierta consistencia, se han observado antes del inicio de los síntomas entre aquellos que posteriormente desarrollan artritis reumatoide en comparación con individuos sanos)(72) como para perfilar la respuesta terapéutica (73). Las citoquinas que se han descrito más asociadas han sido el TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, GM-CSF y citoquinas como IL-8 son abundantes en todos los pacientes, independientemente de la terapia (74). En este trabajo se pudo observar que los niveles de IL-6 e IL-8 permitían diferenciar el grupo de casos y los controles, más que una citoquina clásica como lo es el TNF- $\alpha$ . Además, se pudo apreciar el efecto de diferentes terapias convencionales en estos mediadores. Varios estudios han encontrado fuertes correlaciones entre los niveles de IL-6 con la actividad de la enfermedad, y poco con la IL-8, sin embargo también se ha visto la amplia variabilidad de esta citoquina en respecto al tratamiento (75-77). Por otro lado, como se pudo estimar en el modelo GML, la concentración de IL-8 está asociada más al uso de CSO que a la actividad de la enfermedad por lo que puede ser la razón por la cual se encuentre más elevada en paciente con remisión o enfermedad leve debido a que este grupo suele tratarse con estos medicamentos. Este estudio aporta conocimiento que nos permite darle relevancia a estas dos citoquinas, para así motivar su estudio como bio-marcadores tanto de enfermedad como de seguimiento y de selección de biológicos apropiados para el paciente dado el amplio número de estrategias disponibles en el mercado (i.e.: anti-TNF, IL-6, IL-1 $\beta$ , etc.), los cuales, aunque muestran niveles similares de eficacia y seguridad, no permiten el control de la enfermedad a todos los enfermos (78).

Las células B reguladoras son poblaciones heterogéneas en relación con marcadores celulares. La población CD25<sup>+</sup>CD71<sup>-</sup>CD73<sup>-</sup> ha sido descrita únicamente en relación a la respuesta alérgica (24). Este estudio presenta por primera vez esta población en pacientes con AR y efecto de las parasitosis en estas. Poco se sabe sobre el posible vínculo entre defectos en Bregs y el desarrollo de AR. Daien et al en un estudio buscaron diferenciar varios subconjuntos de células B, como aquellas con fenotipo CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>, CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup> y CD5<sup>+</sup>, sugeridas para ser precursoras de las células B10 y compararlas en número y función en pacientes con AR y controles sanos, a partir de células mononucleares de sangre periférica. Con respecto a los niveles de CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>, CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>, se encontró que las células B eran similares en los pacientes con AR y en los controles, hallazgo concordante con este trabajo. Sin embargo, al ser cultivadas y estimuladas, las células B10 fueron menos en pacientes con AR que en controles. Este estudio no logró encontrar una diferencia entre estas células B10, sin embargo se puede observar una tendencia a ser mayores en los controles que en los casos (79). Otros estudios han encontrado correlación inversa entre variables clínicas (como el DAS-28) con poblaciones de linfocitos B con fenotipo regulador (17, 79-81). A pesar de que los datos aquí presentados no mostraron correlación con esta variable, se pudo ver el efecto en otros parámetros de severidad. La correlación entre la capacidad funcional del paciente (HAQ) y las células B productoras de IL-10 y la aún más fuerte correlación con las frecuencias de la subpoblación específica CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> productoras de IL-10 es un hallazgo novedoso ya que no se han reportado correlaciones entre esta variable con estas células.

Respecto al efecto de la infección por parásitos protozoarios, todavía son raros los estudios que investigan el papel de las Bregs durante el curso de la infección, pero hay evidencias de que este subtipo de células B es de importancia crítica en la homeostasis inmune. En este contexto, Jeong et al. demostraron que las células Breg CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup> que producen IL-10 son inducidas por productos de secreción y son esenciales para la cronicidad de la infección en un modelo murino de *Toxoplasma gondii* (82). A pesar de que el análisis multivariado por regresión muestra que, que en la población celular CD19<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>CD73<sup>-</sup> está

influenciada en su mayoría por la condición de autoinmunidad, no se puede ignorar que la parasitosis tuvo importante sobre este modelo para estas células. Nuestra perspectiva es aumentar el tamaño de la muestra para tener más certeza del efecto observado, dado que el valor de p marginal obtenido pudo deberse a falta de poder asociado a la muestra pequeña.

La elevada frecuencia de células T reguladoras en controles es un hallazgo que se ha replicado en muchos estudios, sin embargo un meta-análisis reciente reportó que el estado o frecuencia de Tregs varía según el sistema de definición (fenotipo). Como conclusión ellos mencionan que la proporción de Tregs definidos por métodos más estrictos y validados funcionalmente es menor en sangre periférica en pacientes con AR. Además mencionan que si la proporción de Tregs difiere en AR, se necesitan definiciones precisas y funcionalmente relevantes de estas Tregs para realmente llegar a conclusiones de su estado en AR (83). El análisis de correlación de del presente estudio, mostró una correlación positiva entre las células B productoras de IL-10 (Bregs) y células T reguladoras, lo cual se pudiese interpretar como una interconexión entre las poblaciones. En el estudio de Daien et al. las células CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> y CD24<sup>hi</sup>CD27 funcionalmente indujeron más células Tregs, al realizar co-cultivos con células T vírgenes, en controles pero no en pacientes con AR(79). Flores-Borja también demostró que en sujetos sanos, las células B CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> B mantienen el equilibrio crucial entre el grupo de poblaciones Tregs y Th1/ Th17. Sin embargo, las células B CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> de pacientes con AR activa pudieron suprimir la liberación de IFN-g y TNF-a por las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, pero no pudieron evitar la diferenciación de células T vírgenes en Th1 y Th17 y para convertir las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en Tregs (80).

Los hallazgos respecto a las citoquinas detectadas en los sobrenadantes no son concluyentes. Todas las citoquinas inflamatorias y la IL-10 presentaron un patrón similar y se correlacionaron fuertemente entre ellas. Esto puede ser debido a los otros tipos celulares que se encuentran en los cultivos los cuales se estimulan y están en mayor proporción que las poblaciones de Bregs. Las principales fuentes *in vivo* de IL-10 son células T (Tregs, Th1 y Th17) monocitos, macrófagos y células

dendríticas, sin embargo, otras células inmunes efectoras son capaces de producir IL-10 en ciertos contextos, incluyendo células B, células T citotóxicas, células NK, mastocitos y granulocitos como neutrófilos y eosinófilos (84). Además se ha reportado altos niveles séricos de IL-10 en enfermedades autoinmunes humanas. En pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES), se ha demostrado que los niveles altos de IL-10 se correlacionan con la actividad de la enfermedad, y los estudios indican que las PBMC cultivadas de pacientes con lupus producen espontáneamente niveles altos de IL-10. Sin embargo, a sabiendas que la producción de IL-6 y TNF-alfa está regulada por IL-10, se pudo evidenciar que la producción espontánea de IL-10 por linfocitos B de los pacientes con LES no tiene ningún efecto en la regulación de IL-6 (85, 86). En general, este estudio es una propuesta para dar respuesta al vínculo entre las enfermedades autoinmunes y los parásitos. Una limitación importante corresponde al tamaño de la muestra, debido a que como se mencionó anteriormente la baja prevalencia de parasitosis no permite dilucidar el real efecto de estas sobre las poblaciones celulares de inmunorregulación. Es necesario igualmente determinar cómo es realmente la respuesta a *Ascaris*, por parte de pacientes y controles realizando la serología para otros isotipos de inmunoglobulinas. Además es necesario el uso de una medida cuantitativa para la reactividad IgE (Immunocap). Nuestro panel de citoquinas detectó diferencias entre pacientes y controles, sin embargo no se exploró la respuesta Th específica, especialmente la Th17, ampliamente estudiada en AR. La detección tanto de las citoquinas indetectables como las detectables debe realizarse por otros métodos como el ELISA para la correlación de resultados. Las células T reguladoras al igual que las B reguladoras, son actualmente no hay un consenso de para su fenotipificación absoluta por ende es necesario llevar a cabo estudio funcionales de ellas. Finalmente, como se ha discutido, el papel de la IL-10 no es totalmente claro, cuando hablamos de inmunorregulación, por lo que las células B reguladoras debe ampliarse en otros mecanismos que ya se han descrito, ej. IL-35, GzmB, PDL1, TIM-1.

## 6. Conclusiones

En una muestra poblacional del trópico se encontró una asociación epidemiológica inversa entre la condición de autoinmunidad y las parasitosis intestinales, principalmente por protozoarios. Los pacientes con artritis reumatoide presentaron una menor frecuencia de poblaciones de linfocitos B y T reguladores. La relación causal con la enfermedad, así como su interrelación con las infecciones parasitarias, debe estudiarse.

## 7. Perspectivas futuras

- Para sustentar el efecto protector de las infecciones por parásitos intestinales, se debe ampliar el tamaño de la muestra
- Es necesario explorar otros perfiles de citoquinas en especial de la respuesta Th1 y Th17.
- La respuesta a *Ascaris lumbricoides* en pacientes con AR debe caracterizarse mejor, esto incluye la evaluación de otros isotipos de inmunoglobulinas y la respuesta a antígenos específicos (AI-CPI y ABA-1)
- La caracterización inmunomoduladora de las Bregs debe realizarse con otros marcadores incluyendo citoquinas (IL-35, TGFb) y moléculas de contacto (PD-L1, TIM-1).
- Es necesario confirmar el efecto de las Bregs sobre las Tregs mediante estudios experimentales.
- Se debe evaluar la respuesta de citoquinas de cada una de estas poblaciones aisladas.

## **8. 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 y la Universidad de Cartagena.

## **9. Agradecimientos**

Agradezco a los pacientes y controles del departamento de Bolívar por su voluntad para participar del proyecto. Al Dr. Alvaro Moreno, reumatólogo del proyecto, colaboró en reclutamiento y diagnóstico de los pacientes. Al Dr. Alvaro Álvarez, medico bacteriólogo, a cargo del análisis coprológico de los sujetos. A Jonathan Rodríguez por su colaboración en el reclutamiento de controles.

## 10. Referencias

1. Turchetti G, Yazdany J, Palla I, Yelin E, Mosca M. Systemic lupus erythematosus and the economic perspective: a systematic literature review and points to consider. *Clinical and experimental rheumatology*. 2012;30(4 Suppl 73):S116-22.
2. Rosenblum MD, Remedios KA, Abbas AK. Mechanisms of human autoimmunity. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(6):2228-33.
3. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *The New England journal of medicine*. 2002;347(12):911-20.
4. Haahtela T, Holgate S, Pawankar R, Akdis CA, Benjaponpitak S, Caraballo L, et al. The biodiversity hypothesis and allergic disease: world allergy organization position statement. *The World Allergy Organization journal*. 2013;6(1):3.
5. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and molecular immunology*: Elsevier Health Sciences; 2011.
6. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+ CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature immunology*. 2005;6(4):345-52.
7. Cabrera JMA, Cañas CA, Cervera R, Correa PA. *Autoinmunidad y enfermedad autoinmune*: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2005.
8. Liu W, Putnam AL, Xu-yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2006;203(7):1701-11.
9. Maizels RM, McSorley HJ. Regulation of the host immune system by helminth parasites. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2016;138(3):666-75.
10. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*. 2001;19:683-765.
11. Lee JH, Noh J, Noh G, Choi WS, Cho S, Lee SS. Allergen-specific transforming growth factor-beta-producing CD19+CD5+ regulatory B-cell (Br3) responses in human late eczematous allergic reactions to cow's milk. *J Interferon Cytokine Res*. 2011;31(5):441-9.
12. Noh J, Choi WS, Noh G, Lee JH. Presence of Foxp3-expressing CD19(+)CD5(+) B Cells in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Human CD19(+)CD5(+)Foxp3(+) Regulatory B Cell (Breg). *Immune network*. 2010;10(6):247-9.
13. Shen P, Roch T, Lampropoulou V, O'Connor RA, Stervbo U, Hilgenberg E, et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature*. 2014;507(7492):366-70.
14. Wang P, Zheng SG. Regulatory T cells and B cells: implication on autoimmune diseases. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2013;6(12):2668-74.
15. Heinemann K, Wilde B, Hoerning A, Tebbe B, Kribben A, Witzke O, et al. Decreased IL-10 regulatory B cells (Bregs) in lupus nephritis patients. *Scandinavian journal of rheumatology*. 2016:1-5.
16. Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*. 2010;32(1):129-40.
17. Ma L, Liu B, Jiang Z, Jiang Y. Reduced numbers of regulatory B cells are negatively correlated with disease activity in patients with new-onset rheumatoid arthritis. *Clinical rheumatology*. 2014;33(2):187-95.
18. Rincón-Arévalo H, Yassin-Noreña L, Vásquez G, Castaño D. Linfocitos B reguladores en enfermedades humanas y modelos murinos de autoinmunidad. *Inmunología*. 2013;32(4):129-38.

19. Vadasz Z, Peri R, Eiza N, Slobodin G, Balbir-Gurman A, Toubi E. The Expansion of CD25 high IL-10 high FoxP3 high B Regulatory Cells Is in Association with SLE Disease Activity. *Journal of immunology research*. 2015;2015:254245.
20. Wang T, Li Z, Li X, Chen L, Zhao H, Jiang C, et al. Expression of CD19+CD24highCD38high B cells, IL10 and IL10R in peripheral blood from patients with systemic lupus erythematosus. *Molecular medicine reports*. 2017;16(5):6326-33.
21. Yang X, Yang J, Chu Y, Xue Y, Xuan D, Zheng S, et al. T follicular helper cells and regulatory B cells dynamics in systemic lupus erythematosus. *PloS one*. 2014;9(2):e88441.
22. Wang L, Zhao P, Ma L, Shan Y, Jiang Z, Wang J, et al. Increased interleukin 21 and follicular helper T-like cells and reduced interleukin 10+ B cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology*. 2014;41(9):1781-92.
23. Zakzuk-Sierra J. Inmunorregulación inducida por helmintos: una actualización. *Iatreia*. 2016;29(2):182-93.
24. van de Veen W, Stanic B, Yaman G, Wawrzyniak M, Sollner S, Akdis DG, et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;131(4):1204-12.
25. Menon M, Blair PA, Isenberg DA, Mauri C. A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity*. 2016;44(3):683-97.
26. Bosma A, Abdel-Gadir A, Isenberg DA, Jury EC, Mauri C. Lipid-antigen presentation by CD1d(+) B cells is essential for the maintenance of invariant natural killer T cells. *Immunity*. 2012;36(3):477-90.
27. Siewe B, Stapleton JT, Martinson J, Keshavarzian A, Kazmi N, Demarais PM, et al. Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8(+) T cell function in vitro. *Journal of leukocyte biology*. 2013;93(5):811-8.
28. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*. 2011;117(2):530-41.
29. Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K, Hagn M, Kaltenmeier C, Barth TF, et al. Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer research*. 2013;73(8):2468-79.
30. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H, et al. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity*. 2014;41(6):1040-51.
31. Saze Z, Schuler PJ, Hong CS, Cheng D, Jackson EK, Whiteside TL. Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. *Blood*. 2013;122(1):9-18.
32. Nouel A, Pochard P, Simon Q, Segalen I, Le Meur Y, Pers JO, et al. B-Cells induce regulatory T cells through TGF-beta/IDO production in A CTLA-4 dependent manner. *Journal of autoimmunity*. 2015;59:53-60.
33. Liu J, Zhan W, Kim CJ, Clayton K, Zhao H, Lee E, et al. IL-10-producing B cells are induced early in HIV-1 infection and suppress HIV-1-specific T cell responses. *PloS one*. 2014;9(2):e89236.
34. Mauri C, Menon M. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *The Journal of clinical investigation*. 2017;127(3):772-9.
35. Cooper GS, Stroehla BC. The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews*. 2003;2(3):119-25.
36. Cooper GS, Bynum ML, Somers EC. Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases. *Journal of autoimmunity*. 2009;33(3-4):197-207.

37. Eaton WW, Rose NR, Kalaydjian A, Pedersen MG, Mortensen PB. Epidemiology of autoimmune diseases in Denmark. *Journal of autoimmunity*. 2007;29(1):1-9.
38. Machado-Alba JE, Ruiz AF, Medina Morales DA. The epidemiology of rheumatoid arthritis in a cohort of Colombian patients. *Revista Colombiana de Reumatología*. 2015;22(3):148-52.
39. Rojas-Villarraga A, Toro CE, Espinosa G, Rodriguez-Velosa Y, Duarte-Rey C, Mantilla RD, et al. Factors influencing polyautoimmunity in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity reviews*. 2010;9(4):229-32.
40. Zampeli E, Vlachoyiannopoulos PG, Tzioufas AG. Treatment of rheumatoid arthritis: Unraveling the conundrum. *Journal of autoimmunity*. 2015;65:1-18.
41. Rzepecka J, Pineda MA, Al-Riyami L, Rodgers DT, Huggan JK, Lumb FE, et al. Prophylactic and therapeutic treatment with a synthetic analogue of a parasitic worm product prevents experimental arthritis and inhibits IL-1 $\beta$  production via NRF2-mediated counter-regulation of the inflammasome. *Journal of autoimmunity*. 2015;60:59-73.
42. Ministerio de Salud y Protección Social. Departamento administrativo de ciencia tei-C. Guía de Práctica Clínica para la detección temprana diagnóstico y tratamiento de la artritis reumatoide 2014. Available from: <http://gpc.minsalud.gov.co/guias/Documents/Artritis%20Reumatoidea/GPC%20AR%20COMPLETA.pdf>.
43. Smallwood TB, Giacomini PR, Loukas A, Mulvenna JP, Clark RJ, Miles JJ. Helminth Immunomodulation in Autoimmune Disease. *Frontiers in immunology*. 2017;8:453.
44. Navarro S, Ferreira I, Loukas A. The hookworm pharmacopoeia for inflammatory diseases. *International journal for parasitology*. 2013;43(3-4):225-31.
45. La Flamme AC, Ruddenklau K, Backstrom BT. Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Infection and immunity*. 2003;71(9):4996-5004.
46. Moroni L, Bianchi I, Lleo A. Geoepidemiology, gender and autoimmune disease. *Autoimmunity reviews*. 2012;11(6-7):A386-92.
47. Gregersen PK, Olsson LM. Recent advances in the genetics of autoimmune disease. *Annual review of immunology*. 2009;27:363-91.
48. Rook GA. Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2012;42(1):5-15.
49. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj*. 1989;299(6710):1259-60.
50. Rook GA, Brunet LR. Old friends for breakfast. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2005;35(7):841-2.
51. Versini M, Jeandel PY, Bashi T, Bizzaro G, Blank M, Shoenfeld Y. Unraveling the Hygiene Hypothesis of helminthes and autoimmunity: origins, pathophysiology, and clinical applications. *BMC medicine*. 2015;13:81.
52. Godfrey RC. Asthma and IgE levels in rural and urban communities of The Gambia. *Clinical allergy*. 1975;5(2):201-7.
53. Masters S, Barrett-Connor E. Parasites and asthma--predictive or protective? *Epidemiologic reviews*. 1985;7:49-58.
54. van den Biggelaar AH, van Ree R, Rodrigues LC, Lell B, Deelder AM, Kremsner PG, et al. Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *Lancet*. 2000;356(9243):1723-7.
55. Yazdanbakhsh M, van den Biggelaar A, Maizels RM. Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. *Trends in immunology*. 2001;22(7):372-7.
56. Gale EA. A missing link in the hygiene hypothesis? *Diabetologia*. 2002;45(4):588-94.

57. Zakzuk J. Inmunorregulación inducida por helmintos: una actualización. *Iatreia*. 2016;29:182-93.
58. Zakzuk J, Casadiego S, Mercado A, Alvis-Guzman N, Caraballo L. *Ascaris lumbricoides* infection induces both, reduction and increase of asthma symptoms in a rural community. *Acta tropica*. 2018;187:1-4.
59. Panda AK, Ravindran B, Das BK. Rheumatoid arthritis patients are free of filarial infection in an area where filariasis is endemic: comment on the article by Pineda et al. *Arthritis and rheumatism*. 2013;65(5):1402-3.
60. Chiardola F, Schneeberger EE, Citera G, Rosemffet GM, Kuo L, Santillan G, et al. Prevalence and clinical significance of eosinophilia in patients with rheumatoid arthritis in Argentina. *Journal of clinical rheumatology : practical reports on rheumatic & musculoskeletal diseases*. 2008;14(4):211-3.
61. Bertias GK, Pamfil C, Fanouriakis A, Boumpas DT. Diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus: has the time come? *Nature reviews Rheumatology*. 2013;9(11):687-94.
62. Acevedo N, Sanchez J, Erler A, Mercado D, Briza P, Kennedy M, et al. IgE cross-reactivity between *Ascaris* and domestic mite allergens: the role of tropomyosin and the nematode polyprotein ABA-1. *Allergy*. 2009;64(11):1635-43.
63. Correale J, Farez MF. The impact of environmental infections (parasites) on MS activity. *Multiple sclerosis*. 2011;17(10):1162-9.
64. Millauer N, Zuercher AW, Miescher SM, Gerber HA, Seitz M, Stadler BM. High IgE in rheumatoid arthritis (RA) patients is complexed with anti-IgE autoantibodies. *Clinical and experimental immunology*. 1999;115(1):183-8.
65. Permin H, Wiik A. The prevalence of IgE antinuclear antibodies in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica Section C, Immunology*. 1978;86C(5):245-9.
66. Maurer M, Altrichter S, Schmetzer O, Scheffel J, Church MK, Metz M. Immunoglobulin E-Mediated Autoimmunity. *Frontiers in immunology*. 2018;9:689.
67. Cusick MF, Libbey JE, Fujinami RS. Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2012;42(1):102-11.
68. Pianta A, Arvikar SL, Strle K, Drouin EE, Wang Q, Costello CE, et al. Two rheumatoid arthritis-specific autoantigens correlate microbial immunity with autoimmune responses in joints. *The Journal of clinical investigation*. 2017;127(8):2946-56.
69. Meretey K, Falus A, Erhardt CC, Maini RN. IgE and IgE-rheumatoid factors in circulating immune complexes in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 1982;41(4):405-8.
70. Heiberg MS, Rodevand E, Mikkelsen K, Kaufmann C, Didriksen A, Mowinckel P, et al. Adalimumab and methotrexate is more effective than adalimumab alone in patients with established rheumatoid arthritis: results from a 6-month longitudinal, observational, multicentre study. *Annals of the rheumatic diseases*. 2006;65(10):1379-83.
71. Gabay C, Emery P, van Vollenhoven R, Dikranian A, Alten R, Pavelka K, et al. Tocilizumab monotherapy versus adalimumab monotherapy for treatment of rheumatoid arthritis (ADACTA): a randomised, double-blind, controlled phase 4 trial. *Lancet (London, England)*. 2013;381(9877):1541-50.
72. Ridgley LA, Anderson AE, Pratt AG. What are the dominant cytokines in early rheumatoid arthritis? *Current opinion in rheumatology*. 2018;30(2):207-14.
73. Burska A, Boissinot M, Ponchel F. Cytokines as Biomarkers in Rheumatoid Arthritis. *Mediators of Inflammation*. 2014;2014:24.
74. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annual review of immunology*. 1996;14:397-440.

75. Milman N, Karsh J, Booth RA. Correlation of a multi-cytokine panel with clinical disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical biochemistry*. 2010;43(16-17):1309-14.
76. Wang J, Platt A, Upmanyu R, Germer S, Lei G, Rabe C, et al. IL-6 pathway-driven investigation of response to IL-6 receptor inhibition in rheumatoid arthritis. *BMJ open*. 2013;3(8):e003199.
77. Reiss WG, Devenport JN, Low JM, Wu G, Sasso EH. Interpreting the multi-biomarker disease activity score in the context of tocilizumab treatment for patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology international*. 2016;36(2):295-300.
78. Romao VC, Vital EM, Fonseca JE, Buch MH. Right drug, right patient, right time: aspiration or future promise for biologics in rheumatoid arthritis? *Arthritis research & therapy*. 2017;19(1):239.
79. Daien CI, Gailhac S, Mura T, Audo R, Combe B, Hahne M, et al. Regulatory B10 cells are decreased in patients with rheumatoid arthritis and are inversely correlated with disease activity. *Arthritis & rheumatology*. 2014;66(8):2037-46.
80. Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, et al. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Science translational medicine*. 2013;5(173):173ra23.
81. Cui D, Zhang L, Chen J, Zhu M, Hou L, Chen B, et al. Changes in regulatory B cells and their relationship with rheumatoid arthritis disease activity. *Clinical and experimental medicine*. 2015;15(3):285-92.
82. Jeong YI, Hong SH, Cho SH, Park MY, Lee SE. Induction of IL-10-producing regulatory B cells following *Toxoplasma gondii* infection is important to the cyst formation. *Biochemistry and biophysics reports*. 2016;7:91-7.
83. Morita T, Shima Y, Wing JB, Sakaguchi S, Ogata A, Kumanogoh A. The Proportion of Regulatory T Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis. *PLoS one*. 2016;11(9):e0162306.
84. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical Reviews in Immunology*. 2012;32(1):23-63.
85. Mongan AE, Ramdahin S, Warrington RJ. Interleukin-10 response abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Scandinavian journal of immunology*. 1997;46(4):406-12.
86. Lalani I, Bhol K, Ahmed AR. Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 1997;79(6):469-83.

## 11. Tablas y figuras suplementarias

Sujeto	Edad	Género	Tipo de residencia	Terapia	DAS28	VSG	VAS	HAQ	Coprológico positivo	IgE Ascaris (O.D)	Sensibilización Ascaris
1	60	F	U	mtx, clq	2,87	60	0	0,25	No	0,0975	No
2	66	F	U	mtx, lfm, pred	4,39	23	10	0,75	No	0,1535	Si
3	58	F	U	mtx, pred	3,09	25	0	0,88	No	0,4874	Si
4	67	F	R	mtx	2,81	55	0	1,5	No	0,6288	Si
5	62	F	R	mtx, lfm, pred	4,07	31	10	0	No	0,123	Si
6	57	F	R	lfm, pred, sulfa	1,88	114	70	0	Si (*)	0,4549	Si
7	67	F	R	pred	3,51	40	10	1,63	Si (°)	0,1512	Si
8	46	F	U	pred, sulfa	3,64	26	0	0,25	No	0,2271	Si
9	57	F	U	n.t	6,53	50	40	1,63	No	0,6775	Si
10	75	M	U	bio	1,46	8	0	1,25	No	0,1118	No
11	40	F	U	mtx, lfm	2,65	44	0	0	No	0,5274	Si
12	25	F	U	n.t	4,48	31	40	1	No	0,3915	Si
13	66	F	U	mtx, bio	3,84	41	0	0,25	No	0,4672	Si
14	59	F	U	mtx, pred, bio	4,27	43	40	0,63	No	0,1443	Si
15	45	F	R	n.t	1,9	15	0	0	No	0,2115	Si
16	67	F	R	mtx, clq, pred	1,9	15	0	0	No	0,4897	Si
17	52	M	R	mtx, lfm, pred	5,15	20	70	1,5	No	0,1605	Si
18	56	F	R	lfm, pred, sulfa	5,37	80	40	1,38	No	0,2687	Si
19	61	F	R	mtx, pred	3,36	30	10	0,75	No	0,2874	Si
20	66	F	R	lfm	6,31	85	50	1,75	No	0,3295	Si
21	55	F	R	n.t	2	19	20	0	No	0,0964	No
22	28	M	R	n.t	5,52	35	70	1,88	No	0,3502	Si
23	71	F	U	lfm, sulfa	5,63	44	80	2,25	No	0,09405	No
24	53	F	U	mtx, bio	4,21	12	50	2,13	No	0,152	Si
25	60	F	U	clq, pred	4,19	30	30	2,38	No	0,1914	Si

**Tabla S 1. Características clínicas de los pacientes con artritis reumatoide.** F: femenino; M: masculino; R: rural; U: urbano; mtx: metotrexate; lfm: leflunomida; sulfa: sulfasalazina; bio: terapia biológica con anti-TNF; pred: prednisolona, corticoide oral; clq: cloroquina, n.t: no tratado; (\*) *E.nana*, *E.coli*; (°) *Strongyloides stercoralis*.

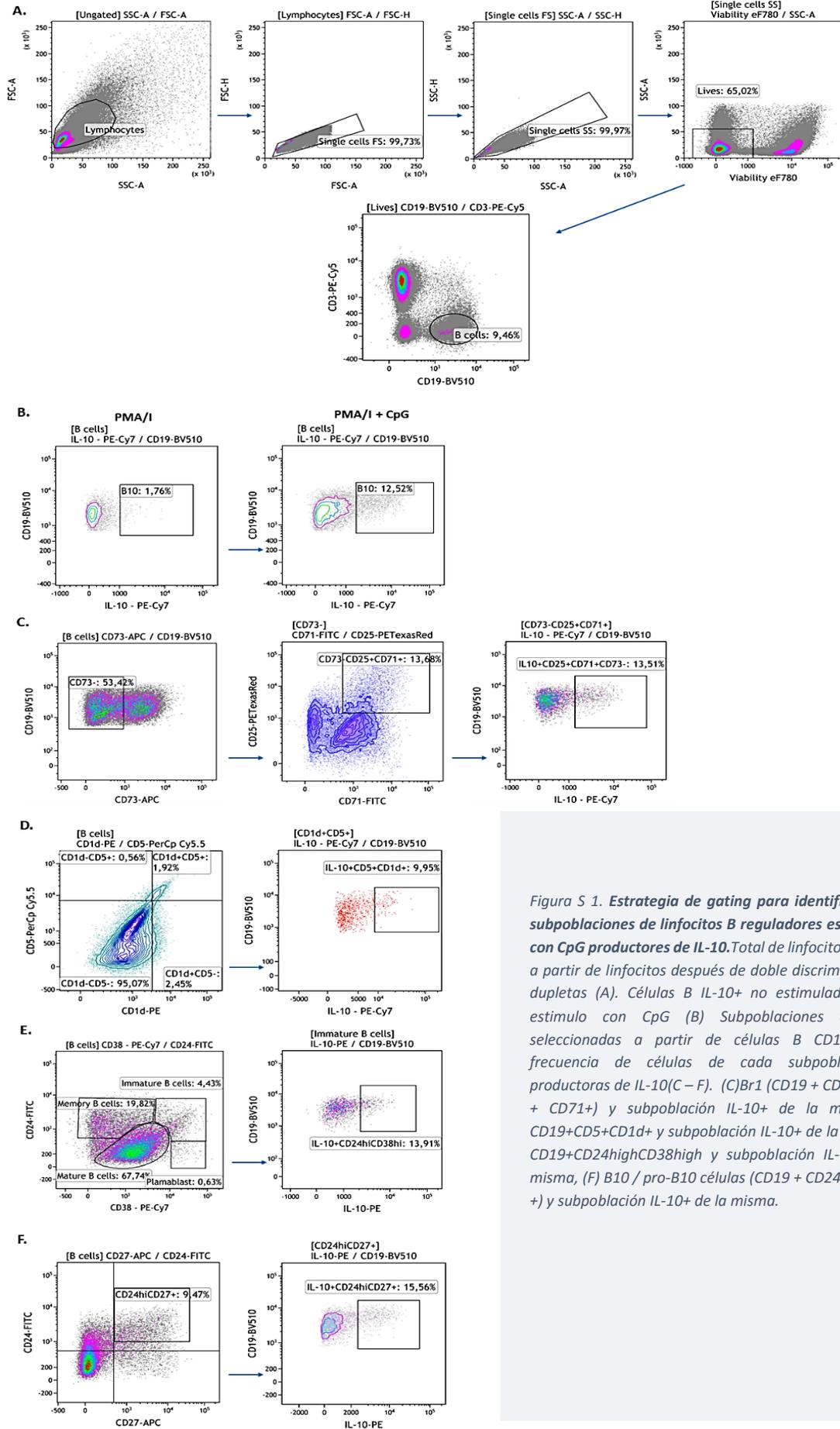


Figura S 1. Estrategia de gating para identificación de subpoblaciones de linfocitos B reguladores estimulados con CpG productores de IL-10. Total de linfocitos B viables a partir de linfocitos después de doble discriminación de dupletas (A). Células B IL-10+ no estimuladas y post estímulo con CpG (B) Subpoblaciones de Bregs seleccionadas a partir de células B CD19+CD3- y frecuencia de células de cada subpoblación de productoras de IL-10(C-F). (C)Br1 (CD19 + CD73 - CD25 + CD71+) y subpoblación IL-10+ de la misma, (D) CD19+CD5+CD1d+ y subpoblación IL-10+ de la misma (E) CD19+CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> y subpoblación IL-10+ de la misma, (F) B10 / pro-B10 células (CD19 + CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup>) y subpoblación IL-10+ de la misma.

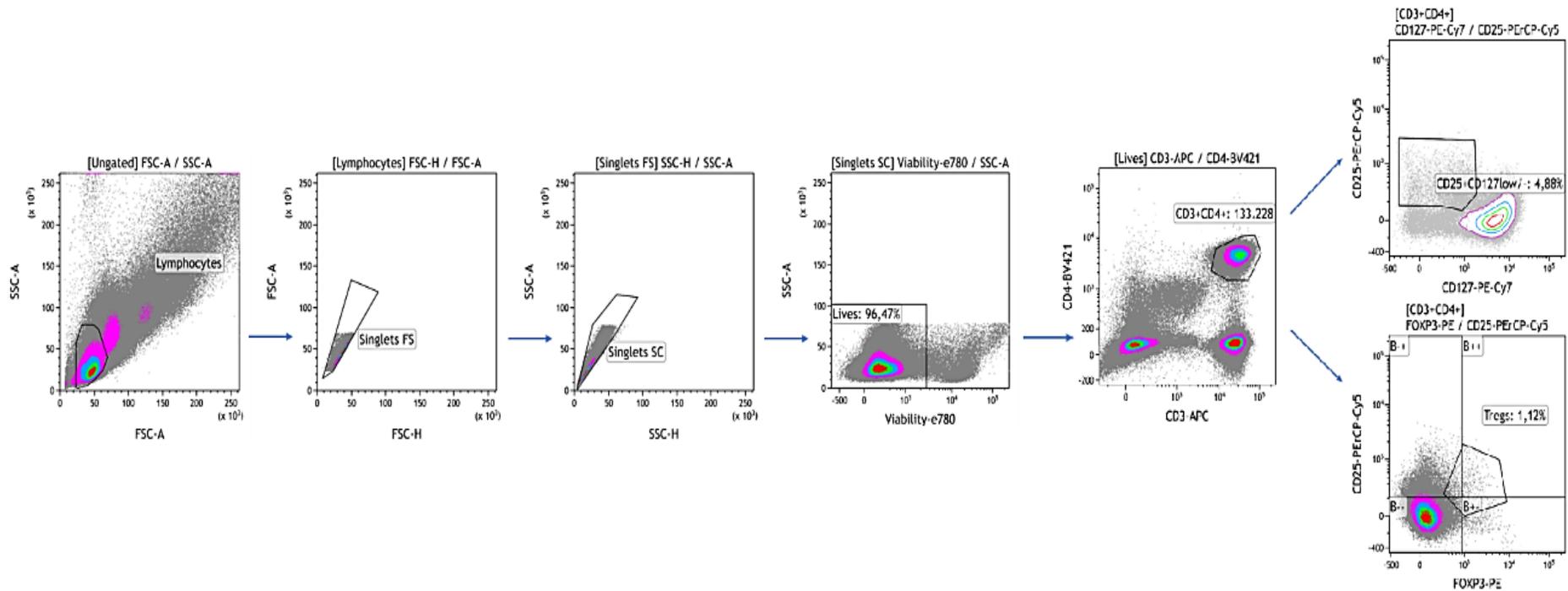


Figura S 2 **Estrategia de gating para identificación de linfocitos T reguladores.** Del total de eventos se seleccionaron las poblaciones que correspondían por parámetros morfológicos y de complejidad (SSC y FSC) a los linfocitos. Se eliminaron las dupletas y se comprobó viabilidad. De los CD3+CD4+ se identificaron los linfocitos T reguladores por los 3 marcadores de superficie e intracelulares (CD25; CD127; FoxP3)

## 12. Anexos

### Anexo 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del proyecto: **Evaluación de un producto recombinante de *Ascaris lumbricoides* con capacidad inmunomoduladora en el tratamiento de artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico**

Investigadores: Josefina Zakzuk, Luis Caraballo, y Nelson Alvis

La Universidad de Cartagena lo invita a que participe en el proyecto de investigación denominado: **“Evaluación de un producto recombinante de *Ascaris lumbricoides* con capacidad inmunomoduladora en el tratamiento de artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico”**, el cual no tiene ningún costo para usted diferente a su tiempo. Su decisión de participar es voluntaria. Por favor, lea este formulario de consentimiento cuidadosamente, y haga cuantas preguntas considere. Aún si ahora usted decide participar podrá abandonar el estudio en cualquier momento si así lo desea.

Este proyecto es una investigación de tipo observacional que se realizará por profesionales investigadores de la Universidad de Cartagena que cuenta con el aval y aprobación del comité de Ética de Universidad de Cartagena. Su objetivo es evaluar la relación de la infección por el parásito intestinal *Ascaris lumbricoides* y el desarrollo de dos enfermedades autoinmunes: artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico. Además, queremos investigar el potencial inmunomodulador de una molécula derivada de este parásito como anti-inflamatorio para el tratamiento de estas enfermedades.

Como parte de esta investigación se le harán preguntas que se consignarán por escrito en un formulario, indagando sobre síntomas de enfermedades autoinmunes, condiciones de vida, hábitos, características de la vivienda, antecedentes personales y familiares. Toda esta información será incorporada a la base de datos del estudio, cuyo carácter es confidencial y que solo será empleada con fines de investigación biomédica o epidemiológica. Se le pedirán en días diferentes dos muestras consecutivas de heces con el fin de determinar la presencia de parásitos intestinales. Estas serán recogidas en su hogar por el mismo médico o el personal de apoyo contratado para la ejecución del proyecto. Los resultados del examen se le darán a conocer de manera oportuna, así como el tratamiento que deba tomar en caso de necesitarlo, lo cual será responsabilidad suya si lo sigue o no. Los investigadores no se comprometen a suministrarle el medicamento que necesite.

También está contemplado en esta investigación realizarle exámenes paraclínicos que sirven para confirmar el diagnóstico y evaluar la severidad de la artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico, según sea el caso. Para esto, se le tomará una muestra de sangre por punción venosa a nivel del antebrazo. La punción será realizada por una enfermera entrenada, con material desechable y adecuadas condiciones de limpieza. La muestra de sangre será marcada con un código especial del estudio. La punción venosa representa un riesgo muy bajo y como única consecuencia podría resultar un pequeño hematoma (morado) o infección en el sitio donde penetra la aguja. En caso de presentarse alguna complicación con la punción venosa, el Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena cubrirá la atención de esta complicación.

Es probable que sea seleccionado a una segunda fase del estudio, donde por limitaciones económicas solo se incluirá a un grupo representativo de las personas encuestadas. Al participante de esta fase se le pedirá una nueva muestra de sangre para estudiar las células del sistema inmunológico (sistema de defensa de su cuerpo) en especial algunas que se han relacionado con la

infección parasitaria y que probablemente pueden conferir protección frente a la enfermedad. Las células que se obtengan de la muestra de sangre que done serán incubadas con un producto del parásito y se observará si esta molécula genera efectos anti-inflamatorios de manera que se pueda plantear como una opción terapéutica susceptible de ser estudiado con más profundidad. Una parte de estas células serán congeladas para estudiar en ellas modificaciones epigenéticas que puedan aportar información valiosa sobre mecanismos de defensa que brinden protección de enfermedades autoinmunes. Los resultados de esta investigación podrían ser de utilidad para en un futuro ofrecer nuevas opciones de tratamiento para la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico, pero de manera inmediata no le proporcionarán beneficios directos para el control de su enfermedad.

### **¿De qué manera se protege mi privacidad?**

Los datos de este estudio serán publicados. El nombre o cualquier forma de identificación de Usted no serán utilizados sin su expresa autorización. La información consignada en la historia clínica podrá ser utilizada por el investigador para el estudio. Esta información puede incluir el nombre, fecha de nacimiento, la dirección, el número de teléfono y la historia médica suya. Se utilizará un código que lo identifica y que solo conocerán los investigadores.

Usted puede hablar con los investigadores en cualquier momento y hacer cualquier pregunta que tenga en relación con el estudio.

A los investigadores: la Doctora Josefina Zakzuk, el Doctor Luis Caraballo y el Doctor Nelson Alvis los puede encontrar en los siguientes teléfonos: 6698491 y 3215412280 o por correo electrónico: [jkakzuku@unicartagena.edu.co](mailto:jkakzuku@unicartagena.edu.co), [lcaraballo@unicartagena.edu.co](mailto:lcaraballo@unicartagena.edu.co) y [nalvis@yahoo.com](mailto:nalvis@yahoo.com).

Me ha sido dada la oportunidad de hacer todas las preguntas y éstas han sido respondidas. Me han dado una copia de este consentimiento informado. Firmo como manifestación de voluntad y aprobación para participar en este estudio:

Nombre del Voluntario \_\_\_\_\_

No del Documento de Identidad \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

Testigo No. 1

Testigo No. 2

Nombre: \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_

C.C. No. C.C. No.

Dirección \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_

Relación con el voluntario \_\_\_\_\_

Relación con el voluntario \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Firma del Investigador que administra en consentimiento

Fecha \_\_\_\_\_

## Anexo 2. Criterios diagnósticos de LES

Criterios de clasificación del lupus eritematoso sistémico según el Colegio Americano de Reumatología	
Criterio	Definición
1. Eritema malar	Eritema fijo, plano o elevado, sobre las eminencias malares, respetando los pliegues nasolabiales
2. Rash discoide	Zonas eritematosas elevadas con escamas queratóticas adherentes y taponamiento folicular. En las lesiones antiguas puede producirse cicatrización atrófica
3. Fotosensibilidad	Erupción cutánea desproporcionada tras exposición a la luz solar, por historia u observada por el médico
4. Úlceras orales	Úlceras orales o nasofaríngeas, normalmente indoloras, observadas por el médico
5. Artritis	Artritis no erosiva en dos o más articulaciones periféricas, con inflamación, derrame sinovial o dolor a la palpación
6. Serositis	Pleuritis: historia clínica convincente, roce auscultado por un médico o demostración de derrame pleural ó Pericarditis: documentada por ECG, roce auscultado por un médico o demostración de derrame
7. Nefropatía	Proteinuria persistente superior a 0,5 g/día o > 3+ si no se ha cuantificado, o Cilindruria: de hematíes o hemoglobina, cilindros granulosos, tubulares o mixtos
8. Alteración neurológica	Convulsiones o psicosis, en ausencia de trastorno metabólico, electrolítico o de fármacos que las puedan producir
9. Alteración hematológica	Anemia hemolítica con reticulocitosis o Leucopenia < de 4.000/mm <sup>3</sup> en <sup>3</sup> 2 ocasiones o Linfopenia < de 1.500/mm <sup>3</sup> en <sup>3</sup> 2 ocasiones o Trombopenia < de 100.000/mm <sup>3</sup> no secundaria a fármacos.
10. Alteración inmunológica	Anti DNA positivo o Anti Sm positivo o Anticuerpos antifosfolípidos positivos basado en 1) Anticuerpos anticardiolipinas IgG o IgM (+) a títulos medios o altos 2) Anticoagulante lúpico (+) o Serología luética falsamente (+) durante al menos 6 meses
11. Anticuerpos antinucleares positivos	Título anormal de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia o por otro test equivalente en ausencia de fármacos capaces de producir lupus inducido por los mismos
Para el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico son necesarios cuatro de estos 11 criterios, no necesariamente simultáneos	

Tomado de: 1997 Update of the 1982 American College of Rheumatology Revised Criteria for Classification of Systemic Lupus Erythematosus

### Anexo 3. Criterios diagnósticos de Artritis Reumatoide

#### Artritis Reumatoide: Criterios de clasificación. ACR/EULAR 2010

<b>Dominio afectación articular: incluye articulaciones dolorosas o inflamadas al momento del examen.</b>	<b>Puntos</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Pequeñas articulaciones: metacarpofalángicas, interfalángicas proximales de la mano, 2-5ta metatarsofalángicas, 1ra interfalángica proximal del pie y carpos.</li> <li>✓ Medianas y grandes articulaciones: hombros, codos, caderas, rodillas y tobillos.</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 articulación grande-mediana</li> <li>• 2-10 articulaciones grandes-medianas</li> <li>• 1-3 articulaciones pequeñas</li> <li>• 4-10 articulaciones pequeñas</li> <li>• &gt;10 articulaciones pequeñas</li> </ul>	<p>0</p> <p>1</p> <p>2</p> <p>3</p> <p>5</p>
<b>Dominio de serología: el rango normal aplicado es el informado por el laboratorio.</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Factor Reumatoideo y anti-CCP negativos</li> <li>• Al menos uno de las pruebas positivas en bajos títulos, no superando tres veces el límite normal</li> <li>• Al menos uno de las pruebas positivas en altos títulos, definido como más de tres veces el límite normal</li> </ul>	<p>0</p> <p>2</p> <p>3</p>
<b>Dominio de duración de sinovitis: reportada por el paciente desde el comienzo de los síntomas en la articulación afectada en el momento del examen.</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Menos de 6 semanas</li> <li>• 6 semanas o más</li> </ul>	<p>0</p> <p>1</p>
<b>Dominio de reactantes de fase aguda: el rango normal aplicado es el informado por el laboratorio.</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína C reactiva y eritrosedimentación normales</li> <li>• Proteína C reactiva y/o eritrosedimentación elevados</li> </ul>	<p>0</p> <p>1</p>

Se toma en cuenta la puntuación más alta de cada dominio. El resultado final es la suma directa de los dominios. Pacientes con  $\geq 6$  puntos presentan diagnóstico de AR definitiva.

#### Tomado de:

Aletaha, D., et al., 2010 *Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative*. *Arthritis & Rheumatism*, 2010. 62(9): p. 2569-2581

## Anexo 4. Formato de medición de actividad en artritis reumatoide (DAS-28)

Nombre y apellido: \_\_\_\_\_

HC N°: \_\_\_\_\_

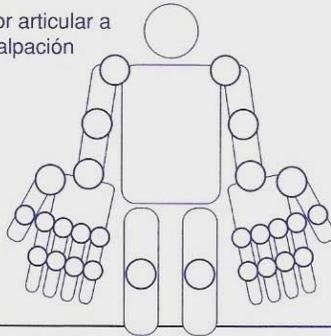
Fecha: \_\_\_\_\_

### Score de Actividad de la Enfermedad (Disease Activity Score - DAS 28)

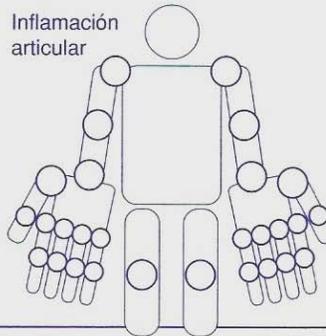
#### Estado articular - Evaluación de 28 articulaciones

(Van der Heijde DMFM y col. J Rheumatol; 20: 579-81. Prevoo MLL y col. Arthritis Rheum; 38: 44-8)

Dolor articular a la palpación



Inflamación articular



1 Número de articulaciones dolorosas

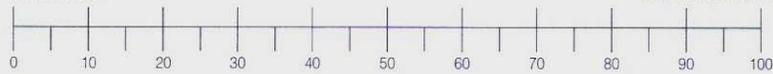
2 Número de articulaciones inflamadas

3 Eritrosedimentación en mm/h

#### 4 Valoración global del paciente

(Actividad de la enfermedad durante los últimos 7 días)\*

Sin actividad



Máxima actividad

\* Por favor, deje que el paciente haga la evaluación y lo indique con una línea vertical

Evaluación del paciente en mm

#### Fórmula para realizar el cálculo de DAS 28

$$0,56 \times \sqrt{\text{N}^\circ \text{ articulaciones dolorosas}} + 0,28 \times \sqrt{\text{N}^\circ \text{ articulaciones inflamadas}} + 0,70 \times \ln \left( \frac{\text{Eritrosedimentación}}{\text{Eritrosedimentación}} \right) + 0,014 \times (\text{Valoración global del paciente en mm}) = \text{DAS 28}$$

#### Evaluación DAS 28

DAS 28 Actual	DAS 28: Diferencia con el valor inicial		
	> 1,2	> 0,6 y ≤ 1,2	≤ 0,6
≤ 3,2 Inactiva	Buena respuesta	Respuesta moderada	Sin respuesta
> 3,2 ≤ 5,1 Moderada	Respuesta moderada	Respuesta moderada	Sin respuesta
> 5,1 Muy activa	Respuesta moderada	Sin respuesta	Sin respuesta

## Anexo 5. Formato HAQ para evaluación de la calidad de vida

### Versión Española del Health Assessment Questionnaire (HAQ)

Traducida y adaptada por J. Esteve-Vives, E. Batlle-Gualda, A. Reig y Grupo para la Adaptación del HAQ a la Población Española

	Durante la <u>última semana</u> , ¿ha sido usted capaz de...	Sin dificultad	Con alguna dificultad	Con mucha dificultad	Incapaz de hacerlo
Vestirse y asearse	1) Vestirse solo, incluyendo abrocharse los botones y atarse los cordones de los zapatos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	2) Enjabonarse la cabeza?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Levantarse	3) Levantarse de una silla sin brazos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	4) Acostarse y levantarse de la cama?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Comer	5) Cortar un filete de carne?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	6) Abrir un cartón de leche nuevo?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	7) Servirse la bebida?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Caminar	8) Caminar fuera de casa por un terreno llano?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	9) Subir cinco escalones?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Higiene	10) Lavarse y secarse todo el cuerpo?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	11) Sentarse y levantarse del retrete?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	12) Ducharse?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Alcanzar	13) Coger un paquete de azúcar de 1 Kg de una estantería colocada por encima de su cabeza?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	14) Agacharse y recoger ropa del suelo?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Preñión	15) Abrir la puerta de un coche?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	16) Abrir tarros cerrados que ya antes habían sido abiertos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	17) Abrir y cerrar los grifos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Otras	18) Hacer los recados y las compras?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	19) Entrar y salir de un coche?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	20) Hacer tareas de casa como barrer o lavar los platos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

0	0.000
1	0.125
2	0.250
3	0.375
4	0.500
5	0.625
6	0.750
7	0.875
8	1.000
9	1.125
10	1.250
11	1.375
12	1.500
13	1.625
14	1.750
15	1.875
16	2.000
17	2.125
18	2.250
19	2.375
20	2.500

Señale para qué actividades **necesita la ayuda de otra persona**:

- |   |  |  |
|---|--|--|
| <input type="checkbox"/> .. Vestirse, asearse | <input type="checkbox"/> .. Caminar, pasear  | <input type="checkbox"/> .. Abrir y cerrar cosas (preñión) |
| <input type="checkbox"/> .. Levantarse        | <input type="checkbox"/> .. Higiene personal | <input type="checkbox"/> .. Recados y tareas de casa       |
| <input type="checkbox"/> .. Comer             | <input type="checkbox"/> .. Alcanzar         |  |

Señale si utiliza alguno de estos **utensilios** habitualmente:

- |  |  |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> .. Cubiertos de mango ancho                   | <input type="checkbox"/> .. Abridor para tarros previamente abiertos |
| <input type="checkbox"/> .. Bastón, muletas, andador o silla de ruedas |  |
| <input type="checkbox"/> .. Asiento o barra especial para el baño      |  |
| <input type="checkbox"/> .. Asiento alto para el retrete               |  |

## Anexo 6. Paneles de marcadores evaluados por citometría de flujo

### Panel TREGS FOXP3

	<i>Marcador</i>	<i>Fluorocromo</i>	<i>Empresa</i>	<i>Referencia</i>
<i>Superficie</i>	CD4	V450	BD Bioscience	560345
	CD3	APC	e-bioscience	17-0037-42
	CD127	PECy7	e-bioscience	25-1278-42
	CD25	PerCp Cy5,5	e-bioscience	45-0259-42
<i>Intracelular</i>	FOXP3	PE	BD Pharmingen	560046
	Viabilidad	APC-Cy7	e-bioscience	65-0865-14

### Panel CD38/CD24/CD27

	<i>Marcador</i>	<i>Fluorocromo</i>	<i>Empresa</i>	<i>Referencia</i>
<i>Superficie</i>	CD19	BV510	BD Horizon	562947
	CD3	PECy5	BD Pharmingen	555341
	CD38	PECy7	e-bioscience	25-0389-42
	CD24	FITC	BD Pharmingen	555427
	CD27	APC	eBioscience	17-0279-73
<i>Intracelular</i>	IL-10	PE	BD Pharmingen	559330
	Viabilidad	APC-Cy7	e-bioscience	65-0865-14

**Panel CD5/CD1d/CD71/CD73/CD25**

	<b>Marcador</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Empresa</b>	<b>Referencia</b>
<b>Superficie</b>	CD19	BV510	BD Horizon	562947
	CD3	PECy5	BD Pharmingen	555341
	CD73	APC	e-bioscience	17-0739-42
	CD71	FITC	e-bioscience	11-0719-42
	CD25	PECF594	BD Horizon	562403
	CD5	PerCPCy5.5	Invitrogen	45-0058-42
<b>Intracelular</b>	CD1d	PE	BD Pharmingen	550255
	IL-10	PECy7	eBioscience	25-7108-42
	Viabilidad	APC-Cy7	e-bioscience	65-0865-14

## Anexo 7. Aprobación comité de ética medica



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

#### HACE CONSTAR

Que, el proyecto titulado "EVALUACIÓN DE UN PRODUCTO RECOMBINANTE DE ASCARIS LUMBRICOIDES CON CAPACIDAD INMUNOMODULADORA EN EL TRATAMIENTO DE ARTRITIS REUMATOIDE Y LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO", presentado por la doctora Josefina Zakzuk, Docente del Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena, se ajusta a los requerimientos de los referentes éticos contemplados en la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y por no tratarse de un proyecto relacionado con ensayos clínicos, se omite el requerimiento contemplado en la resolución 2378 de 2008.

El presente proyecto requiere de Consentimiento Informado, de acuerdo al riesgo mínimo inherente, según la interpretación de los artículos 15 y 16 de la resolución 08430 de 1993, tal como consta en el Acta N° 87 del Comité de Ética en Investigaciones del día 23 de mayo de 2016.

Para constancia se firma en la ciudad de Cartagena, el veintitrés (23) de mayo del año dos mil dieciséis (2016).

  
ALVARO OLIVERA DIAZ, MD  
Presidente



Vicerrectoría de Investigaciones  
Centro – Cra. 4 No. 38-40, Claustro de la Merced Telefax: 6642663  
E-mail: [investigaciones@unicartagena.edu.co](mailto:investigaciones@unicartagena.edu.co)  
web: [www.unicartagena.edu.co](http://www.unicartagena.edu.co)  
Cartagena de Indias, D.T. y C. – Colombia