



Universidad
de Cartagena
Fundada en 1827

iii Instituto de
Investigaciones
Inmunológicas



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES INMUNOLÓGICAS
UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

“Efectos inmunomoduladores de la cistatina de *Ascaris lumbricoides* sobre los linfocitos B”

Trabajo de grado para optar al título de Magíster en Inmunología

Candidato:

Jonathan José Rodríguez Cantillo, MD.

Tutor:

Josefina Zakzuk Sierra, MD., PhD.

Docente

Cartagena de Indias, Bolívar, Colombia

3 de marzo de 2022

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN EJECUTIVO.....	5
2. INTRODUCCIÓN.....	7
3. MARCO CONCEPTUAL.....	8
3.1 Artritis reumatoide.....	8
3.2 Células B reguladoras.....	9
3.3 Inmunomodulación inducida por helmintos.....	11
3.4 Células B reguladoras inducidas por helmintos.....	13
3.5 Generalidades de las cistatinas.....	14
3.5.1 Superfamilia de cistatinas.....	15
3.5.2 Estructura de las cistatinas.....	16
3.5.3 Mecanismo de acción de la cistatina.....	18
3.5.4 Efectos biológicos de las cistatinas.....	19
3.5.5 Cistatinas identificadas en helmintos.....	20
3.5.6 Efecto de las cistatinas en las células B reguladoras.....	22
3.5.7 Efecto de las cistatinas en modelos de artritis reumatoide.....	22
3.5.8 Cistatina de <i>Ascaris lumbricoides</i>	23
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVOS.....	25
5.2.1 General.....	25
5.2.2 Específicos.....	25
6. METODOLOGÍA.....	25
6.1. Diseño general del estudio.....	25
6.2 Criterios de selección.....	26
6.2.1. Fase 1: Criterios de selección de donador sano.....	26
6.2.2. Fase 2: Criterios de selección de casos y controles.....	27

6.3 Consentimiento informado.....	28
6.4 Obtención de muestras biológicas	28
6.5 Tamaño de la muestra	28
6.6 Metodología específica	28
6.6.1 Expresión y purificación de la cistatina recombinante AI-CPI	28
6.6.2 Aislamiento de PBMCs	29
6.6.3 Tinción con marcador de viabilidad FVD	30
6.6.4 Tinción con estuche de viabilidad Anexina-V – Yoduro de Propidio	30
6.6.5 Cultivo y recolección de sobrenadantes de PBMCs de donadores sanos	31
6.6.6 Tinción con anticuerpos monoclonales de superficie y citometría de flujo.....	31
6.6.7 Purificación magnética de linfocitos B.....	32
6.6.8 Cultivo y recolección de sobrenadantes de linfocitos B purificados de donadores sanos, casos y controles.	33
6.6.9 Determinación de IL-10 en sobrenadantes de cultivo de PBMCs y linfocitos B purificados mediante ELISA.....	33
6.6.10 Determinación de IL-10 en sobrenadantes de cultivo de PBMCs y linfocitos B purificados mediante CBA.....	34
6.6.11 Análisis Estadístico	34
7. RESULTADOS	35
7.1 Respuesta inmunitaria frente a distintas concentraciones de rAI-CPI	35
7.2. Viabilidad celular de PBMCs frente a distintas concentraciones de rAI-CPI mediante anexina y yoduro de propidio.....	36
7.3 Viabilidad celular de linfocitos T y B frente a distintas concentraciones de rAI-CPI	38
7.4 Respuesta inmunitaria de PBMCs de donadores sanos frente a rAI-CPI	42
7.5 Expresión de marcadores relacionados con Bregs	44
7.6 Respuesta inmunitaria de linfocitos B purificados de donadores sanos frente a rAI-CPI	46
7.6 Respuesta inmunitaria de linfocitos B purificados de pacientes con AR y controles frente a rAI-CPI.....	48

8. DISCUSIÓN.....	53
9. CONCLUSIONES	57
10. PERSPECTIVAS FUTURAS	57
11. FINANCIAMIENTO.....	58
12. CONFORMACIÓN Y TRAYECTORIA DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN.....	58
13. REFERENCIAS	60
14. ANEXOS.....	67
Anexo 1. Consentimiento informado	67
Anexo 2. Formulario de identificación de características sociodemográficas para parasitosis intestinales.....	70
Anexo 3. Paneles de marcadores celulares.....	74
Anexo 4. Aprobación Comité de Ética en Investigaciones de la Universidad de Cartagena	75
Anexo 5. Figuras suplementarias	76
Anexo 6. Publicaciones	86

1. RESUMEN EJECUTIVO

La actividad aberrante de los linfocitos B se ha asociado con distintas enfermedades autoinmunitarias como la artritis reumatoide (AR) (1). Esta enfermedad se caracteriza por tener un fuerte componente inflamatorio por lo que han sido distintos los mecanismos estudiados para crear dianas terapéuticas. Las cistatinas helmínticas han demostrado tener efectos antiinflamatorios en modelos de inflamación como la AR experimental. rAI-CPI, una cistatina helmíntica, ha demostrado un papel inmunorregulador en modelos inflamatorios. Uno de los mecanismos por medio del cual lo hace es a través de la inducción de la citoquina antiinflamatoria IL-10. Hasta ahora se desconoce el papel de rAI-CPI en la inducción de IL-10 en los linfocitos B de donadores sanos y pacientes con AR. En este estudio se analizó la inducción de IL-10 por parte de linfocitos B purificados de PBMCs de donadores, y pacientes con AR pareados con controles por edad y sexo frente a la estimulación con rAI-CPI. Durante la selección de la concentración de rAI-CPI adecuada para realizar las estimulaciones de todos los experimentos, se encontró que la concentración 0,1 μM indujo los mayores niveles de IL-10 en comparación con las otras concentraciones (1 μM , 0,01 μM , 0,001 μM). Para averiguar si los bajos niveles de IL-10 en la concentración 1 μM se debieron a efectos citotóxicos, se realizaron estudios de viabilidad de PBMCs y linfocitos B con los marcadores FVD y Anexina-V + yoduro de propidio frente a las cuatro concentraciones de rAI-CPI utilizadas. Se encontró que rAI-CPI 1 μM fue citotóxica para los linfocitos B de donadores sanos, a diferencia de la concentración de rAI-CPI 0.1 μM . Posteriormente, cuando se evaluaron los niveles de IL-10 en sobrenadantes de PBMCs provenientes de donadores sanos mediante ELISA se encontraron unos niveles más altos en la condición estimulada con rAI-CPI 0.1 μM comparada con la condición control ($p=0,012$). Para verificar la inducción en linfocitos B de marcadores asociados a Bregs, las PBMCs de los donadores sanos fueron sometidas a tinción de marcadores de superficie e intracelular (CD25, CD1d, CD71, CD73, CD5 e IL.10). Se encontró un descenso estadísticamente significativo en la expresión del marcador CD25 en la condición rAI-CPI 0.1 μM + CpG comparada con CpG ($p=0.037$), mientras que no se hallaron diferencias significativas en los demás marcadores. Después, se midieron los niveles de IL-10 en los sobrenadantes de linfocitos B purificados de PBMCs de donadores sanos mediante ELISA y se encontraron unos niveles más altos en la condición estimulada con rAI-CPI comparada con la condición control ($p=0,0037$).

Posteriormente, se compararon los niveles de IL-10 en los sobrenadantes de linfocitos B purificados de pacientes con AR y sus controles pareados mediante ELISA, encontrándose diferencias significativas en los niveles de IL-10 cuando se comparó la condición RPMI entre los grupos ($p=0,034$). La medición de IL-10 e IL-6 mediante CBA no arrojó diferencias significativas cuando se comparó entre las condiciones y grupos. En conclusión, se demuestra que las altas concentraciones de rAI-CPI son citotóxicas para la subpoblación de linfocitos B. La estimulación con rAI-CPI sugiere que es capaz de inducir producción de IL-10 en linfocitos B de donadores sanos. Esta tendencia no fue tan clara en el grupo de casos y controles. La inducción de linfocitos B reguladores no es concluyente de acuerdo a las mediciones de marcadores de superficie e intracelulares. Se sugiere la realización de estos experimentos con otras técnicas de purificación de linfocitos B, así como un aumento en el tamaño de la muestra.

2. INTRODUCCIÓN

El ascenso de las enfermedades inflamatorias crónicas no transmisibles y autoinmunitarias, como la AR, se ha asociado con cambios en los hábitos higiénicos, específicamente, la pérdida de contacto con los organismos parasitarios. La AR es una enfermedad autoinmunitaria con un importante componente inflamatorio cuyo estudio ha derivado en la creación de distintas opciones terapéuticas. Los estudios con parásitos llevaron al descubrimiento de unas moléculas con una capacidad inmunorreguladora llamadas cistatinas. Su capacidad antiinflamatoria ha sido demostrada en distintos modelos de inflamación, incluidos los de AR, lo que las perfila a futuro como potenciales opciones terapéuticas. En el Instituto de Investigaciones Inmunológicas se ha identificado una molécula derivada de *Ascaris lumbricoides*, rAI-CPI (2), la cual ha demostrado tener actividad inmunomoduladora en modelos de colitis y asma experimental. Se encontró que la cistatina ejerce una actividad antiinflamatoria sobre macrófagos y células dendríticas. Sin embargo, se requiere saber si existen más subtipos de células inmunitarias implicadas en la inmunorregulación ejercida por la cistatina. Conociendo que la deficiencia o las alteraciones en la funcionalidad de los linfocitos B reguladores se encuentran involucradas en la fisiopatología de la AR, sumado al conocimiento de que existe una cistatina parasitaria la cual ha demostrado inducir linfocitos B reguladores, es importante explorar si rAI-CPI es capaz de ejercer una actividad inmunorreguladora en el contexto de inducción de linfocitos B reguladores. El objetivo de esta tesis de grado es evaluar la capacidad de inducción de IL-10 por parte de rAI-CPI en linfocitos B de donadores sanos y de pacientes con AR. Por ello, se extrajo sangre periférica de donadores sanos y se evaluó si el efecto de rAI-CPI era directo sobre los linfocitos B de los participantes del estudio. Por lo anterior, se establecieron dos escenarios experimentales en donde se añadió rAI-CPI a células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y a linfocitos B purificados magnéticamente provenientes de las PBMCs de donadores sanos. En ambos escenarios se evaluó la producción de IL-10, y se evaluó la expresión de marcadores reguladores en linfocitos B provenientes de las PBMCs de estos donadores. Una vez observada la producción de IL-10 en los donadores sanos, se procedió a evaluar la producción de esta citoquina en linfocitos B de pacientes con AR. Se comparó la producción de IL-10 en linfocitos B purificados provenientes de pacientes

con AR y controles pareados. De esta forma se evaluó la capacidad de rAI-CPI para inducir la producción de IL-10 y poblaciones de linfocitos B reguladores.

3. MARCO CONCEPTUAL

3.1 Artritis reumatoide

La AR es una enfermedad crónica, autoinmunitaria, inflamatoria sistémica, cuya aparición y desarrollo están influenciados por factores genéticos, epigenéticos y ambientales (3). Esta enfermedad autoinmune la cual se encuentra fuertemente asociada a discapacidad funcional, empeoramiento de la calidad de vida y alto costo en su manejo (4–6). Distintos elementos celulares y componentes solubles del sistema inmunitario innato y adaptativo son responsables de la inflamación y la remodelación tisular que experimentan diversas zonas dianas durante el progreso de la enfermedad, participando todo tipo de células inmunitarias innatas y adaptativas como los macrófagos, linfocitos B, linfocitos T; así como células no inmunitarias como los condrocitos, osteoclastos y células sinoviales (7,8). Dentro de las zonas más afectas, resaltan los componentes articulares los cuales se tornan dolorosos, edematosos, e hinchados como consecuencia de una pérdida en la tolerancia inmunitaria hacia antígenos propios, un evento que conlleva a la inflamación de las membranas sinoviales articulares, destrucción cartilaginosa y de estructuras óseas adyacentes (9). Con la identificación de marcadores séricos como el factor reumatoideo y los anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados (*ACPA*) se ha logrado predecir la severidad de la AR antes de su instauración clínica. Se sabe que la intervención médica temprana evita la progresión de la enfermedad hacia unos fenotipos caracterizados por mermar la funcionalidad de los pacientes por los cambios estructurales irreversibles que experimentan y que eran indicadores de peso en los antiguos métodos de clasificación de la AR (10). Debido a la complejidad de la enfermedad, ha existido un desmedido esfuerzo por caracterizar o definir aquellas rutas moleculares implicadas en el desarrollo de la enfermedad. La respuesta diferencial que los pacientes han tenido frente a la medicación confirma la existencia de una variedad de fenotipos en las células inmunitarias involucradas en la fisiopatología de la AR reflejada en los distintos efectos clínicos al usar medicamentos con distintas dianas celulares (11).

Dentro de este grupo de células se hallan los linfocitos B, cuya actividad inusual se ha asociado con la manifestación de la enfermedad (1). Desde el punto de vista de la inmunomodulación, se ha encontrado una menor cantidad de células T reguladoras en pacientes con AR comparados con controles (12,13). Paralelamente, cuando se habla de la faceta reguladora de los linfocitos B (Bregs), se ha descrito una actividad defectuosa y un número reducido de los mismos en pacientes con AR comparados con controles (14,15).

3.2 Células B reguladoras

El auge del estudio de los linfocitos B reguladores fue motivado por el descubrimiento de que ratones de experimentación deficientes para células B eran incapaces de recuperarse de una encefalitis autoinmune experimental (EAE) (16). Hallazgos posteriores evidenciaron un papel regulador por parte de los linfocitos B sobre distintas enfermedades con componente inflamatorio como la colitis (17), la EAE (18) y la artritis (19), al secretar IL-10, una citoquina antiinflamatoria. Por lo anterior, se motivó al estudio exhaustivo de esta novedosa clase de linfocitos B con características inmunorreguladoras, los cuales recibieron la denominación de “linfocitos B reguladores” o *Bregs* (20). Los resultados de estas investigaciones fueron claves para el entendimiento de funcionalidades adicionales no conocidas hasta ese entonces y que iban más allá de su clásica respuesta humoral. Las Bregs fueron encontradas responsables de inhibir las respuestas inmunitarias de perfil Th1, Th2 y Th17; y de desviar la diferenciación de linfocitos T hacia un perfil inmunorregulador (21,22). Se encontró que las Bregs eran capaces de mantener a una reserva de células T reguladoras conocidas como Tregs, induciendo en estas la expresión del factor de transcripción maestro Foxp3 (23,24). Estudios adicionales hallaron a las Bregs como capaces de interactuar con las células dendríticas y suprimir en ellas la secreción de citoquinas proinflamatorias, impidiendo indirectamente la diferenciación de linfocitos T hacia el perfil Th1 y Th17 (25). En la actualidad se ha descrito el papel inmunorregulador de las Bregs en un sinnúmero de condiciones como las enfermedades autoinmunes (26), las alergias (27), los tumores (28), los trasplantes (29) y las infecciones (30).

Uno de los desafíos que ha surgido desde el descubrimiento de las Bregs ha sido el tema de su caracterización y clasificación. Se sabe que los linfocitos B reguladores identificados hasta el momento pueden hacer parte de cualquier subtipo de células B conocidas: B1; B2; o de tipo plasmocitos, los cuales están conformados por los plasmablastos y las células plasmáticas (31–34). Sin embargo, no existe un consenso en cuanto a la identificación de factores de transcripción propios que definan a este tipo de células; situación diferente a las Tregs, cuyo factor de transcripción regulador maestro es Foxp3 (35). Si bien es cierto que la expresión de IL-10 ha sido útil para la caracterización de algunos linajes de células B con funciones inmunorreguladoras, existen otros marcadores de superficie que han sido identificados en ellas, pero que son regulados al alta, o a la baja, en función del grado de diferenciación y activación de la célula. Por lo anterior, existe una disyuntiva en cuanto a si la expresión de estos marcadores de superficie que hacen a las Bregs una población heterogénea obedece a la influencia de un ambiente celular particular que induzca a la expresión de los mismos; o si son marcadores expresados como consecuencia de la activación de factores de transcripción maestros aún no identificados. La gran variedad de factores externos que determinan el destino de una célula B hacia una con un fenotipo regulador resaltan la complejidad del proceso en el cual intervienen elementos de la inmunidad innata y adaptativa como la señalización mediada por TLR (36,37), BCR (18), e interacción con receptores de citoquinas (38–42). Por ello, se ha optado por una forma de clasificación de las Bregs en función de las citoquinas antiinflamatorias secretadas: IL-10, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) e IL-35 (43). En la Tabla 1 se muestran los distintos subtipos de Bregs caracterizados en modelos experimentales de enfermedades autoinmunes, un campo en donde este tipo de células han destacado por su demostrada actividad de inmunorregulación en un escenario altamente inflamatorio.

Tabla 1 Subtipos de linfocitos B reguladores identificados en modelos de enfermedad autoinmune

Citoquina efectora	Fenotipo	Tipo de Bregs	Especie	Referencia
IL-10	CD1d ^{hi} CD5 ⁺ (B10)	B2	Ratón	(44,45)
			Humano	(46)
	BCR activados	B2	Ratón	(47)
	CD21 ^{hi} CD23 ⁺ IgM ^{hi} (T2-MZP)	B2	Ratón	(48)
	TIM-1 ⁺	B2	Ratón	(49)
	GIFT15 B	B2/plasmocitos	Ratón	(50)
	CD44 ^{hi} CD138 ⁺	Plasmocitos	Ratón	(51)
	CD24 ^{hi} CD27 ⁺	?	Humano	(52)
	CD24 ^{hi} CD38 ^{hi}	?	Humano	(53,54)
	CD154 ⁺	?	Humano	(55)
TGF-β	Activado por LPS	?	Ratón	(56)
	CD25 ^{hi} CD27 ^{hi} CD86 ^{hi} CD1d ^{hi}	?	Humano	(57)
IL-35	CD138 ^{hi}	Plasmocito	Ratón	(58)

Abreviaturas: TGF-β: factor de crecimiento transformante β. Tabla tomada y modificada de Baba *et al.* (43)

3.3 Inmunomodulación inducida por helmintos

La inmunorregulación ocasionada por los helmintos ahora es entendida como un complejo mecanismo de supervivencia parasitaria que se ha gestado como producto de una relación hospedador-parásito durante millones de años (59). Esta regulación del sistema inmunitario se produce a distintos niveles, y se establecería en función de la carga parasitaria y la susceptibilidad genética del hospedador. Por lo general, la

inmunorregulación ocurre cuando la carga parasitaria es alta y crónica; en cambio, cuando es ligera, suelen presentarse manifestaciones patológicas como reacción a la infección (60,61). Al principio, el tema de la inmunorregulación derivada de la infección por helmintos fue evidenciada por el establecimiento de un balance positivo de citoquinas antiinflamatorias sobre las inflamatorias en el organismo hospedador; sin embargo, no se encontraba del todo esclarecido el mecanismo molecular por medio del cual el parásito ejercía esta influencia. Los estudios de las infecciones por filarias (62,63) evidenciaron que aquellos individuos asintomáticos-infectados tenían mayores niveles séricos de IL-10 (64); mientras que los sintomáticos-infectados tenían un menor número de células T reguladoras y unos perfiles Th1/Th17 con una respuesta exacerbada (65). La cuantiosa evidencia surgida a partir del tema de la inmunorregulación otorgada al hospedero de las infecciones helmínticas señala que el parásito actúa sobre distintas dianas celulares hasta tal punto de subvertir al sistema inmunológico en su ramas innata y adaptativa (66). Además, los crecientes hallazgos señalaron al helminto como capaz de influenciar la prevalencia del individuo hacia distintas enfermedades con un importante componente inflamatorio: las alergias (67) y las enfermedades autoinmunes (68). Hasta este punto se reconoce la presencia de moléculas excretadas por los helmintos, y que actualmente se denominan como productos de excreción-secreción parasitarios los cuales les han sido identificadas capacidades inmunorreguladoras. Estas partículas secretadas actúan como actores fisiológicos en la interfase helminto-hospedador, y pueden ser tan variadas al abarcar proteínas, lípidos, carbohidratos (69), y vesículas extracelulares cargadas con micro RNAs (miRNA) (70,71). Si bien estas moléculas *in vivo* tendrían un papel digestivo al emanar del intestino y del útero parasitarios, adquirirían otras funciones fuera del soma helmíntico. Dentro del grupo de las proteínas excretadas se pueden encontrar las proteasas, los inhibidores de proteasas, los homólogos a alérgenos de veneno, las enzimas glicolíticas y las enzimas, las cuales pueden variar de una especie a otra, y las cuales han sido resumidas en revisiones narrativas de la literatura científica (69). Compete especificar en este apartado que, de los productos de excreción parasitarias, los inhibidores de las proteasas helmínticas, también llamadas cistatinas, son el énfasis de una parte de la revisión realizada para este proyecto debido a que la cistatina de *A. Lumbricoides*, Al-CPI, será usada en los experimentos planteados en la metodología. Por

lo anterior, en un apartado posterior se profundizará acerca de las generalidades de las células T reguladoras y lo descrito de ellas en el apartado de la inmunorregulación.

3.4 Células B reguladoras inducidas por helmintos

En distintos modelos de infección se ha revelado una capacidad de los helmintos para expandir poblaciones de linfocitos B con características reguladoras. Smit *et al.* describieron una reducción en la inflamación de la vía aérea en ratones sensibilizados a OVA como consecuencia de la transferencia adoptiva de linfocitos B CD19⁺ de bazo de ratones infectados crónicamente con *S. mansoni*. Este efecto antiinflamatorio fue mediado por la IL-10 (72). Por otro lado, se registró una reducción de la inflamación eosinofílica de la vía aérea y de los niveles de IL-5 en el lavado broncoalveolar de ratones sensibilizados a OVA cuando fueron transferidos con linfocitos B CD19⁺CD23^{hi} provenientes de los nódulos mesentéricos linfáticos (NML) de ratones infectados por *H. polygyrus*. Los autores demostraron que la transferencia de estas células B hacia ratones a los cuales les fue inducido EAE también provocó efectos antiinflamatorios (73). Otros autores registraron una inhibición de la inflamación de la vía aérea inducida por OVA en ratones transferidos con linfocitos B CD19⁺CD1d^{high} provenientes de ratones infectados con *S. Mansoni* y sensibilizados a OVA. Se reconoció la capacidad de estas células B para suprimir la respuesta alérgica de la vía aérea al inducir la presencia de Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ en el infiltrado pulmonar secundario al reto alérgico. De forma sorprendente, estas Bregs lograron revertir la inflamación alérgica ya establecida en la vía aérea de ratones sensibilizados a OVA. Además, se encontró un mantenimiento de la actividad regulatoria en aquellas células B generadas de forma *ex vivo* (74). Por otro lado, unas Bregs productoras de IL-10, las cuales fueron obtenidas de ratones infectados por *S. Mansoni*, demostraron tener un papel protector en modelos de anafilaxia letal sistémica. Sin embargo, este efecto sólo se alcanzó cuando se hacía uso de células B deficientes para IL-4, debido a que las que lo producían exacerbaban la respuesta inflamatoria sistémica letal (75). En otro lugar se describió la presencia de células B CD19⁺ derivadas de la sangre periférica de pacientes con diagnóstico de esclerosis múltiple (EM) con una producción de IL-10 y expresión de CD1d significativamente más altas en aquellos infectados con helmintos (*Hymenolepis nana*, *Trichuris trichiura*, *Ascaris*

Lumbricoides, *Strongyloides stercoralis*, *Enterobius vermicularis*) comparados con los infectados con *Trypanosoma cruzi*, *Paracoccidioides brasiliensis*, o sin infección (76). Curiosamente los mismos autores habían descrito con anterioridad una cantidad significativamente más baja de recaídas, y una menor actividad de la EM en los infectados con helmintos cuando se compararon con los no infectados. La infección helmíntica se asoció a una mayor inducción de Tregs (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺), así como con una mayor excreción de IL-10 y TGF-β (77).

3.5 Generalidades de las cistatinas

Las cistatinas son una familia de inhibidores reversibles, de unión fuerte, de proteasas de cisteína altamente conservadas en la naturaleza. Inhiben a la mayoría de las cisteínas endopeptidasas del tipo papaína y a otras peptidasas que tienen un grupo sulfhídrido en su sitio activo (78). Las cistatinas se localizan principalmente en los endosomas y lisosomas, sin embargo, también pueden hallarse en el núcleo, el citosol, la membrana celular o secretadas por varios tipos de células (79,80). Las proteasas de cisteínas que inhiben consisten en pequeñas proteínas con una masa molecular entre los 23 a 24 kDa. Se caracterizan por tener unos residuos catalíticos responsables de reacciones hidrolíticas sobre distintos polipéptidos, teniendo una actividad incrementada cuando el medio en donde se encuentran es ácido (pH: 5 - 6.5) (81). Estas proteasas de cisteína no solamente se caracterizan por la amplia variedad de organismos en donde se sintetizan, y que abarcan desde bacterias, plantas, animales y humanos; sino que también se encuentran involucradas en una amplia gama de procesos biológicos y patológicos como el catabolismo de proteínas, regeneración de heridas, remodelación de hueso, osteogénesis y resorción ósea, cáncer entre muchas otras funciones (82). Cuando se encontró que las proteasas de cisteínas eran producidas por algunas bacterias como *Clostridium histolyticum* y *Porphyromonas gingivalis*, se les asoció una función digestiva y de infectividad debido a la capacidad de otorgar a la bacteria la capacidad de penetrar los tejidos sanos del hospedero (83,84). En los picornavirus, por ejemplo, las proteasas de cisteínas son fundamentales para la replicación vírica debido a que escinden, de forma proteolítica, a precursores de proteínas necesarios para el ensamblaje de nuevas partículas de virus (85). En los mamíferos se han encontrado

presentes en los lisosomas celulares inhibiendo a varios tipos de catepsinas (B, H, L y S) responsables de procesos inmunitarios como la presentación antigénica (86). En los parásitos favorecen la invasión, la metabolización de proteínas y la degradación de moléculas que hacen parte de la respuesta inmune del hospedero (87).

3.5.1 Superfamilia de cistatinas

Con base a la secuencia de aminoácidos que poseen las proteínas con actividad inhibitoria de cisteínas proteasas son asignadas en una de las tres familias mayores de cistatinas (88).

Familia 1 (estefinas).

Estas cistatinas se caracterizan por carecer de enlaces disulfuros o cadenas de carbohidratos en comparación con las de otras familias. Poseen secuencias estrechamente relacionadas y carecen de secuencia señalizadora. Las cistatinas de este grupo son producidas intracelularmente, y se ha descrito su presencia en órganos humanos como el hígado, bazo, placenta, mucosa oral y útero. Se conforman aproximadamente de 100 residuos de aminoácidos con una masa molecular aproximada de 11 kDa (81,88). No es única su presencia en humanos, también se ha descrito su presencia en otros mamíferos (89). Las cistatinas de esta familia han recibido el nombre de estefinas, dentro de las que se encuentran la estefina humana A y B, de las cuales se ha descrito estar presentes en varios tejidos (90) y tienen entre sí una amplia identidad de secuencia. Estas han sido halladas en centros germinales de órganos linfoides secundarios y en células dendríticas foliculares (91).

Familia 2.

Llamadas también como “familia de cistatinas”, se caracterizan por tener dos bucles de disulfuro cerca del extremo carboxilo. Estas cistatinas son excretadas al medio extracelular y algunas de ellas se encuentran glicosiladas. Este grupo de cistatinas están

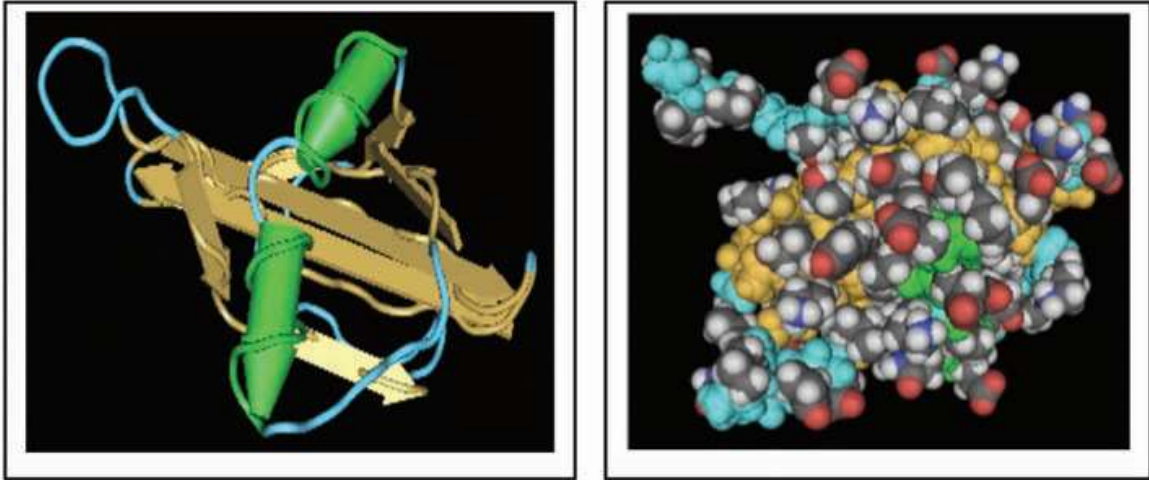
conformadas por 115 a 120 residuos de aminoácidos y tienen una masa molecular de 13 a 14 kDa (81). Los genes que codifican para estas cistatinas están agrupadas en un segmento de 1.2 Mb en el cromosoma 20 (92). Las cistatinas humanas dentro de grupo son la C, D, S, SA, N, E y M. (81,93,94). Algunas cistatinas de nemátodos se encuentran incluidas en este grupo y han mostrado capacidad para inhibir a las catepsinas B, L y S (95). Las cistatinas de los nemátodos se encuentran involucradas en la regulación de la respuesta inmune a nivel de procesamiento antigénico y presentación de antígeno-células presentadora de antígeno (CPA), así como con la regulación a la baja de la respuesta inmune de linfocitos T del hospedero que infectan (96).

Familia 3.

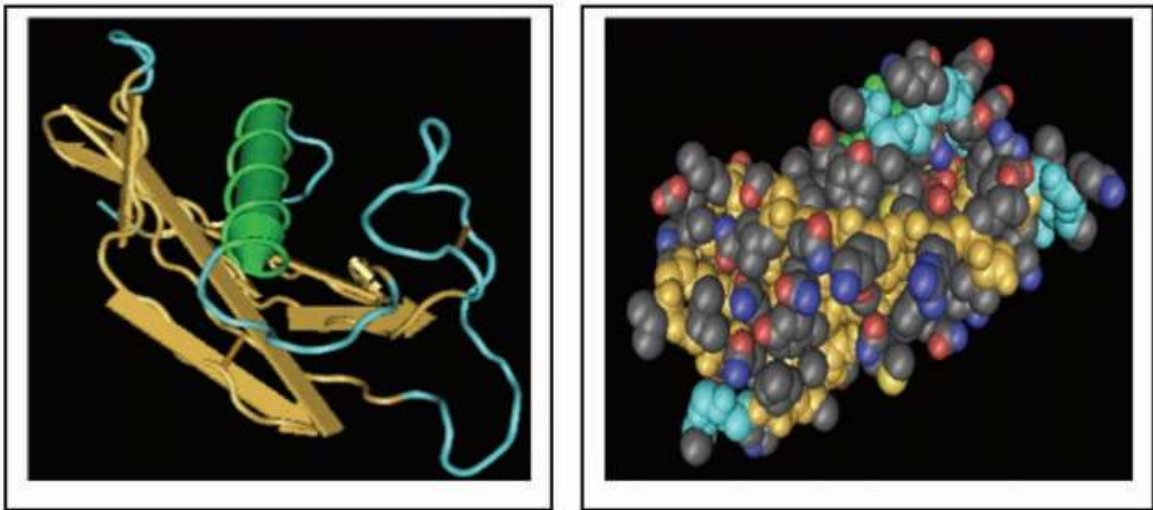
Los kininógenos son proteínas multifuncionales intravasculares que contienen tres dominios de cistatina tipo 2 (81). El gen de kinógeno ha sido localizado en el brazo largo del cromosoma 3, específicamente en 3q26-qter (97). Los primeros kininógenos de alto y bajo peso molecular fueron conocidos en sus comienzos como precursores biosintéticos de quininas vasoactivas, como la bradiquinina y calicidina, afectando directamente la cascada de coagulación sanguínea y la regulación de la presión arterial (98). Los kininógenos, junto con la α 2-macroglobulina, son los mayores inhibidores de proteinasas de cisteína en el plasma sanguíneo. En los seres humanos, el H-kininógeno y el L-kininógeno son glicoproteínas de cadena sencilla, compuestas por una cadena pesada N-terminal, el segmento de quinina y una cadena ligera C-terminal. La cadena pesada y la cadena ligera están interconectadas por puentes disulfuro (99,100).

3.5.2 Estructura de las cistatinas

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las cistatinas que pertenecen a la primera familia, es decir las estefinas, muestra una alta identidad de secuencias (>50%) (**Figura 1**). Estudios de cristalografía y mutagénesis definen tres motivos conservados responsables de la actividad inhibitoria que ejercen sobre las proteasas de cisteína C1. El primero es una glicina N-terminal (101), el segundo es un bucle de glutamina-valina-



Cistatina A (Familia 1 de cistatina)



Cistatina D (Familia 2 de cistatina)

Figura 2. Modelo de cintas y espacio de las cistatina A y D. Cada estructura de cistatina tiene un núcleo de láminas β antiparalelas de cinco hebras envueltas alrededor de un núcleo de una hélice central. Tomado de *Ochieng et al.* (103).

3.5.3 Mecanismo de acción de la cistatina

El modelo general de la inhibición de cisteína proteasas por las cistatinas recibe la denominación de *modelo de cuña*. El extremo N-terminal y el primer y segundo bucle de

la cistatina se fijan como una cuña altamente complementaria a la hendidura del sitio activo de la papaína lo que impide la unión de la última con su sustrato. No hay reordenamiento conformacional de ninguna de las dos moléculas, la interacción es predominantemente hidrófoba. En el modelo de interacción de la cistatina y la papaína ilustrado en la (Figura 3), los dos primeros bucles de la cistatina interactúan con los residuos que recubren la parte más ancha de la hendidura del sitio activo de la papaína, pero de manera relativamente alejada del sitio catalítico Cys25 (90).

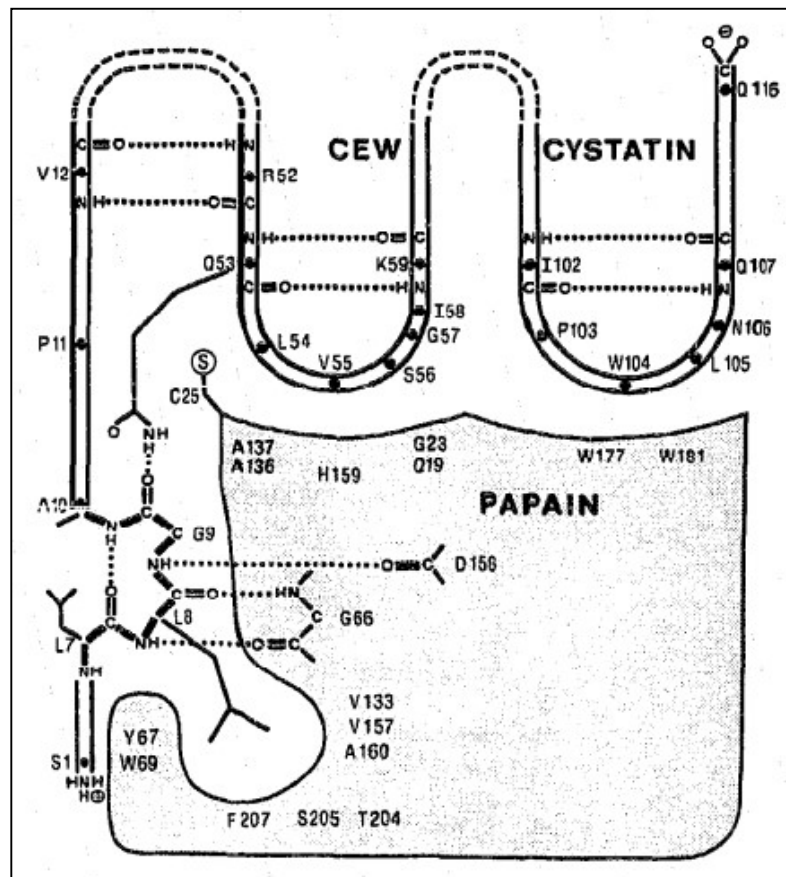


Figura 3. Esquema del “modelo truncado” propuesto para la interacción de la cistatina de la clara de huevo y la papaína. Tomado de Turk et al. (90).

3.5.4 Efectos biológicos de las cistatinas

Las cistatinas parasitarias han demostrado inhibir *in vitro* las proteasas de cisteína endosomales y la actividad enzimática de la papaína. Lo anterior podría afectar la

presentación antigénica de las células inmunitarias (104). Los experimentos con las cistatinas de *Ascaris Lumbricoides*, *Onchocerca volvulus* y *Helogmosomoides polygyrus* sugieren la factibilidad de lo anterior al verse disminuidas la expresión de las moléculas coestimuladoras HLA-DR, CD-40 y CD-86 en la superficie de las células expuestas al producto parasitario (105–107). Sin embargo, el mecanismo molecular por medio del cual la cistatina realiza este efecto no se encuentra establecido.

Otra función biológica de las cistatinas parasitarias es su capacidad para estimular la producción de IL-10, una citoquina antiinflamatoria. Se ha visto este efecto sobre macrófagos y monocitos humanos. Las distintas rutas biológicas implicadas en la producción de IL-10 (la vía dependiente de p38, la vía dependiente de ERK) secundaria a la estimulación por parte de la cistatina demuestran su influencia en el sistema inmunitario (108). Existe una variedad de estudios que apuntan a la capacidad de las cistatinas de distintos parásitos para producir óxido nítrico, una molécula con posturas controversiales en el apartado de la inflamación.

La cistatina de *Áscaris lumbricoides* ha demostrado ejercer estos efectos biológicos de acuerdo a los estudios realizados por *Coronado et al.*, y en los cuales se profundizará más adelante (105,109).

3.5.5 Cistatinas identificadas en helmintos

En los estudios realizados con las cistatinas de helmintos se han identificado distintos efectos biológicos que estas moléculas ejercen a nivel celular y humoral, en un contexto de inmunomodulación. Los resultados de experimentos realizados en distintos modelos animales apuntan a que estas proteínas tienen la capacidad de interferir con el procesamiento antigénico de algunas células, así como la capacidad de inducir la producción de IL-10, óxido nítrico y disminuir la expresión de moléculas coestimuladoras.

Cuando se estudió a Bm-CPI-2, una cistatina homóloga a la producida por *Brugia malayi*, un nemátodo parasitario, se evidenció su capacidad para inhibir la acción hidrolítica sobre los substratos utilizados por las cisteínas proteasas propias de endosomas y lisosomas de líneas celulares de linfocitos B humanos. CPI-2 inhibió en las APC la presentación

antigénica de epítopes específicos para linfocitos T, lo que resalta su papel inmunomodulador (95). Por otro lado, el estudio de la nipocistatina (rNbCys) de *Nippostrongylus brasiliensis* permitió evidenciar una capacidad de la última para provocar una restricción en la proliferación de linfocitos T de ratones. El antígeno utilizado en este caso fue la ovoalbúmina, y sólo aquellos linfocitos T de ratones previamente sensibilizados a OVA, pero tratados con la cistatina, tuvieron una proliferación marcadamente disminuida. Lo anterior no sucedió en las líneas linfocitarias sin especificidad hacia la ovoalbúmina. Por otro lado, en el apartado humoral, no se encontraron alteraciones en los niveles séricos de IgG1 e IgG2 de ambos grupos; pero sí en los de IgE, los cuales estaban disminuidos en el grupo expuesto a la nipocistatina. Los autores concluyeron que los efectos alcanzados y derivados de la cistatina estribaban en su capacidad para interferir con el procesamiento antigénico (110). Otros hallazgos se aunaron a la literatura científica cuando la onchocistatina (rOv17) sintetizada por *O. volvulus* demostró suprimir la proliferación inducida por antígeno de PBMCs humanas. Se halló que era capaz de inducir la producción IL-10 de una forma independiente a la estimulación antigénica. Además, el acompañado descenso en la expresión de proteínas de HLA-DR y CD86 en el grupo de células expuestas a onchocistatina, una condición que fue reversible mediante el uso de anticuerpos anti-IL10, demostró su papel para provocar un estado de hiporrespuesta inmunitaria al interferir con el procesamiento antigénico. Se sabe que la onchocistatina es inhibidora de las serinas proteasas catepsinas L y S. Además, con los experimentos anteriores, se llegó a descubrir que la misma tiene como diana principal los monocitos, puesto que su depleción no estuvo acompañada de hiporreactividad celular (106). Esta hiporreactividad celular también fue encontrada en experimentos con otras cistatinas provenientes de *Heligmosomoides polygyrus* y *Ascaris Lumbricoides*, las cuales demostraron reducir la expresión sobre la superficie de HLA-DR, CD40 y CD86 con paralela inducción de IL-10 e IL-6 en monocitos (105,107). Recientemente, se encontró que TsCstN, una nueva cistatina caracterizada proveniente de *Trichinella spiralis*, fue capaz de suprimir la producción de interleucinas proinflamatorias y la expresión de MHCII en macrófagos derivados de la médula ósea (111).

3.5.6 Efecto de las cistatinas en las células B reguladoras

Hasta el momento sólo existe un estudio que ha descrito la inducción de células B reguladoras en ratones tratados con rBmaCys, una cistatina recombinante derivada del nemátodo *Brugia malayi*. Los resultados revelaron un aumento significativo en el número de Tregs IL10⁺ y de células B IgM⁺B1 en la cavidad peritoneal de ratones tratados con la molécula comparados con controles. También, se registró una menor expresión de los factores de transcripción TBX21/T-bet, y de TNF- α e IL-6 en el tejido colónico del grupo tratado, hallazgos que sugieren un efecto antiinflamatorio provocado por la cistatina (112). Los autores no establecen el mecanismo de acción por medio del cual ocurriría este resultado. Lo descrito en la literatura respecto a estas células B IgM⁺ es que su frecuencia se ha encontrado reducida en ratones con síntomas de colitis inducida de forma experimental (113). Como dato interesante, en humanos, estas son más abundantes en pacientes con enfermedad de Crohn en remisión comparados con los que tienen síntomas (114). Por otro lado, teniendo en cuenta la inducción de Tregs por parte de las Bregs, en el infiltrado inflamatorio pulmonar desencadenado por el reto alérgico descrito por Amu *et al.* (74), sería interesante establecer el si existe alguna relación similar entre las Bregs y Tregs inducidas por las cistatinas helmínticas.

3.5.7 Efecto de las cistatinas en modelos de artritis reumatoide

La administración de la cistatina de *B. malayi*, ha demostrado ejercer una actividad inmunorreguladora en modelos de AR inducida por albúmina sérica bovina metilada (mBSA). Según los hallazgos experimentales obtenidos por Yadav *et al.*, esta cistatina es capaz de reducir indicadores de inflamación, como aquellos utilizados para medir la inflamación en las patas de los ratones, lo que incluye hinchazón e infiltrado de células inflamatorias, en muestras histológicas, los cuales se encontraron significativamente reducidos comparados con el grupo control. Los niveles de IL-10 fueron significativamente mayores en los ratones tratados con la cistatina recombinante, y la IL-4 estuvo significativamente reducida en el mismo grupo comparados con los no tratados con la cistatina recombinante. A nivel humoral, se encontró que aquellos ratones tratados

con la cistatina recombinante tenían unos niveles de IgG1 significativamente mayores, y de IgG2_a, IgG2_b, IgG3 específicos para albúmina de suero bovino metilado (mBSA) significativamente reducidos, algo interpretado como una reducción en la inflamación por acción de la cistatina (115). Por otro lado, las muestras biológicas de ratones tratados profilácticamente con la cistatina recombinante de *S. japonicum* y a los cuales se les indujo artritis mediante el uso de colágeno tipo 2 bovino, mostraron una regulación al alza de células T reguladoras, y una respuesta inmunitaria volcada hacia el perfil Th2 (IL-4), con una disminución de la respuesta inmunitaria de perfil Th1 y Th17. En este estudio se encontró que la cistatina es capaz de inducir selectivamente la producción de anticuerpos al evidenciarse unos niveles significativamente más altos de IgG₁ específica para colágeno tipo 2 bovino, y significativamente más bajos de IgG₂ específicas para el mismo colágeno, en el grupo de ratones tratados profilácticamente con la cistatina, comparados con controles (116).

3.5.8 Cistatina de *Ascaris lumbricoides*

Se ha demostrado que rAI-CPI tiene propiedades inmunomoduladoras. Coronado *et al.* hallaron que en un modelo de colitis experimental los ratones tratados con rAI-CPI presentaron una reducción significativa del índice de actividad de la enfermedad (DAI), el puntaje de inflamación histológica y de la actividad de la mieloperoxidasa comparados con controles. También se encontró una expresión significativamente reducida de IL-6 y TNF-A, así como de los niveles de estas citoquinas en el tejido colónico. También hubo una sobreexpresión de IL-10 y del gen de TGF-B. Aunque la administración de rAI-CPI indujo la expresión iNOS, una enzima asociada con procesos proinflamatorios y la cual es diana terapéutica en modelos de enfermedad intestinal inflamatoria, su papel en el desarrollo de la colitis es controversial. En este estudio, la inducción de esta enzima no se encontró asociada con exacerbación de síntomas de colitis (109). Los mismos autores, tiempo después, experimentaron con un modelo de inflamación de la vía aérea. Se encontró que los ratones tratados con rAI-CPI previo a la sensibilización alérgica con *Blomia Tropicalis* tenían una respuesta inflamatoria significativamente reducida del infiltrado inflamatorio perivascular/peribronquial, en el número de eosinófilos, neutrófilos y células caliciformes, en los niveles de citoquinas Th2 del lavado bronquioalveolar (IL-5,

13, 10) y sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos re-estimulados *in vitro* con rAI-CPI (IL-4, 5, 13, IFN- γ , IL-10, LAP-TGF β), en los niveles de anticuerpos IgE totales y específicos al alérgeno y en el número de células caliciformes comparados con controles. También se asoció un incremento significativo en el número de células T reguladoras en bazo, y en los niveles de IL-10 del lavado bronquioalveolar y de los sobrenadantes de cultivos de esplenocitos de ratones solamente tratados con rAI-CPI y los tratados previa sensibilización alérgica. Estos niveles de IL-10 no cambiaron significativamente cuando se usaron anticuerpos contra el receptor de IL-10. Además, cuando se estudió el efecto de la cistatina recombinante en células dendríticas humanas derivadas de monocitos se encontró que las últimas tenían una tendencia hacia una menor expresión de moléculas coestimuladoras CD86 y CD83 comparadas con controles (105). Posteriormente, en un estudio no publicado se encontró que cuando se adicionaba rAI-CPI a células dendríticas derivadas de monocitos coestimulados con LPS había unos niveles significativamente reducidos de HLA-DR, CD86 y PD-L1 comparados con las células estimuladas únicamente con LPS. Bajo las mismas condiciones, se encontró que la producción de citoquinas IL-10, TNF, IL-6 e IL-8 era significativamente menor en el primer grupo. En cuanto a monocitos de sangre periférica, se halló una disminución significativa en la fluorescencia media de HLA-DR, CD-86 y PD-L1 en aquellos expuestos a rAI-CPI y LPS comparados con los expuestos únicamente a LPS. rAI-CPI también redujo significativamente la proliferación de linfocitos T CD3⁺CD4⁺ estimulados con CD2/3/28 comparados con aquellos a los que no se les adicionó la cistatina. La coestimulación de PBMCs de pacientes alérgicos a *Blomia Tropicalis* con rAI-CPI y extracto de *B. tropicalis* redujo significativamente los niveles de IL-10 e IL-5 comparados con los niveles de aquellos estimulados únicamente con extracto de *B. tropicalis*.

4. HIPÓTESIS

La cistatina de *Ascaris lumbricoides*, AI-CPI, induce el desarrollo de células B reguladoras.

5. OBJETIVOS

5.2.1 General

Evaluar la capacidad de rAI-CPI para inducir la producción de IL-10 en linfocitos B de donadores sanos y de pacientes con artritis reumatoide.

5.2.2 Específicos

1. Evaluar si rAI-CPI induce la producción de IL-10 en cultivos de células mononucleares de sangre periférica de donadores sanos.
2. Evaluar la producción de IL-10 y la expresión de marcadores asociados a Bregs inducida por rAI-CPI en linfocitos B purificados de muestras de donadores sanos.
3. Comparar la producción de IL-10 inducida por rAI-CPI en los linfocitos B de pacientes con artritis reumatoide y controles sanos pareados por edad y sexo.

6. METODOLOGÍA

6.1. Diseño general del estudio

Corresponde a un estudio exploratorio en la que la unidad de análisis son los linfocitos B. Se comenzó con una fase de investigación en donde se determinó si rAI-CPI, un producto recombinante de *Ascaris lumbricoides*, es capaz de inducir la producción de IL-10 en PBMCs de donadores sanos. Posteriormente, con el fin de evaluar si rAI-CPI tiene una acción directa sobre linfocitos B, se purificó por selección magnética negativa esta población y se estimuló con este producto recombinante. Luego, se evaluó la producción de IL-10 por tinción intracelular y medición en sobrenadantes. De igual forma, se comparó la expresión de marcadores de Bregs en linfocitos B (CD71, CD73, CD25 e IL-10).

La segunda fase del estudio evaluó el efecto inmunomodulador de AI-CPI sobre un cultivo de linfocitos B de pacientes con diagnóstico de AR y controles. Se utilizó la misma metodología para recolectar las PBMCs y purificar los linfocitos B. Estos linfocitos B se

estimularon con AI-CPI para evaluar el potencial inmunomodulador del producto recombinante. Se midieron los niveles de IL-10 en sobrenadantes y se compararon los niveles de IL-10 entre los pacientes con AR y controles. En la **Figura 3.** se puede observar el diagrama de flujo del diseño general del estudio.

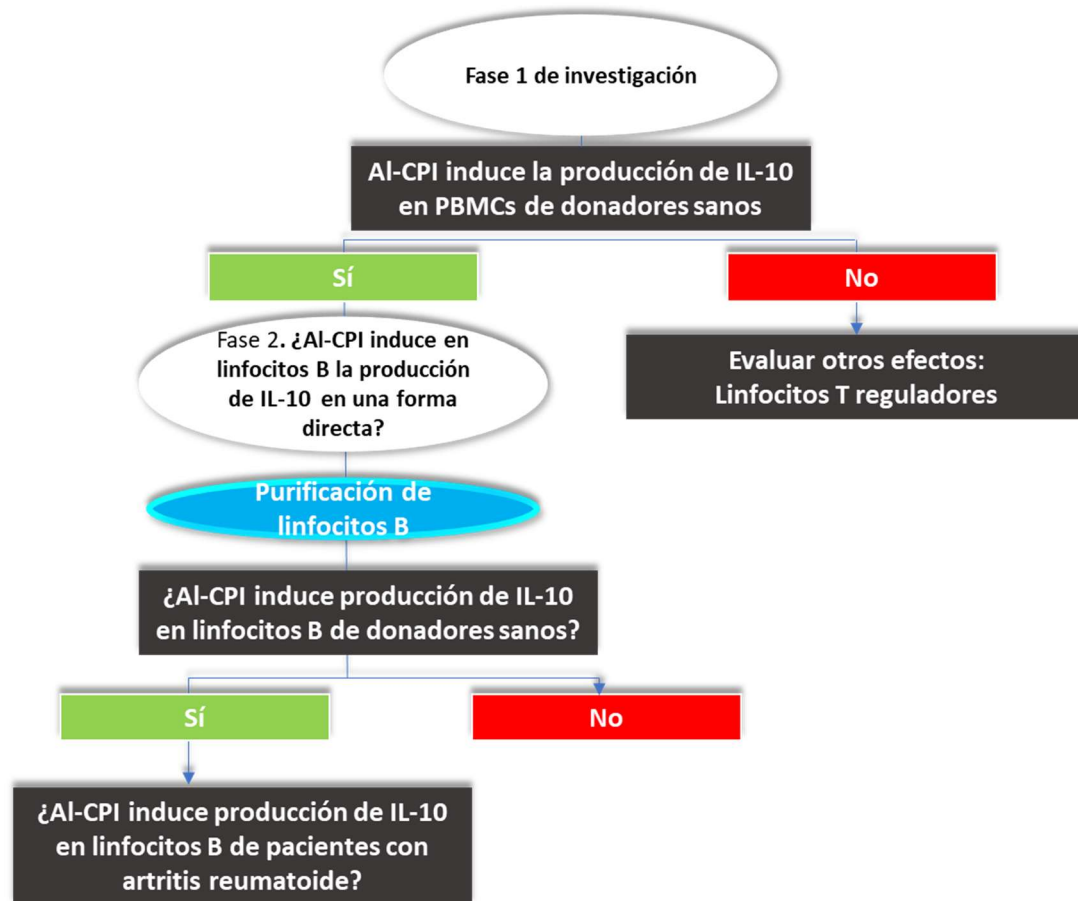


Figura 4. Diagrama de flujo del diseño general del estudio.

6.2 Criterios de selección

6.2.1. Fase 1: Criterios de selección de donador sano

Con el fin de explorar si rAI-CPI induce IL-10 en PBMCs se seleccionaron 11 individuos sanos con edad entre los 20 a 40 años sin diagnóstico de AR u otra enfermedad

autoinmunitaria, o de alergias, a los cuales se les realizó una historia clínica para descartar sospecha de estas enfermedades.

6.2.2. Fase 2: Criterios de selección de casos y controles

Los pacientes con diagnóstico de AR fueron seleccionados de una base de datos del Instituto de Investigaciones Inmunológicas compuesta por pacientes diagnosticados con AR (CIE 10: M05-M06) en un estudio previo llamado “Evaluación de un producto recombinante de *Ascaris lumbricoides* con capacidad inmunomoduladora en el tratamiento de artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico” IP: Josefina Zakzuk, Contrato: 699-2017. Los controles del estudio fueron personas con similitud en edad y sexo los cuales no tenían relación de parentesco con el paciente, pero vivieran (vecino) o en un estrato socioeconómico similar (pareados).

- 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 AR, mujeres embarazadas, pacientes con diagnóstico de otras poliartalgias inflamatorias, pacientes con otras enfermedades que causen artritis y pacientes que presenten complicaciones extra-articulares de la AR (vasculitis reumatoide, síndrome Felty, enfermedad pulmonar asociada y neoplasias, entre otras). Sujetos que hayan recibido tratamiento antihelmíntico en los últimos 6 meses.

6.2.2.1 Definición de caso

Individuos residentes en municipios del Departamento de Bolívar que fueron diagnosticados con AR en un estudio previo siguiendo los criterios de la guía de práctica clínica colombiana del Ministerio de la Salud, la cual se basa en los criterios establecidos por el ACR/EULAR 2010 para hacer el diagnóstico de la enfermedad.

6.2.2.3 Definición de control

Individuos sanos que no tuviesen diagnóstico de AR u otras enfermedades autoinmunes, ni alergias, a los cuales se les realizó una historia clínica para descartar sospecha de estas enfermedades.

6.3 Consentimiento informado

Para participar en el estudio se le informó a los participantes en qué consistía la investigación y se les solicitó la firma de un consentimiento informado (Anexo 1) que fue aprobado por el Comité de Ética en Investigaciones de la Universidad de Cartagena (Anexo 4).

6.4 Obtención de muestras biológicas

Para el cumplimiento de los objetivos específicos se solicitó la siguiente muestra biológica:

1. Cuatro tubos vacutainer de 10 mL con heparina para extracción de PBMCs gradiente de Ficoll y de plasma para medición de citoquinas e identificación de poblaciones celulares en los estudios inmunológicos celulares.

Nota: Las muestras de los casos y sus controles pareados se tomaban y se procesaban siempre el mismo día.

6.5 Tamaño de la muestra

El presente estudio corresponde a un análisis exploratorio y el tamaño de la muestra se ha definido por conveniencia. La primera fase de investigación sobre los efectos funcionales de rAI-CPI se realizaron en PBMCs provenientes de **11** donadores sanos. La comparación entre casos de AR y controles se hizo en **5** casos y **7** controles.

6.6 Metodología específica

6.6.1 Expresión y purificación de la cistatina recombinante AI-CPI

La proteína de estudio, rAI-CPI, se obtuvo de células transformadas de *Escherichia coli* cepa BL21 (DE3) con la secuencia codificante para la cistatina de estudio en el plásmido pET-15b. La proteína recombinante se obtuvo del Banco de Recombinantes del Grupo de Alergología Experimental e Inmunogenética de la Universidad de Cartagena “Silvia Jiménez Hernández”. Para su producción, las células se cultivaron en caldo Luria-Bertani modificado con ampicilina 100 µg/ml a 37°C y se utilizó como inductor de expresión isopropil- β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y se congeló a -20°C. Para el lisado se

realizó la sonicación de los cultivos una vez descongelados. Antes de realizar la purificación se dializó la proteína con Tris-HCL a una concentración de 20mM, pH:8.5, y se filtró con filtro de 0.2 μ m. La purificación de la proteína se realizó por medio de cromatografía de intercambio iónico (FPLC) haciendo uso del equipo BiologicDuoFlow. La proteína se purificó dos veces por este método para medir el grado de pureza. La endotoxina se removió utilizando el estuche de eliminación de endotoxinas ToxinEraser™ (GenScript, Estados Unidos) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este sistema se basó en una matriz de afinidad a la polimixina B modificada que permite la eliminación de las endotoxinas de una manera eficiente. En primer lugar, la columna se lavó con 5 mL de Buffer de regeneración contenido en el estuche a una velocidad de 0.25 mL/min. Este proceso se repitió 2 veces más. Luego, la columna se equilibró con 6 mL del “Equilibrium Buffer” (receta del fabricante) a una velocidad de 0.5 mL/min, esto se repitió 3 veces. Posteriormente, se colocó 5 mL de rAI-CPI en la columna y se ajustó la velocidad a 0.25 mL/min. La proteína recolectada se guardó a 4°C para la posterior medición de la endotoxina.

6.6.2 Aislamiento de PBMCs

Se extrajeron PBMCs para su posterior cultivo con la proteína recombinante. La extracción de PBMCs se realizó usando un método de separación Ficoll por gradiente de densidad. Se extrajo la 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 se centrifugaron por 20 minutos a 800 g con el fin de visualizar y extraer la capa de PBMCs. Las células se lavaron 2 veces con 25 mL de PBS/EDTA, y se resuspendieron en 2 mL de RPMI (Sigma Aldrich, Ref. 8758) completado con penicilina/estreptomicina, vitaminas y piruvato (5mL, 10 mL y 50 mL para 500 ml de RPMI, respectivamente). Finalmente, las células se contaron en el equipo automatizado Cell counter (TC20™ Automated Cell Counter. Ref. 1450102 BioRad) y se diluyeron en función del número de células por pozo a cultivar con AI-CPI.

6.6.3 Tinción con marcador de viabilidad FVD

Luego del aislamiento de las PBMCs, las células se sembraron en placas de 24 pozos (Corning ref. 3526) a una concentración (1×10^6 células/mL). Se añadió rAI-CPI 1 μ M, 0.1 μ M, 0.01 μ M y 0.001 μ M; y RPMI como control negativo. Las células se incubaron por 72 horas en CO₂ a 37°C. Después de recolectar las células, estas fueron lavadas con PBS y se centrifugaron a 300g por 7 minutos. Las células se tiñeron con el marcador eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (cat: 65-0865-14) diluido 1uL (FVD): 4000 μ L (PBS) y se añadieron los anticuerpos de superficie CD19 y CD3, correspondientes a linfocitos B y T, respectivamente. Las células se incubaron durante 20 minutos a 2-8 ° C protegidas de la luz. Se realizó un lavado con Stain Buffer (FBS) (BD Biosciences, Ref 554657) y se centrifugaron a 300g por 5 min a 4°C. 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).

6.6.4 Tinción con estuche de viabilidad Anexina-V – Yoduro de Propidio

Para la medición de la viabilidad de las PBMCs estimuladas con diferentes concentraciones de rAI-CPI, también se hizo uso del Kit *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* (Invitrogen, cat. BMS500FI). Después de 72 horas de incubación de PBMCs sembradas en placas de 24 pozos (Corning ref. 3526) a una concentración de 1×10^6 células/mL por pozo estimuladas con rAI-CPI 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M, 0,001 μ M y RPMI como control negativo, se recolectaron las células y se lavaron con 200 μ L de Stain Buffer (FBS) (BD, Biosciences, Ref 554657). Las PBMCs se centrifugaron a 300g por 5 min a 4°C y se resuspendieron en 100 uL de Binding Buffer (*Kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit*) para la posterior adición de 2.5 uL de *Annexin V- FITC*. La suspensión celular se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, para un posterior lavado con 100 uL de Binding Buffer. Después de centrifugar la suspensión celular a 300g por 7 min a 4°C, está se reconstituyó con 95 uL de Binding Buffer y se adicionó 5 uL de yoduro de propidio (*Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* (Invitrogen, cat. BMS500FI)). La lectura de las células se realizó usando el equipo FACS Aria III (BD Biosciences) y el análisis de los datos se realizó usando el software de análisis de citometría de flujo Kaluza (Beckman Coulter Inc).

Tabla 2. Estímulos y concentraciones utilizadas en cultivos celulares

Estímulo	Concentraciones
Control negativo	RPMI
rAI-CPI	1uM, 0,1 uM, 0,01 uM, 0,001 μM
CpG	0,5 μM

6.6.5 Cultivo y recolección de sobrenadantes de PBMCs de donadores sanos

Después del aislamiento de las PBMCs (aproximadamente 30 millones), las células se sembraron en placas de 24 pozos (Corning ref. 3526) a una concentración (1×10^6 células/mL). Se añadió rAI-CPI 0,1 μM, RPMI para el control negativo, y para el control positivo se utilizó CpG (ODN 2006, ref. 130-100-105. Miltenyi Tech (Stock 100uM)) a una concentración de 0,5 μM. Adicionalmente, se estableció otra condición con estimulación simultánea de rAI-CPI con CpG. Las células se incubaron por 72 horas en CO₂ a 37°C. Posteriormente, se recolectaron los sobrenadantes mediante centrifugación de la suspensión celular a 300g por 7 minutos y se almacenaron a -80°C hasta su análisis. El pellet de células fue procesado para su evaluación por citometría de flujo.

6.6.6 Tinción con anticuerpos monoclonales de superficie y citometría de flujo

Para explorar el comportamiento de marcadores asociados a Bregs, se utilizó un panel de marcadores de citometría de flujo previamente estandarizado en el Instituto de Investigaciones Inmunológicas (117). En general, se hicieron análisis de expresión de marcadores en 60.000 eventos identificados como linfocitos B (CD3- CD19+, eFluor viability dye-). El pellet celular recolectado de las muestras de donadores sanos fueron resuspendidas en PBS para posteriormente ser teñidas 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 veces 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 (**Anexo 3**). 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 utilizados.

6.6.7 Purificación magnética de linfocitos B

Para la purificación magnética de linfocitos B por selección negativa se utilizó el kit *B Cell Isolation Kit II*, human de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de aislar las PBMCs, estas se resuspendieron en 40 µL de MACS buffer por cada 10⁶ células y se añadió 10 µL de cóctel de anticuerpos biotinilados CD2, CD14, CD16, CD36, CD43 y CD235a (glicoforina A) por cada 10⁶ células. El cóctel de anticuerpos realiza un marcaje de las células no-linfocitos B (células T, células NK, monocitos, células dendríticas, granulocitos, plaquetas y células). La suspensión celular se incubó por 5 minutos en refrigeración (2-8°C). Posteriormente, se adicionaron 30 µL de microperlas anti-biotina por cada 10⁶ células. La suspensión anterior se incubó por 10 minutos en refrigeración (2-8°C). Las columnas LS se dispusieron en los campos magnéticos del separador y se lavaron con 3 mL de Binding Buffer. La suspensión celular se vertió sobre la columna LS dispuesta en el campo magnético del separador MidiMACS con recolección del flujo continuo el cual está conformada por los linfocitos B recientemente separados. Las columnas se enjuagaron con MACS buffer para recolectar la mayor cantidad de linfocitos B. La pureza se confirmó por citometría de flujo, encontrándose valores por encima de 90%.

6.6.8 Cultivo y recolección de sobrenadantes de linfocitos B purificados de donadores sanos, casos y controles.

Después de la purificación magnética de linfocitos B provenientes de donadores sanos, casos y controles, las células se sembraron en placas de 96 pozos (Corning ref. 3526) a una concentración (1×10^6 células/mL). Las células purificadas se estimularon bajo las mismas condiciones establecidas para las PBMCs: rAl-CPI 0.1 μ M, RPMI (control negativo) o CpG 0.5 μ M (ODN 2006) por 72 horas en 5% de CO₂ a 37°C. Posteriormente, se recolectaron los sobrenadantes mediante centrifugación de la suspensión celular durante 7 minutos a 300 g, y se almacenaron a -80°C.

6.6.9 Determinación de IL-10 en sobrenadantes de cultivo de PBMCs y linfocitos B purificados mediante ELISA

Se determinaron las concentraciones de IL-10 mediante ELISA en los sobrenadantes usando una curva estándar de IL-10 (Ready-set-Go! Human IL-10 Lyophilized Standard, ref 29-8109-60. LOT: 4281957; eBioscience). El procedimiento se realizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En el primer día se realizó la fijación por 16 horas del anticuerpo de captura anti-IL-10 (JES3-9D7, REF 14-708-85 eBioscience) a las placas de microtitulación de 96 pozos. En el segundo día se bloqueó la placa con PBS BSA 1% por 2 horas seguido de lavados sucesivos de los pozos con PBS Tween-20 0.05%. Posteriormente, se realizaron 7 diluciones seriadas del estándar de IL-10 partiendo desde la concentración 300 pg/mL hasta 4,6875 pg/mL y se añadieron los sobrenadantes de los cultivos de PBMCs y linfocitos B purificados, así como los pozos correspondientes a la condición blanco. En el tercer día se realizó la adición del anticuerpo de detección Anti-IL10 Biotin (JES3-12G8, ref 13-7109-85, LOT 4285157), y después se adicionó la avidina-HRP (250x, Ref 00-4100-94, LOT 4278917). Posterior a 6 lavados, se incubó con el sustrato TMB (ELISA Substrate Solution eBioscience 10255 2018-01) por 15 minutos y se paró la reacción con H₂SO₄, 2N). Para la lectura de las densidades ópticas se hizo uso del espectrofotómetro (Termofisher Scientific, Multiskan GO) a una longitud de onda de 450 nm. Los OD resultantes fueron sometidos a análisis mediante la herramienta online

gratuita Myassays (www.myassays.com) usando una curva logística de 4 parámetros (4P) recomendada para este tipo de estudios para la interpolación de los datos.

6.6.10 Determinación de IL-10 en sobrenadantes de cultivo de PBMCs y linfocitos B purificados mediante CBA

Se determinaron las concentraciones de las citoquinas utilizando el estuche BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit [Interleuquina-6 (IL-6); Interleuquina-10 (IL-10)]. 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 linfocitos B de los sujetos de los casos y controles del estudio 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.

6.6.11 Análisis Estadístico

Para comparar los niveles de IL-10 entre las condiciones de los sobrenadantes de cultivos celulares de donadores sanos, casos y controles, se usaron las pruebas T student o Wilcoxon dependiendo la distribución de los datos. Para las comparaciones entre los niveles de IL-10 entre casos y controles se utilizaron las pruebas t-test no pareada y Mann-Whitney. Las ilustraciones gráficas se realizaron en el programa GraphPad Prism 8 for Windows (Version 8.0.2 (263)). La determinación de medias y desviaciones estándares se realizó en el programa IBM SPSS Statistics 25.0. Se utilizó un umbral de significancia estadística para el valor de p de 0.05.

7. RESULTADOS

7.1 Respuesta inmunitaria frente a distintas concentraciones de rAI-CPI

Para evaluar si rAI-CPI tiene un efecto inductor de IL-10 en cultivos de PBMCs, se inició con una titulación de las diferentes concentraciones de rAI-CPI (1 μ M; 0,1 μ M; 0,01 μ M y 0,001 μ M) en presencia o ausencia de un agonista de TLR-9 (CpG) en células obtenidas de donadores sanos (n= 5) (**Figura 5**). Se observó que la concentración de 0,1 μ M de rAI-CPI indujo los mayores niveles de IL-10 (media: 7,5 \pm 5,2 ng/mL) en comparación con el control negativo (RPMI: 4,6 \pm 3,1 ng/mL) (**Tabla 3**). Dado que la concentración más alta de rAI-CPI no mostró cambios en la producción de IL-10 con respecto a los niveles basales, sospechamos que esta proteína podía tener efectos citotóxicos sobre las PBMCs. Anteriormente, en un trabajo de tesis previo (118) se demostró que la concentración de 1 μ M no tenía efectos citotóxicos sobre monocitos. Por esta razón, se procedió a la realización de estudios de viabilidad celular enfocados en linfocitos, los cuales serán descritos en la próxima sección.

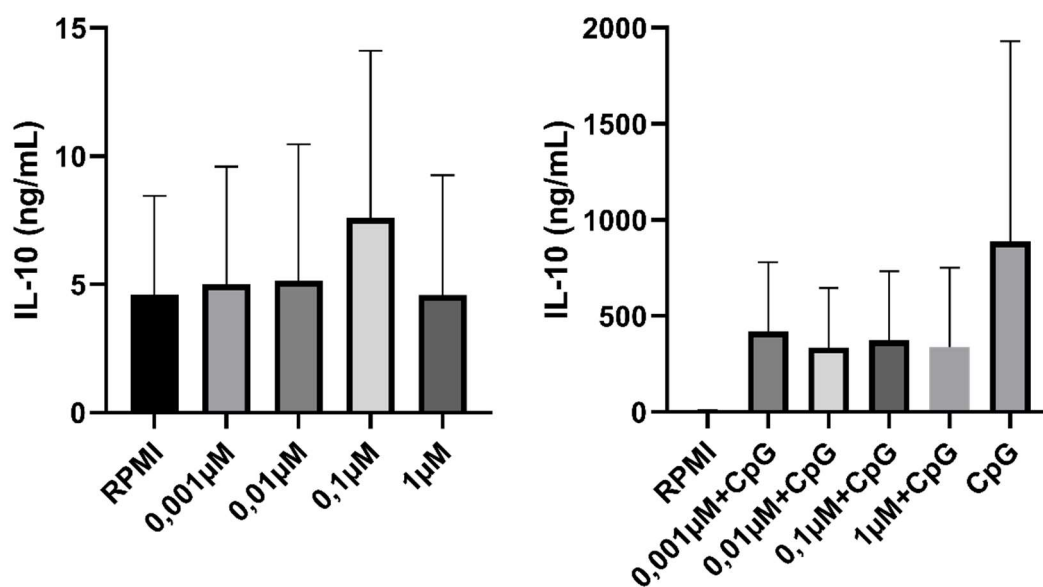


Figura 5. Niveles de IL-10 en sobrenadantes de PBMCs provenientes de donadores sanos estimulados con rAI-CPI a diferentes concentraciones y CpG medidos mediante ELISA. AI-CPI 0,1 μ M indujo la mayor liberación de IL-10 en PMBCs de donadores sanos. Las PBMCs de donadores sanos fueron incubadas con rAI-CPI (1 μ M; 0,1 μ M; 0,01 μ M y 0,001 μ M) y CpG 0,5 μ M durante 72 horas. Los datos representan la media (DE \pm) de un experimento (n = 5). RPMI, control negativo. CpG, control positivo.

Tabla 3. Media de las concentraciones de IL-10 en sobrenadantes de PBMCs de donadores sanos estimuladas con rAI-CPI

Estímulo	Media (ng/mL)	± DE
RPMI	4,61	3,10
rAI-CPI 0,001 µM	4,99	3,71
rAI-CPI 0,01 µM	5,14	4,29
rAI-CPI 0,1 µM	7,59	5,25
rAI-CPI 1 µM	4,58	3,77
rAI-CPI 0,001 µM + CpG	418,58	291,15
rAI-CPI 0,01 µM + CpG	336,34	249,48
rAI-CPI 0,1 µM + CpG	374,65	287,92
rAI-CPI 1 µM + CpG	339,84	330,51
CpG	886,78	839,08

7.2. Viabilidad celular de PBMCs frente a distintas concentraciones de rAI-CPI mediante anexina y yoduro de propidio

La tinción con anexina-V se ha relacionado con una morfología nuclear apoptótica, así como con fragmentación del ADN. La anexina se une a los residuos de fosfatidil-serina expuestos en la parte externa de la membrana de las células que han iniciado la condensación nuclear durante la apoptosis. Lo anterior sucede justo antes que la membrana se permeabilice al yoduro de propidio, un marcador que penetra en la célula en la fase tardía de la apoptosis cuando existe pérdida estructural de la membrana plasmática (119). Mediante la utilización de estos dos marcadores se quiso averiguar si el mecanismo de la muerte celular estaba mediado por apoptosis. Para la anterior se cultivaron las PBMCs de dos donadores sanos con rAI-CPI 1 µM, 0,1 µM, 0,01 µM y 0,001 µM durante 72 horas, Una vez cumplido el tiempo de incubación, las células fueron recolectadas y teñidas con el marcador de viabilidad anexina y yoduro de propidio, En ambos donadores se encontró un descenso en el porcentaje de células vivas (DN), así como un aumento en el número de células en fase avanzada de la apoptosis (doblemente

positivas para anexina y yoduro de propidio), cuando fueron estimuladas con la concentración más alta de la proteína recombinante (**Figura 8**).

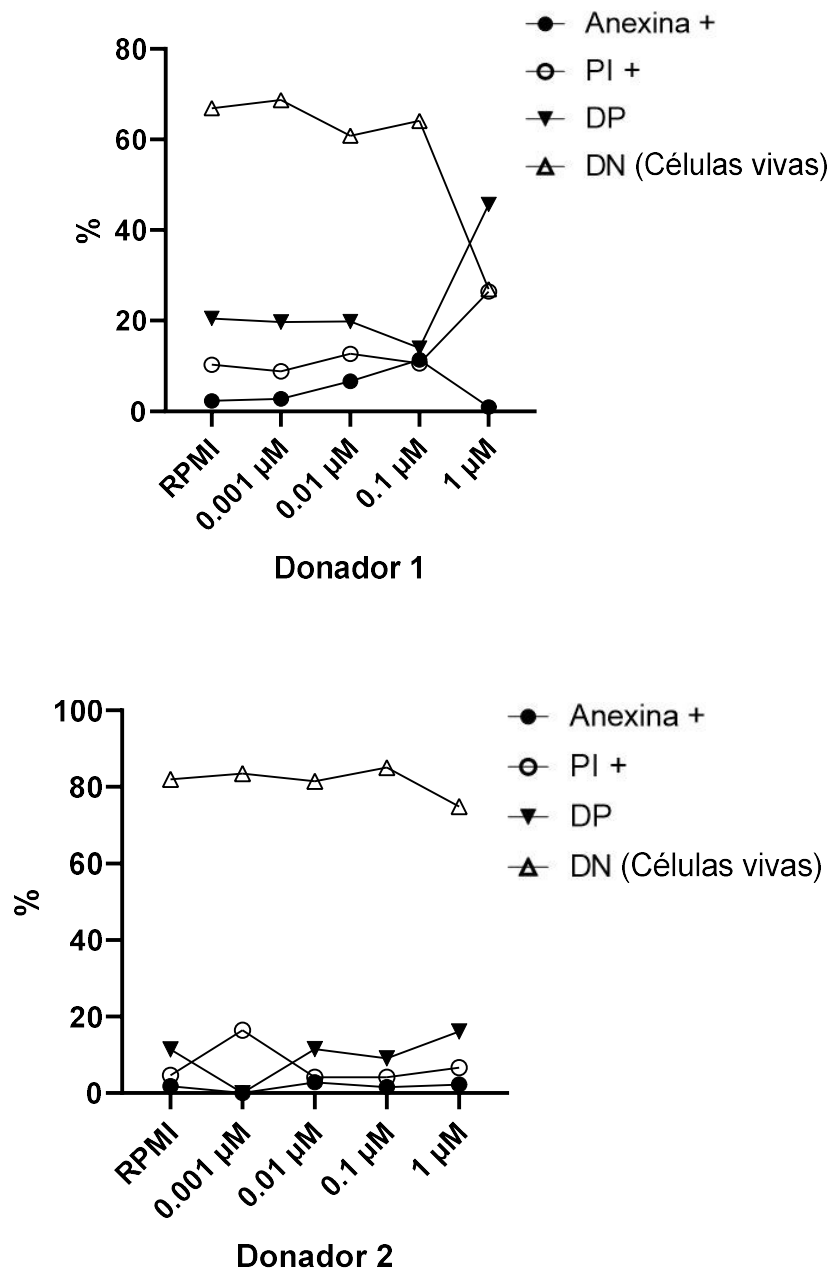


Figura 6. Viabilidad de PBMCs de donadores sanos estimuladas con rAI-CPI. rAI-CPI 1 μM es citotóxica en PBMCs de algunos donadores. Las PBMCs de donadores sanos fueron estimuladas con rAI-CPI 0,001 μM, 0,01 μM, 0,1 μM y 1 μM con 72 horas de incubación. Las células fueron teñidas con Anexina V y yoduro de propidio (PI). Los datos representan el porcentaje de células en cada una de las condiciones. RPMI, control negativo. DP, doble positivas. DN, doble negativas.

7.3 Viabilidad celular de linfocitos T y B frente a distintas concentraciones de rAI-CPI

Para establecer el porcentaje de linfocitos T y B vivos en los cultivos de PBMCs estimulados con rAI-CPI, se cultivaron las PBMCs de tres donadores sanos con rAI-CPI 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M y 0,001 μ M durante 3 días. Una vez cumplido el tiempo de incubación, las células fueron recolectadas y teñidas con los marcadores de superficie CD3 y CD19 expresados por linfocitos T y B, respectivamente, y con el marcador de viabilidad FVD el cual tiñe de forma irreversible a las células muertas. En la lectura en el citómetro se determinó el porcentaje de linfocitos viables teniendo en cuenta aquellas células que no incorporaron FVD (**Figura 7**). El análisis a las 24 horas mostró valores similares de viabilidad celular en presencia o ausencia de rAI-CPI. Sin embargo, a los 3 días, se halló un notorio descenso en el porcentaje de linfocitos B vivos estimulados con rAI-CPI 1 μ M en los tres donadores sanos (**Figura 8**). Este descenso también se observó en los linfocitos T vivos de dos de los donadores (**Figura 9**). Lo anterior podría sugerir que rAI-CPI 1 μ M ejerce un efecto citotóxico en las poblaciones de linfocitos B y T, por lo que se procedió a averiguar si el mecanismo de muerte se encontraba mediado por apoptosis.

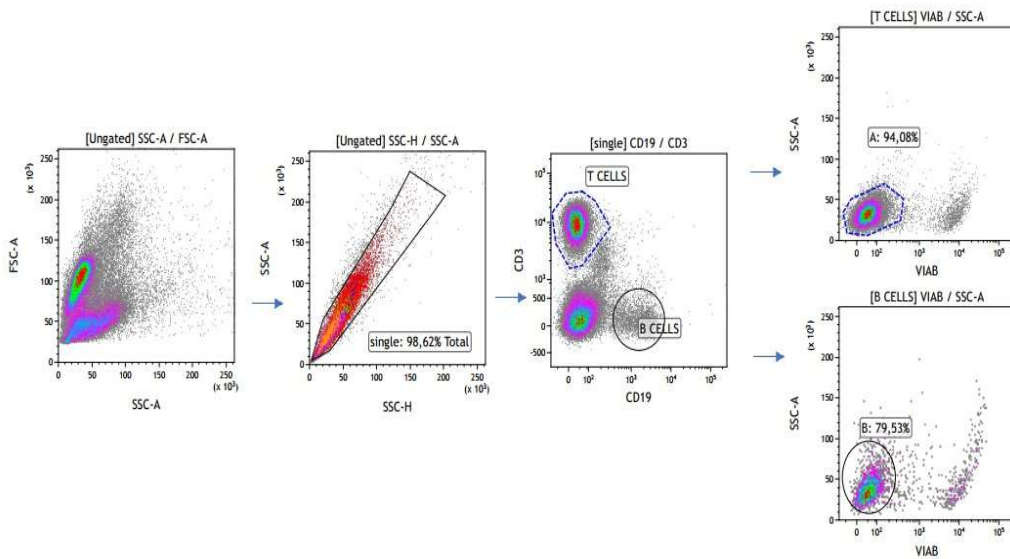


Figura 7. Estrategia de identificación celular por citometría de flujo para identificación de linfocitos T y B viables mediante FVD. Del total de eventos, se eliminaron las dupletas (SSC-A y SSC-H). Después se identificaron las subpoblaciones de linfocitos T y B mediante los marcadores de superficie CD3 y CD19, respectivamente. Finalmente se comprobó el marcador de viabilidad FVD en estas subpoblaciones.

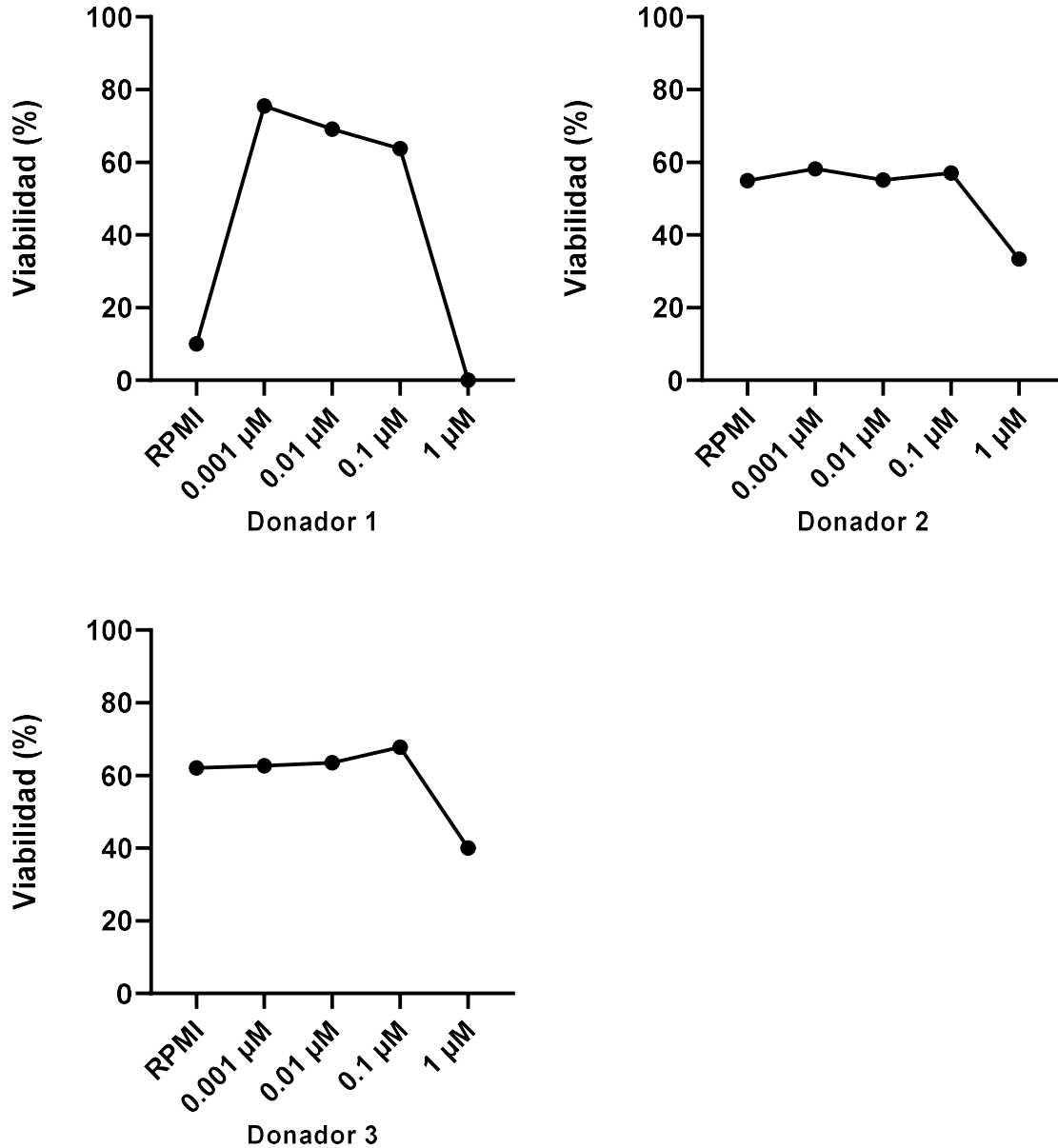


Figura 8. Viabilidad de linfocitos B provenientes de PBMCs de donadores sanos estimulados con rAI-CPI. rAI-CPI 1 μM es citotóxica en linfocitos B de donadores sanos. Las PBMCs de donadores sanos fueron estimulados con rAI-CPI 0,001 μM , 0,01 μM , 0,1 μM y 1 μM con 72 horas de incubación. Posteriormente se hizo tinción con marcadores de superficie CD3, CD19 y FVD. Los datos representan el porcentaje de células vivas que no incorporaron el marcador FVD. RPMI, control negativo.

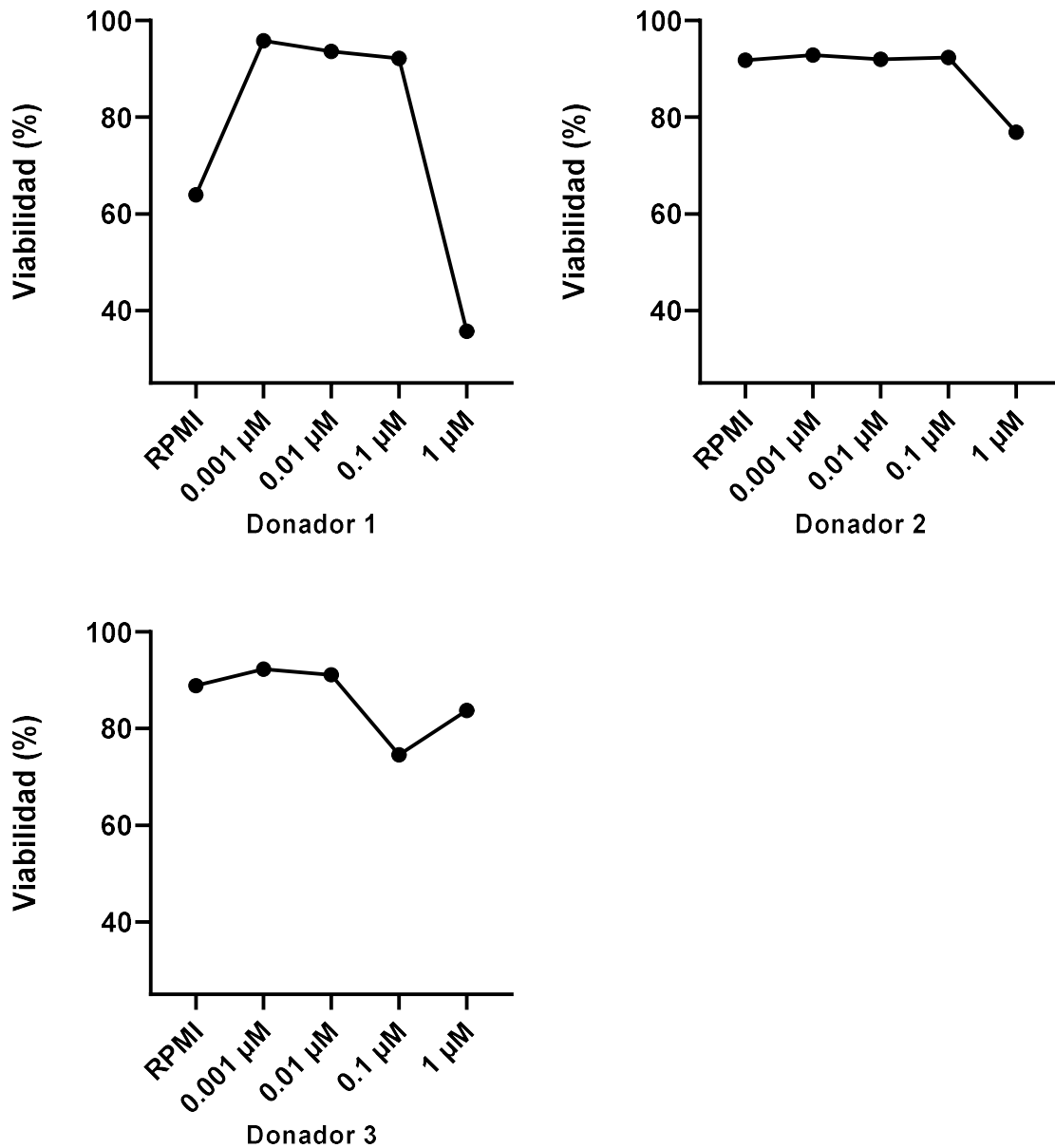


Figura 9. Viabilidad de linfocitos T provenientes de PBMCs de donadores sanos estimulados con rAI-CPI. rAI-CPI 1 μM es citotóxica en linfocitos T de algunos donadores sanos. Las PBMCs de donadores sanos fueron estimulados con rAI-CPI 0,001 μM, 0,01 μM, 0,1 μM y 1 μM con 72 horas de incubación. Posteriormente se hizo tinción con marcadores de superficie CD3, CD19 y FVD. Los datos representan el porcentaje de células vivas que no incorporaron el marcador FVD. RPMI, control negativo.

7.4 Respuesta inmunitaria de PBMCs de donadores sanos frente a rAI-CPI

Con el propósito de averiguar el efecto inductor de IL-10 por parte de rAI-CPI se midieron, mediante ELISA, las concentraciones de IL-10 en sobrenadantes de cultivos de PBMCs de donadores sanos (n=11) (**Tabla 4**) estimulados con rAI-CPI 0,1 μ M y un agonista del TLR9 (CpG) en incubación durante 72 horas. rAI-CPI indujo un aumento estadísticamente significativo en la media de las concentraciones de IL-10 comparado con la condición sin estimular ($p < 0,05$); un aumento que también fue visto con la cistatina y CpG, pero que no alcanzó significancia estadística cuando se comparó con la condición estimulada con CpG solamente (**Figura 10**).

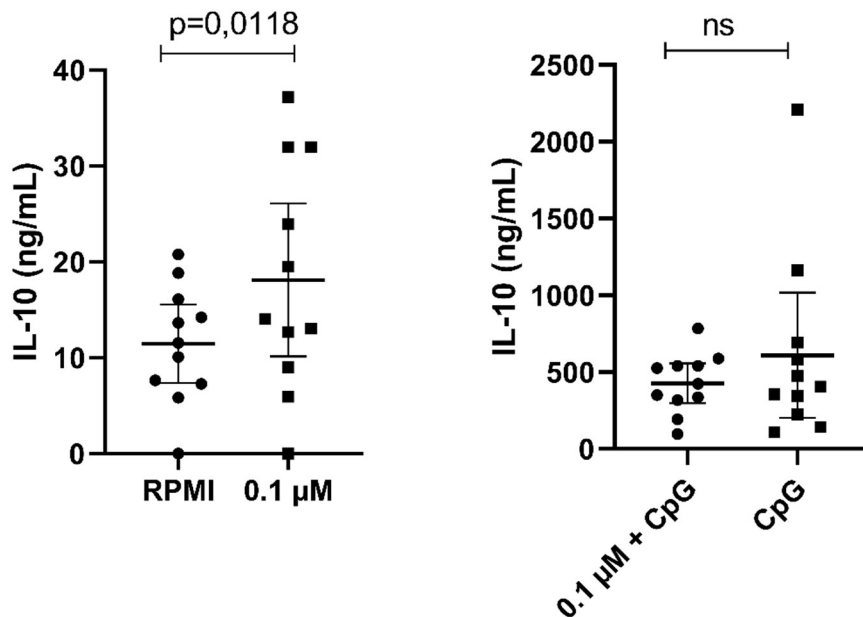


Figura 10. Niveles de IL-10 en sobrenadantes de PBMCs provenientes de donadores sanos estimulados con rAI-CPI y CpG medidos mediante ELISA. rAI-CPI 0,1 μ M indujo mayores niveles de IL-10 comparado con la condición RPMI en sobrenadantes de PBMCs de donadores sanos. Las PBMCs de donadores sanos fueron estimulados con rAI-CPI 0,1 μ M y CpG 0,5 μ M con 72 horas de incubación. Los datos representan la media de IL-10 (95% IC) de un experimento (n = 11) y prueba t-test. RPMI, control negativo. CpG, control positivo.

Tabla 4. Características sociodemográficas de los participantes

Tipo de participante	Edad (años)	Sexo (F)	Ubicación (Urbano/Rural)	DAS
<i>Donadores sanos (n=11)</i>	29,5 ± 4,96	54,54%	100% / 0%	No aplica
<i>Casos (n=5)</i>	58,4 ± 10,23	100%	80% / 20%	4,06 ± 1,79
<i>Controles (n=7)</i>	56,4 ± 10,65	100%	85,7% / 14.3%	No aplica

DAS (Disease activity score): Puntaje de marcador de la enfermedad, sólo en pacientes con AR.

Tabla 5. Media de las concentraciones de IL-10 en sobrenadantes de PBMCs de donadores sanos (n = 11) estimuladas con rAI-CPI 0,1 µM y CpG 0,5µM medidos mediante ELISA.

Estímulo	Media (ng/mL)	± DE
RPMI	11,45	6,10
rAI-CPI 0,1 µM	18,12	11,89
rAI-CPI 0,1 µM + CpG	426,95	194,79
CpG	609,57	607,20

7.5 Expresión de marcadores relacionados con Bregs

Después de realizar un *gating* exploratorio para linfocitos B en PBMCs provenientes de un donador sano (**Figura 11**), se hizo una selección electrónica de los linfocitos B en los cultivos de los primeros 6 donadores sanos y se evaluó el efecto de rAI-CPI en la expresión de marcadores previamente asociados a Bregs. La adición de CpG aumentó la expresión de los marcadores en los que se espera este comportamiento (IL-10, CD1d, CD5, CD25 y CD71) y redujo de manera esperada la expresión del marcador CD73. Los valores de IMF obtenidos en los cultivos con rAI-CPI fueron similares a la condición de no estimulación. La adición de rAI-CPI, tanto solo como en presencia de CpG, no indujo cambios significativos en la expresión de los marcadores en comparación con sus condiciones controles (RPMI o CpG, respectivamente), excepto el marcador CD25 el cual se encontró significativamente reducido en la condición rAI-CPI + CpG cuando se comparó con la condición CpG ($p=0.037$) (**Figura 12**).

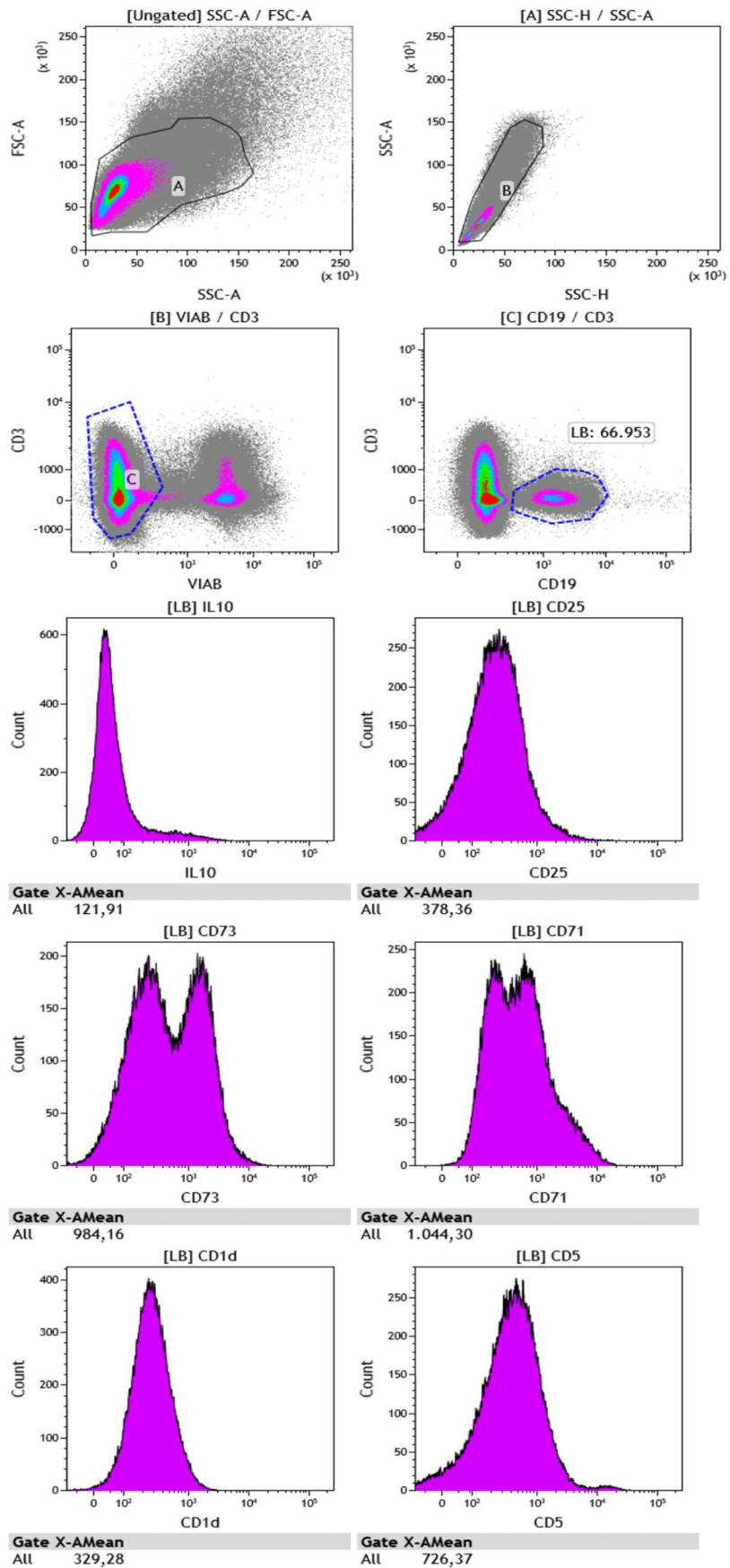


Figura 11. Selección electrónica de linfocitos B provenientes de un donador sano para la evaluación de la expresión de marcadores asociados a Bregs. La imagen es representativa de células PBMCs recolectadas de un donador sano y que fueron estimulados con rAI-CPI 0,1 μ M y CpG 0,5 μ M con 72 horas de incubación. Posteriormente las células fueron teñidas con los marcadores de superficie: CD25, CD1d, CD71, CD73, CD5; e intracelulares: IL.10.

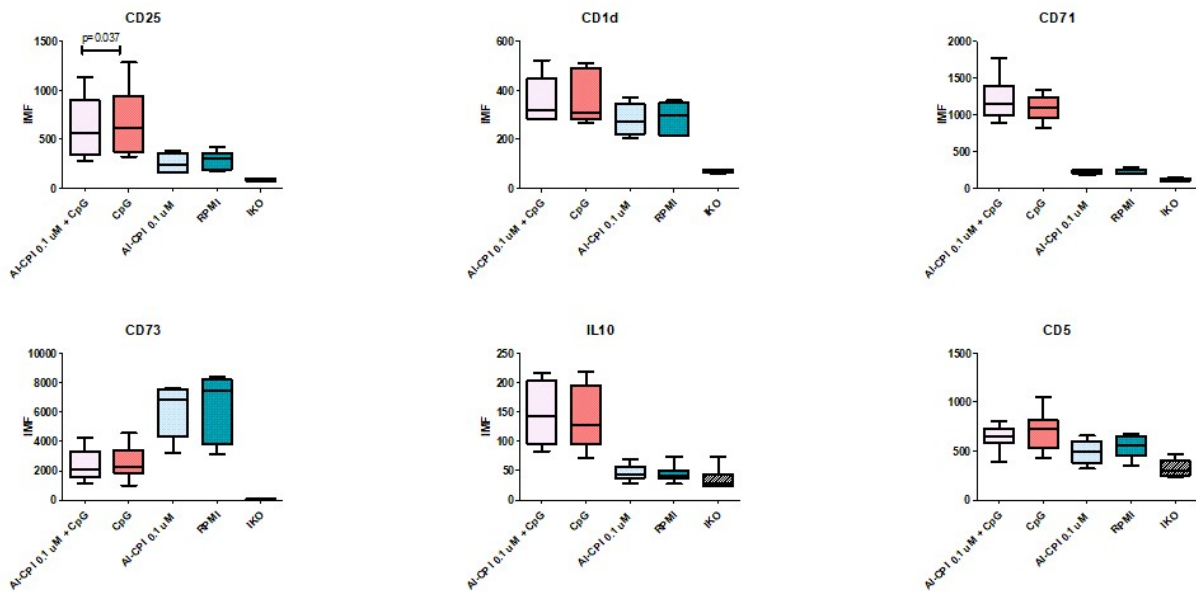


Figura 12. Expresión de marcadores de linfocitos B reguladores en células CD3-CD19+. rAI-CPI 0,1 μ M disminuyó la expresión del marcador de superficie CD25 en PBMCs de donadores sanos. Las PBMCs provenientes de donadores sanos fueron estimulados con rAI-CPI 0,1 μ M y CpG 0,5 μ M con 72 horas de incubación y teñidas con los marcadores de superficie CD25, CD1d, CD71, CD73, CD5; e intracelulares, IL-10. Los datos corresponden a la media de IMF para cada marcador (95% IC) de un experimento (n = 6) y prueba t-test determinado en una ventana de células vivas, CD3- y CD19+.

7.6 Respuesta inmunitaria de linfocitos B purificados de donadores sanos frente a rAI-CPI

Para averiguar si rAI-CPI ejercía un efecto antiinflamatorio mediante la producción de IL-10 en un subtipo celular en específico, se midieron, mediante ELISA, las concentraciones de IL-10 en los sobrenadantes de linfocitos B purificados de PBMCs de donadores sanos estimulados con rAI-CPI 0,1 μ M y un agonista del TLR9 (CpG) en incubación durante 72 horas. rAI-CPI indujo un aumento estadísticamente significativo en la media de las

concentraciones de IL-10 comparado con la condición sin estimular ($p < 0,05$); un aumento también visto en la condición estimulada con la cistatina y CpG comparada con la condición estimulada con CpG solamente (**Tabla 5**), una diferencia que no alcanzó significancia estadística (**Figura 13**).

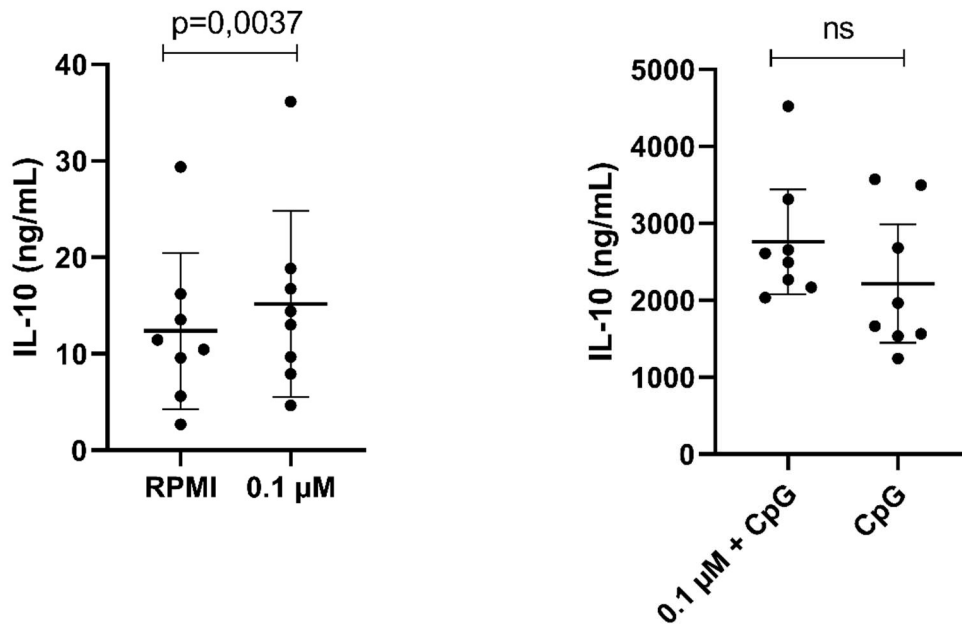


Figura 13. Niveles de IL-10 en sobrenadantes de linfocitos B purificados de PBMCs de donadores sanos estimulados con rAI-CPI y CpG medidos mediante ELISA. rAI-CPI 0,1 μM indujo mayores niveles de IL-10 comparado con la condición RPMI en linfocitos B de donadores sanos. Los linfocitos B purificados de donadores sanos fueron estimulados con rAI-CPI 0,1 μM y CpG 0,5 μM con 72 horas de incubación. Los datos representan la media de IL-10 (95% IC) de un experimento (n = 8) y prueba t-test. RPMI, control negativo. CpG, control positivo.

Tabla 6. Media de las concentraciones de IL-10 en sobrenadantes de linfocitos B purificados de PBMCs de donadores sanos (n = 8) estimulados con rAI-CPI 0,1 μm y CpG 0,5μM medidos mediante ELISA

Estímulo	Media (ng/mL)	± DE
RPMI	12,37	8,09
rAI-CPI 0,1 μM	15,18	9,67
rAI-CPI 0,1 μM + CpG	2758,58	813,43
CpG	2216,18	918,69

7.6 Respuesta inmunitaria de linfocitos B purificados de pacientes con AR y controles frente a rAI-CPI

Los pacientes con AR seleccionados tuvieron una media de edad de $58,4 \pm 10,23$ años mientras que la media de sus controles pareados fue de $56,4 \pm 10,65$ años. Todos los participantes fueron del sexo femenino. Con el propósito de averiguar si rAI-CPI ejerce un efecto sobre la producción de IL-10 en un subtipo celular en específico, se midieron, mediante ELISA, las concentraciones de IL-10 en los sobrenadantes de linfocitos B purificados de PBMCs de pacientes con AR y controles estimulados con rAI-CPI $0,1 \mu\text{M}$ y un agonista del TLR9 (CpG) en incubación durante 72 horas. Se encontró que la media de los niveles de IL-10 fueron más altos en las condiciones rAI-CPI comparado con RPMI, así como en las condiciones rAI-CPI y CpG comparado con la condición estimulada con CpG solamente tanto en casos como en controles (**Tabla 6**), unas diferencias que no alcanzaron significancia estadística (**Figura 14**). Cuando se hicieron las comparaciones entre las condiciones de ambos grupos, se encontró que en todas las condiciones la media de IL-10 más alta en los casos comparada con la de controles, sin embargo, solo alcanzó una diferencia estadísticamente significativa la condición con RPMI (**Figura 15**).

Tabla 7. Media de las concentraciones de IL-10 en sobrenadantes de linfocitos B purificados de PBMCs de pacientes con AR y controles estimulados con rAI-CPI y CpG medidos mediante ELISA

Estímulo	Casos (n=5)		Controles (n=7)	
	Media (ng/mL)	± DE	Media (ng/mL)	± DE
RPMI	1,26	1,17	4,63	2,89
rAI-CPI $0,1 \mu\text{M}$	1,98	2,42	4,83	2,69
rAI-CPI $0,1 \mu\text{M}$ + CpG	731,05	873,61	1178,66	1046,15
CpG	518,71	534,74	939,84	1152,92

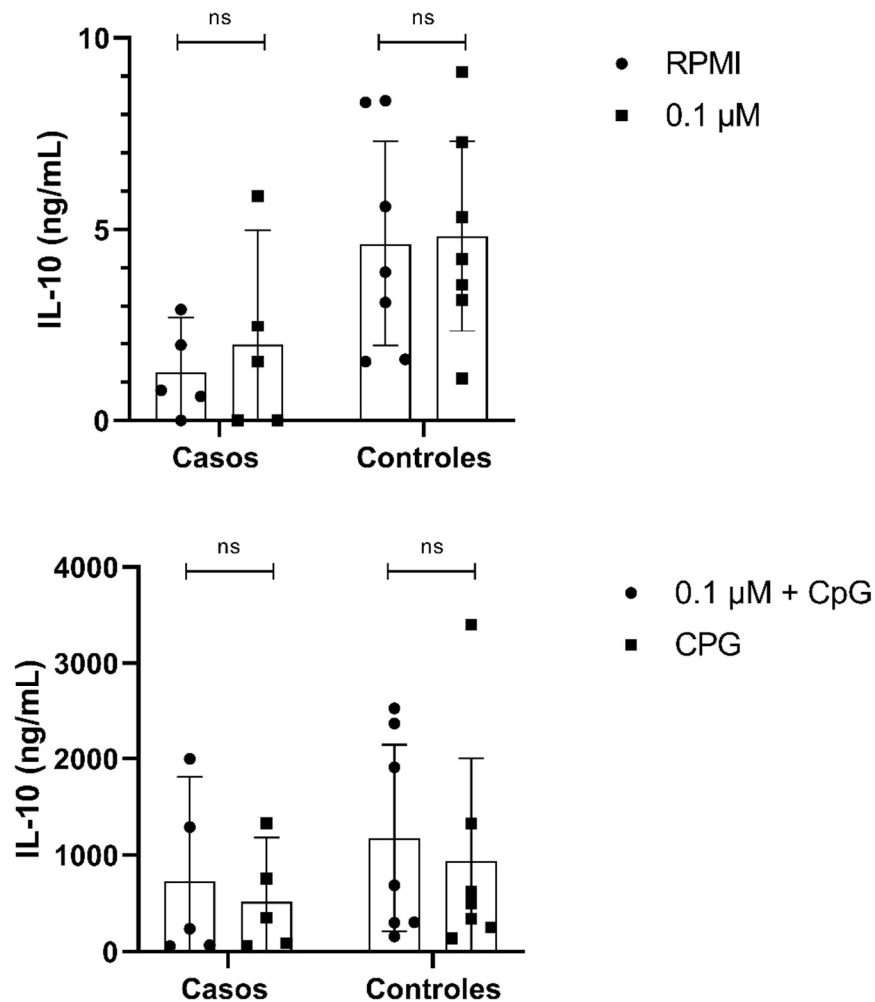


Figura 14. Niveles de IL-10 en sobrenadantes de linfocitos B purificados de PBMCs de pacientes con AR y controles estimulados con rAI-CPI y CpG medidos mediante ELISA. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IL-10 de sobrenadantes de linfocitos B de pacientes con AR y controles. Los linfocitos B purificados de pacientes con AR (n=5) y controles (n=7) fueron estimulados con rAI-CPI 0,1 μM y CpG 0,5 μM con 72 horas de incubación. Los datos representan la media de IL-10 (95% IC) de un experimento, prueba t-test y Wilcoxon en distribuciones de media de IL-10 paramétricas y no paramétricas, respectivamente. RPMI, control negativo. CpG, control positivo.

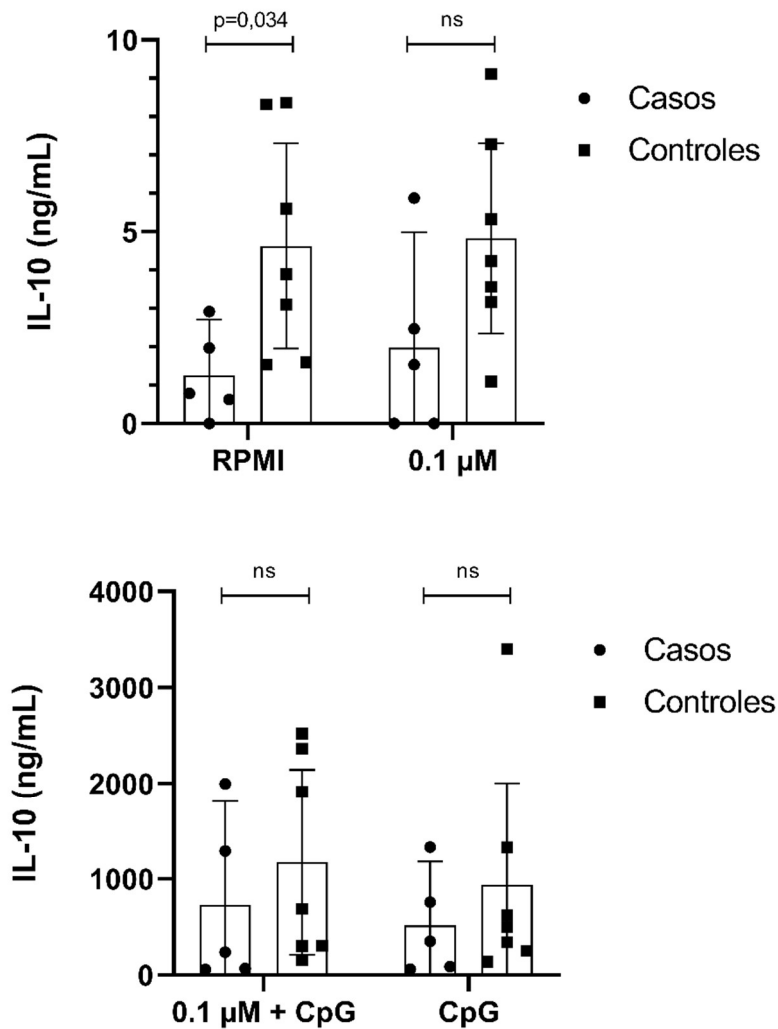


Figura 15. Niveles de IL-10 en sobrenadantes de linfocitos B purificados de PBMCs de pacientes con AR y controles estimulados con rAI-CPI y CpG medidos mediante ELISA. Los controles tuvieron unos niveles de IL-10 más altos en comparación con los pacientes con AR. Los linfocitos B purificados de pacientes con AR (n=5) y controles (n=7) fueron estimulados con rAI-CPI 0,1 μM y CpG 0,5 μM con 72 horas de incubación. Los datos representan la media de IL-10 (95% IC) de un experimento, prueba t-test no pareado y Mann-Whitney en distribuciones de media de IL-10 paramétricas y no paramétricas, respectivamente. RPMI, control negativo. CpG, control positivo.

Los niveles de IL-10 también fueron medidos mediante CBA para las condiciones rAI-CPI y CpG, y CpG solamente. De forma similar a los resultados obtenidos mediante ELISA, tanto en casos como en controles, la condición rAI-CPI y CpG tuvo una media de IL-10 más alta comparada con la condición estimulada con CpG solamente. También se

encontró que los controles tenían una media de IL-10 más alta en comparación con los casos (**Tabla 7**). Ninguno de estos análisis alcanzó significancia estadística (**Figura 16**).

Cuando se midieron en los sobrenadantes los niveles de IL-6 mediante CBA, se encontró que en los pacientes con AR la condición con rAI-CPI y CpG indujo una menor producción de IL-6 en comparación con la condición estimulada CpG solamente. Lo contrario ocurrió con los niveles de IL-6 de los controles, en los cuales se halló una media de IL-6 más alta cuando se estimuló con rAI-CPI y CpG comparada con la condición estimulada con CpG (**Tabla 7**). A pesar de que no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas en estas comparaciones, la media de los niveles de IL-6 fue más alta para los controles en las dos condiciones estudiadas (**Figura 17**).

Tabla 8. Media de las concentraciones de IL-10 e IL-6 en sobrenadantes de linfocitos B purificados de PBMCs de pacientes con AR y controles estimulados con rAI-CPI y CpG medidos mediante CBA

Estímulo	Casos (n=5)		Controles (n=6)	
	Media (ng/mL)	± DE	Media (ng/mL)	± DE
IL-10				
rAI-CPI 0,1 µM	591,61	694,52	784,99	814,00
CpG	424,58	464,02	671,95	931,47
IL-6				
rAI-CPI 0,1 µM	1457,27	1271,97	1925,84	1757,59
CpG	1128,92	1266,37	1201,26	1659,16

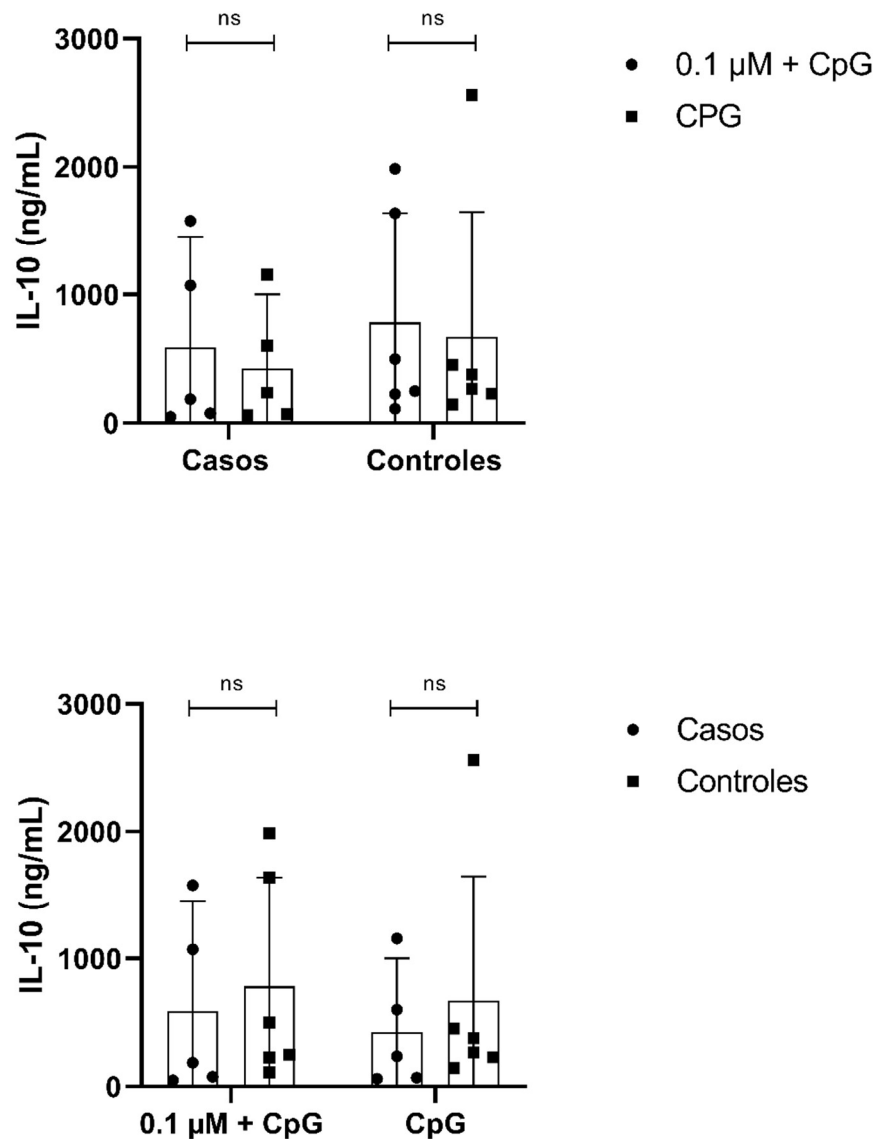


Figura 16. Niveles de IL-10 en sobrenadantes de linfocitos B purificados de PBMCs de pacientes con AR y controles estimulados con rAI-CPI y CpG medidos mediante CBA. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de IL-10 de sobrenadantes de linfocitos B de pacientes con AR y controles. Los linfocitos B purificados de pacientes con AR (n=5) y controles (n=6) fueron estimulados con rAI-CPI 0,1 μM y CpG 0,5 μM con 72 horas de incubación. Los datos representan la media de IL-10 (95% IC) de un experimento; pruebas t-test y Wilcoxon en análisis pareados; y pruebas t-test no pareado y Mann-Whitney en análisis no pareados. RPMI, control negativo. CpG, control positivo.

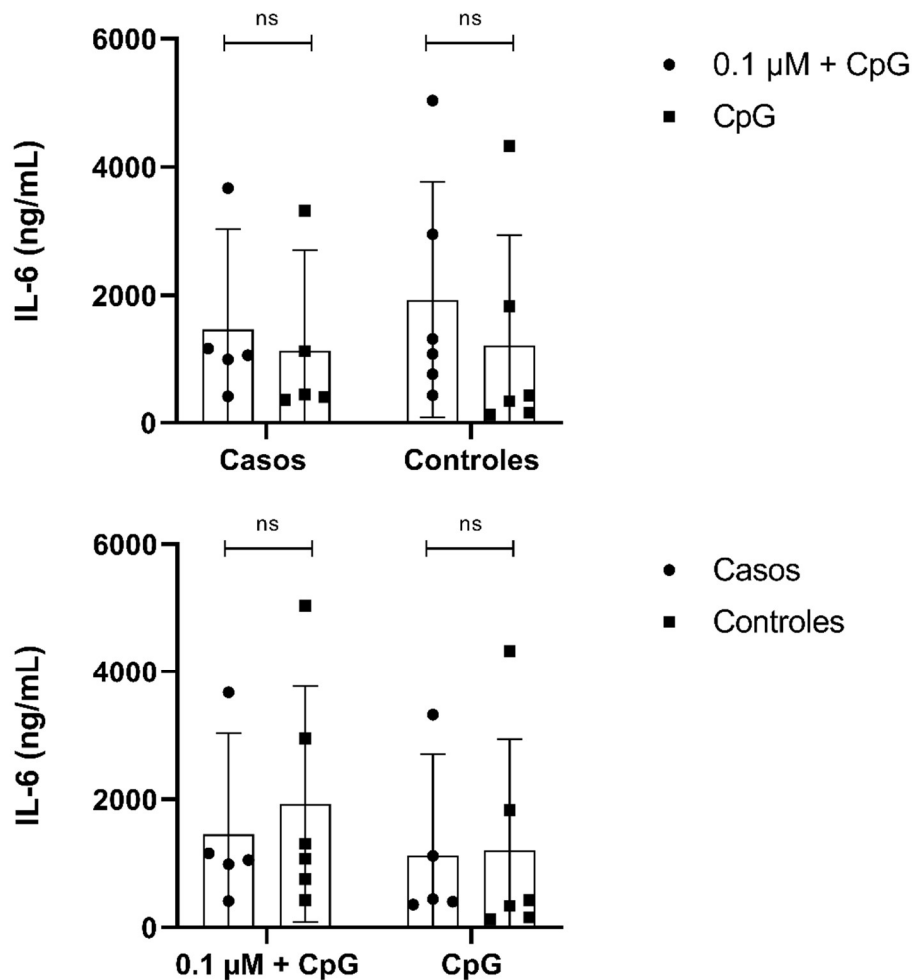


Figura 17. Niveles de IL-6 en sobrenadantes de linfocitos B purificados de PBMCs de pacientes con AR y controles estimulados con rAI-CPI y CpG medidos mediante CBA. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de IL-6 de sobrenadantes de linfocitos B de pacientes con AR y controles. Los linfocitos B purificados de pacientes con AR (n=5) y controles (n=6) fueron estimulados con rAI-CPI 0,1 μM y CpG 0,5 μM con 72 horas de incubación. Los datos representan la media de IL-10 (95% IC) de un experimento; pruebas t-test y Wilcoxon en análisis pareados; y pruebas t-test no pareado y Mann-Whitney en análisis no pareados. RPMI, control negativo. CpG, control positivo.

8. DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis se evaluó por primera vez si rAI-CPI tiene un efecto tolerogénico sobre los linfocitos B. Los resultados expuestos en el marco de esta investigación muestran que rAI-CPI induce la producción de IL-10 en cultivos de linfocitos B purificados por selección magnética en donadores sanos y pacientes con AR. Dentro de otros hallazgos se observa que las concentraciones de rAI-CPI 1 μ M, con la que se han descrito efectos tolerogénicos sobre monocitos y células dendríticas, ejercen un efecto citotóxico sobre las PBMCs, linfocitos B y T de donadores sanos.

Durante la selección de la concentración de rAI-CPI a utilizar en los cultivos experimentales, se encontró que rAI-CPI 1 μ M ejerció un efecto citotóxico reflejado en un menor porcentaje de PBMCs vivas (doble negativas para anexina y yoduro de propidio), y un mayor porcentaje de PBMCs en estadios tardíos de la apoptosis comparados con el resto de las concentraciones de rAI-CPI utilizadas. La variación de los porcentajes de viabilidad celular difirió en cada uno de los donadores, siendo el donador 1 más sensible al efecto de rAI-CPI 1 μ M. Esta mayor sensibilidad también fue vista en la exposición de linfocitos B del mismo donador a esta concentración de rAI-CPI, los cuales se encontraron notoriamente disminuidos mediante la medición con FVD. Lo anterior podría sugerir un efecto diferencial de la cistatina en función del perfil genético de cada individuo, algo en relación con hallazgos previos de otros estudios en donde se encontraron respuestas variables de distintos individuos a rAI-CPI y de efectos no citotóxicos en otros subtipos celulares (monocitos) expuestos a concentraciones de rAI-CPI 1 μ M (118). La elucidación del receptor putativo con el que interactúa rAI-CPI serían claves a la hora de entender los aspectos de variabilidad de respuesta entre individuos y entre subtipos celulares que se encuentran pobremente comprendidos.

La condición rAI-CPI 0.1 μ M indujo una media significativamente más alta de IL-10 en los sobrenadantes de linfocitos B purificados de donadores sanos cuando se comparó con el control negativo ($p < 0,0037$). Aunque la condición rAI-CPI + CpG mantuvo esta tendencia al alza cuando se comparó con la condición CpG, las diferencias no alcanzaron significancia estadística. Lo anterior sugeriría que rAI-CPI tiene una tendencia a inducir producción de IL-10 en este tipo celular, algo que se corrobora en los niveles más altos, pero no significativos, de IL-10 intracelular en este subtipo en la condición rAI-CPI comparado con las condiciones controles. Los niveles de IFM de los demás marcadores

tampoco alcanzaron diferencias estadísticamente significativas, excepto CD25, lo que podría sugerir que rAI-CPI no induce la proliferación de linfocitos B reguladores con expresión de estos marcadores. A pesar que el método de purificación de linfocitos B escogido demostró una alta pureza en la recolección de este subtipo celular, se encuentra en desventaja con técnicas más eficientes como el *cell-sorting*. Por lo anterior, consideramos este aspecto una limitación del presente estudio debido al potencial efecto que otros subtipos celulares podrían ejercer en la muestra de linfocitos B recolectada, lo que podría alterar la expresión de sus marcadores de superficie y producción de IL-10. Por otro lado, la producción de IL-10 no es un criterio suficiente para hablar de funciones reguladoras por parte de este subtipo celular. Este estudio carece de pruebas de funcionalidad que demuestren un papel inmunorregulador por parte de los linfocitos B, las cuales han sido demostradas en experimentos de cocultivo con linfocitos T cuyo desenlace primario es la proliferación de linfocitos T reguladores y aumento en la expresión de marcadores coestimuladores (CD80, CD86, PD-L1 y PD-L2) que demuestran la importancia del contacto célula-célula para la inducción de células con fenotipo regulador (54,120). Por otro lado, cuando se analizaron los sobrenadantes de los linfocitos B de casos y controles, se observó en ambos una tendencia al alza en la media de IL-10 en las condiciones estimuladas con rAI-CPI comparada con sus respectivos controles. De las comparaciones anteriores no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, pero sí hubo una cuando se comparó la condición RPMI entre los dos grupos ($p=0,034$), siendo más alta en el grupo control. Lo anterior establece unas concentraciones basales de IL-10 más alta en controles comparada con los casos. Para las demás condiciones, los controles tuvieron unos niveles de IL-10 más altos comparados con los casos, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Se sugiere la realización de estos experimentos con una muestra mayor de casos y controles con el propósito de obtener unas medias de niveles de IL-10 propias de una muestra representativa para esta población de estudio al observarse la alta variabilidad de los niveles de IL-10 en los individuos de cada grupo, los cuales fueron pocos para efecto de este estudio de tipo exploratorio.

Con respecto a las mediciones de los niveles de citoquinas mediante CBA, los niveles de IL-10 también mantuvieron una tendencia a ser más altos en el grupo control para las dos condiciones estudiadas, así como también se observó una tendencia en ambos grupos de una mayor inducción de IL-10 para la condición estimulada con rAI-CPI + CpG comparada con la condición estimulada con CpG solamente. Las diferencias anteriores no alcanzaron una significancia estadística. En cuanto a los niveles de IL-6, una citoquina proinflamatoria asociada con la fisiopatología de la AR, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las comparaciones. El CpG es conocido por ser un fuerte inductor de IL-6 en linfocitos B (121), por lo que es recomendable la determinación de los niveles de IL-6 con rAI-CPI solamente.

La reducción significativa en el marcador de superficie CD25 en los linfocitos B de donadores sanos en la condición estimulada con rAI-CPI + CpG comparada con CpG solamente ($p=0.037$) podría sugerir un papel inmunorregulador por parte de rAI-CPI. Si bien el marcador CD25 hace parte de un subtipo de linfocito B regulador, por sí mismo constituye un marcador de activación de linfocitos B. Los linfocitos B CD25⁺ han demostrado tener un papel importante en la activación de linfocitos T, maduración de linfocitos B y su expresión se ha visto incrementada ante la exposición de agonistas de TLRs, como CpG, lo que sugiere un papel importante en la defensa temprana contra agentes microbianos (122). Desde este punto de vista, la disminución de CD25 en presencia de un fuerte agonista de TLR-9 podría sugerir cierto tipo de inmunorregulación en este subtipo de linfocito B.

Existe evidencia de que los linfocitos B tienen un papel inmunorregulador en enfermedades autoinmunes como la AR mediante la producción de IL-10 (18,19). La infección y exposición a compuestos parasitarios ha demostrado un aumento de linfocitos B productores de IL-10 (123,124). Este aumento también se ha visto en linfocitos B1a IgM⁺ en asociación a atenuación de síntomas de colitis en un modelo experimental expuesto a la cistatina de *Bruyia Malayi*. Los datos anteriores sugieren que la inmunorregulación parasitaria podría estar siendo alcanzada mediante la inducción de

linfocitos B de tipo regulador. Considerando que rAI-CPI podría ejercer efectos directos sobre otras poblaciones celulares debido a que ha demostrado inhibir la proliferación de linfocitos T CD3⁺CD4⁺ (118), no se descarta la posibilidad que la cistatina de *A. Lumbricoides* ejerza inmunomodulación mediante la generación de linfocitos B reguladores.

9. CONCLUSIONES

- La concentración 1 μ M de rAI-CPI es citotóxica para los linfocitos B.
- La inducción de IL-10 en cultivos de linfocitos B purificados por selección magnética debe comprobarse con métodos de purificación más exigentes dado que no se pudo demostrar por tinción de IL-10 intracelular dicho efecto inductor.
- No se encontraron diferencias en los niveles de IL-10 inducidos por rAI-CPI 0.1 μ M entre pacientes con AR y controles.

10. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Para evaluar los efectos de rAI-CPI sobre los linfocitos B de pacientes con AR es necesario aumentar el número de individuos participantes para realizar comparaciones con una muestra significativa de esta población.
- Evaluar la actividad funcional de los linfocitos B previamente estimulados con rAI-CPI en cocultivos con linfocitos T midiendo la expresión de marcadores reguladores de linfocitos T (FOXP3).
- Evaluar los niveles de expresión de moléculas coestimuladoras CD80, CD86, PD-L1 y PD-L2 en linfocitos B estimulados con rAI-CPI para determinar una actividad de inmunorregulación mediada por contacto.

- Realizar la medición de otros marcadores de superficie para linfocitos B de fenotipo regulador reportados en la literatura (CD24, CD38, CD27) posterior a la estimulación con rAI-CPI.
- Se sugiere la realización de estos experimentos con otras técnicas de purificación de linfocitos B como *cell sorting* para garantizar un mayor grado de pureza celular.

11. 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

12. CONFORMACIÓN Y TRAYECTORIA DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

Esta propuesta de investigación resulta de la línea de investigación Helmintiasis y Alergias del grupo Alergología Experimental e Inmunogenética, COL0000363, el cual se encuentra clasificado en la categoría A1 por Colciencias y el cual se encuentra avalado por la Universidad de Cartagena. Dirigido por el Doctor Luis Caraballo, este grupo de investigación tiene como fortalezas su capacidad en infraestructura física y de recurso humano para producir moléculas recombinantes con capacidad inmunorreguladora. Estas moléculas son sometidas a un proceso de caracterización, lo que permite conocer sus propiedades biológicas e inmunológicas, incluidas su alergenicidad y actividad alérgica. Las investigaciones derivadas de la línea Helmintiasis y Alergias han estudiado el impacto de la ascariasis sobre la respuesta inmunológica de las enfermedades crónicas inflamatorias (125–130). Los productos científicos derivados de esta vertiente investigativa, y de las otras líneas de investigación, han sido publicados en revistas de alto nivel de circulación internacional, así como también han sido citados por autores expertos en el campo de la inmunoparasitología y la alergología. Lo anterior ha

permitido que el Instituto de Investigaciones Inmunológicas se haya consolidado como un centro de referencia mundial y local en Alergología Experimental. En los inicios de la línea HelminCIAS y Alergias se demostró que el contacto con los componentes de *A. Lumbricoides* estaba asociado con la presentación y exacerbación de enfermedades alérgicas. Los estudios epidemiológicos llevados a cabo en un municipio de Bolívar determinaron la alta prevalencia de infección por *A. lumbricoides* en un valor poco más del 60% (131) y una asociación significativa con la presentación de asma (127). Aunque las helmintiasis constituyen un problema de salud pública en sí misma, la literatura ha descrito una faceta benéfica de las helmintiasis, las cuales pueden mediar un efecto protector frente a patologías inflamatorias mediadas por el sistema inmunológico, y dentro de las que se incluyen aquellas con componente autoinmunitario como la AR. La identificación, caracterización y producción a nivel recombinante de un producto de *A. Lumbricoides*, rAI-CPI, y su posterior aplicación sobre modelos de colitis y asma experimental, demostró la actividad antiinflamatoria de este producto en los modelos de inflamación usados por *Coronado et al.* (105,109). Ahora, en esta línea de investigación, se está investigando si rAI-CPI tiene mayores capacidades inmunorreguladoras, en el sentido de si el producto parasitario puede actuar sobre otro tipo de células involucradas en la fisiopatología de la artritis. Cabe resaltar que los estudios de los productos con capacidad inmunorreguladora en el Instituto de Investigaciones Inmunológicas derivaron de los estudios de los alérgenos y su influencia en la presentación de las enfermedades alérgicas, en especial en las del Trópico (132). Paralelamente, en el Instituto de Investigaciones Inmunológicas se realizan otras investigaciones relacionadas con las alergias, desde el punto de vista clínico, experimental e inmunogenético (133–138), lo que refleja una constante actividad científica.

13. REFERENCIAS

1. Alivernini S, Toluoso B, Fedele AL, Di Mario C, Ferraccioli G, Gremese E. The B side of rheumatoid arthritis pathogenesis. *Pharmacol Res.* 2019 Nov;149(July):104465.
2. Caraballo L, Zakzuk J, Acevedo N. Helminth-derived cystatins: The immunomodulatory properties of an *Ascaris lumbricoides* cystatin. *Parasitology.* 2021;148(14):1744–56.
3. Giannini D, Antonucci M, Petrelli F, Bilia S, Alunno A, Puxeddu I. One year in review 2020: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2020;38(3):387–97.
4. Rodríguez Cantillo J, López Crespo J, Polo Ibarra J, Moreno Grau Á, Alvis Guzmán N, Zakzuk Sierra J. Medición de la calidad de vida de pacientes con artritis reumatoide atendidos en el Hospital Universitario del Caribe, Bolívar, Colombia. *Rev Ciencias Biomédicas.* 2021;10(4):246–55.
5. Martinec R. Quality of Life in Patients with Rheumatoid Arthritis – a Preliminary Study. *Acta Clin Croat.* 2019;58(1):157–66.
6. Huscher D, Mittendorf T, von Hinüber U, Kötter I, Hoese G, Pfäfflin A, et al. Evolution of cost structures in rheumatoid arthritis over the past decade. *Ann Rheum Dis.* 2015 Apr;74(4):738–45.
7. Gierut A, Perlman H, Pope RM. Innate Immunity and Rheumatoid Arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2010 May;36(2):271–96.
8. Klareskog L, Amara K, Malmström V. Adaptive immunity in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2014 Jan;26(1):72–9.
9. Aletaha D, Funovits J, Smolen JS. Physical disability in rheumatoid arthritis is associated with cartilage damage rather than bone destruction. *Ann Rheum Dis.* 2011 May 1;70(5):733–9.
10. Kay J, Upchurch KS. ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. *Rheumatology.* 2012 Dec 1;51(suppl 6):vi5–9.
11. Nakayamada S, Kubo S, Yoshikawa M, Miyazaki Y, Yunoue N, Iwata S, et al. Differential effects of biological DMARDs on peripheral immune cell phenotypes in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2018 Jan 1;57(1):164–74.
12. Al-Zifzaf DS, El Bakry SA, Mamdouh R, Shawarby LA, Ghaffar AYA, Amer HA, et al. FoxP3+T regulatory cells in Rheumatoid arthritis and the imbalance of the Treg/TH17 cytokine axis. *Egypt Rheumatol.* 2015 Jan;37(1):7–15.
13. Alunno A, Manetti M, Caterbi S, Ibba-Manneschi L, Bistoni O, Bartoloni E, et al. Altered Immunoregulation in Rheumatoid Arthritis: The Role of Regulatory T Cells and Proinflammatory Th17 Cells and Therapeutic Implications. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:1–12.
14. Ummano D. Defective IL-10-producing Breg cells. *Nat Rev Rheumatol.* 2017 Mar 2;13(3):132–132.
15. Matsushita T. Regulatory and effector B cells: Friends or foes? *J Dermatol Sci.* 2019 Jan;93(1):2–7.
16. Wolf SD, Dittel BN, Hardardottir F, Janeway CA. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Induction in Genetically B Cell-deficient Mice. *J Exp Med.* 1996 Dec 1;184(6):2271–8.
17. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. Chronic Intestinal Inflammatory Condition Generates IL-10-Producing Regulatory B Cell Subset Characterized by CD1d Upregulation. *Immunity.* 2002 Feb;16(2):219–30.
18. Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol.* 2002 Oct 3;3(10):944–50.
19. Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of Arthritis by Interleukin 10-producing B Cells. *J Exp Med.* 2003 Feb 17;197(4):489–501.

20. Mizoguchi A, Bhan AK. A Case for Regulatory B Cells. *J Immunol*. 2006 Jan 15;176(2):705–10.
21. Gray M, Miles K, Salter D, Gray D, Savill J. Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2007 Aug 28;104(35):14080–5.
22. Carter NA, Vasconcellos R, Rosser EC, Tulone C, Muñoz-Suano A, Kamanaka M, et al. Mice Lacking Endogenous IL-10–Producing Regulatory B Cells Develop Exacerbated Disease and Present with an Increased Frequency of Th1/Th17 but a Decrease in Regulatory T Cells. *J Immunol*. 2011 May 15;186(10):5569–79.
23. Sun J-B, Flach C-F, Czerkinsky C, Holmgren J. B Lymphocytes Promote Expansion of Regulatory T Cells in Oral Tolerance: Powerful Induction by Antigen Coupled to Cholera Toxin B Subunit. *J Immunol*. 2008 Dec 15;181(12):8278–87.
24. Tadmor T, Zhang Y, Cho H-M, Podack ER, Rosenblatt JD. The absence of B lymphocytes reduces the number and function of T-regulatory cells and enhances the anti-tumor response in a murine tumor model. *Cancer Immunol Immunother*. 2011 May 21;60(5):609–19.
25. 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 Dec;41(6):1040–51.
26. Ray A, Dittel B. Mechanisms of Regulatory B cell Function in Autoimmune and Inflammatory Diseases beyond IL-10. *J Clin Med*. 2017 Jan 23;6(1):12.
27. Braza F, Chesne J, Castagnet S, Magnan A, Brouard S. Regulatory functions of B cells in allergic diseases. *Allergy*. 2014 Nov;69(11):1454–63.
28. Zhang Y, Gallastegui N, Rosenblatt JD. Regulatory B cells in anti-tumor immunity. *Int Immunol*. 2015 Oct;27(10):521–30.
29. Wortel C, Heidt S. Regulatory B cells: Phenotype, function and role in transplantation. *Transpl Immunol*. 2017 Mar;41:1–9.
30. Shen P, Fillatreau S. Suppressive functions of B cells in infectious diseases. *Int Immunol*. 2015 Oct;27(10):513–9.
31. Mauri C, Bosma A. Immune Regulatory Function of B Cells. *Annu Rev Immunol*. 2012 Apr 23;30(1):221–41.
32. Shen P, Fillatreau S. Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. *Nat Rev Immunol*. 2015 Jul 12;15(7):441–51.
33. Baba Y, Matsumoto M, Kurosaki T. Signals controlling the development and activity of regulatory B-lineage cells. *Int Immunol*. 2015 Oct;27(10):487–93.
34. Fillatreau S. Natural regulatory plasma cells. *Curr Opin Immunol*. 2018 Dec;55:62–6.
35. Rudensky AY. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev*. 2011 May;241(1):260–8.
36. Lampropoulou V, Hoehlig K, Roch T, Neves P, Gómez EC, Sweenie CH, et al. TLR-Activated B Cells Suppress T Cell-Mediated Autoimmunity. *J Immunol*. 2008 Apr 1;180(7):4763–73.
37. Yanaba K, Bouaziz J-D, Matsushita T, Tsubata T, Tedder TF. The Development and Function of Regulatory B Cells Expressing IL-10 (B10 Cells) Requires Antigen Receptor Diversity and TLR Signals. *J Immunol*. 2009 Jun 15;182(12):7459–72.
38. Giordani L, Sanchez M, Libri I, Quaranta MG, Mattioli B, Viora M. IFN- α amplifies human naïve B cell TLR-9-mediated activation and Ig production. *J Leukoc Biol*. 2009 Aug;86(2):261–71.
39. Yang M, Sun L, Wang S, Ko K-H, Xu H, Zheng B-J, et al. Cutting Edge: Novel Function of B Cell-Activating Factor in the Induction of IL-10–Producing Regulatory B Cells. *J Immunol*. 2010 Apr 1;184(7):3321–5.
40. Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, Matsushita T, Horikawa M, Kountikov EI, et al. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature*. 2012 Nov 14;491(7423):264–8.

41. Rosser EC, Oleinika K, Tonon S, Doyle R, Bosma A, Carter NA, et al. Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1 β and interleukin-6 production. *Nat Med*. 2014 Nov 19;20(11):1334–9.
42. Wang R-X, Yu C-R, Dambuza IM, Mahdi RM, Dolinska MB, Sergeev Y V., et al. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat Med*. 2014 Jun 17;20(6):633–41.
43. Baba Y, Saito Y, Kotetsu Y. Heterogeneous subsets of B-lineage regulatory cells (Breg cells). *Int Immunol*. 2020 Mar 7;32(3):155–62.
44. Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz J-D, Fujimoto M, Tedder TF. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest*. 2008 Sep 18;118(10):3420–30.
45. Meng X, Grötsch B, Luo Y, Knaup KX, Wiesener MS, Chen X-X, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α is a critical transcription factor for IL-10-producing B cells in autoimmune disease. *Nat Commun*. 2018 Dec 17;9(1):251.
46. 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. Rieux-Laucat F, editor. *PLoS One*. 2014 Feb 14;9(2):e88441.
47. Hussain S, Delovitch TL. Intravenous Transfusion of BCR-Activated B Cells Protects NOD Mice from Type 1 Diabetes in an IL-10-Dependent Manner. *J Immunol*. 2007 Dec 1;179(11):7225–32.
48. Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ, Ehrenstein MR, et al. Novel Suppressive Function of Transitional 2 B Cells in Experimental Arthritis. *J Immunol*. 2007 Jun 15;178(12):7868–78.
49. Xiao S, Brooks CR, Sobel RA, Kuchroo VK. Tim-1 Is Essential for Induction and Maintenance of IL-10 in Regulatory B Cells and Their Regulation of Tissue Inflammation. *J Immunol*. 2015 Feb 15;194(4):1602–8.
50. Rafei M, Hsieh J, Zehntner S, Li M, Forner K, Birman E, et al. A granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-15 fusokine induces a regulatory B cell population with immune suppressive properties. *Nat Med*. 2009 Sep 9;15(9):1038–45.
51. 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.
52. 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.
53. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity*. 2010 Jan;32(1):129–40.
54. 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. *Sci Transl Med*. 2013 Feb 20;5(173):173ra23-173ra23.
55. Díaz-Alderete A, Crispin JC, Inés Vargas-Rojas M, Alcocer-Varela J. IL-10 production in B cells is confined to CD154+ cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun*. 2004 Dec;23(4):379–83.
56. Tian J, Zekzer D, Hanssen L, Lu Y, Olcott A, Kaufman DL. Lipopolysaccharide-Activated B Cells Down-Regulate Th1 Immunity and Prevent Autoimmune Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. *J Immunol*. 2001 Jul 15;167(2):1081–9.
57. Kessel A, Haj T, Peri R, Snir A, Melamed D, Sabo E, et al. Human CD19+CD25high B regulatory cells suppress proliferation of CD4+ T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmun Rev*. 2012 Jul;11(9):670–7.
58. 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 Mar 23;507(7492):366–70.
59. Allen JE, Maizels RM. Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat Rev Immunol*. 2011 Jun 25;11(6):375–88.
60. van Riet E, Hartgers FC, Yazdanbakhsh M. Chronic helminth infections induce immunomodulation: Consequences and

mechanisms. *Immunobiology*. 2007 Jun;212(6):475–90.

61. Figueiredo CA, Barreto ML, Rodrigues LC, Cooper PJ, Silva NB, Amorim LD, et al. Chronic Intestinal Helminth Infections Are Associated with Immune Hyporesponsiveness and Induction of a Regulatory Network. *Infect Immun*. 2010 Jul;78(7):3160–7.
62. Maizels RM, Yazdanbakhsh M. Immune Regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol*. 2003 Sep;3(9):733–44.
63. Malhotra I, Ouma JH, Wamachi A, Kioko J, Mungai P, Njzovu M, et al. Influence of Maternal Filariasis on Childhood Infection and Immunity to *Wuchereria bancrofti* in Kenya. *Infect Immun*. 2003 Sep;71(9):5231–7.
64. Mahanty S, Mollis SN, Ravichandran M, Abrams JS, Kumaraswami V, Jayaraman K, et al. High Levels of Spontaneous and Parasite Antigen-Driven Interleukin-10 Production Are Associated with Antigen-Specific Hyporesponsiveness in Human Lymphatic Filariasis. *J Infect Dis*. 1996 Mar 1;173(3):769–72.
65. Babu S, Bhat SQ, Pavan Kumar N, Lipira AB, Kumar S, Karthik C, et al. Filarial Lymphedema Is Characterized by Antigen-Specific Th1 and Th17 Proinflammatory Responses and a Lack of Regulatory T Cells. Fujiwara RT, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009 Apr 21;3(4):e420.
66. McSorley HJ, Maizels RM. Helminth Infections and Host Immune Regulation. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Oct 1;25(4):585–608.
67. Caraballo L, Acevedo N, Zakzuk J. Ascariasis as a model to study the helminth/allergy relationships. *Parasite Immunol*. 2019 Jun 6;41(6):e12595.
68. Smallwood TB, Giacomini PR, Loukas A, Mulvenna JP, Clark RJ, Miles JJ. Helminth immunomodulation in autoimmune disease. *Front Immunol*. 2017;8(APR).
69. Hewitson JP, Grainger JR, Maizels RM. Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol Biochem Parasitol*. 2009 Sep;167(1):1–11.
70. Coakley G, Maizels RM, Buck AH. Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections. *Trends Parasitol*. 2015 Oct;31(10):477–89.
71. Coakley G, Buck AH, Maizels RM. Host parasite communications—Messages from helminths for the immune system. *Mol Biochem Parasitol*. 2016 Jul;208(1):33–40.
72. Smits HH, Hammad H, van Nimwegen M, Soullie T, Willart MA, Lievers E, et al. Protective effect of *Schistosoma mansoni* infection on allergic airway inflammation depends on the intensity and chronicity of infection. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Oct;120(4):932–40.
73. Wilson MS, Taylor MD, O’Gorman MT, Balic A, Barr TA, Filbey K, et al. Helminth-induced CD19+CD23hi B cells modulate experimental allergic and autoimmune inflammation. *Eur J Immunol*. 2010 Mar 19;40(6):1682–96.
74. Amu S, Saunders SP, Kronenberg M, Mangan NE, Atzberger A, Fallon PG. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(5):1114–1124.e8.
75. Mangan NE, Fallon RE, Smith P, van Rooijen N, McKenzie AN, Fallon PG. Helminth Infection Protects Mice from Anaphylaxis via IL-10-Producing B Cells. *J Immunol*. 2004 Nov 15;173(10):6346–56.
76. Correale J, Farez M, Razzitte G. Helminth infections associated with multiple sclerosis induce regulatory B cells. *Ann Neurol*. 2008;64(2):187–99.
77. Correale J, Farez M. Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2007 Feb;61(2):97–108.
78. Vray B, Hartmann S, Hoebeke J. Immunomodulatory properties of cystatins. *Cell Mol Life Sci*. 2002 Oct 1;59(9):1503–12.

79. Bird PI, Trapani JA, Villadangos JA. Endolysosomal proteases and their inhibitors in immunity. *Nat Rev Immunol.* 2009 Dec;9(12):871–82.
80. Prunk M, Perišić Nanut M, Sabotič J, Kos J. Cystatins, cysteine peptidase inhibitors, as regulators of immune cell cytotoxicity. *Period Biol.* 2017 Mar 17;118(4):353–62.
81. Henskens YM, Veerman EC, Nieuw Amerongen A V. Review. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1996 Jan;377(2):71–120.
82. Turk B, Turk D, Turk V. Protease signalling: The cutting edge. *EMBO J.* 2012;31(7):1630–43.
83. Curtis MA, Aduse-Opoku J, Rangarajan M. Cysteine Proteases of *Porphyromonas Gingivalis*. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001 May 1;12(3):192–216.
84. Kocholaty W, Weil L, Smith L. Proteinase secretion and growth of *Clostridium histolyticum*. *Biochem J.* 1938;32(10):1685–90.
85. Kay J, Dunn BM. Viral proteinases: weakness in strength. *BBA - Gene Struct Expr.* 1990;1048(1):1–18.
86. Barrett AJ, Rawlings ND, Woesser JF. Cysteine peptidases. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. London: Academic Press; 1998. p. 543–798.
87. McKerrow JH, Sun E, Rosenthal PJ, Bouvier J. The Proteases and Pathogenicity of Parasitic Protozoa. *Annu Rev Microbiol.* 1993 Oct;47(1):821–53.
88. Barrett AJ, Fritz H, Grubb A, Isemura S, Järvinen M, Katunuma N, et al. Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. *Biochem J.* 1986 May 15;236(1):312–312.
89. Turk B, Krizaj I, Kralj B, Dolenc I, Popovic T, Bieth JG, et al. Bovine stefin C, a new member of the stefin family. *J Biol Chem.* 1993 Apr 5;268(10):7323–9.
90. Turk V, Bode W. The cystatins: Protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett.* 1991 Jul 1;285(2):213–9.
91. Rinne A, Dorn A, Järvinen M, Alavaikko M, Jokinen K, Hopsu-Havu VK. Immunoelectron microscopical location of the acid cysteine proteinase inhibitor in the lymphatic tissue of the tonsils. *Acta Histochem.* 1986 Jan;79(2):137–45.
92. Freije JP, Pendás AM, Velasco G, Roca A, Abrahamson M, López-Otín C. Localization of the human cystatin D gene (CST5) to chromosome 20p11.21 by in situ hybridization. *Cytogenet Genome Res.* 1993;62(1):29–31.
93. Ni J, Abrahamson M, Zhang M, Fernandez MA, Grubb A, Su J, et al. Cystatin E is a Novel Human Cysteine Proteinase Inhibitor with Structural Resemblance to Family 2 Cystatins. *J Biol Chem.* 1997 Apr;272(16):10853–8.
94. Sotiropoulou G, Anisowicz A, Sager R. Identification, Cloning, and Characterization of Cystatin M, a Novel Cysteine Proteinase Inhibitor, Down-regulated in Breast Cancer. *J Biol Chem.* 1997 Jan;272(2):903–10.
95. Manoury B, Gregory WF, Maizels RM, Watts C. Bm-CPI-2, a cystatin homolog secreted by the filarial parasite *Brugia malayi*, inhibits class II MHC-restricted antigen processing. *Curr Biol.* 2001 Mar;11(6):447–51.
96. Hartmann S, Lucius R. Modulation of host immune responses by nematode cystatins. *Int J Parasitol.* 2003 Sep;33(11):1291–302.
97. Fong D, Chan MM, Hsieh WT. Gene mapping of human cathepsins and cystatins. *Biomed Biochim Acta.* 1991;50(4–6):595–8.
98. Nakanishi S. Substance P precursor and kininogen: their structures, gene organizations, and regulation. *Physiol Rev.* 1987 Oct 1;67(4):1117–42.
99. Salvesen G, Parkes C, Abrahamson M, Grubb A, Barrett AJ. Human low-Mr kininogen contains three copies of a cystatin sequence that are divergent in structure and in inhibitory activity for cysteine proteinases. *Biochem J.* 1986 Mar 1;234(2):429–34.

100. DeLa Cadena RA, Colman RW. Structure and functions of human kininogens. *Trends Pharmacol Sci.* 1991 Jan;12(C):272–5.
101. Hall A, Dalboge H, Grubb A, Abrahamson M. Importance of the evolutionarily conserved glycine residue in the N-terminal region of human cystatin C (Gly-11) for cysteine endopeptidase inhibition. *Biochem J.* 1993;291(1):123–9.
102. AUERSWALD EA, GENENGER G, ASSFALG-MACHLEIDT I, MACHLEIDT W, ENGH RA, FRITZ H. Recombinant chicken egg white cystatin variants of the QLVSG region. *Eur J Biochem.* 1992 Nov;209(3):837–45.
103. Josiah Ochieng, Gautam Chaudhuri. Cystatin Superfamily. *J Health Care Poor Underserved.* 2010;21(1A):51–70.
104. Liu J, Svård SG, Klotz C. *Giardia intestinalis* cystatin is a potent inhibitor of papain, parasite cysteine proteases and, to a lesser extent, human cathepsin B. *FEBS Lett.* 2019 Jun 22;593(12):1313–25.
105. Coronado S, Zakzuk J, Regino R, Ahumada V, Benedetti I, Angelina A, et al. *Ascaris lumbricoides* Cystatin Prevents Development of Allergic Airway Inflammation in a Mouse Model. *Front Immunol.* 2019 Sep 27;10(SEP).
106. Schönemeyer A, Lucius R, Sonnenburg B, Brattig N, Sabat R, Schilling K, et al. Modulation of Human T Cell Responses and Macrophage Functions by Onchocystatin, a Secreted Protein of the Filarial Nematode *Onchocerca volvulus*. *J Immunol.* 2001 Sep 15;167(6):3207–15.
107. Sun Y, Liu G, Li Z, Chen Y, Liu Y, Liu B, et al. Modulation of dendritic cell function and immune response by cysteine protease inhibitor from murine nematode parasite *Heligmosomoides polygyrus*. *Immunology.* 2013 Apr;138(4):370–81.
108. Venugopal G, Mueller M, Hartmann S, Steinfeld S. Differential immunomodulation in human monocytes versus macrophages by filarial cystatin. Sharma J, editor. *PLoS One.* 2017 Nov 15;12(11):e0188138.
109. Coronado S, Barrios L, Zakzuk J, Regino R, Ahumada V, Franco L, et al. A recombinant cystatin from *Ascaris lumbricoides* attenuates inflammation of DSS-induced colitis. *Parasite Immunol.* 2017 Apr;39(4):e12425.
110. Dainichi T, Maekawa Y, Ishii K, Zhang T, Nashed BF, Sakai T, et al. Nippocystatin, a Cysteine Protease Inhibitor from *Nippostrongylus brasiliensis*, Inhibits Antigen Processing and Modulates Antigen-Specific Immune Response. Petri WA, editor. *Infect Immun.* 2001 Dec 1;69(12):7380–6.
111. Kobpornchai P, Flynn RJ, Reamtong O, Rittisoonthorn N, Kosoltanapiwat N, Boonnak K, et al. A novel cystatin derived from *Trichinella spiralis* suppresses macrophage-mediated inflammatory responses. Hübner MP, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020 Apr 1;14(4):e0008192.
112. Bisht N, Khatri V, Chauhan N, Kalyanasundaram R. Cystatin from Filarial Parasites Suppress the Clinical Symptoms and Pathology of Experimentally Induced Colitis in Mice by Inducing T-Regulatory Cells, B1-Cells, and Alternatively Activated Macrophages. *Biomedicine.* 2019 Oct 31;7(4):85.
113. Kiyohara H, Sujino T, Teratani T, Miyamoto K, Arai MM, Nomura E, et al. Toll-Like Receptor 7 Agonist-Induced Dermatitis Causes Severe Dextran Sulfate Sodium Colitis by Altering the Gut Microbiome and Immune Cells. *Cmgh.* 2019;7(1):135–56.
114. Preisker S, Brethack A-K, Bokemeyer A, Bettenworth D, Sina C, Derer S. Crohn's Disease Patients in Remission Display an Enhanced Intestinal IgM+ B Cell Count in Concert with a Strong Activation of the Intestinal Complement System. *Cells.* 2019 Jan 21;8(1):78.
115. Yadav RSP, Khatri V, Amdare N, Goswami K, Shivkumar VB, Gangane N, et al. Immuno-Modulatory Effect and Therapeutic Potential of *Brugia malayi* Cystatin in Experimentally Induced Arthritis. *Indian J Clin Biochem.* 2016 Apr 23;31(2):203–8.
116. Liu F, Cheng W, Pappoe F, Hu X, Wen H, Luo Q, et al. *Schistosoma japonicum* cystatin attenuates murine collagen-induced arthritis. *Parasitol Res.* 2016 Oct 8;115(10):3795–806.
117. Lopez Crespo J. Efecto de las parasitosis intestinales en la presentación y severidad de artritis reumatoide y su impacto en linfocitos T y B reguladores. Universidad de Cartagena; 2019.

118. Lozano Mendoza A. Evaluación de los efectos inmunomoduladores de la cistatina de *Ascaris lumbricoides* sobre poblaciones celulares humanas. Universidad de Cartagena; 2019.
119. Koopman G, Reutelingsperger CPM, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Pals ST, Van Oers MHJ. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994;84(5):1415–20.
120. Mielle J, Audo R, Hahne M, Macia L, Combe B, Morel J, et al. IL-10 producing B cells ability to induce regulatory T cells is maintained in rheumatoid arthritis. *Front Immunol*. 2018;9(MAY):1–11.
121. Hanten JA, Vasilakos JP, Riter CL, Neys L, Lipson KE, Alkan SS, et al. Comparison of human B cell activation by TLR7 and TLR9 agonists. *BMC Immunol*. 2008;9:1–15.
122. Brisslert M, Bokarewa M, Larsson P, Wing K, Vincent L, Tarkowski A. Phenotypic and functional characterization of human CD 25 + B cells.
123. Wilson EH, Katz E, Goodridge HS, Harnett MM, Harnett W. In vivo activation of murine peritoneal B1 cells by the filarial nematode phosphorylcholine-containing glycoprotein ES-62. *Parasite Immunol*. 2003;25(8–9):463–6.
124. Harnett W, McInnes IB, Harnett MM. ES-62, a filarial nematode-derived immunomodulator with anti-inflammatory potential. *Immunol Lett*. 2004;94(1–2):27–33.
125. Zakzuk J, Mercado D, Bornacelly A, Sánchez J, Ahumada V, Acevedo N, et al. Hygienic conditions influence sensitization to *Blomia tropicalis* allergenic components: Results from the FRAAT birth cohort. *Pediatr Allergy Immunol*. 2019;30(2):172–8.
126. Zakzuk J. Imunorregulação induzida por helmintos: Uma atualização. *Iatreia*. 2016;29(2):182–93.
127. Buendía E, Zakzuk J, Mercado D, Alvarez A, Caraballo L. The IgE response to *Ascaris* molecular components is associated with clinical indicators of asthma severity. *World Allergy Organ J*. 2015;8(1):8.
128. Caraballo L, Acevedo N. New Allergens of Relevance in Tropical Regions: The Impact of *Ascaris lumbricoides* Infections. *World Allergy Organ J*. 2011;4(5):77–84.
129. 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. *World Allergy Organ J*. 2013;6(1):3.
130. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med*. 2002 Sep;347(12):911–20.
131. 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 Trop*. 2018 Nov;187(August 2017):1–4.
132. Caraballo L, Zakzuk J, Lee BW, Acevedo N, Soh JY, Sánchez-Borges M, et al. Particularities of allergy in the Tropics. *World Allergy Organ J*. 2016;9(1):1–44.
133. Caraballo L, Valenta R, Puerta L, Pomés A, Zakzuk J, Fernandez-Caldas E, et al. The allergenic activity and clinical impact of individual IgE-antibody binding molecules from indoor allergen sources. *World Allergy Organ J*. 2020 May;13(5):100118.
134. Martínez B, Simão F, Gomes V, Nguidi M, Amorim A, Carvalho EF, et al. Searching for the roots of the first free African American community. *Sci Rep*. 2020 Dec 26;10(1):20634.
135. Acevedo N, Benfeitas R, Katayama S, Bruhn S, Andersson A, Wikberg G, et al. Epigenetic alterations in skin homing CD4+CLA+ T cells of atopic dermatitis patients. *Sci Rep*. 2020 Dec 22;10(1):18020.
136. Ahumada V, Zakzuk J, Coronado S, Aglaz L, Araujo G, Briza P, et al. Identification of a new, no cross-reacting allergen from *Ascaris lumbricoides*. *World Allergy Organ J*. 2020 Aug;13(8):100400.
137. Ahumada V, Manotas M, Zakzuk J, Aglas L, Coronado S, Briza P, et al. Identification and Physicochemical Characterization of a New Allergen from *Ascaris lumbricoides*. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 21;21(24):9761.

138. Lozano A, Zakzuk J, Caraballo L. Characterization of the allergenic properties of a pi-class glutathione transferase from *Ascaris suum*. *World Allergy Organ J.* 2020 Aug;13(8):100399.

14. 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: jzakzuku@unicartagena.edu.co,
lcaraballog@unicartagena.edu.co y 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. Formulario de identificación de características sociodemográficas para parasitosis intestinales

Formulario de identificación de factores de riesgo sociodemográficos para parasitosis intestinales.

1. Fecha: DD/MM/AAAA	2. Nombre del Encuestador: _	3. Número de 4. encuesta:__	
5. DATOS DE IDENTIFICACIÓN			
6. 1. Nombre del adulto: _____	7. 2. Fecha de nacimiento: DD/MM/AAAA	8. 3. Género: F _____ M _____	
9. 4. Municipio:	10. 5. Dirección:	11. 6. Teléfono	12. 7. Estrato: 13.
14. 8. Nivel de escolaridad: 15. Ninguna ___ Primaria incompleta ___ Primaria completa ___ Secundaria incompleta ___ Secundaria completa ___ Técnico o Tecnólogo _ Universitario ___ Postgrado _____			
16. 9. Ocupación: 17. Empleador _ Trabajador independiente _____ ¿En qué? _____ Trabajador asalariado ___ Jubilado _____ Desempleado _		18. 10. Cuánto es el ingreso total mensual del hogar: 19. \$ __	
20. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA VIVIENDA			
21. 11. ¿De qué material está construida la casa? 22. Bloque, ladrillo, piedra. Madera pulida _____ Tapia pisada, adobe ___ Bahareque revocado ___ Bahareque sin revocar _ Madera burda, tabla, tablón ___ Material prefabricado _____ Guadua, caña. Esterilla, otro vegetal _____ Zinc, tela, carbón, latas, desechos, plástico _____			

23. Sin paredes_____			
24. 12. Material predominante en el piso de la casa:			
25. Alfombra o tapete de pared a pared_____Madera pulida y lacada, parqué_____ Baldosa, vinilo, tableta, ladrillo___Mármol_____ Madera burda, tabla, tablón, otro vegetal___cemento, gravilla____Tierra, arena___ Otro, ¿Cuál? _____			
26. 13. Tipo de Techo: Eternit_Zinc___Palma_Madera_____ Otro, ¿Cuál? ___			
27. 14. ¿La casa está sobre una avenida principal? Sí_____No____	29. 15. ¿La calle está pavimentada?	31. 16. ¿Hay agua estancada en los alrededores?	34. 17. ¿Son permanentes? Sí No
28. Observación:	30. Sí__No____	32. Sí__No____	35. ¿Cuánto demora en secarse los depósitos?
		33. Si la respuesta es "no", salte a la pregunta 18.	
36. 18. ¿Hay caños pluviales? Sí_____No____		37. 19. ¿Tiene acceso a los caños pluviales? Sí_____No____	
38. CONDICIONES SANITARIAS			
39. 20. Número de adultos que viven en la casa:	40. 21. Número de niños que viven en la casa:_____ Edades: _____	41. 22. Número de habitaciones que tiene la casa:	
42. 23. Número de personas que duermen por habitación:	43. 24. ¿La familia vive en una sola pieza? Sí_____No____	44. 25. ¿Tiene servicio de acueducto? Sí_____No____	
		45. ¿Desde hace cuánto tiempo? _____	
46. 26. ¿Almacena agua de consumo en tanques? Sí_____No____	47. 27. ¿Cada cuánto lava los tanques?	48. 28. ¿Dónde ubica el tanque de almacenamiento?	
		49.	

50. 29. ¿De dónde obtiene el hogar, el agua para beber o preparar alimentos?

51. Acueducto público_ Acueducto comunal o vereda__Pozo con bomba_____Pozo sin bomba, jagüey
___Agua lluvia_____ Rio, quebrada, manantial, nacimiento_Pila pública___Carro tanque__Aguatero
___Agua embotellada o en bolsa__

FORMULARIO DE IDENTIFICACION DE FACTORES DE RIESGO SOCIODEMOGRÁFICOS PARA PARASITOSIS INTESTINALES

52. 30. ¿Cómo eliminan la basura en esta vivienda?

53. La recoge el servicio del aseo_____¿Cada cuánto tiempo?_La tiran a un rio, quebrada, caño o laguna _____

54. La tiran a un patio, lote, zanja o baldío___La entierran___¿Qué tan lejos?_____La queman___La recoge un
servicio informal___ La eliminan de otra forma_¿Cuál?_____

55. HÁBITOS HIGIÉNICOS

56. 31. ¿Con qué frecuencia
hierva usted el agua que
consume?

57. Siempre_____Casi
siempre___Algunas veces
___Casi nunca___Nunca_

58. 32. ¿Con qué frecuencia se Lava las
manos antes de preparar los
alimentos?

59. Siempre__Casi siempre__Algunas
veces_____Casi nunca___
___Nunca_

60. 33. ¿Con qué frecuencia lava los
alimentos antes de consumirlos?

61. Siempre___Casi siempre___Algunas
veces_____Casi nunca_____
___Nunca_

62. 34. ¿Su familia usa papel sanitario luego
de defecar? Sí_____No_____

63. 35. ¿Con qué frecuencia se lava las manos luego de ir al baño?

64. Siempre___Casi siempre___Algunas veces_Casi nunca___Nunca_

65. 36. ¿Dónde preparan los alimentos en este hogar?

66. En un cuarto usado sólo para cocinar_____ En un cuarto usado también para dormir_____
En una sala comedor con lava-platos_____ En una sala comedor sin lava-platos_____En un
patio, corredor, enramada o al aire libre_____No preparan alimentos en la vivienda _

67. ANTECEDENTES DE ENFERMEDADES PARASITARIAS

<p>68. 37. ¿Ha expulsado algún parásito?</p> <p>69. Sí__No____ ¿Cuántas veces?____¿Cuándo fue la última vez?_____</p>	<p>70. 38. ¿Le ha dado algún tratamiento?</p> <p>71. Sí__No____</p> <p>72. Si la respuesta es “no” salte a la pregunta 41.</p>	<p>73. 39. ¿Qué medicamentos usó?</p> <p>74.</p>
<p>75. 40. ¿Cuántas veces ha tomado antiparasitarios en el último año?</p>	<p>76. 41. ¿Cuántos coprológicos se ha hecho en el último año?</p>	<p>77. 42. ¿Cuándo se hizo el último coprológico?</p> <p>78. 79.</p>
<p>80. 43. ¿Cuál fue el resultado de los coprológicos anteriores?</p>		

Anexo 3. Paneles de marcadores celulares

Panel CD5/CD1d/CD71/CD73/CD25

	Marcador	Fluorocromo	Empresa	Referencia
<i>Superficie</i>	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
	CD1d	PE	BD Pharmingen	550255
<i>Intracelular</i>	IL-10	PECy7	eBioscience	25-7108-42
	Viabilidad	APC-Cy7	e-bioscience	65-0865-14

Panel Anexina, Yoduro de Propidio, FVD

	Marcador	Fluorocromo	Empresa	Referencia
	Anexina	FITC	eBioscience	BMS500FI-20
	Yoduro de Propidio	Texas Red	eBioscience	BMS500FI-20
	Viabilidad	APC-Cy7	e-bioscience	65-0865-14

Anexo 4. Aprobación Comité de Ética en Investigaciones de la Universidad de Cartagena



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
web: www.unicartagena.edu.co
Cartagena de Indias, D.T. y C. – Colombia

Anexo 5. Figuras suplementarias

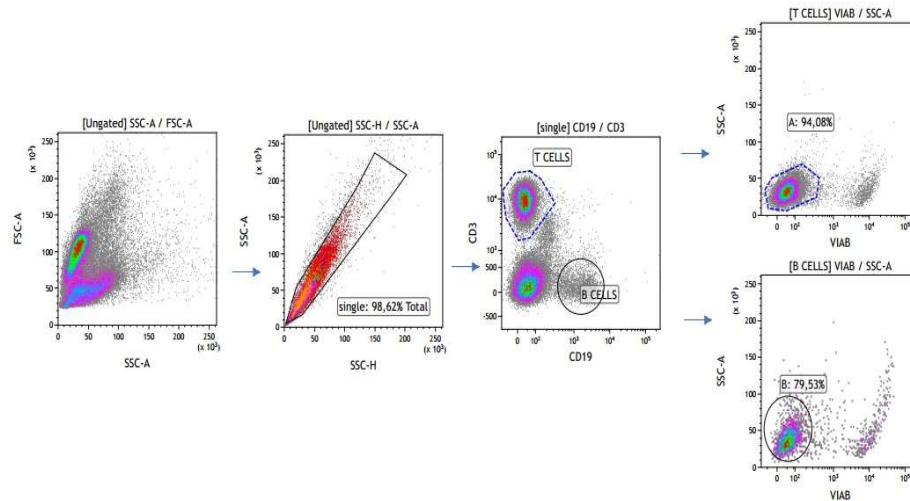


Figura S1. Estrategia de gating para identificación de linfocitos T y B viables mediante FVD. Del total de eventos se seleccionaron las poblaciones que cumplían con los parámetros morfológicos y de complejidad (SSC y FSC) de los linfocitos. Después se identificaron las subpoblaciones de linfocitos T y B mediante los marcadores de superficie CD3 y CD19, respectivamente. Finalmente se comprobó el marcador de viabilidad FVD en estas subpoblaciones.

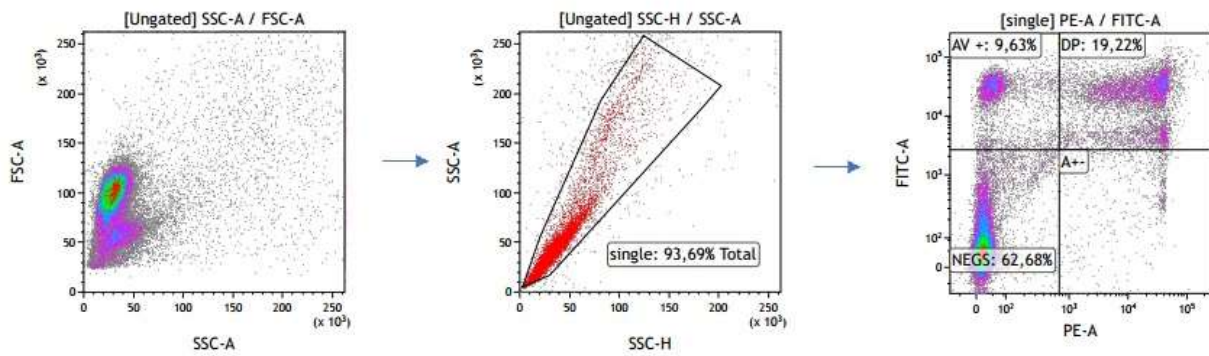


Figura S2. Estrategia de gating para identificación de linfocitos viables mediante anexina y yoduro de propidio. Del total de eventos se seleccionaron las poblaciones que cumplieran con los parámetros morfológicos y de complejidad (SSC y FSC) de los linfocitos. Después se comprobó el marcador de viabilidad anexinaV-FITC y yoduro de propidio (PE).

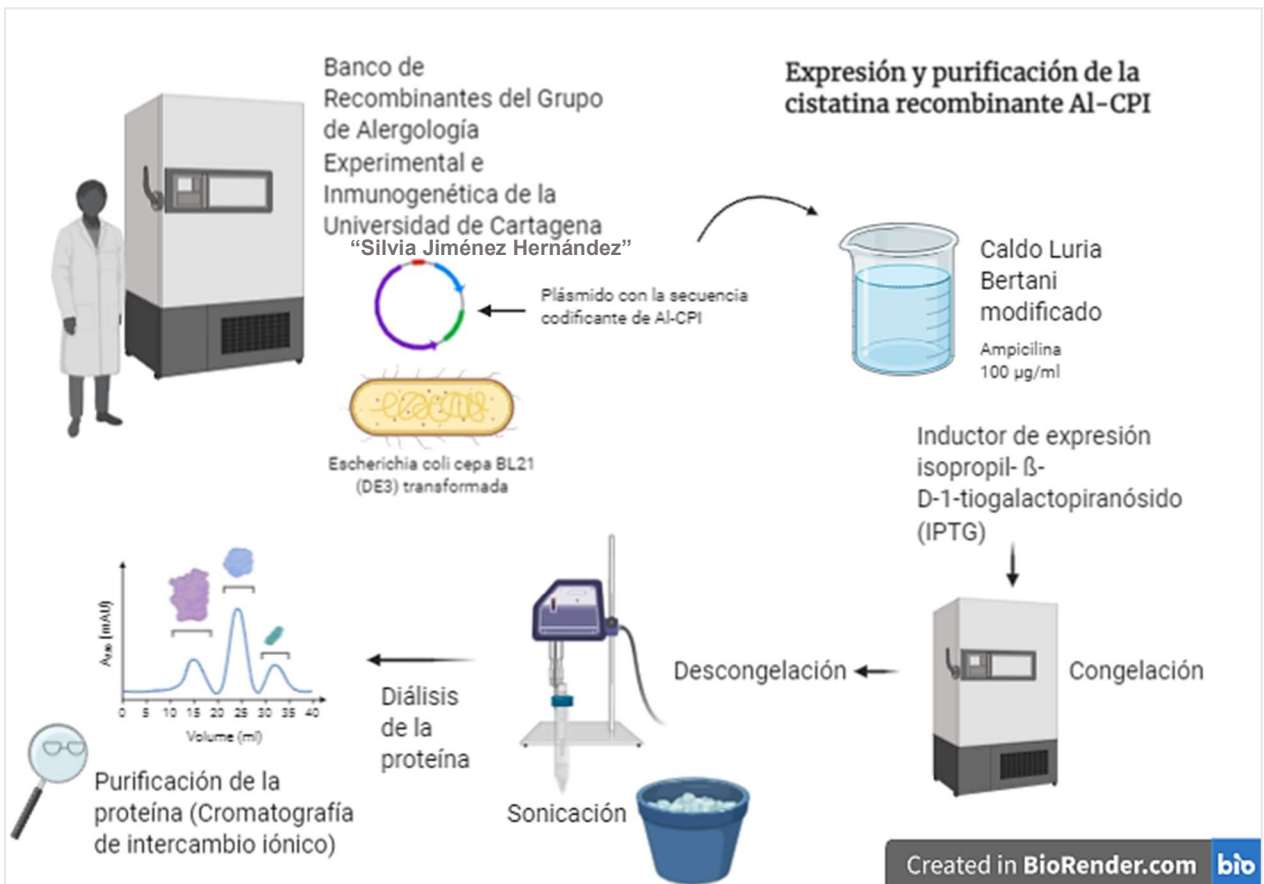


Figura S3. Expresión y purificación de la cistatina recombinante AI-CPI. El proceso de expresión y purificación de rAI-CPI se realizó bajo condiciones nativas mediante la utilización de la secuencia codificante de la cistatina de *Áscaris* insertada en el plásmido Pet-15b. (Imagen: elaboración propia del autor).

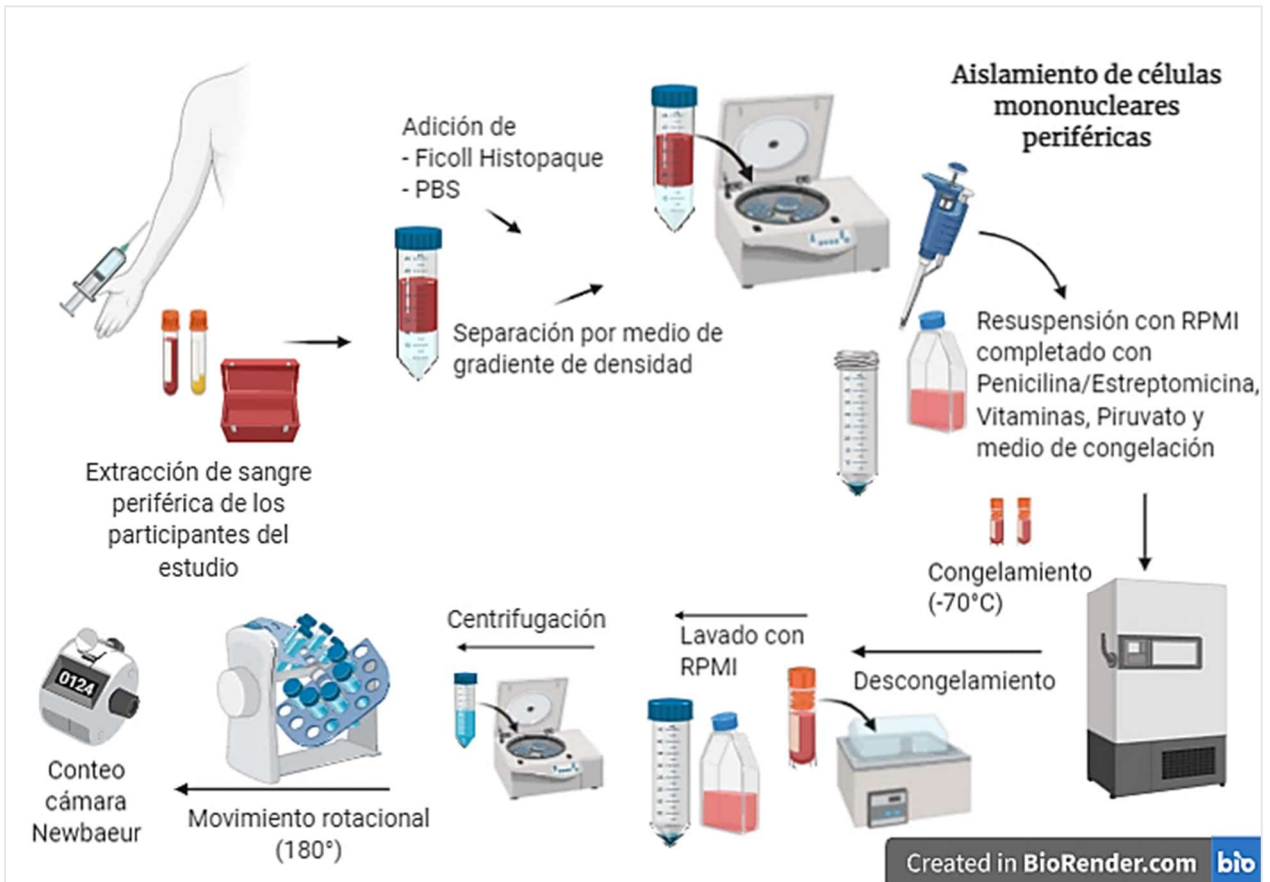


Figura S4. Aislamiento de PBMCs de los participantes del estudio. Se utilizó la técnica de separación por gradiente de densidad Ficoll estandarizada en el Instituto de Investigaciones Inmunológicas. (Imagen: elaboración propia del autor).

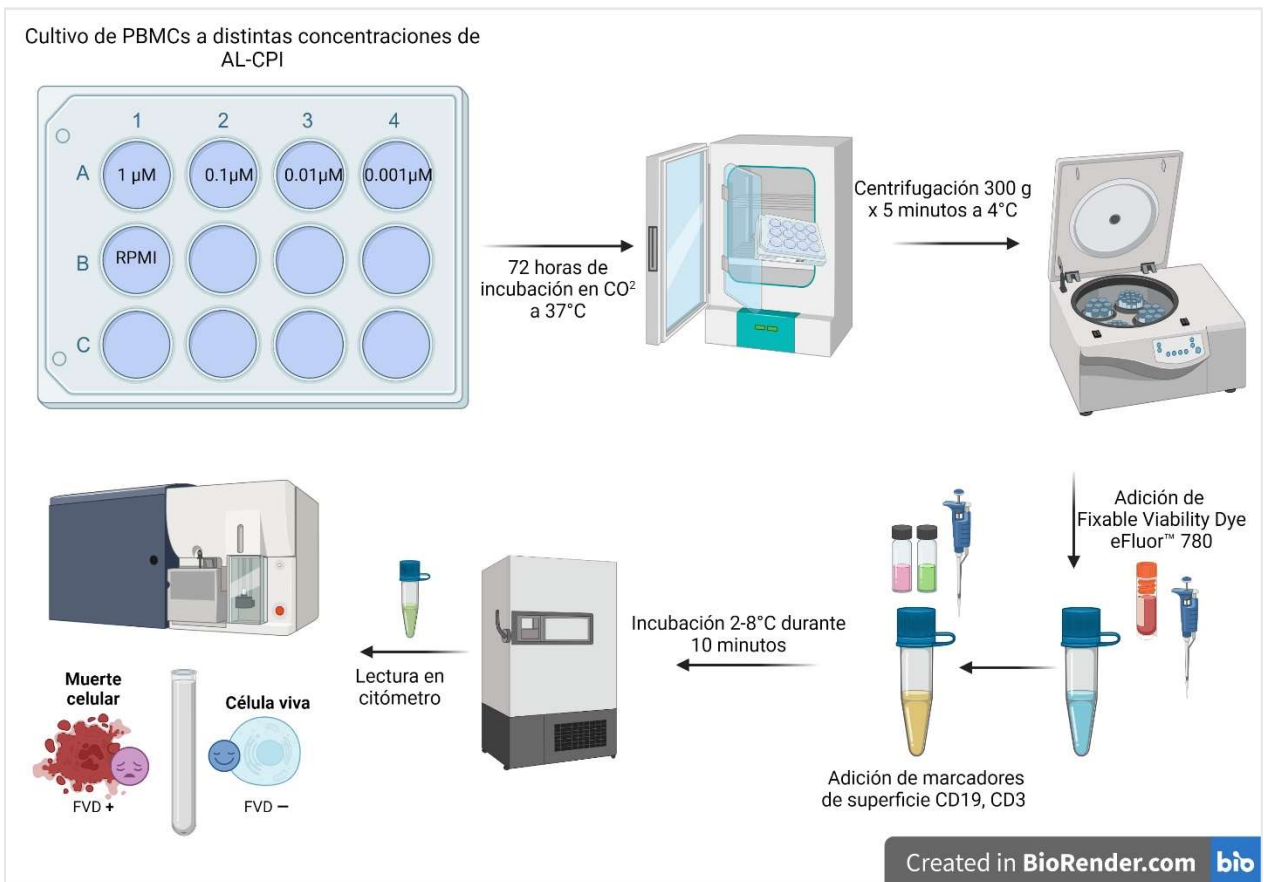


Figura S5. Tinción con marcador de viabilidad FVD. Después del cultivo de PBMCs a distintas concentraciones de rAI-CPI durante 72 horas se realizó marcación de las PBMCs con el marcador Fixable Viability Dye e Fluor 780 (FVD). Posteriormente las PBMCs fueron teñidas con los marcadores de superficie CD19 y CD3, que corresponden a linfocitos B y T, respectivamente, para posterior lectura en el citómetro. (**Imagen:** elaboración propia del autor).

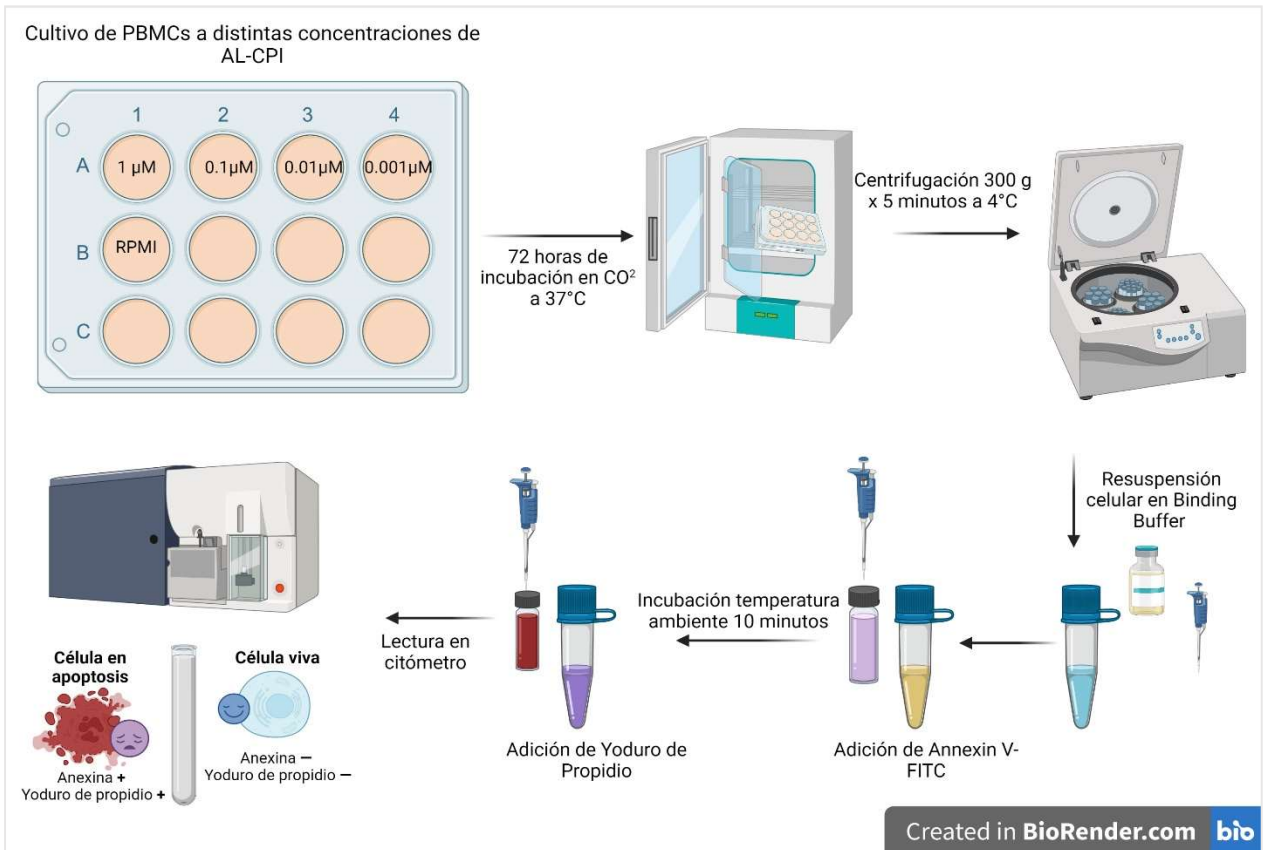


Figura S6. Tinción con estuche de viabilidad Anexina-V – Yoduro de Propidio. Después del cultivo de PBMCs a distintas concentraciones de rAI-CPI durante 72 horas se realizó marcación de las PBMCs con Anexina-V y Yoduro de propidio para posterior lectura en el citómetro. (Imagen: elaboración propia del autor).

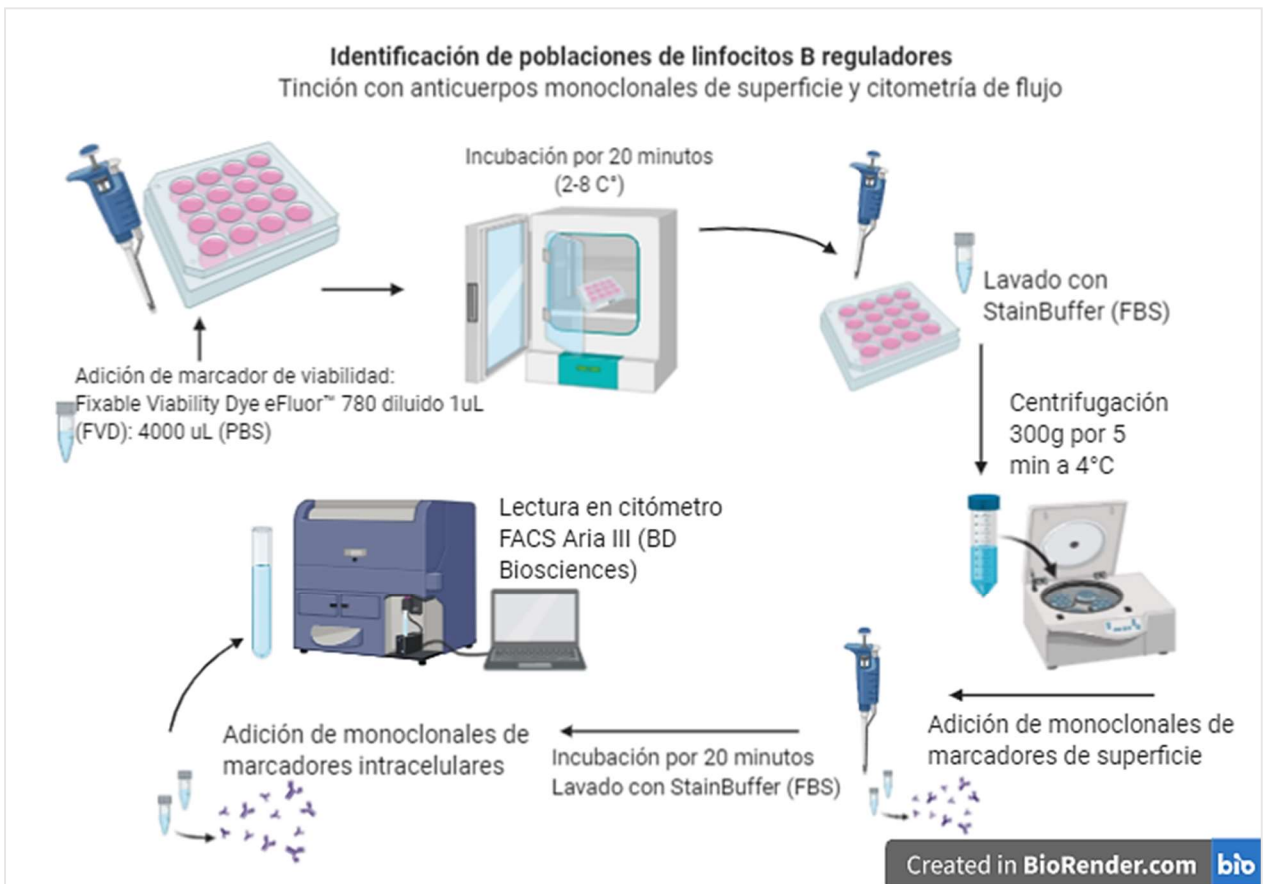


Figura S7. Tinción con anticuerpos monoclonales de superficie e intracelulares para verificación de poblaciones de linfocitos B reguladores. Después de la incubación de las PBMCs a distintas concentraciones de rAI-CPI, se procedió a tinción del marcador de viabilidad FVD. Posteriormente se adicionaron los anticuerpos contra marcadores de superficie del panel CD5/CD1d/CD71/CD73/CD25, y después se realizó tinción intracelular de IL-10. Finalmente se hizo lectura en el citómetro de flujo. (**Imagen:** elaboración propia del autor).

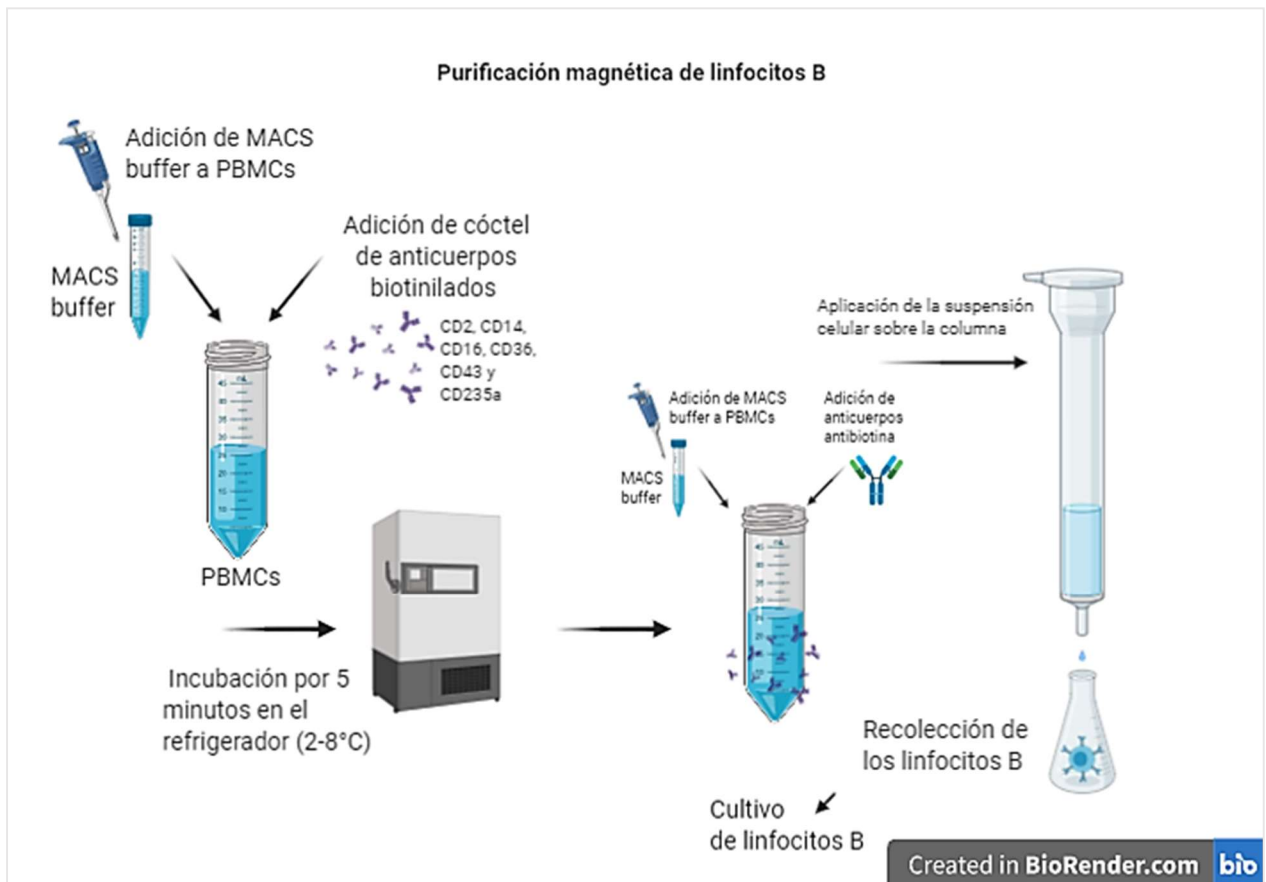


Figura S8. Purificación magnética de linfocitos B. Se utilizó el estuche de purificación *B Cell Isolation Kit II, human*, el cual incluye el cóctel de anticuerpos biotinilados (CD2, CD14, CD16, CD36, CD43 y CD235a) que se unen a células no-linfocitos B. Posteriormente se adicionó el anticuerpo anti-biotina y la suspensión se aplicó sobre la columna de separación. El eluido recolectado correspondió a linfocitos B, mientras que el resto de células permanecieron unidos a la fase sólida de la columna. (Imagen: elaboración propia del autor).

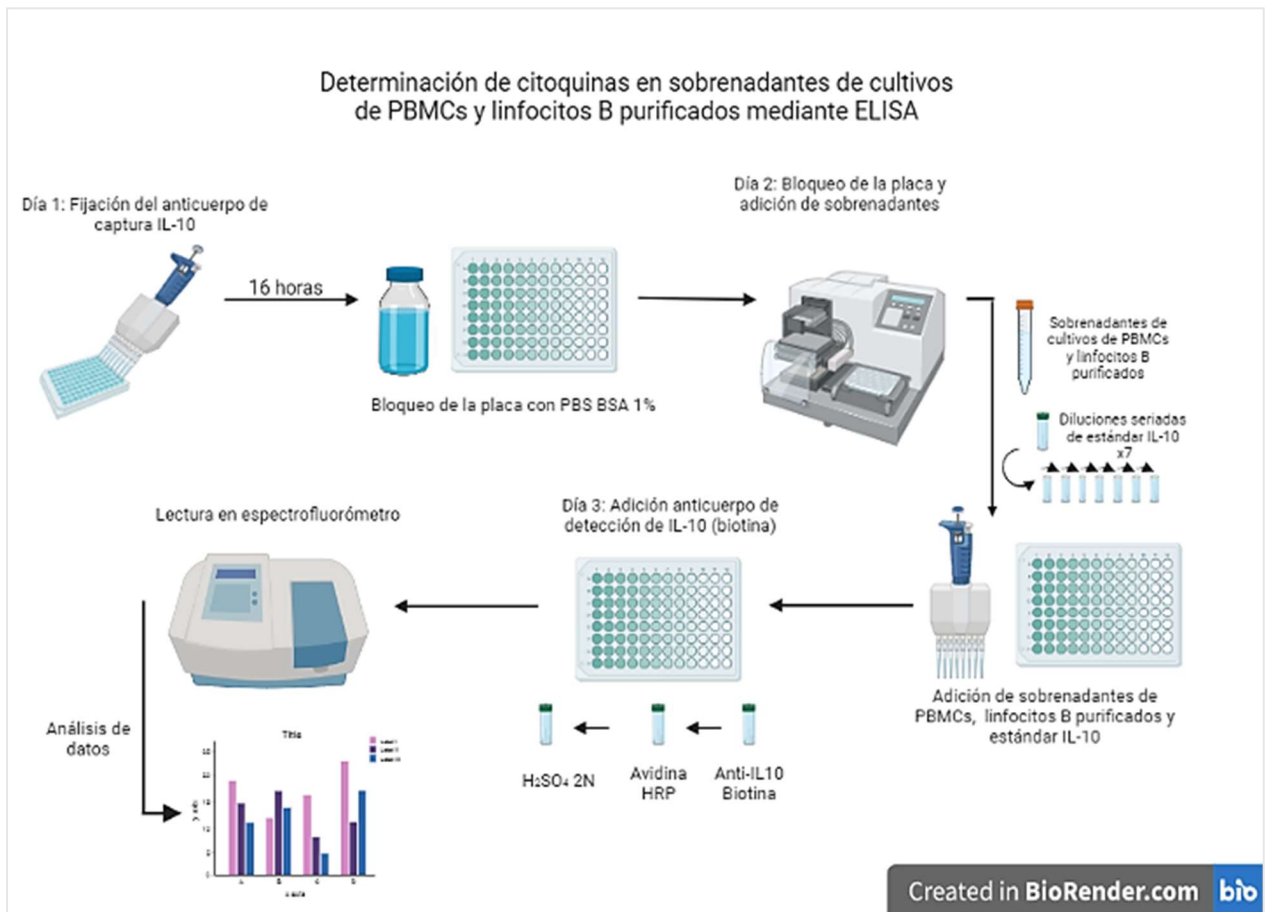


Figura S9. Determinación de IL-10 en sobrenadantes de cultivo de PBMCs y linfocitos B purificados mediante ELISA. Se inició con la fijación del anticuerpo de captura anti-IL-10 sobre la placa de ELISA durante 16 horas. Posteriormente se realizó el bloqueo de la placa con PBS-BSA 1% y se adicionaron los sobrenadantes de PBMCs y linfocitos B purificados. Se realizaron 7 diluciones seriadas del estándar de IL-10 partiendo desde la concentración 300 µg/mL. Al día siguiente se adicionaron el anticuerpo anti-IL-10 biotinilado, la avidina-HRP, y sustrato. Se detuvo la reacción después de 15 minutos con H₂SO₄ y se hizo lectura en espectrofluorómetro. (**Imagen:** elaboración propia del autor).

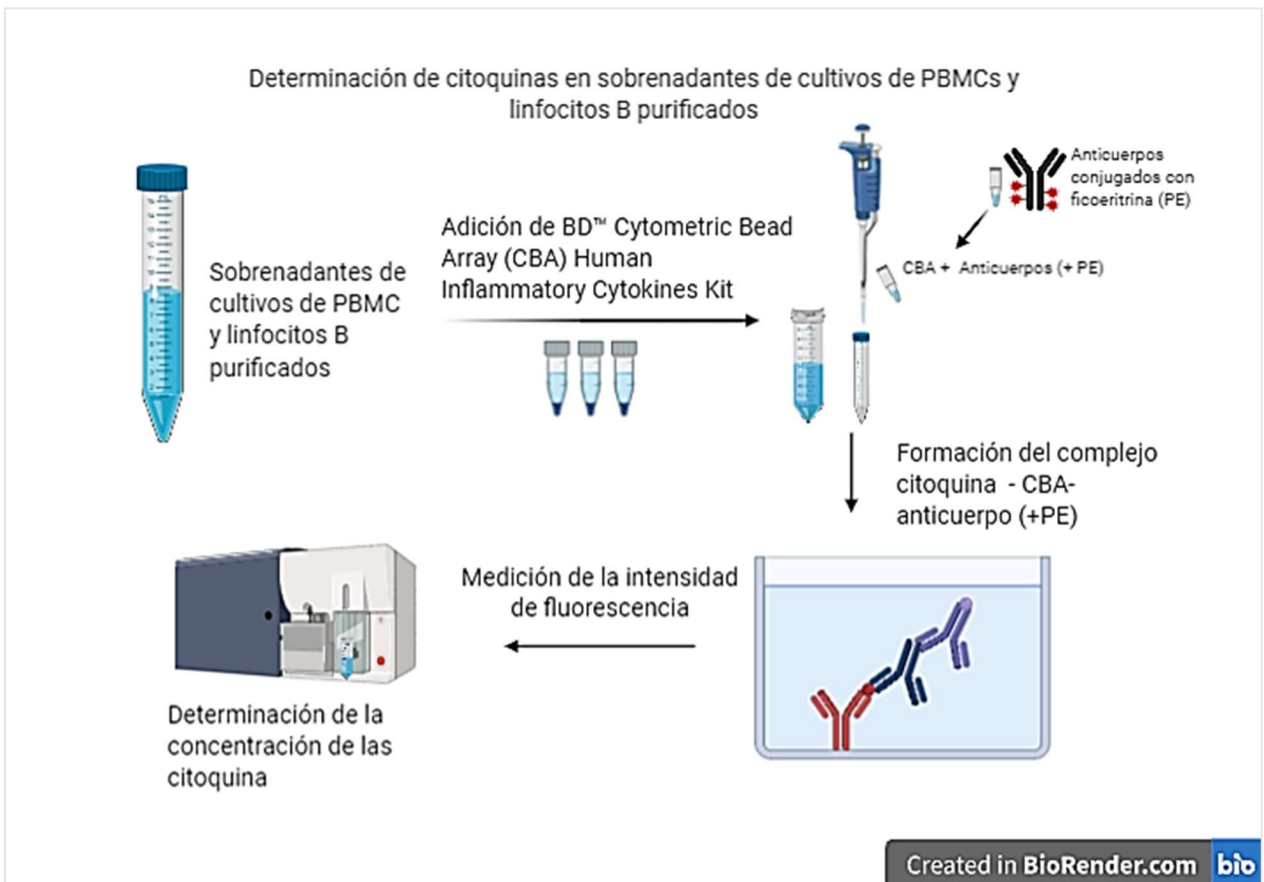



Figura S10. Determinación de IL-10 en sobrenadantes de cultivo de PBMCs y linfocitos B purificados mediante CBA. Se utilizó el estuche BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit [Interleuquina-6 (IL-6) Interleuquina-10 (IL-10)] compuesto de anticuerpos conjugados con ficoeritina (PE) que se unen a las perlas citométricas ya unidas a las citoquinas medidas. La formación del complejo citoquina-CBA-anticuerpo(+PE) permite la determinación de las concentraciones de IL-6 y IL-10 en los sobrenadantes mediante lectura por citometría. (**Imagen:** elaboración propia del autor).

Anexo 6. Publicaciones

Durante el transcurso de la realización de este estudio se hizo la publicación del manuscrito “Medición de la calidad de vida de pacientes con artritis reumatoide atendidos en el Hospital Universitario del Caribe, Bolívar, Colombia” en Revista Ciencias Biomédicas de la Universidad de Cartagena (ISSN: 2215-7840 – ISSN Electrónico: 2389-7252), Vol. 10, No. 4. (Octubre/2021) (doi: <https://doi.org/10.32997/rcb-2021>) (Ver en referencias: [no. 4](#)).

REVISTA CIENCIAS BIOMÉDICAS
ARTÍCULOS ORIGINALES



Medición de la calidad de vida de pacientes con artritis reumatoide atendidos en el Hospital Universitario del Caribe, Bolívar, Colombia

Measurement of the quality of life of patients with rheumatoid arthritis attending at the Hospital Universitario del Caribe, Bolivar, Colombia

Jonathan Rodríguez Cantillo¹, Juan López Crespo¹, Javier Polo Ibarra¹, Alvaro Moreno Grau², Nelson Alvis Guzmán³ & Josefina Zakzuk Sierra⁴

¹ Instituto de Investigaciones Inmunológicas, Universidad de Cartagena.
² Consulta externa de Reumatología, Hospital Universitario del Caribe, Cartagena.
³ Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena.
⁴ Facultad de Economía, Universidad de Cartagena.

ACCESO ABIERTO

Para citaciones: Rodríguez Cantillo, J., López Crespo, J., Polo Ibarra, J., Moreno Grau, A., Alvis Guzmán, N. & Zakzuk Sierra, J. (2021). Medición de la calidad de vida de pacientes con artritis reumatoide atendidos en el Hospital Universitario del Caribe, Bolívar, Colombia. *Revista Ciencias Biomédicas*, 10(4), 246-255. <https://doi.org/10.32997/rcb-2021-3667>

Recibido: 25 de agosto de 2021
Aprobado: 24 de septiembre de 2021

Autor de correspondencia:
Josefina Zakzuk Sierra
zazukjo@unicartagena.edu.co

Editor: Inés Benediti, Universidad de Cartagena-Colombia.

Copyright © 2021, Rodríguez Cantillo, J., López Crespo, J., Polo Ibarra, J., Moreno Grau, A., Alvis Guzmán, N. & Zakzuk Sierra, J. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> la cual permite el uso sin restricciones, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre y cuando se acredite el origen y la fecha de su publicación.

RESUMEN

Introducción: en varias poblaciones se ha evidenciado un deterioro de la calidad de vida y de la capacidad funcional en pacientes con artritis reumatoide. Estos aspectos son importantes para tener en cuenta en el manejo de la enfermedad, pues en algunos casos han sido complementarios en la toma de decisiones sobre los enfoques y conductas terapéuticas. Hasta ahora, en el departamento de Bolívar, Colombia, se desconoce el grado de afectación de la calidad de vida asociada a esta condición de salud.

Objetivo: describir la afectación de la calidad de vida del paciente diagnosticado con artritis reumatoide en el departamento de Bolívar y establecer relaciones con sus características sociodemográficas y de severidad de la enfermedad.


Métodos: se hizo uso de las escalas HAQ-DI y EQ-5D-3L, así como de la escala DAS28-VSG para la medición de la actividad clínica de la enfermedad.

Resultados: el 77.1% de los pacientes indicó afectación en su calidad de vida con predominio de afectación moderada, siendo más frecuente el dolor/malestar (57.1%), y menos común el cuidado personal (40%). La afectación de la calidad de vida se correlacionó con la actividad clínica de la enfermedad y el nivel de incapacidad funcional. La actividad clínica de la enfermedad fue el predictor más importante de la incapacidad funcional medida por HAQ-DI.

Conclusión: en esta muestra representativa de pacientes con artritis reumatoide del departamento de Bolívar, se presenta una importante afectación en la calidad de vida.

Palabras Clave: Artritis reumatoide; Calidad de vida; EQ-5D; HAQ-DI; Salud Pública.

Abreviaturas: AR: Artritis reumatoide; DAS-28: Disease activity score; HAQ-DI: Health Assessment Questionnaire-Disability Index; FARME: Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad; GLM: Modelo de regresión generalizado; PRO: Resultados reportados por el paciente



Revista Ciencias Biomédicas Vol. 10 Núm. 4, (2021), 246-255

*Dedico esta tesis a mi padre;
a mi hermana;
y a mi madre, que en paz descansa.*

JR