

***Estudios experimentales sobre el efecto
inmunomodulador de la cistatina de Ascaris lumbricoides***

Tesis para obtener el título de Dc

**SANDRA MILENA
CORONADO RIOS**

Bióloga, Magister en
Ciencias Biomédicas

Director
de tesis:

Luis
Caraballo
MD, PhD

Co director:

Josefina Zakzuk MD, PhD



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES INMUNOLOGICAS
UNIVERSIDAD DE CARTAGENA**

SOMETIDA: mayo de 2020

AGRADECIMIENTOS

Agradezco inmensamente a mi tutor Profesor Luis Caraballo por su confianza, apoyo y dedicación en mi formación doctoral. También a la profesora Josefina Zakzuk por la supervisión de las actividades académicas y experimentales. A todos los miembros del III que me acogieron y colaboraron, a mis compañeros de

doctorado y en especial a mi amigo Ronal. Al profesor Oscar Palomares y su grupo de investigación en la UCM donde se realizaron varios ensayos presentados en esta tesis, a la doctora Inés Benedetti por su colaboración. A la Facultad de Medicina de la Universidad de Cartagena que me concedió la comisión de estudios remunerada.

Agradezco a Dios y agradezco a mis seres queridos por todo su apoyo y amor.

Esta tesis doctoral fue realizada durante la ejecución del proyecto de investigación *“Identificación y caracterización de proteínas de Ascaris lumbricoides con propiedades inmunomoduladoras de utilidad en inmunoterapia de enfermedades alérgicas” Investigador Principal Luis Caraballo, financiado por Colciencias, contrato No. 406-2011 y la Universidad de Cartagena).*

CONTENIDO	
AGRADECIMIENTOS.....	1
RESUMEN	7
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	10
<i>Respuesta inflamatoria y enfermedades asociadas.....</i>	<i>10</i>

Mecanismos comunes de inflamación	11
Enfermedad Inflamatoria intestinal (IBD)	
12 Asma alérgica	
18	
<i>Cistatinas de helmintos y su papel inmunomodulador en IBD y el asma</i>	
22 HIPÓTESIS.....	
25 OBJETIVOS.....	
26	
<i>Objetivo general</i>	26
<i>Objetivos específicos</i>	26
CAPITULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	27
<i>Primera parte: Obtención de la cistatina recombinante</i>	27
Material biológico y obtención de ADNc	27
Producción de rAI-CPI	28
Purificación de rAI-CPI y remoción de endotoxina	29
Pruebas de actividad bioquímica y dicroísmo circular	29
<i>Segunda parte: Respuesta inmune in vitro e in vivo a rAI-CPI</i>	31
Ensayo de citotoxicidad	31
Cuantificación de la liberación de óxido nítrico	31
Análisis de la expresión de genes y producción de citoquinas	32
Activación del NF-κB utilizando células THP1-Blue	32
Pruebas de reactividad IgE-rAI-CPI en humanos	33
Pruebas de citotoxicidad aguda, respuesta inmune y anafilaxia cutánea pasiva (PCA) en ratones BALB/C	36
<i>Tercera parte: Inmunomodulación por rAI-CPI en dos modelos murinos de inflamación</i>	
38 Modelo de inflamación intestinal inducida químicamente por DSS	
38 Modelo de inflamación alérgica por extracto de <i>B. tropicalis</i>	
42 Análisis estadístico	
47	
CAPITULO 3 RESULTADOS	
48 rAI-CPI es bioquímicamente activa	48
La secuencia que codifica para AI-CPI se encontró en la biblioteca de ADNc	48

<i>rAI-CPI es bioquímicamente activa</i>	49
<i>rAI-CPI no es toxica e induce respuesta inmunológica</i>	
51 <i>rAI-CPI no es citotóxica e induce activación celular</i>	51
<i>rAI-CPI tiene reactividad IgE e IgG4 en sueros de individuos humanos sensibilizados a áscaris pero no induce activación de basófilos ni liberación de histaminas</i>	55
<i>rAI-CPI no causa efectos tóxicos según los marcadores estudiados</i>	58
<i>La inmunización con rAI-CPI genera una respuesta de IgG y producción de altos niveles de IL-10</i>	60
<i>rAI-CPI induce la expresión de FoxP3 en linfocitos T CD4⁺ CD25⁺</i>	62
<i>rAI-CPI atenúa la inflamación intestinal</i>	
63 <i>rAI-CPI mejora los parámetros de la enfermedad inflamatoria intestinal inducida por DSS</i>	63
<i>rAI-CPI disminuye la expresión de genes y citoquinas pro-inflamatorias y estimula la producción de las citoquinas anti-inflamatorias IL-10 Y TGF-β en el colon</i>	66
<i>rAI-CPI previene el desarrollo de la inflamación alérgica inducida por B. tropicalis</i>	
70 <i>rAI-CPI previene la inflamación de las vías aéreas</i>	70
<i>rAI-CPI inhibe la producción total y específica de IgE al extracto de B. tropicalis y promueve la producción de IgG</i>	73
<i>rAI-CPI modifica la producción de citoquinas a nivel local y sistémico</i>	
75 <i>rAI-CPI incrementa los niveles de Tregs en bazo</i>	76
<i>La inhibición de la vía de señalización de la IL-10 reduce el efecto de rAI-CPI sobre la respuesta humoral pero no su efecto antialérgico</i>	77
<i>rAI-CPI interfiere con la maduración de las HmoDCs</i>	
79 CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.....	
83 CONCLUSIONES.....	
95 RETOS Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	
96 PUBLICACIONES CIENTÍFICAS RELACIONADAS CON ESTA TESIS.....	
97 REFERENCIAS.....	
98	

Índice de Tablas

Tabla 1. Pool de sueros usados para la detección de la reactividad IgE mediante <i>western blotting</i>	34
Tabla 2. Caracterización de los donantes para las pruebas de BAT y LH.....	
Tabla 3. Sistema de puntuación para los índices de actividad de la enfermedad inflamatoria intestinal (DAI)	39
Tabla 4. Sistema de puntuación para el análisis histopatológico.....	40
Tabla 5. Diluciones de los anticuerpos y sueros.....	45
Tabla 6. Peso de los órganos en el estudio de toxicidad aguda	59
Tabla 7. Parámetros bioquímicos medidos en sangre en el estudio de toxicidad aguda	59

Índice de Figuras

Figura 1. Modelo agudo de enfermedad inflamatoria intestinal inducida por DSS.	39
Figura 2. Modelo animal de inflamación alérgica de las vías respiratorias.....	43
Figura 3. Corridos electroforéticos de ARNm y ADNc.	48
Figura 4. SDS-PAGE y actividad bioquímica de rAI-CPI.....	49
Figura 5. Evaluación de la estructura de rAI-CPI.	50
Figura 6. Evaluación de la citotoxicidad de rAI-CPI.	51
Figura 7. Producción de ON inducido por rAI-CPI en macrófagos peritoneales de ratón.	52
Figura 8. Cambios transcripciones inducidos por rAI-CPI en macrófagos peritoneales de ratón.....	53
Figura 9. Citoquinas inducidas por rAI-CPI en macrófagos peritoneales de ratón.	54
Figura 10. Efecto de rAI-CPI sobre la línea celular THP1-Blue.....	55
Figura 11. Reactividad IgE a rAI-CPI.....	56
Figura 12. Evaluación de la activación de basófilos por rAI-CPI.	57
Figura 13. ELISA de Liberación de Histaminas.....	58
Figura 14. Prueba de Anafilaxia Cutánea Pasiva.	60
Figura 15. Respuesta humoral inducida por rAI-CPI.....	61
Figura 16. Respuesta de citoquinas a rAI-CPI.....	62
Figura 17. Citometría de flujo de la inducción de FoxP3 por rAI-CPI.....	63
Figura 18. Efecto de rAI-CPI sobre los parámetros de la enfermedad inflamatoria intestinal.	64
Figura 19. Cambios en la longitud del colon.	65
Figura 20. Efectos de rAI-CPI sobre la Mieloperoxidasa y la inflamación en el colon.	66
Figura 21. Expresión relativa de genes en el tejido colonico.	67
Figura 22. Niveles de citoquinas en tejido colonico.....	68
Figura 23. Macrófagos y Tregs productores de IL-10 en MNL.....	69
Figura 24. Eosinófilos, neutrófilos y macrófagos en BAL.	

71	Figura 25. Hallazgos histológicos y score de inflamación pulmonar.
72	Figura 26. Pletismografía de cuerpo completo (Buxco) y reto con Metacolina
73	Figura 27. rAI-CPI interfiere con la producción de IgE y potencia la respuesta IgG2a.
74	Figura 28. rAI-CPI modifica la producción de citoquinas Th2 a nivel local y sistémico.
76	Figura 29. rAI-CPI estimula la diferenciación de Tregs.
77	Figura 30. Efecto de la administración sistémica anti-IL10.
78	Figura 31. Efecto de la administración sistémica anti-IL10 sobre la respuesta humoral.
79	Figura 32. rAI-CPI interfiere con la maduración de las células dendríticas.
80	Figura 33. Efecto de rAI-CPI sobre las HmoDCs.....
81	Figura 34. Niveles de citoquinas detectados en los sobrenadantes del co-cultivo.....
82	

4

Abreviaturas

Administración i.p, i.n, i.v: intraperitoneal, intranasal,
intravenosa ADNc: ADN complementario

AI-CPI: inhibidor de cisteína proteasa de *Ascaris*

lumbricoides Anti-IL-10R: anticuerpo monoclonal anti IL-10
receptor

APC: célula presentadora de antígeno

ASA: estudio sobre *Ascaris* y severidad del asma

AST y ALT: aspartato aminotransferasa y alanina

aminotransferasa BAL: lavado bronco alveolar

BALB/c: Bagg albino mouse

BtE: extracto de *Blomia tropicalis*

BUN: nitrógeno ureico sanguíneo

CCL28: quimioquina epitelial asociada a la mucosa

CD: Crohn disease (enfermedad de Crohn)

CD83: Cluster of Differentiation 83

CD86: Cluster of Differentiation 86

DAI: disease activity index (índice de actividad de la enfermedad en
colitis) DAMPs: y patrones moleculares asociados a daños

DCs: dendritic cells (células dendríticas)

DSS: Dextran sulfate sodium (dextran sulfato de sodio)

E/S: producto de excreción o ecreción

EU: unidades de endotoxina bacteriana

FoxP3: forkhead box P3 transcription factor

HDM: House dust mite (acaró del polvo doméstico)
HLA-DR: human leukocyte antigen DR-isotype
HmoDCs: células dendríticas derivadas de monocitos humanos IBD:
inflammatory bowel disease (enfermedad inflamatoria intestinal)
IC50: concentración inhibitoria máxima media (50)
IECs: células epiteliales intestinales
IgE: inmunoglobulina E
IgG: inmunoglobulina G
IL-: Interleuquina
ILCs: células linfoides innatas
INF γ : interferón gamma
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible
IRF: factores de respuesta a interferón

5

LPS: lipopolisacárido bacteriano
MHCII: moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II
MNL o GLM: ganglios linfáticos mesentéricos
MPL: mieloperoxidasa
NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B
activadas NKT: natural killer cells (linfocitos T asesinos naturales)
NO: nitric oxide (óxido nítrico)
NOD2: nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein
2 OMS: Organización Mundial de la Salud
OVA: ovoalbúmina
PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos
PAS 1: *Ascaris summi*-derived protein
PBMCs: células polimorfonucleares de sangre periférica
PCA: passive cutaneous anaphylaxis (anafilaxia cutánea pasiva)
rAI-CPI: inhibidor de cisteína proteasa recombinante de *Ascaris lumbricoides* RAW 264.7: línea celular de macrófagos murinos
TGF β : factor de crecimiento transformante β
THP-1 blue: línea celular monocítica para monitorear la vía de transducción de señales
NF κ B, TLR4: Toll like receptor 4 (receptores celulares tipo toll)
TNF α : factor de necrosis tumoral alfa
Tregs: linfocitos T reguladores
TSLP: linfopoyetina estromal tímica

RESUMEN

Las enfermedades inflamatorias crónicas no transmisibles (ECNT) son un grupo clínicamente heterogéneo de entidades cuya prevalencia va en aumento a nivel mundial y comparten vías inflamatorias comunes resultantes de la combinación de factores genéticos y ambientales. Algunas enfermedades incluidas en este grupo son la diabetes, desordenes autoinmunes, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la enfermedad inflamatoria intestinal, el asma y las alergias, aunque cada una de ellas con características clínicas diferentes.

En la última década se ha propuesto el estudio y la evaluación de productos derivados de parásitos helmintos como alternativa terapéutica potencial para el tratamiento de algunas enfermedades inflamatorias. Los helmintos son organismos multicelulares con estilo de vida parasítico en el cual han desarrollado la capacidad modular el sistema inmune de sus hospederos mamíferos a un estado de supresión,

creando un entorno favorable a su supervivencia; principalmente mediante la excreción/secreción (E/S) de moléculas con actividad inmunomoduladora o antiinflamatoria.

Para el caso de *Ascaris lumbricoides*, que es el causante de la helmintiasis más común en mundo y la más prevalente en humanos, hay muy poca información sobre los mecanismos inmunomoduladores de sus productos de E/S. A la fecha se sabe que secreta la proteína PAS1, la cual en modelos murinos modula la inflamación y el asma alérgica a través de la inducción de células T reguladoras (Tregs), también se ha demostrado un efecto supresor del extracto del gusano adulto sobre la respuesta celular y humoral en varios modelos animales de inflamación; y que el líquido pseudocelómico del parásito suprime la inflamación mediante alteración de la función de células dendríticas y macrófagos.

7

A. lumbricoides también produce una cistatina (inhibidor de cisteína proteasas o AI CPI) altamente homóloga a las de otros helmintos con actividad inmunomoduladora. La cistatina de *A. lumbricoides* es una proteína de 14.6 kD de la cual ni la respuesta inmune ni sus propiedades inmunomoduladoras habían sido estudiadas, por lo que en esta tesis se exploraron estos aspectos usando la cistatina recombinante (rAI CPI).

Inicialmente se determinaron las características de actividad bioquímica y estructurales de rAI-CPI y se realizaron pruebas *in vitro* de citotoxicidad, se describió la respuesta de citoquinas en una línea celular de macrófagos peritoneales de ratón, células *THP-1blue* y células dendríticas derivadas de monocitos humanos (HmoDCs). También se evaluó la presencia de anticuerpos IgE e IgG4 específicos contra rAI-CPI en muestras de suero de individuos humanos expuestos y sensibilizados a *A. lumbricoides* y la capacidad de rAI-CPI

de activar basófilos o estimular la liberación de histaminas en muestras sanguíneas de individuos con IgE específica a ella.

Los estudios *in vivo* correspondieron al análisis de toxicidad aguda, de alergenicidad mediante un modelo de anafilaxia cutánea pasiva (PCA) y de descripción de la respuesta inmune en ratones BALB/c. El efecto inmunomodulador se estudió usando dos modelos murinos de inflamación: uno de colitis aguda inducida por dextran sulfato de sodio (DSS) y uno de asma alérgica inducida por el extracto del acaro del polvo doméstico (HDM) *Blomia tropicalis*.

Los resultados indicaron que la rAI-CPI producida posee estructuras secundarias de plegamiento y tiene actividad inhibidora de las cisteína proteasas. *In vitro* rAI-CPI no es citotóxica y estimula a los macrófagos murinos a producir altos niveles de IL 10 y TGF β . En las células THP1-blue se observa activación de manera similar que con los ligandos del TLR4, mientras que el efecto sobre las HmoDCs es la inhibición

8

de la expresión de las moléculas de superficie marcadoras de maduración HLA-DR, CD83 y DC86.

Aunque *in vitro* rAI-CPI es reconocida por la IgE humana, no se observó que cause activación de basófilos o liberación de histamina. En los ratones, rAI-CPI no es toxica según los parámetros evaluados y no induce PCA. Por otro lado, rAI-CPI estimula el sistema inmune favoreciendo el desarrollo de la respuesta Th1, un efecto importante observado es la producción de IL-10 y la estimulación de Tregs.

En el modelo de colitis inducida por DSS se observó que el índice de severidad de la enfermedad, los marcadores macroscópicos, microscópicos e inmunológicos de la inflamación disminuyeron significativamente en los animales tratados

preventivamente con rAI-CPI. También se detectaron más linfocitos Tregs y macrófagos productores de IL-10 en los ganglios linfáticos mesentéricos (MNL) de los ratones tratados que en los del grupo control enfermo.

En el modelo de asma alérgica se encontró que la rAI-CPI protegió a los ratones del desarrollo de la inflamación de las vías aéreas inducida por extracto de *B. tropicalis* (BtE). El porcentaje de eosinófilos y los niveles de citoquinas Th2 en lavado broncoalveolar (BAL) fueron significativamente menores en los ratones tratados preventivamente que en los controles asmáticos, mientras que la producción de IL 10 y TGF- β se observó aumentada. Se observó un efecto importante en cuanto a la producción de anticuerpos, en los animales tratados con rAI-CPI se evidenció un cambio en la producción de IgE a IgG en particular IgG2a específica a *B tropicalis*. La administración del anticuerpo monoclonal bloqueante del receptor de IL-10 (anti IL10R) llevo a una disminución significativa en el porcentaje de Tregs en bazo en comparación con el control de isotipo y cierto grado de modificación del efecto preventivo de rAI-CPI sobre la respuesta humoral.

Respuesta inflamatoria y enfermedades asociadas

La inflamación es una respuesta biológica que puede desencadenarse por variedad de estímulos como agentes patógenos, células dañadas, alérgenos, exposición a compuestos tóxicos, etc. La inflamación actúa en pro de eliminar los estímulos nocivos que la desencadenan para iniciar en el organismo un proceso de curación, por lo que puede decirse que es un mecanismo de defensa vital para la salud. La inflamación aguda desata una serie de respuestas celulares y

moleculares que interactúan para minimizar lesiones o eliminar agentes infecciosos, contribuyendo a la restauración de los tejidos y la homeostasis, sin embargo la inflamación aguda no controlada o la exposición constante a los estímulos que la provocan puede convertirse en crónica llegando a causar daño tisular permanente y enfermedad [1].

La inflamación crónica está influenciada además por factores genéticos como son: (i) los que codifican respuestas inmunes exageradas o que no se modulan efectivamente, (ii) mecanismos moleculares que promueven el desarrollo de autoinmunidad y (iii) procesos que conducen al deterioro o mala función de las barreras epiteliales llevando a exposición microbiana prolongada [2].

En conjunto, los factores mencionados y sus interacciones hacen de las enfermedades inflamatorias crónicas un grupo de condiciones médicas muy complejas cuya prevalencia sigue aumentando a nivel mundial, al grado que actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) las clasifica como la mayor amenaza para la salud humana, previendo que la prevalencia de enfermedades como la diabetes, desordenes autoinmunes, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), el asma y las alergias aumentará de manera permanente durante los próximos años [3].

Mecanismos comunes de inflamación

La inflamación e inicia tras la detección de agentes infecciosos, traumáticos, físicos o químicos. La exposición a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a daños (DAMPs) activan las células del sistema inmune innato, lo que resulta en la expresión de genes proinflamatorios, la producción de citoquinas, quimiocinas y otras sustancias químicas que median el reclutamiento celular y el desarrollo de la respuesta adaptativa específica. Estos

procesos están mediados por varias vías de señalización intracelular, especialmente las vías NF- κ B y AP-1 (que impulsan la producción de citoquinas proinflamatorias, la expresión de quimiocinas y moléculas de adhesión endotelial) y la vía IRF (factores de respuesta a interferón) que promueven la producción de interferones de Tipo I [4]. Otros estímulos traumáticos como la radiación, accidentes cerebrovasculares, exposición a toxinas e incluso el estrés psicológico, pueden inducir inflamación por activación de vías neuroendocrinas, mediante la regulación positiva de las "vías de estrés" o a través de la activación de las vías del citocromo P450 por presencia de especies reactivas de oxígeno o metabolitos intermedios con efectos inmunotóxicos [5].

El ambiente pro inflamatorio en el que se continúan estimulando los receptores de superficie celular y activando importantes vías de señalización celular como la transductora de señal de Janus quinasa (JAK) y la activadora de la transcripción (STAT) será determinante en el tipo de inflamación linfocítica a desarrollarse (Th1, Th2, Th17), así la desregulación de estas vías puede asociarse directamente al tipo de presentación clínica de una enfermedad inflamatoria [1]. Claros ejemplos son: la desregulación de la vía señalización de Wnt/ β -catenina con la MAPK descrita en IBD [6], la vía de señalización del Fc ϵ R1 y del TCR que aumentan la actividad ERK

MAPK y STAT 6 llevando a la diferenciación y activación celular específica en el asma alérgica [7] [8].

Enfermedad Inflamatoria intestinal (IBD)

Definición y epidemiología

La enfermedad inflamatoria intestinal, hace referencia a varias alteraciones gastrointestinales crónicas producto de una respuesta inflamatoria no controlada y persistente, la IBD está compuesta principalmente por la enfermedad de Crohn

(CD) y la colitis ulcerosa (UC) que se presentan en personas genéticamente susceptibles expuestas a factores de riesgo ambientales. La IBD además abarca otras variantes menos comunes como la colitis microscópica, que a su vez incluye la colitis colágena y la colitis linfocítica, la colitis eosinofílica y la colitis indeterminada, o no clasificada (que representa cerca del 10% de las personas con IBD) [9].

La IBD se caracteriza por periodos alternos de recidivas con inflamación y daño del epitelio intestinal. Los síntomas incluyen dolor abdominal, vómito, fatiga, diarrea, sangrado rectal, anemia y pérdida de peso. En la IBD comúnmente se evidencia distorsión de la arquitectura intestinal y un aumento significativo de neutrófilos y macrófagos en la lámina propia y las criptas intestinales, con compromiso de las células productoras de moco y la pérdida de la diversidad microbiana [10-12]. Las manifestaciones de la IBD se extienden además al sistema musculoesquelético, la piel, el hígado, el páncreas, los ojos, los riñones, además de ser un factor asociado a la aparición de cáncer intestinal [13-16].

Por lo general la IBD se presenta en los años más productivos de la vida sin una prevalencia de género significativa, tiene una incidencia máxima entre la segunda y cuarta década de la vida, afecta en gran manera la calidad de vida a quienes la padecen y se convierte en un problema económico a los programas de salud. Los datos acerca de poblaciones susceptibles son escasos, aunque la mayor incidencia se observa en personas blancas y judías, sin embargo; recientemente se ha reportado aumento en las poblaciones asiáticas e hispanas. Se estiman más de 100

casos de IBD por cada 100.000 habitantes a nivel mundial, presentando mayor incidencia y prevalencia en los países desarrollados, en una revisión sistemática reciente se informó que la incidencia anual de UC en Norte América es de

19.2/100.000 personas-año, y la prevalencia de 505/100.000 personas. Similarmente, la incidencia reportada de CD es de 20.2/100.000 personas-año y la prevalencia de 322/100.000 personas [17].

En Colombia no se dispone de datos concluyentes acerca de la incidencia de la IBD debido a que se han realizado a partir de registros hospitalarios de localidad y comunidades puntuales, sin embargo, se estima que la UC (80.7% de los casos) presenta una mayor prevalencia que la CD (15.8%) afectando igualmente tanto a hombres como a mujeres [18]. Un reporte más reciente indicó que el 75.8% de los casos correspondió a UC y el 24,2% a CD, con un leve predominio del sexo femenino en ambas (56% y 55%, respectivamente) [19]. En Cartagena, se ha estimado la prevalencia de IBD (29/100.000) en una institución prestadora de salud, siendo la UC el mayor diagnóstico presentado (alrededor del 77%) [20]. Aunque no se disponga de más datos, se considera la IBD en Colombia sigue una tendencia al aumento en el número de casos similar a la mundial [21].

Inmunobiología de la IBD

La desregulación de las respuestas inmunes normales en la mucosa intestinal constituye la base de la patogénesis en la IBD. En la mucosa intestinal sana los mecanismos de inmunidad innata y adaptativa controlan un estado de "*inflamación de bajo grado*" [22]. Los múltiples componentes de la inmunidad innata en la pared intestinal como son: la presencia de una capa mucosa, la impermeabilidad de la barrera epitelial, la secreción de compuestos bactericidas, la actividad fagocítica de macrófagos y neutrófilos, la secreción de TGF- β protector del epitelio por las células estromales de la lámina propia entre otros; son suficientes para proteger de la invasión de microorganismos comensales y patógenos presentes en la luz del

en algunos individuos genéticamente susceptibles, los antígenos microbianos o derivados de alimentos penetran la barrera epitelial intestinal y promueven el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa clásica con su iniciación y fases efectoras que provocan episodios de inflamación más o menos grave en la pared intestinal, principalmente en la mucosa si se trata de UC y en la submucosa si se trata de CD [9].

La primera barrera inmunológica del intestino es su integridad física determinada por las células epiteliales intestinales (IECs) y las células de la inmunidad innata. Las IECs del intestino comprenden varios tipos de células que ayudan en el mantenimiento del equilibrio a través de diferentes mecanismos; estas las células incluyen enterocitos, células caliciformes, células neuroendocrinas, células de Paneth y células M. La importancia de la barrera epitelial en la predisposición a la IBD es apoyada por el hallazgo de permeabilidad intestinal anormal en individuos con CD [23]. Además, en IBD y principalmente en la CD se observa producción defectuosa de las cadherinas en las células intestinales, proteínas que conforman las uniones estrechas del epitelio [24] aumentando así su permeabilidad. Como resultado de estudios de asociación del genoma completo también han identificado polimorfismos en múltiples loci asociados con IBD [25]. Entre los más importantes son las variantes genéticas en relación a los mecanismos de interacción hospedero microorganismo, en particular la detección y respuesta a microorganismos mediante la vía NOD2 [26]. La identificación de NOD2 ha resaltado la importancia de inmunidad innata en la enfermedad inflamatoria intestinal.

Se considera que en la patogénesis de la IBD los neutrófilos juegan un papel importante clave, son capaces de secretar especies reactivas de oxígeno; entre ellas la mieloperoxidasa (MPO) y moléculas como péptidos antimicrobianos, enzimas hidrolíticas, proteasas y trampas de neutrófilos con el fin de combatir

microorganismos patógenos. Al ser activados por los macrófagos residentes en el epitelio intestinal son capaces de atravesarlo y migrar hacia el lumen a combatir directamente a los patógenos, a la vez que secretan citoquinas (IL-6, IL-17 e IL-1 β) y quemoquinas que atraen a las células presentadoras de antígeno (APC), células dendríticas (DCs) y a más macrófagos [27]. Sin embargo la excesiva migración de los neutrófilos conlleva al aumento de la permeabilidad de la mucosa permitiendo el ingreso prolongado de microorganismos a esta y el influjo de más neutrófilos [28]. De hecho, el aumento significativo de la actividad de la enzima MPO en la mucosa intestinal se considera un marcador de IBD ya que relaciona la concentración de neutrófilos activados en el tejido inflamado [29, 30].

Al tiempo que las DCs y macrófagos, se encuentran activados en la mucosa inflamada en respuesta al reconocimiento de PAMPs por parte de los TLRs, de los cuales se tiene evidencia que se incrementa su expresión significativamente en células epiteliales intestinales y en células dendríticas durante la IBD (especial en la UC) [31-33], se secretan grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α [34]. De hecho, se considera a los macrófagos activados como la principal fuente de citoquinas proinflamatorias en el intestino que causan el desbalance inmunológico en la patogénesis de la IBD [35].

La activación del sistema de IL-1 β en respuesta a la iniciación de la cicloxigenasa 2 COX-2, fosfolipasa A2 y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) permite el reclutamiento de granulocitos, linfocitos T CD4+, Th17 y la activación de las células linfoides innatas (ILCs) asociados a fases tempranas de la inflamación [36]. La IL-6 ejerce funciones en la mucosa intestinal activando la liberación de citoquinas proinflamatorias (IFN γ , TNF- α e IL-1 β) e inhibiendo la apoptosis de poblaciones celulares como APCs y linfocitos T [37], aunque también estimula la proliferación y expansión de las células epiteliales intestinales [38]. Los miembros de la familia de

la IL-12 producidos por las APCs favorecen la polarización de la respuesta inmune

15

hacia un perfil Th1, fenómeno observado con más claridad en CD que en UC, aunque en el caso de las lesiones tempranas no existe esa diferencia [39]. Sin embargo en individuos con CD se ha observado un aumento de la liberación de IL 23 que induce una respuesta local Th17 y suprime la actividad de las células T reguladoras [40].

Por su parte el aumento de la producción de TNF- α en pacientes con IBD va correlacionado con múltiples funciones proinflamatorias mediadas por el factor de transcripción NF- κ B incluyendo un aumento de la angiogénesis, inducción muerte a las células de Paneth, producción de metaloproteinasas de la matriz por parte de fibroblastos, pérdida de la función de la barrera epitelial debido al daño inducido en las células epiteliales y de nuevo activación de macrófagos y linfocitos T efectores, razones por las que se considera la citoquina proinflamatoria central en la patogénesis de la IBD [41]. Por su parte, las células linfoides innatas constituyen una fuente importante de IFN γ , IL-22 y citoquinas inducibles por la IL-23, tales como la IL-17A e IL-17B en individuos con CD [42]. Se ha identificado alta frecuencia de poblaciones de ILCs productoras de IFN γ (ILCs tipo 1) en el intestino inflamado de personas con CD, lo cual indica que estas células tienen también un papel importante en la patogénesis de la inflamación de la mucosa intestinal [43].

En cuanto a la respuesta adaptativa, los linfocitos T se hallan en gran cantidad en la lámina propia y son responsables de la producción de grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias debido a la inducción de una respuesta protectora específica contra patógenos, aunque esta se asocia también a una pérdida de tolerancia hacia la flora comensal [44]. A pesar de que el inicio del proceso inflamatorio en las etapas tempranas es bastante común; en la IBD se evidencia

una marcada distinción en la producción de IFN γ , TNF- α , IL-12/23 (estimulan la diferenciación hacia el perfil Th1), IL-15, IL-18 e IL-21 (llevan a la estabilización de

16

la respuesta Th1 polarizada) en individuos con CD en comparación con UC, lo que sugiere que la CD es dirigida por poblaciones de células Th1 [45].

Mientras que para la UC, se considera que la respuesta inmune muestra un perfil Th2 no clásico debido a que se evidencia un importante aumento de IL-5 e IL-13 pero no de IL-4 [45] [46], además de la presencia de células T asesinas naturales (NKT) asociada a procesos de fibrosis, aparición de úlceras y daño de la barrera epitelial [47]. Otra población celular importante son los linfocitos Th17, que se hallan

de manera abundante en el intestino inflamado y es inducida principalmente por la IL-6 e IL-23 (procedente de las APCs) en las dos principales formas de IBD con predominio en la UC [48]. Los linfocitos Th17 producen citoquinas como IL-17, IL-26, IL-21 e IFN γ las cuales inducen la expresión de TNF, IL-1 β e IL-8, aumentando así el reclutamiento de neutrófilos y la liberación de metaloproteinasas por parte de los fibroblastos, por lo que se les atribuye un papel importante en el mantenimiento del microambiente de la inflamación intestinal [49].

En IBD la respuesta de los linfocitos T reguladores (Tregs) es crucial en la delimitación de la inflamación, se ha encontrado que los individuos con IBD tienen un número significativamente reducido de células Treg periféricas que se aumenta a nivel intestinal [50-52]. En IBD se observa sólo una moderada expansión de los Tregs en comparación con los subconjuntos de células T proinflamatorias en el tejido intestinal, sin embargo existe evidencia de que su actividad es suficiente para contrarrestar la respuesta inflamatoria [53-55].

Podría decirse entonces que a nivel intestinal la estimulación constante de células del sistema inmune innato, el predominio de linfocitos Th1 y Th2 con desregulación Tregs, la producción de mediadores inflamatorios y una compleja red de citoquinas, son los responsables de la destrucción del tejido que conduce a la inflamación crónica característica de la IBD.

17

Asma alérgica

Definición y epidemiología

El asma, una de las enfermedades crónicas no transmisibles más comunes en niños y adultos, es un trastorno inflamatorio crónico de las vías respiratorias que se caracteriza por limitación variable del flujo de aire. El asma es una consecuencia de las complejas interacciones genético-ambientales, con heterogeneidad en la presentación clínica, el tipo e intensidad de la inflamación y remodelación de las vías respiratorias; los signos y síntomas son disnea, tos, molestias en el pecho y sibilancias. Según los hallazgos clínicos y de laboratorio, se han descrito diferentes fenotipos de asma siendo el *asma alérgica* uno de los fenotipos mejor descritos y la sensibilización alérgica el factor de riesgo más fuerte para el inicio y la progresión en niños y adultos [56].

Epidemiológicamente, el asma se considera un problema de salud mundial debido que anualmente sus tasas de prevalencia van en aumento; según el estudio de 2016 de la Red Global de Asma se estimó que más de 339.4 millones de personas en el mundo sufren de asma y que para 2025 probablemente se sumarán cien millones más [57]. Sin embargo la información acerca tendencias de prevalencia del asma, especialmente con respecto a los estudios que separen el asma alérgica del asma no alérgica es escasa; en un estudio realizado en Suecia en el que se usó la

rinoconjuntivitis alérgica como marcador de sensibilización para definir el asma alérgica, se encontró que esta aumentó de 5.0% en 1996 a 6.0% en 2006 y luego a 7.3% en 2016, mientras que la prevalencia del asma no alérgica se mantuvo estable en torno al 3,4% -3,8% [58].

Latino América incluye 20 países y está habitada por 600 millones de personas de las cuales se estima que hay alrededor de 40 millones de asmáticos. En los Estados Unidos, la prevalencia del asma es de aproximadamente 8% en adultos y 9.3% en niños; por el contrario, más de la mitad de los países latinoamericanos informan una

18

prevalencia de asma infantil superior al 15% [59]. Los datos proporcionados por el estudio ISAAC's en su fase 3 (International Study of Asthma and Allergy) indican que la prevalencia de síntomas de asma y alergia varía ampliamente entre los países de Latino América, por ejemplo tenemos que México, Paraguay, Ecuador, Bolivia, Colombia, Chile y Argentina tienen prevalencias entre el 6,9-15%. Honduras, Uruguay, Nicaragua y Panamá entre el 15-20%. Perú, Costa Rica, Cuba, El Salvador Venezuela y Brasil están por encima de este porcentaje entre 20-33% [60].

Inmunobiología del asma alérgica

El asma alérgica se caracteriza por el desarrollo de una respuesta inmunológica tipo Th2 que es desencadenada por la exposición a alérgenos ambientales, contra los cuales una minoría de la población (genéticamente susceptible o atópica) reacciona así [61]. La respuesta alérgica conducente a la inflamación de las vías respiratorias se inicia con la sensibilización, la cual ocurre cuando el individuo se expone a un alérgeno proveniente de HDMs, hongos, mascotas o pólenes entre otros. Algunos alérgenos además poseen actividad proteasa que genera daño en los epitelios

aumentando su permeabilidad e induciendo a la liberación de algunas señales químicas como la linfopoyetina estromal tímica (TSLP), IL-25 e IL-33, las cuales influyen en el estado de activación/maduración de las células dendríticas [62].

La sensibilización a los alérgenos requiere de la interacción entre las células dendríticas presentadoras de antígeno presentes en epitelio respiratorio y los linfocitos T *naive* de los órganos linfoides locales; este proceso necesita el previo procesamiento de los alérgenos en péptidos pequeños por parte de la APC y la presentación mediante complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II) al linfocito T, el cual experimenta diferenciación a un linfocito Th2 alérgeno específico productor de altas cantidades de citoquinas pro-alérgicas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 y IL-13) [63].

19

Una minoría de estos linfocitos Th2 alérgeno específicos migran al folículo e interactúan con los linfocitos B iniciando en ellos un cambio de clase que lleva a la producción de inmunoglobulina E específica de alérgeno, otros se trasladan hasta la mucosa de las vías respiratorias por influencia de quimioatrayentes y promueven la respuesta inflamatoria local Th2 [64]. Por otro lado, se ha demostrado que a nivel de la submucosa células linfoides innatas de tipo 2 (ILC2) producen grandes cantidades de IL-5 y IL-13 en respuesta a IL-25 e IL-33, lo cual promueve aún más el desarrollo de la respuesta alérgica [65].

La IgE secretada se encuentra libre circulando en el organismo y por otro lado unida a la superficie de células efectoras a través de sus receptores de alta afinidad (FcεRI) presentes principalmente en mastocitos, eosinófilos y basófilos, como también en los receptores de baja afinidad (FcεRII-CD23), en los linfocitos B, células dendríticas y macrófagos; dando origen a lo que se denomina células sensibilizadas [66]. Los receptores FcεRI también se hallan en células dendríticas y

se ha demostrado que esta IgE captura los alérgenos y facilita su presentación a los linfocitos Th2 de memoria [67]. Es de resaltar que la presentación de alérgenos dependiente de FcεRI-IgE por parte de las células dendríticas puede reducir críticamente el umbral de un individuo atópico para ejecutar respuestas de linfocitos T específicos de alérgenos; de hecho este tipo de activación de la célula dendrítica lleva a un aumento de la producción de CCL28 una quimiocina que atrae selectivamente a los linfocitos Th2 [68]. Esta activación de linfocitos Th2 alérgeno específico se asocia con una amplificación de la producción de IgE en un ciclo vicioso de los mecanismos inmuno-patogénicos del asma alérgica.

En una exposición al alérgeno posterior a la sensibilización, su unión al complejo IgE-FcεRI de los mastocitos induce la activación de estas células y la secreción de mediadores preformados (histamina y proteasas) y lipídicos de nueva síntesis (leucotrienos y prostaglandinas) que conjuntamente conducen al aumento de la

20

permeabilidad vascular, contracción del músculo liso de las vías respiratorias y secreción exacerbada de moco provocando que el flujo de aire disminuya y en general la sintomatología del asma alérgica [69].

Además, las citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento liberados por el mastocito estimulan el reclutamiento de células inflamatorias como eosinófilos, macrófagos, neutrófilos y linfocitos T. Los productos liberados por este conjunto de células activas asientan las bases de la hiperreactividad y remodelación de las vías respiratorias al causar daño en las capas epiteliales, favorecer la broncoconstricción y la deposición de matriz extracelular. Así, niveles elevados de IL-5 en tejido bronquial causan eosinofilia en las vías respiratorias, mientras que un aumento de IL-4 e IL-13 inducen metaplasia de células caliciformes e hiperreactividad. La persistencia del proceso inflamatorio y la continua estimulación con el alérgeno generan cambios persistentes en la estructura de las

vías respiratorias como fibrosis subepitelial y deposición de colágeno en el músculo liso, llevando a la fase crónica del asma [70].

En contraparte los Tregs son una población clave en la supresión de la respuesta Th2 y la patogénesis del asma [71], se ha reportado que individuos con asma tienen menos Tregs ($CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$) en la sangre periférica que los individuos sin asma y que en niños con asma hay deficiencia pulmonar de estas células en comparación con niños sin asma [72, 73]. Los estudios en ratones han demostrado que la eliminación de Tregs antes de la sensibilización alérgica agrava la inflamación de las vías respiratorias y la hiperreactividad bronquial; mientras que la transferencia de Tregs de animales sanos a animales asmáticos suprime la hiperreactividad bronquial, reduce el número de eosinófilos y los niveles de IL-5 e IL-13 hallados en lavado broncoalveolar (BAL), principalmente mediante la producción de TGF- β e IL 10 [74, 75].

Cistatinas de helmintos y su papel inmunomodulador en IBD y el asma

Los helmintos ejercen una respuesta dual sobre el sistema inmune; por un lado, pueden inducir una fuerte respuesta inmune de tipo 2 similar a la observada en las alergias y por el otro, pueden ejercer una fuerte inmunosupresión [76] estos efectos en sus hospederos dependen de varios factores como son: la especie infectante, la intensidad de la infección y factores genéticos de respuesta del hospedero [77]. En las últimas dos décadas se ha usado modelos animales y celulares para estudiar los mecanismos mediante los cuales la infección o los productos de E/S de los helmintos ejercen inmunomodulación, principalmente los involucrados en la supresión o desviación de la respuesta inmune que generan un ambiente antiinflamatorio prolongador de la vida del parásito [78]. El conocimiento acerca de estos mecanismos abre la posibilidad de usar moléculas derivadas o

recombinantes

de helmintos en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y los estudios actuales se dirigen a investigar no solo los mecanismos, sino la eficiencia y la seguridad de su administración [79].

Entre las moléculas secretadas por diversas especies de helmintos se encuentran las cistatinas. Las cistatinas son un grupo homólogo de inhibidores de cisteína proteasas altamente conservadas en la naturaleza que inhiben a la mayoría de las cisteína endopeptidasas del tipo papaína y a otras peptidasas que tienen un grupo sulfhídrico en el sitio activo. Son secretadas en varios estadios de desarrollo y participan en distintos procesos fisiológicos del parásito, además influyen en la respuesta inmune del hospedero, modulándola hacia un estado de inmunosupresión [80]. Experimentalmente se ha observado que las cistatinas de helmintos ejercen inmuno-modulación mediante: (i) la interferencia con la maduración de las células dendríticas, el procesamiento y presentación de antígeno, (ii) la producción de citoquinas reguladoras, (iii) inducción de macrófagos reguladores y (iv) la inducción de liberación de óxido nítrico [81].

22

Se han aislado, caracterizado y descrito cistatinas con propiedades inmunomoduladoras en *Onchocerca volvulus*, *Brugia malayi*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Litomosoides sigmodontis*, *Heligmosomoides polygyrus*, *Clonorchis sinensis* y *Acanthocheilonema viteae* entre muchas otras especies [82]. Siendo a la fecha la cistatina recombinante de *A. viteae* (*AvCistatina*) una de las mejor caracterizadas, se ha demostrado que tiene actividad directa suprimiendo la proliferación de los linfocitos T [83]. En un modelo murino de asma alérgica inducida por ovoalbúmina (OVA), la administración de *AvCistatina* durante la fase de sensibilización con el alérgeno (modelo preventivo) o antes del reto alérgico (modelo terapéutico) disminuyó significativamente la infiltración de células inflamatorias en el pulmón, principalmente de eosinófilos, también previno la

hiperreactividad bronquial y redujo significativamente la producción de citoquinas Th2; de la misma manera en un modelo de colitis aguda inducida químicamente por DSS se observó disminución del infiltrado inflamatorio y recuperación de la mucosa intestinal, en ambos se reportó un aumento significativo de la producción de IL-10 especialmente por parte de los macrófagos [84].

Resultados similares se observaron en un modelo de inflamación de las vías aéreas inducido por un alérgeno de polen clínicamente relevante (GPE), y el efecto sobre PBMC de individuos humanos alérgicos al polen. En este estudio no solo se observó disminución del reclutamiento de eosinófilos y de la producción de citoquinas Th2

en pulmón, sino también disminución de los niveles de IgE alérgeno específica. Ex vivo la re estimulación con GPE de las células del bazo provenientes de ratones previamente tratados con *AvCistatina* redujo la producción de IL-5 e IL-13, y aumento significativamente la producción de IL-10. En las PBMC humanas que se trataron con *AvCistatina* se observó un cambio en la respuesta de citoquinas hacia un perfil Th1 con mayor producción de IFN γ [85].

Estudios más recientes demostraron que los macrófagos son el blanco principal de la *AvCistatina*, que induce en ellos un fenotipo conocido como *macrófagos reguladores* caracterizado por producir altas cantidades de IL-10 [86]. Incluso la transferencia de estos macrófagos reguladores es suficiente para suprimir la inflamación alérgica de las vías aéreas inducida por OVA y la inflamación intestinal inducida por DSS [87], otro efecto es también la producción de IL-10 por parte de los linfocitos T y la inducción de Tregs. En cuanto a la inflamación intestinal un comportamiento similar se observó con la cistatina recombinante de *C. sinensis* (rCsStefin-1), la cual mejoró todos los parámetros de la inflamación inducida por

DSS, en particular en este estudio se encontró que el número de macrófagos productores de IL-10 se aumentó significativamente tanto en el bazo como en los MLN de los ratones tratados con rCsStefin-1 [88].

A. lumbricoides produce y secreta una cistatina homologa a otras cistatinas de helmintos con actividad inmunomoduladora confirmada. Esta cistatina fue descrita estructural y funcionalmente como una proteína de 14.6 kD, mediante la clonación y expresión del ADNc obtenido de parásitos adultos [89, 90], sin embargo a la fecha la respuesta inmune o las propiedades inmunomoduladoras no han sido estudiadas, por lo que esta tesis explora estos aspectos claves empleando la cistatina recombinante (rAI-CPI) en modelos *in vitro* e *in vivo*.

La cistatina de *A. lumbricoides* tiene propiedades inmunomoduladoras de reducen las manifestaciones inflamatorias en distintos contextos fisiopatológicos.

25
OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar las propiedades inmunomoduladoras de la cistatina recombinante de *A. lumbricoides*.

Objetivos específicos

1. Clonar, expresar y purificar como proteína recombinante la cistatina de *A. lumbricoides* a partir de una biblioteca de ADNc del parásito adulto.
2. Evaluar la toxicidad aguda y describir la respuesta inmune *in vitro* e *in vivo* a rAI-CPI incluyendo su alergenicidad.
3. Evaluar el efecto inmunomodulador de rAI-CPI en un modelo agudo de inflamación intestinal inducida químicamente en ratones BALB/c.
4. Evaluar el efecto inmunomodulador de rAI-CPI en un modelo de inflamación alérgica de las vías aéreas inducido por el extracto del acaro *B. tropicalis* en ratones BALB/c.

Primera parte: Obtención de la cistatina recombinante

Material biológico y obtención de ADNc

Este trabajo fue diseñado como un estudio descriptivo experimental. En primer lugar se construyó una biblioteca de ADNc a partir de parásitos adultos de *A. lumbricoides*, los cuales se obtuvieron mediante desparasitación con albendazol en un comunidad urbana (Barrio La Candelaria, Cartagena de Indias). Se colectaron 3 hembras adultas de *A. lumbricoides* con la siguiente descripción: la primera de 15 cm de longitud y 1,21 gramos, la segunda de 21 cm y 3,8 gramos y la tercera de 19 cm y 2,9 gramos. Los parásitos se lavaron con abundante agua estéril y se almacenaron a -80°C en nitrógeno líquido.

Para la extracción de ARN, los especímenes se cortaron en fragmentos de aproximadamente 2 cm y se colocaron sobre un mortero estéril tratado con inhibidor de ARNasas DEPC (Diethyl Pirocarbonate) y pre-enfriado a -80°C. La extracción de del ARN total se realizó usando Trizol (Gibco, Invitrogen) y el ARN mensajero se purificó usando el método *batch* (Oligotex, Qiagen GmbH, Hilden Germany). La concentración y calidad de las muestras se analizó usando el sistema automatizado de electroforesis Experion (BioRad). Posteriormente, se construyó una biblioteca de ADNc usando un sistema comercial (cDNA Synthesis Kit Agilent Santa Clara, CA, USA). Los insertos de ADNc se ligaron al vector Uni-ZAP XR y se empaquetaron en el virus bacteriófago Lambda (Gigapack III Gold). El bacteriófago se usó para infectar la bacteria *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' y amplificar la biblioteca la cual se almaceno a -80°C. La verificación del empaquetamiento se realizó amplificación usando los cebadores oligo dT o M13 y T3 o T7 y T3 recomendados por el fabricante.

Producción de rAI-CPI

La secuencia de ADNc codificante de la cistatina se aisló de la biblioteca de ADNc de *A. lumbricoides* mediante amplificación por PCR utilizando los cebadores específicos (directo 5'GAAGTTCTCCCACGGCTTCT3' y reverso 5'TCACAGTTGCAGCGATCATT3') diseñados de acuerdo a la secuencia de nucleótidos reportada en el GeneBank (HQ404231.1, www.ncbi.nlm.nih.gov) [89].

La secuencia de aminoácidos ADR51550.1 se usó para realizar el cálculo relativo de la masa molecular y el punto isoeléctrico

(http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html). El amplicon obtenido fue secuenciado para verificar su identidad mediante un servicio comercial (Corpogen, Colombia).

La secuencia optimizada se insertó en el plásmido pQE30 (servicio comercial, GenScript, USA). Se usaron 5 ng del plásmido recombinante (pQE30/Al-CPI-His tagged) para transformar la cepa de *E coli* SG13009 (Novagen) mediante electroporación en medio SOC. Las transformantes se seleccionaron por su resistencia simultánea en medio agar Luria-Bertani (LB) con 100 mg/ml de ampicilina y 30 mg/ml de kanamicina. Las colonias de transformantes fueron crecidas en medio líquido LB con ampicilina y kanamicina durante 12 horas y transferidas a nuevo medio en una dilución 1:20 e incubadas a 37°C en agitación de 250 rpm hasta que alcanzaron una OD₆₀₀ de 0.5. A una muestra de 5 ml de este cultivo se le adicionó IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido) 1mM para inducir la expresión de la proteína teniendo en cuenta un control de cultivo no inducido.

La expresión de rAI-CPI se verificó por electroforesis SDS-PAGE al 15% bajo condiciones reductoras para lo cual se tomaron muestras de 200 μL de cultivo que se centrifugaron a máxima velocidad durante 1 minuto, se resuspendieron en tampón Laemmli, se calentaron a 95°C por 5 minutos y se cargaron (10μL) en el gel. La expresión se verificó por observación de una banda de proteína con el peso molecular esperado no presente en el control de cultivo no inducido. La expresión

final de la proteína se realizó en cultivos inducidos con IPTG 0.5 mM durante 20 horas a 25°C en agitación suave 200rpm.

Purificación de rAI-CPI y remoción de endotoxina

Para la purificación de la proteína, los cultivos se centrifugaron a 5000 g durante 30 minutos a 4°C, las células se resuspendieron en Tris-HCl 50 mM/ NaCl 30 mM pH 7.8 y se lisaron por ultra-sonicación usando el equipo FB 705 (Fisher Scientific). El pellet se resuspendió en Tris-HCl/0.2% NLS (N-lauroylsarcosine, Sigma) 40 mM pH 8.0 y se dejó en agitación durante 24 horas a 20°C para solubilizar las proteínas.

Posteriormente se centrifugo a 5000 g durante 30 minutos y el sobrenadante se cargó con una columna de níquel Ni-NTA (ácido nitrilotriacético, Qiagen). Se lavó la columna con 10 volúmenes de Tris-HCl 20 mM pH 8.0 y se eluyó la proteína con Tris-HCl 20 mM/NaCl 200 mM/imidazole 50 mM pH 8.0, se concentró a 5 ml aproximadamente usando tubos concentradores (Millipore Amicon 3000-Da) y se dializó en agua a 4°C durante 12 horas (membrana 8000-Da) con agitación. La concentración final se realizó usando el reactivo Bradford y cada paso de la purificación se monitoreo mediante SDS-PAGE. Finalmente la proteína se liofilizo y se almaceno a -20°C para usos posteriores, sin embargo para la mayoría de los ensayos descritos en esta tesis se requirió utilizar la proteína sin liofilizar en particular para la remoción de endotoxina bacteriana. La remoción y cuantificación de endotoxina bacteriana se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante de ToxinEraser Endotoxin Removal Kit y Toxin Sensor, (GenScript, USA).

Pruebas de actividad bioquímica y dicroismo circular

La actividad bioquímica de rAI-CPI de inhibición de cisteína proteasas se evaluó en ensayos utilizando las enzimas papaína y catepsina B humana (Sigma, Saint Louis, USA) como sustratos. Se evaluó la cinética de actividad de ambas

proteasas sobre sus sustratos colorimétricos específicos (Z-arg-arg-p-NA diluido en DMSO y Glu

Phe-leu-p-NA diluido en agua) en ausencia o presencia de rAI-CPI [91, 92]. En una

29

reacción de 15 minutos, las proteasas y sus sustratos específicos se incubaron solos, con cistatina de pollo (como control positivo) o con rAI-CPI a diferentes concentraciones. La activación de la papaína (50 µg/reacción) se realizó incubando en buffer Tris-HCl 50 mM, cisteína 2 mM y EDTA 0.1 mM, pH 6.5 durante 30 minutos a 40°C. La catepsina B (1 ng/reacción) se activó incubando en buffer acetato de sodio 100 mM, EDTA 2 mM, DTT 1 mM, cisteína 4 mM, pH 5.5 durante 5 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia de los productos liberados se detectó en un espectrofotómetro (SpectraMax) a 410 nm cada 20 segundos durante 5 minutos. La actividad inhibitoria de rAI-CPI se expresó como un porcentaje de la actividad total detectada en ausencia de esta [93].

Los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron en un dicrógrafo Jasco J-715 con una lámpara de xenón de 150 W. Se usó una cubeta circular con un paso óptico de 0.1 cm. La concentración de rAI-CPI usada fue de 890 µg/ml en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7.5 y tras las medidas de dicroísmo circular se determinó la concentración de proteína con el método del BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo, Rockford, USA). El barrido de longitud de onda se realizó a una velocidad de 50 nm/min entre 190 - 260 nm. La elipticidad a cada longitud de onda se expresó como la elipticidad molar por residuo de aminoácido en grados·cm² /dmol y se corrigió con la elipticidad molar obtenida para la disolución de tampón. Los porcentajes correspondientes al aporte de cada una de las estructuras secundarias a los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron mediante la deconvolución de los espectros con el programa CDNN CD (Applied Photophysics), utilizando una matriz de proteínas con contenidos en estructura secundaria conocidos. Este análisis se realizó en la Universidad Complutense de

Madrid en colaboración con el Doctor Oscar Palomares [94].

30

Segunda parte: Respuesta inmune in vitro e in vivo a rAI-CPI

Ensayo de citotoxicidad

Se evaluaron *in vitro* la citotoxicidad y el perfil de citoquinas inducidas por rAI-CPI sobre la línea celular de macrófagos peritoneales de ratón RAW 264.7. Para esto, se cultivaron células RAW 264.7 (American Type Culture Collection, Sigma, Manassas, VA, USA) en Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) 10%, L-glutamina (2mM) y antibiótico (100 U/mL de penicilina A y 100 U/mL de estreptomycin) a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO₂. El efecto de rAI-CPI sobre la viabilidad celular se determinó empleando el método de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-

il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) [95]. Los macrófagos (2×10^5 células/mL) se sembraron en placas de 96 pozos en presencia de diluciones de rAI-CPI (100 – 0.01 µg/mL) libre de endotoxinas (0.0018 EU/mL), seguido de la estimulación con LPS (1 µg/mL, Sigma) y se incubaron durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se adicionó MTT (0.25 mg/mL, Sigma) diluido en medio de cultivo libre de SFB y se incubó durante 4 horas. Posteriormente, el MTT fue removido por aspiración, los cristales de formazán se disolvieron adicionando 100 µL de DMSO y se cuantificó su absorbancia a 550nm en el Multiskan EX (Thermo Scientific). Se calculó la IC₅₀ mediante regresión no lineal.

Cuantificación de la liberación de óxido nítrico

Se cuantificó la liberación de óxido nítrico (NO) empleando el método de Griess

[96]. Los macrófagos (2×10^5 células/mL) se sembraron en placas de 96 pozos en presencia de rAI-CPI (25 – 0.5 $\mu\text{g/mL}$ libre de endotoxina), seguido de la estimulación con LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) y se incubaron durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se recogieron los sobrenadantes y se mezclaron con reactivo de Griess (sulfanilamida 1%, ácido fosfórico al 5% y diclorhidrato de naftiléndiamina al 0.1%). Se incubó por 10 minutos y se determinó su absorbancia a 550nm. Paralelamente,

31

se analizó la liberación de óxido nítrico en células no estimuladas (no LPS). Se calculó la concentración de nitritos mediante una curva de calibración utilizando nitrito de sodio.

Análisis de la expresión de genes y producción de citoquinas Se analizaron los cambios transcripcionales inducidos por rAI-CPI (14.2 $\mu\text{g/mL}$) frente al control de estímulo con LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) a varios intervalos de tiempo (1 h, 4 h, 10 h y 20 h) y también cuando las células se incubaron con rAI-CPI antes de estimularse con LPS. Los macrófagos (2×10^5 células/mL) se sembraron en placas de 24 pozos en presencia de rAI-CPI solamente o rAI-CPI seguido de la estimulación con LPS y se incubaron durante sus respectivos tiempos. Posteriormente las células se removieron y se resuspendieron en *RNA Later* (Qiagen, GmbH, Hilden Germany), la extracción total se realizó empleando el kit GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, EU Lithuania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ARN extraído se cuantificó (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific) y se sintetizó el ADNc usando el estuche Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific, EU Lithuania). La cuantificación relativa de la expresión se realizó usando el 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), empleando Power SYBR® Green (Applied Biosystems, USA) y cebadores específicos para los genes IL-12, TNF- α , IL-1 β ,

IL-6, IL-10, y TGF- β . La expresión relativa se calculó mediante el método delta-delta CT utilizando como control β -actina. Un cultivo en condiciones similares se dejó incubar durante 24 horas posterior al estímulo, se colectaron los sobrenadantes y se midieron las concentraciones de las citoquinas of IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN- γ , TNF- α y LAP TGF- β mediante ELISA (eBiosciences, San Diego, CA, USA).

Activación del NF- κ B utilizando células THP1-Blue

Se analizó el efecto de rAI-CPI en la activación de las vías de TLR usando la línea celular de monocitos humanos THP1-Blue (InvivoGen San Diego, CA). Estas células

32

expresan el gen indicador fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) dirigida por el promotor NF- κ B. Las células se sembraron en placas de fondo plano de 96 pocillos (1×10^6 células/mL) en medio RPMI suplementado con SBF 10%, 50U/ml de penicilina, 50 μ g/ml de estreptomina y L-glutamina 2 mM. Para la estimulación las células se trataron con rAI-CPI libre de endotoxina (1 μ M- 10nM), o los ligandos de TLR4, TLR2 (LPS 100nM y PamC3SK4 100nM respectivamente) como control de activación y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 18 horas. En otros ensayos las células se cultivaron con diferentes concentraciones de rAI-CPI durante 30 minutos y luego se estimularon con los ligandos de TLR. Para cuantificar la estimulación, se transfirieron 20 μ l de sobrenadante de cada pozo a una placa limpia, se añadió 180 μ l/pocillo del reactivo QUANTI-Blue™ (InvivoGen San Diego, CA) y se incubó durante 30 minutos. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 620nm. El porcentaje de los niveles de SEAP secretados al medio de cultivo se calculó mediante la fórmula $R (\%) = 1 - [(A - C) / (B - C)] \times 100$, donde A es la media A₆₂₀ de las tres repeticiones obtenidas cuando las células se cultivaron con rAI CPI, y B es el valor medio de A₆₂₀ obtenido cuando las células se expusieron a ligandos de TLR, y C es la media A₆₂₀ de tres repeticiones

obtenidas cuando a las células se les adiciono solo PBS [97].

Pruebas de reactividad IgE-rAI-CPI en humanos

Para la evaluación de la actividad alérgica de AI-CPI se emplearon muestras derivadas de pacientes asmáticos alérgicos residentes en la ciudad de Cartagena de Indias que fueron reclutados en el programa ASA (Ascaris y Severidad del Asma), proyecto de investigación (602-2009, Departamento Administrativo de Ciencia y Tecnología e Innovación y Universidad de Cartagena). Inicialmente se evaluó la reactividad IgE a rAI-CPI mediante western blot; para ello la proteína se separó por electroforesis SDS-PAGE tris-glicina al 16% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (MiniTrans blot instrument, BioRad) durante 90 minutos a 180mA. Luego la membrana se bloqueó con leche descremada-PBS y se incubó

33

durante 12 horas con una mezcla de sueros proveniente de individuos con altos títulos de IgE a Ascaris (ImmunoCAP >0.35 kU/L) (Tabla 1). Luego la membrana se incubó con *Anti-IgE* humana unida a fosfatasa alcalina en una dilución 1:500. El complejo inmune se detectó enzimáticamente usando el sustrato cromógeno NBT BCIP (*p-nitro blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate* BioRad).

Tabla 1. Pool de sueros usados para la detección de la reactividad IgE mediante western blotting						
IgE a Ascaris kU/L ImmunoCAP (individuos estudio Ascaris y Severidad del Asma)						
<i>Pool A Positivo</i>	32,69	39,22	39,55	49,27	60,21	78,86
<i>Pool B Negativo</i>	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02

La prevalencia de anticuerpos IgE específicos a rAI-CPI se determinó mediante ELISA en 237 individuos sensibilizados y no sensibilizados a *A. lumbricoides*, pertenecientes al estudio ASA que se mencionó antes. En cada pocillo de una microplaca (Immulon™ DK) se inmovilizaron 0.5 µg de rAI-CPI diluida en tampón

carbonato/bicarbonato pH 9.2, posteriormente las placas se lavaron con PBS-0.1% Tween 20 y se bloquearon con tampón de bloqueo (PBS-BSA 1%/azida de sodio 0.02%) durante 3 horas. Los sueros se diluyeron en tampón de bloqueo (1:5) y se incubaron durante 12 horas, tras 5 lavados a cada pozo se adiciono 100µL de anti IgE humana unida a fosfatasa alcalina y se incubo durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de 5 lavados más, se adiciono 100µL del sustrato p-Nitrofenil fosfato y se incubo durante 30 minutos, al término de los cuales la reacción se detuvo por adición de NaOH 3N y se realizó la lectura de la absorbancia a 405nm (espectrofotómetro Spectra MAX250 Sunnyvale, California 94089). Todas las lecturas se realizaron por duplicado previa titulación del ELISA, por placa se incluyeron controles positivos y negativos proporcionados por el Instituto de Investigaciones Inmunológicas. Para la determinación de la IgG4 a rAI-CPI se usó

34

una dilución de sueros de 1:2000 y se usó la anti IgG4 humana (γ -chain specific) unida fosfatasa alcalina (BD Biosciences Pharmigen) en una dilución 1: 32.000 [98].

Adicionalmente, se realizaron pruebas de activación de basófilos (BAT) y liberación de histamina. Para esto se seleccionaron individuos del estudio ASA que tuvieran IgE y prueba cutánea al el extracto de *A. lumbricoides* (Tabla 2). A estos individuos (n = 8) se le tomaron muestras de sangre en tubos con EDTA y se realizó la prueba siguiendo todas las instrucciones y recomendaciones del *Allergenicity Kit* (Cellular Analysis of Allergy from Beckman Coulter, Marsella, FR). Las muestras control se incubaron con PBS, como control positivo se usó anti-IgE y diluciones del extracto de *A. lumbricoides* y de rAI-CPI (0.1 µg/ml, 1µg/ml and 10µg/ml). Luego las muestras de incubaron con los anticuerpos monoclonales unidos a fluoroforos CRTH2-FITC, CD203-PE y CD3-PC durante 15 minutos a 37° C.

Posteriormente se lisaron los eritrocitos y las células restantes se lavaron y se resuspendieron en PBS formaldehído al 0.1%, finalmente se analizaron por citometría de flujo y los resultados se expresaron como índice de estimulación. El ensayo de liberación y cuantificación de histaminas se realizó siguiendo todas las instrucciones del fabricante (IBL Release and Histamine ELISA, Hamburg, Germany).

Tabla 2. Caracterización de los donantes para las pruebas de BAT y LH					
ID	IgE Ascaris (kU/L)	IgE rAI-CPI (OD)	PC*rAI-CPI (25 µg/ml)	PC*rAI-CPI (50 µg/ml)	PC*Extrac to de Ascaris
040	9.02	0,165	2 (4)	1(3)	8 (23)
064	3,61	0,947	2 (4)	1 (3)	4 (20)
084	2,49	0.165	0 (2)	0 (2)	8 (23)
101	0.74	0.677	0 (1)	0 (1)	4 (18)
109	2.18	0.186	0 (0)	0 (0)	4 (18)
167	32,69	0,451	0 (2)	0 (0)	6 (15)
193	0.93	0.296	0 (2)	0 (2)	5 (16)
217	3,64	0,222	0 (0)	1 (3)	6 (24)
NS	0,10	0,111	0 (0)	0 (0)	0 (0)

PC=prueba cutánea (*) diámetro en mm de pápula (eritema), Individuos pertenecientes al estudio ASA. kU/L (ImmunoCAP).

Pruebas de citotoxicidad aguda, respuesta inmune y anafilaxia cutánea pasiva (PCA) en ratones BALB/C

Todos los ratones con los que se trabajó correspondieron a hembras de genética BALB/c entre 6 y 8 semanas de edad y 20± 2 g de peso (Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia) que fueron mantenidas con alimento y agua ad libitum con ciclos de día/noche de 12 horas, 50-60% de humedad y temperatura

controlada (22 ± 3 °C) en el bioterio de la Universidad de Cartagena. Los experimentos animales fueron realizados de acuerdo con los lineamientos institucionales (Acta de comité de Bioética 36, 13-10-2011) y las regulaciones internacionales [99].

Para determinar la seguridad de la administración de rAI-CPI, los ratones se inyectaron intraperitonealmente (i.p) con la proteína libre de endotoxina a una dosis diaria de $1\mu\text{g/g}$ de peso durante 15 días ($n=6$). Diariamente se monitoreo el peso y se documentaron los cambios en sus patrones de comportamiento, apariencia física, dolor, heridas y signos de enfermedad en comparación con un grupo control (al que se inyectó PBS) [100]. La eutanasia se realizó mediante inyección de dosis letal de Pentobarbital y se extrajeron los órganos (hígado, riñones y bazo) para su evaluación macroscópica y de peso. En sangre se analizaron parámetros bioquímicos como glucosa, albúmina, proteínas totales, nitrógeno ureico sanguíneo (BUN), colesterol total, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina [101], estas pruebas se realizaron en un laboratorio clínico certificado (Clínica Cardiovascular Jesús de Nazaret, Cartagena).

Para el estudio inicial de la respuesta inmune a rAI-CPI, a un grupo de ratones ($n=6$) se les inyectó i.p $20\mu\text{g}$ de la proteína libre de endotoxina (tres veces cada 7 días) y a otro grupo de ratones solamente PBS ($n=6$), al día 31 se realizó la eutanasia y se tomaron muestras de sangre para evaluación de anticuerpos totales y específicos tipo IgE, IgG, IgG1 e IgG2a, también se analizó la respuesta de citoquinas en cultivo de esplenocitos re estimulados con rAI-CPI después de 72 horas de incubación

mediante la maceración del tejido, los esplenocitos se cultivaron en medio RPMI 1640 completo (suplementado con 1mM de piruvato de sodio, 2mM, de L-glutamina, 100 U/mM penicilina-estreptomocina y 10% de SFB inactivado (Qualified One Shot, Gibco, USA). Las células (1×10^6 /mL) se estimularon con 20 μ g/mL de rAI-CPI o medio como control y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 72 horas. Tras la incubación se colectaron los sobrenadantes de los cultivos y se almacenaron -80°C hasta su uso. Los niveles de citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos (IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IFN γ , TNF α , LAP, TGF- β) se determinaron mediante ELISA, usando un estuche comercial y siguiendo las recomendaciones del fabricante (eBiosciences, USA). Las suspensiones celulares del bazo también se utilizaron para la identificación de Tregs (CD3⁺CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) mediante citometría de flujo, siguiendo las instrucciones del estuche comercial *Foxp3 anti-mouse staining kit* (BD, San Diego, CA, USA). Todos los análisis de citometría de flujo se realizaron en el citómetro FACSaria III (BD Biosciences, USA) del Instituto de Investigaciones Inmunológicas y usando el software Kaluza Análisis versión 2.1 (Beckman Coulter, USA).

Para la prueba de anafilaxia cutánea pasiva se utilizaron sueros de ratones (n=6) por grupo que fueron inmunizados con 25 μ g de rAI-CPI, 25 μ g de OVA o PBS en emulsión con 2mg/ml de Hidroxido de Aluminio (tres veces cada 7 días). El día 21 se realizó la eutanasia de estos ratones y se obtuvieron los sueros para medición de IgE total y específica y para el uso en la prueba de PCA. La prueba se realizó mediante la administración intradérmica (oreja y abdomen) de 0,1 mL del suero (anti-rAI-CPI, anti-OVA o control PBS) sin diluir y diluidos (1/10). Pasadas 24 horas se indujo la reacción anafiláctica por administración vía intravenosa de 0.2 mL de una solución al 0,5 % del colorante azul de Evans conteniendo 25 μ g de OVA, 25 μ g de rAI-CPI o PBS, pasadas las 2 horas y tras observación de la circulación del Azul de Evans se realizó la eutanasia, se extrajeron las porciones de piel del

abdomen y las orejas completas y se colocaron en tubos con 1 mL de formamida, se incubaron a 37°C durante 48 horas y se midió la densidad óptica del colorante extravasado a una OD_{623 nm} [103].

Tercera parte: Inmunomodulación por rAI-CPI en dos modelos murinos de inflamación

Modelo de inflamación intestinal inducida químicamente por DSS

Inducción química de la colitis

En este estudio la colitis experimental se indujo mediante la administración oral de DSS (Dextran Sulfato de Sodio 36,000–50,000kDa; MPBiomedicals, OH, USA) al 4% en el agua de consumo de los ratones durante 7 días (un modelo agudo de inflamación intestinal) [104]. Los ratones (BALB/C) fueron aleatorizados en 4 grupos de (n=6): grupo control sano (control), grupo control enfermo (DSS control), un grupo con inflamación intestinal inducida y tratado con rAI-CPI a 0.5 µg/g de peso (grupo rAI-CPI 1) y grupo con inflamación intestinal inducida y tratado con rAI-CPI a 0.25 µg/g de peso (grupo rAI-CPI 2). rAI-CPI fue administrada i.p diariamente durante 14 días, es decir, antes y durante la inducción de la enfermedad inflamatoria intestinal

(Figura 1). La concentración de endotoxina en la proteína fue 0.018 EU/mg, menos de 0.0175 EU por aplicación. Este modelo y todos los parámetros de evaluación se realizaron dos veces de manera independiente.

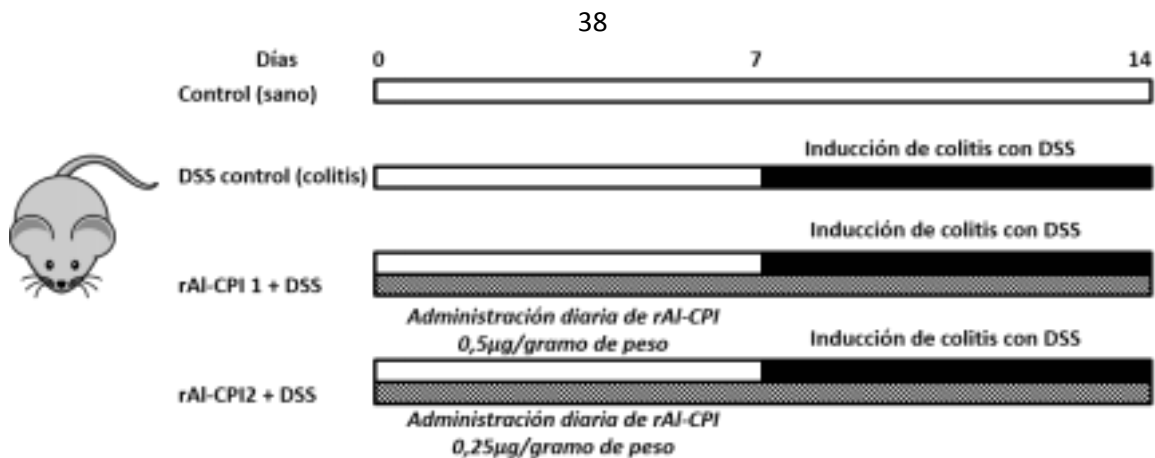


Figura 1. Modelo agudo de enfermedad inflamatoria intestinal inducida por DSS. Previa estandarización del modelo en el que se usaron concentraciones de DSS al 3, 4 y 5%.

Índice de actividad de la enfermedad inflamatoria intestinal (DAI) Durante los 14 días del modelo agudo se determinaron los índices de actividad de la enfermedad inflamatoria intestinal (disease activity index, DAI) basados en la pérdida de peso, la consistencia de las heces y el sangrado intestinal (Tabla 3) De igual manera se documentó el cambio de peso corporal en cada grupo y se expresó en forma de porcentaje respecto al día 0 [105]. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical el día 14.

Tabla 3. Sistema de puntuación para los índices de actividad de la enfermedad inflamatoria intestinal (DAI)				
<i>Puntuación</i>	<i>Pérdida de peso (%)</i>	<i>Consistencia de la heces</i>	<i>Sangre en heces</i>	<i>Prolapso rectal</i>

0	1-4	Sólido	No visible	Ausente
1	5-8	Suave	Ocasional	Menor
2	>9	Líquido	Visible	Significativo

Análisis macroscópico e histológico del colón

Durante la eutanasia se realizó la extracción completa del colon, este fue lavado con PBS y se determinó el índice peso/longitud (mg/mm) como marcador macroscópico de inflamación. Para el análisis microscópico, las secciones de tejido colónico fueron conservadas en formalina neutra y posteriormente embebidas en

39

parafina, cortadas y teñidas con eosina-hematoxilina (H&E). La puntuación histológica se realizó mediante una escala que clasifico la extensión de la infiltración inflamatoria en las capas colónicas [105] (Tabla 4).

Tabla 4. Sistema de puntuación para el análisis histopatológico	
<i>Hallazgo histológico</i>	<i>Puntuación</i>
Ulceración	0(ausente) 1 (Muy ligero) 2(Leve) 3(Moderado) 4(Severo)
Infiltración de polimorfonucleares	
Infiltración de mononucleares	
Fibrosis	
Edema	
Dilatación	
Depleción de células caliciformes	

Medida de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) y producción de citoquinas en colon

Posterior a la extracción del colon, se tomaron piezas de colon de aproximadamente 1 cm y se sumergieron en tampón fosfato

hexa-decil-trimetil-amonio (HTAB) 0.5% y ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA) 0.3% (pH 6.0), la cuales se homogenizaron usando el homogenizador de tejido (TissueRuptor-Qiagen). Luego, las muestras de sometieron a 3 ciclos rápidos de congelación–descongelación con nitrógeno líquido y se centrifugaron durante de 20 minutos a 4000 g a 4°C. El sobrenadante recuperado se empleó para evaluar la actividad de la enzima MPO utilizando el protocolo descrito por Laroui et al, con algunas modificaciones [106]. En resumen, volúmenes iguales de sobrenadante se mezclaron con una solución de o-dianisidina dihidroclorhidrato 0.067% y peróxido de hidrógeno 0.003% y se incubaron dentro del lector de placas documentando la velocidad de cambio de OD₄₅₀ (Multiscan EX Thermo). Los resultados se presentan como unidades de actividad de la enzima por mg de proteínas. Una unidad de actividad fue definida como aquella que degrado 1µmol de peróxido de hidrogeno por minuto a 25°C.

Para el análisis de citoquinas las muestras fueron homogenizadas de manera similar pero esta vez usando el reactivo para extracción de proteínas (T-PER, Thermo

40

Scientific) mezclado con el coctel completo de inhibidor de proteasas (Easy pack, Roche, Mannheim Germany). Los homogenizados se centrifugaron a 10 000 × g por 10 minutos y los sobrenadantes de transfirieron a microtubos y se almacenaron para determinar los niveles de IL-6, IL-12p70, IFN-γ, TNF-α, IL-10 y LAP-TGF-β mediante ELISA (eBiosciences, San Diego, CA, USA).

Medición de la expresión génica en colon

Para el análisis de expresión, se extrajeron piezas de colon de aproximadamente 1 cm y se sumergieron en microtubos conteniendo *RNA Later* (Qiagen, GmbH, Hilden Germany) y se homogenizaron en frío, la extracción total de mRNA se realizó empleando el estuche GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific,

EU

Lithuania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El mRNA extraído se cuantificó (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific) y se usó para la reacción de síntesis de cDNA usando el estuche Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific, EU Lithuania). Para la amplificación se usó el 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), empleando Power SYBR® Green (Applied Biosystems, USA) y cebadores específicos para los genes IL-12, iNOS, TNF- α , IL

1 β , IL-6, IL-10 y TGF- β . La expresión génica relativa se calculó mediante el método delta-delta CT utilizando como control β -actina [106].

Macrófagos y linfocitos T productores de IL-10 en GLM (MLNs) Posterior a la extracción de la cadena de ganglios mesentéricos, se obtuvieron las

suspensiones celulares mediante maceración y paso por filtro de 70 μ m (Falcon 2340; BD Biosciences, San Jose, CA) las suspensiones celulares fueron dispuestas en tubos con RPMI 1640 durante su procesamiento, lavadas por centrifugación, suspendidas en *Stain buffer* y usadas para la tinción de macrófagos y linfocitos T productores de IL-10 así: CD45⁺-F4/80⁺-IL-10⁺ o CD3⁺CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺[88]. Para la cuantificación de Tregs se siguieron las instrucciones del estuche comercial *Foxp3 anti-mouse staining kit* (BD, San Diego, CA, USA). Para la tinción intracelular

41

de IL-10, las células se incubaron en solución de permeabilización durante 30 minutos a 4°C antes de la adición del anticuerpo (*Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set*, eBiosciences, San Diego, CA, USA). Los análisis de citometría de flujo se realizaron en el citómetro FACSAria III (BD Biosciences, USA) del Instituto de Investigaciones Inmunológicas.

Modelo de inflamación alérgica por extracto de B. tropicalis

Inducción de la inflamación alérgica y administración de rAI-CPI En el modelo de inflamación alérgica, se sensibilizaron ratones hembra (n=6-7)

BALB/C entre 6-8 semanas de edad tres veces (días 7, 14 y 21) por inyección i.p con 20 µg del extracto del acaro del polvo domestico *B. tropicalis* (contenido de endotoxina 2 EU/mg) emulsificado en 2 mg de hidróxido de aluminio (Imject Alum, Thermo Fisher Scientific, USA). En los días 28, 29 y 30, los ratones se anestesiaron con sevoflurano inhalado y se les administró intranasalmente (i.n) una dosis de 25 µg de extracto de *B. tropicalis*, mientras que a los ratones del grupo control sano se les administró PBS (25 µL por narina) [107]. A los ratones del grupo de análisis de inmunomodulación se les administró i.p. 20 µg de rAI-CPI libre de endotoxina (contenido de endotoxina 0.0087 EU/mg) cuatro veces con intervalos de 7 días, la primera dosis la recibieron una semana antes (día 0) del inicio de la sensibilización y 4h antes de las inyecciones con el extracto de *B. tropicalis* (Figura 2). A otro grupo de ratones (n=6) se les administro i.p e i.n 20 µg de rAI-CPI en condiciones similares al modelo de inflamación para reforzar los análisis de respuesta inmune a la recombinante. Estos ensayos se realizaron tres veces de manera independiente. A dos grupos adicionales de ratones (n=6) se les administro una dosis i.p de 100 µg del anticuerpo monoclonal neutralizante del receptor de IL-10 (anti-mouse CD210/anti IL-10R) o 100 µg del control de isotipo IgG (eBioscience, San Diego, CA, USA) [84, 108] 24 horas antes de la inyección de rAI-CPI y la sensibilización con el extracto de *B. tropicalis*.

42

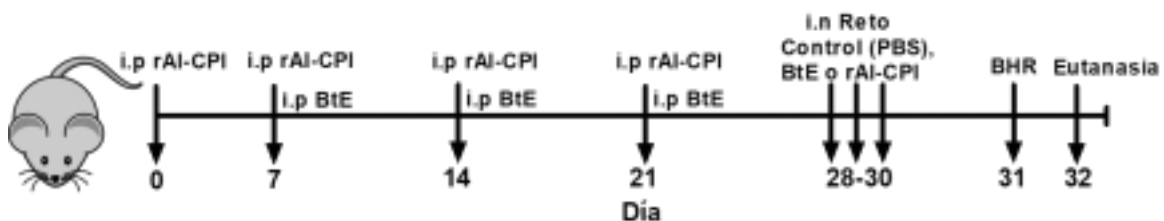


Figura 2. Modelo animal de inflamación alérgica de las vías respiratorias.

Medición de la hiperreactividad de las vías aéreas

La medición se realizó posterior a los retos intranasales (día 31) mediante pletismografía de cuerpo completo y con los ratones consientes (Buxco Electronics, Troy, N.Y., USA) durante la provocación con dosis crecientes (3.1-50 mg/ml) de metacolina (Sigma–Aldrich, Alemania) [107]. Los cambios en los valores de Penh (pausa aumentada) se utilizaron como una medida indirecta de la hiperreactividad de las vías aéreas [109, 110].

Lavado broncoalveolar (BAL)

La eutanasia (día 32) se realizó mediante inyección de una dosis letal de pentobarbital. Inmediatamente después, se realizó el lavado broncoalveolar (BAL), se recolectaron muestras de sangre y se extrajeron los pulmones y el bazo. Las muestras de BAL se recolectaron mediante lavado de las vías respiratorias a través de la tráquea (2 veces) con 0,8 ml de PBS enfriado en hielo y conteniendo un cóctel completo de inhibidor proteasas (Roche, Alemania). Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 340g a 4°C, los sobrenadantes se recogieron y se almacenaron a -80 °C para las posteriores mediciones de citoquinas. Las células se resuspendieron inicialmente en una solución de lisis y se incubaron durante 5 minutos en hielo, posteriormente se lavaron con PBS por centrifugación y se resuspendieron en la solución tampón de tinción. La identificación de las células se realizó mediante citometría de flujo por análisis de la expresión de marcadores de la superficie celular en todas las células CD45⁺ así: los macrófagos alveolares (Siglec-F⁺ CD11c⁺), los eosinófilos (Siglec-F⁺ CD11c⁻) y los neutrófilos (CD11b⁺

Ly6G⁺) [111] [112]. Los análisis de citometría de flujo se realizaron en el citómetro FACSAria III (BD Biosciences, USA) del Instituto de Investigaciones Inmunológicas y usando el software Kaluza Análisis versión 2.1 (Beckman Coulter, USA).

Análisis de citoquinas y linfocitos T reguladores en bazo

Posterior a la extracción del bazo, se obtuvieron las suspensiones celulares mediante la maceración del tejido y paso por filtro estéril de 70µm (Corning cell strainer Sigma-Aldrich). La viabilidad celular se midió por exclusión del azul de tripano (0,4%) usando un contador celular automatizado (TC20 BioRad, USA); en todos los casos la viabilidad fue >90%. Los esplenocitos se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 1mM de piruvato de sodio, 2mM, de L-glutamina, 100 U/mM penicilina-estreptomicina y 10% de suero fetal bovino inactivado (FBS, Qualified One Shot, Gibco, USA). Las células (1×10^6) se estimularon con 20 µg/mL de extracto de *B. tropicalis*, 20 µg/mL de rAI-CPI o medio como control y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 72 horas. Tras la incubación se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos y se almacenaron -80°C hasta su uso. Los niveles de citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos y en BAL (IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IFN γ and LAP TGF- β) se determinaron mediante ELISA, usando estuches comerciales y siguiendo las recomendaciones del fabricante (eBiosciences, USA).

En las suspensiones celulares del bazo también se identificaron linfocitos T reguladores (CD3⁺CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) mediante citometría de flujo, siguiendo las instrucciones del estuche comercial *Foxp3 anti-mouse staining kit* (BD, San Diego, CA, USA). Todos los análisis de citometría de flujo se realizaron en el citómetro FACSAria III (BD Biosciences, USA) del Instituto de Investigaciones Inmunológicas y usando el software Kaluza Análisis versión 2.1 (Beckman Coulter, USA).

Durante la eutanasia se realizó la exanguinación de los ratones y se almacenó el plasma para la determinación de los anticuerpos, los niveles totales de IgE, IgG, IgG1 e IgG2a se determinaron usando estuches comerciales siguiendo todas las indicaciones del fabricante (Ready-Set-Go kits, eBioscience, San Diego, CA, USA). Los niveles específicos se determinaron cubriendo micro placas Maxisorp™ con 5 µg/mL de extracto de *B. tropicalis* o rAI-CPI durante 12 horas a 4°C, luego las placas se lavaron 4 veces con PBS-Tween 20 al 0.1%. Cada pocillo se bloqueó con PBS

BSA 1%, Tween 20 al 0.05% durante 3 horas a temperatura ambiente. Las microplacas se lavaron 5 veces y los sueros diluidos se incubaron 12 horas a 4°C, después de 5 lavados a los pocillos se adicionó el respectivo anticuerpo marcado con biotina (anti-mouse IgE, IgG1 o IgG2a), tras 5 lavados se adicionó la fosfatasa alcalina, (ExtrAvidin Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) y se incubó una hora adicional, se lavó 5 veces más y se adicionó la solución del sustrato (Paranytrophenil diphosphate 1 mg/mL). Las densidades ópticas se leyeron a 405 nm en espectrofotómetro. Para aumentar la sensibilidad del ELISA/IgE, los sueros se trataron previamente con G sepharose para depletar la IgG [113]. Las diluciones de los anticuerpos y los sueros se encuentran registradas (Tabla 5).

Tabla 5. Diluciones de los anticuerpos y sueros			
Anticuerpo	Clon	Dilución del conjugado	Dilución de la muestra
<i>Biotin Anti mouse IgE</i>	2363	1:1000	1:10
<i>Biotin Rat Anti mouse IgG1</i>	A85-1	1:10000	1:80000
<i>Biotin Rat Anti mouse IgG2a</i>	-	1:1000	1:320
<i>ExtrAvidin Fosfatasa alcalina 1:4000</i>			

Análisis histológico

Para los análisis histológicos de los pulmones se conservaron en formalina neutra

al 10%, las muestras se embebieron en parafina y se realizaron cortes para obtener secciones de 4µm destinadas a las tinciones con hematoxilina-eosina (H&E) y ácido peryódico de Schiff (PAS). Las láminas fueron visualizadas por un patólogo para evaluar el grado de infiltrado celular y la producción de moco. Para determinar el grado de infiltración perivascular y peribronquial se asignaron puntajes como se ha descrito [107]. Las imágenes se capturaron en magnificación de 400x y 100x usando el microscopio Eclipse 400 con cámara DS-Fi1m (Digital camera Nikon, Japan). Las imágenes se procesaron con el software NIS-Elements-3.01 (Nikon Elements Software).

Efectos sobre células dendríticas derivadas de monocitos humanos (HmoDCs)

Para estos ensayos se usaron PBMCs de donantes sanos del Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid. Las PBMCs se obtuvieron mediante centrifugado por gradiente de densidad de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Reino Unido) a partir de sangre heparinizada. Los monocitos se aislaron por selección positiva utilizando perlas magnéticas cubiertas con anti-human-CD14 y mediante el sistema autoMACS (Miltenyi Biotec, Alemania) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los monocitos purificados se cultivaron en RPMI/FBS 10% y GM-CSF/IL 4 recombinante (100ng/ml) como se ha reportado antes [114]. Después de 6 días de cultivo, se recolectaron las HmoDC inmaduras (2×10^5) y se estimularon con LPS (100 ng/ml, Sigma-Aldrich, EE. UU.), rAI-CPI (100 ng/ml) o se incubaron con rAI CPI 30 minutos antes de la adición de LPS [115]. Las células se incubaron a 37°C durante 12 horas y se analizó la expresión de las moléculas de superficie HLA-DR, CD80 y CD83 mediante citometría de flujo (HLA-DR-FITC, CD86-PE y CD83-APC Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). La viabilidad celular se verificó por exclusión del azul tripan (0,4%) en microscopio de luz y por tinción con yoduro de

propidio por citometria de flujo. Los sobrenadantes de los cultivos se usaron para medir las citoquinas mediante ELISA. Adicionalmente las HmoDC estimuladas con rAI-CPI o LPS se usaron para realizar co-cultivo con células T CD4⁺ alogénicas (relación 1: 5). Las células T *naïve* (CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻) se purificaron a partir de PBMCs por selección negativa de linfocitos T CD4⁺ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Se tuvo en cuenta que la pureza los linfocitos T fuera superior al 90%. Tras 6 días de incubación del co-cultivo se midió las citoquinas IL-10 e INF γ en los sobrenadantes. Los análisis de citometria de flujo de las HmoDCs se realizaron en el centro de Citometría y Microscopia de Fluorescencia usando el equipo FACSAria III (Becton Dickinson) de la Universidad complutense de Madrid.

Análisis estadístico

Según sea el caso de cada ensayo experimental realizado en este trabajo, los resultados se expresaron como el promedio \pm con el error estándar (SEM) mediante pruebas de prueba t-student, Kruskal Wallis o análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de Bonferroni, Tukey o Dunnett post hoc para las comparaciones

entre grupos previa comprobación de los supuestos del modelo. En todas las pruebas se consideraron significativos valores de $p < 0.05$.

CAPITULO 3 RESULTADOS

rAI-CPI es bioquímicamente activa

La secuencia que codifica para AI-CPI se encontró en la biblioteca de ADNc

Tras la síntesis de ADNc a partir de la purificación de RNAm extraído de los especímenes adultos, se empaquetaron 39 secuencias verificadas mediante amplificación con los cebadores T7 y M13, estas clonas hacen parte de la biblioteca de ADNc de *A. lumbricoides* del Instituto de Investigaciones Inmunológicas. Posteriormente se usaron los cebadores diseñados para realizar la búsqueda de la secuencia codificante de AI-CPI, se encontraron amplicones de aproximadamente 400 pb en 4 clonas (Figura 3). Los productos de amplificación secuenciados tuvieron correspondencia del 100% con la secuencia HQ404231.1 reportada por Liu et al [89].

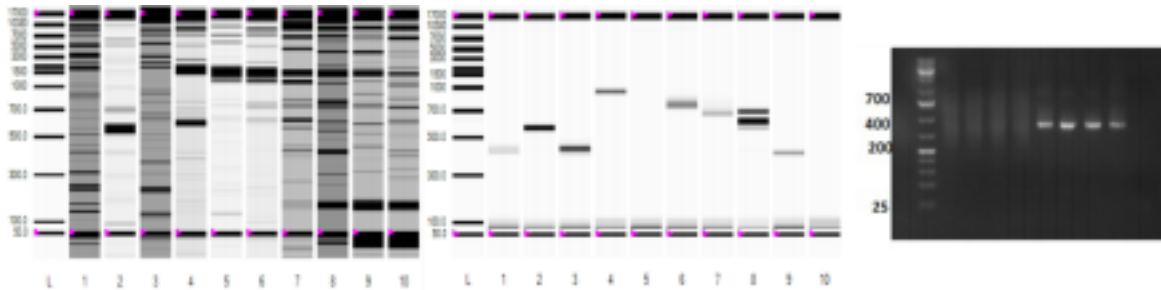


Figura 3. Corridos electroforéticos de ARNm y ADNc.
 (Izquierda) Corrido electroforético del RNA mensajero de *A. lumbricoles* usando el sistema automatizado Experion (BioRad). L corresponde al marcador de peso molecular de alta sensibilidad y 1-10 corresponden a las muestras. (Centro) 1-10-Amplificados de cDNA de la biblioteca (8/39) usando cebadores oligo dT o T7-M13. (Derecha) Corrido electroforético del gel de agarosa que muestra el amplificado del gen codificante de AI-CPI en la biblioteca de ADNc de *Ascaris*.

rAI-CPI es bioquímicamente activa

Después de realizar la transformación bacteriana y determinar la cinética de crecimiento del cultivo inducido con IPTG, se purificaron en promedio 2 mg de proteína recombinante por litro, la cual debió ser recuperada de la fracción insoluble del cultivo usando NLS, la proteína recombinante tiene el peso molecular esperado de 14.6 kDa. Aproximadamente 50 mg de la proteína purificada se almacenó a

80°C. Los ensayos de actividad bioquímica demostraron que la rAI-CPI inhibe la actividad de la papaína y la catepsina B humana. rAI-CPI mostro tener fuerte actividad inhibidora sobre ambas proteasas, la IC₅₀ calculada fue 890.18 ± 31.3 nM para la papaína y 64.26 ± 5.537 nM para la catepsina B (Figura 4), el hecho que la proteína sea bioquímicamente activa sugiere que la recombinante posee un patrón de plegamiento similar a la proteína natural.

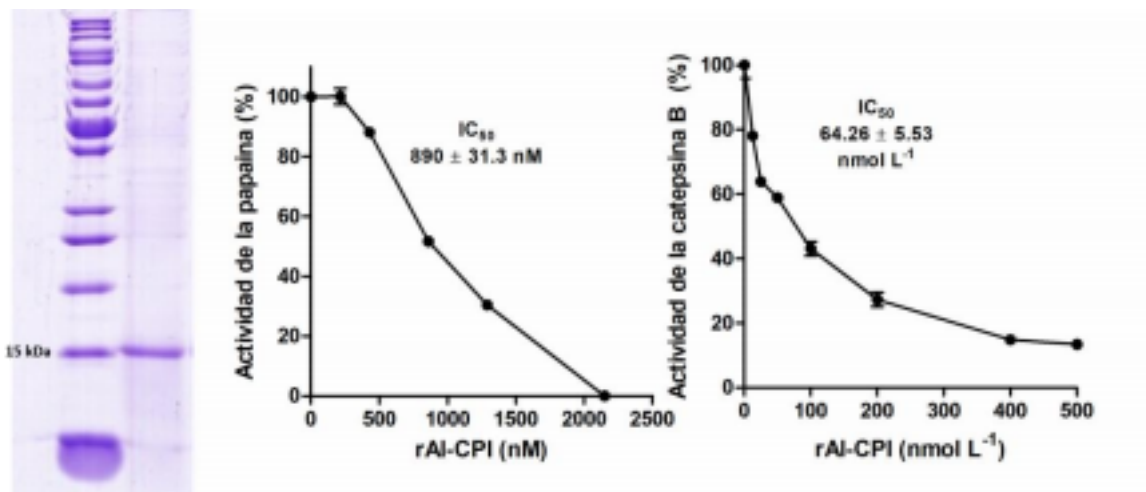


Figura 4. SDS-PAGE y actividad bioquímica de rAI-CPI.

(Izquierda) Corrido electroforético en gel SDS-PAGE donde se observa la proteína recombinante (rAI-CPI) purificada frente al patrón de peso molecular. (Derecha) Actividad inhibidora de cisteína proteasas de rAI-CPI, diferentes concentraciones de la recombinante se incubaron con papaína, Catepsina B y se analizó la hidrólisis de sus respectivos sustratos, los datos corresponden a los valores promedio de cuatro repeticiones independientes del ensayo.

49

Por otro lado, según los espectros de dicroísmo circular rAI-CPI presenta las características estructurales típicas de las cistatinas, con un contenido mayoritario de láminas β sobre hélices α , también se encontró que la proteína es termoestable, ya que su conformación de estructuras secundarias no varió significativamente al ser expuesta durante 10 minutos a 80°C (Figura 5). Sin embargo el porcentaje de “*random coil*” propio de los estados agregados fue alto [116].

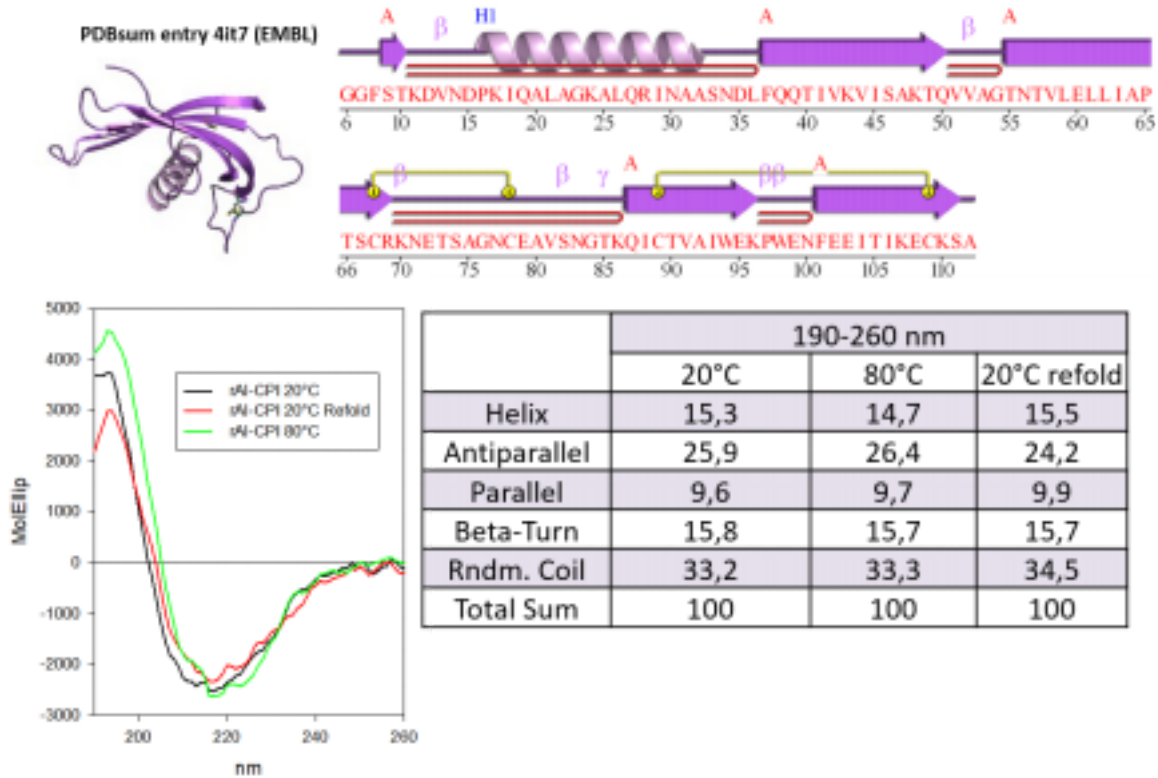


Figura 5. Evaluación de la estructura de rAI-CPI. (Superior) Estructuras secundaria y terciaria de la citinina de *Á. lumbricoides* tomado de RCSB PDB (DOI: 10.2210/pdb4IT7/pdb). (Inferior) Espectro de CD de rAI-CPI en fosfato de sodio 50 mM (pH 7,5). Elipticidad molar medida a 190- 260 nm mientras la temperatura se cambió de 20° C a 80° C y nuevamente a 20°C.

rAI-CPI no es toxica e induce respuesta inmunológica

rAI-CPI no es citotóxica e induce activación celular

Con el fin de establecer concentraciones seguras de la proteína recombinante, es decir, que no afectaran la viabilidad celular durante realización de los ensayos *in vivo*, se expusieron *in vitro* las células a diferentes concentraciones de la proteína.

Se encontró que a concentraciones menores de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, la viabilidad de la línea celular de macrófagos RAW 264.7 no es afectada y se determinó la concentración a la que el 50% de las células empezaron a verse afectadas ($\text{CL}_{50} = 55.78 \pm 5.71 \text{ mg}/\text{mL}$) (Figura 6), por lo que todos los ensayos *in vivo* se realizaron usando concentraciones iguales o menores a $25\mu\text{g}/\text{ml}$.

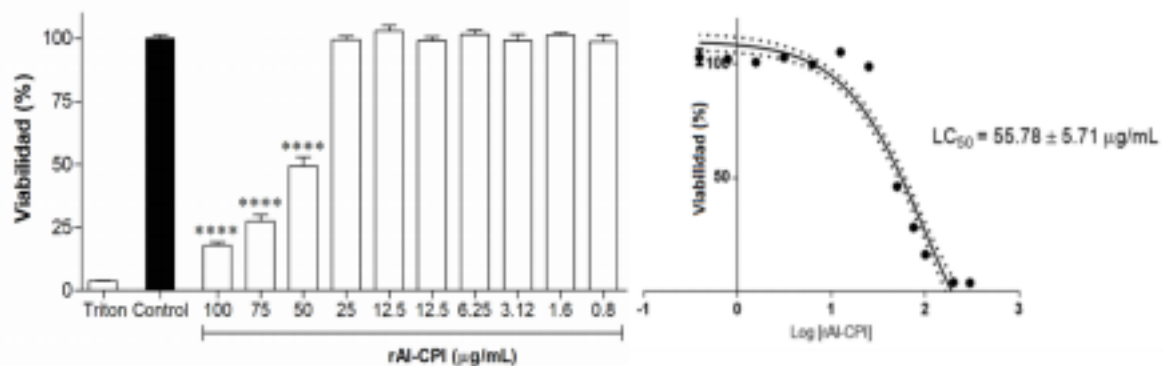


Figura 6. Evaluación de la citotoxicidad de rAI-CPI.

Viabilidad de la línea celular de macrófagos peritoneales murinos RAW264.7 al ser expuestos a rAI-CPI. (Izquierda) Efecto citotóxico de rAI-CPI. (Derecha) Cálculo de CL_{50} . Los datos corresponden al promedio de lo observado en tres ensayos independientes +SEM. (ANOVA+Dunnett * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ al ser comparados con el control LPS).

Para establecer si rAI-CPI induce la liberación de NO en los macrófagos RAW264.7, se determinó la cantidad de nitritos (medida indirecta de NO) en los sobrenadantes de los macrófagos estimulados con rAI-CPI frente al control de estímulo con LPS y células no estimuladas, se observó que rAI-CPI induce liberación de nitritos a 25 y 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pero significativamente menos al compararse con LPS y a

concentraciones menores de 3.21 $\mu\text{g}/\text{ml}$ no hay diferencia al comparar con el control de células no estimuladas. Por otro lado, el tratamiento con rAI-CPI previo a la estimulación con LPS (25–0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), no mostro modificar los niveles de nitritos liberados a ninguna de las concentraciones usadas (Figura 7).

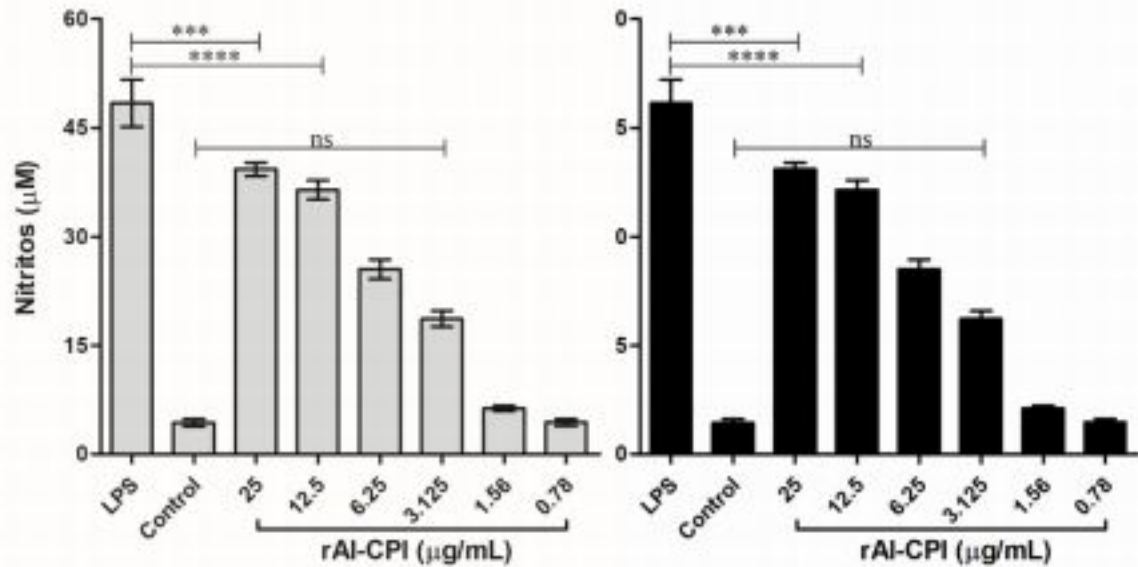


Figura 7. Producción de ON inducido por rAI-CPI en macrófagos peritoneales de ratón. (Izquierda) inducción de la liberación de Nitritos (Derecha) Efecto de rAI-CPI sobre la liberación de Nitritos cuando los macrófagos RAW264.7 se estimularon con LPS. Los datos corresponden al promedio de lo observado en tres ensayos independientes +SEM. (ANOVA+Dunnett * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ al ser comparados con el control LPS).

Con el propósito de observar el perfil transcripcional que induce rAI-CPI en los macrófagos, estos se activaron con LPS o rAI-CPI (1 μM), o tratando las células con rAI-CPI previo a la adición del LPS y se registraron los cambios en la expresión de los genes (INF γ , IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , ARG1, Ym1 y RELM α , IL-10 y TGF- β) en varios puntos de tiempo (1, 4, 10 y 20 horas). Se encontró que rAI-CPI estimula en los macrófagos una activación importante en la que se observa un fenotipo mezclado. Es notorio un aumento temprano (entre la hora 1 y 10) en la expresión de genes marcadores pro inflamatorios INF γ , IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α aunque a niveles significativamente menores que el LPS ($p < 0.001$). Sin embargo también se

observó un aumento significativo y sostenido en la expresión de IL-10 desde la hora 4 en comparación con el estímulo del LPS ($p < 0.001$), la expresión de TGF- β

tuvo un comportamiento similar, estos dos productos génicos son propios del perfil M2c. Además, se observa aumento en la expresión del gen RELM α que es significativamente diferente a partir de la hora 10 ($p < 0.01$) en comparación con el estímulo de LPS, este gen se sobre expresa en el perfil M2a (Figura 8), no se obtuvo resultados diferentes en los genes ARG1 y Ym1. Exceptuando una disminución en la expresión del gen de TNF- α no se observó que el tratamiento previo con rAI-CPI influenciara significativamente la expresión de los demás genes frente al estímulo con LPS.

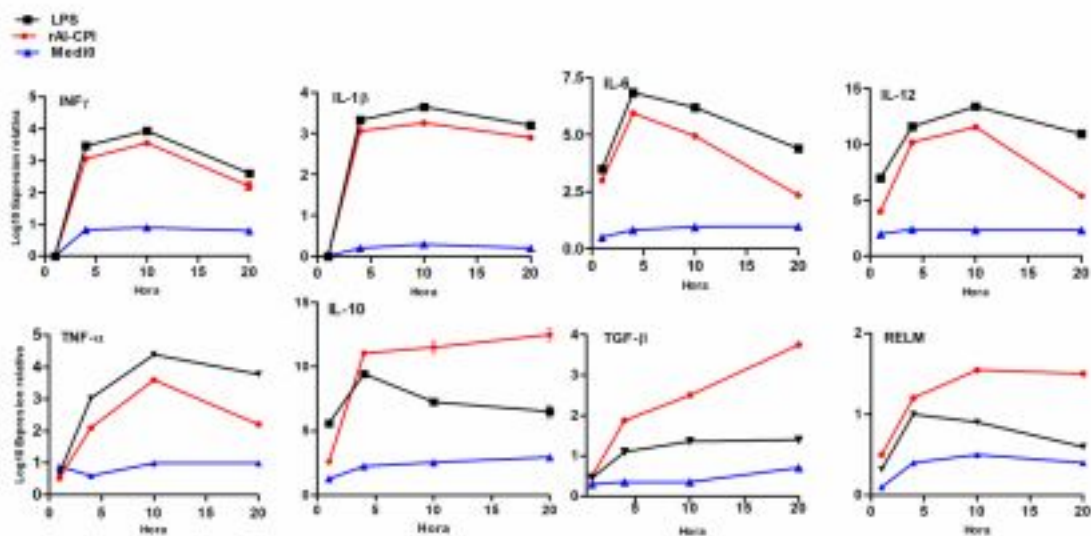


Figura 8. Cambios transcripciones inducidos por rAI-CPI en macrófagos peritoneales de ratón. Perfil de expresión genes inducido por rAI-CPI en macrófagos peritoneales de la línea RAW264.7 comparado con el inducido por el LPS. Los datos corresponden a lo observado por duplicado en dos ensayos independientes.

Para confirmar estos efectos se midieron las citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos. No se encontraron niveles de detectables de IL-12 inducidos por rAI-CPI, sin embargo se confirmó la expresión de las demás citoquinas en concordancia con los análisis de expresión de genes (Figura 9). Por lo tanto, la estimulación *in vitro*

macrófagos con rAI-CPI induce un fenotipo caracterizado por una expresión temprana y transitoria de marcadores de activación antiinflamatorios seguidos de una más sostenida de marcadores de un fenotipo híbrido M2a/M2c.

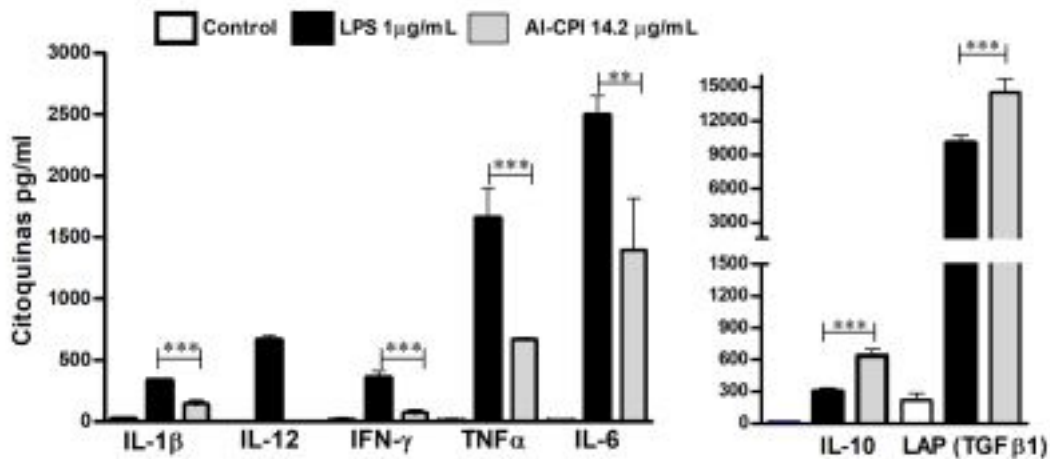


Figura 9. Citoquinas inducidas por rAI-CPI en macrófagos peritoneales de ratón. Perfil de expresión de citoquinas inducido por rAI-CPI en macrófagos peritoneales de la línea RAW264.7 comparado con el inducido por el LPS o el control (medio de cultivo). Los datos corresponden a lo observado en tres ensayos independientes a las 24 horas del cultivo +SEM. (ANOVA+Dunnett * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ al ser comparados con el control LPS).

Adicionalmente se buscó determinar si rAI-CPI activa una respuesta en los macrófagos a través de la vía de TLR4, para ello se estimularon células de la línea THP1-Blue-NF-kB con diferentes concentraciones de rAI-CPI frente a una patrón de concentración de LPS (desde 100 hasta 0.39 ng/ml), concentraciones de LPS menores a 12.5 ng/ml de LPS o 100 ng/ml de rAI-CPI no indujeron actividad de SEAP. rAI-CPI indujo activación del NF-kB altas concentraciones (0.25-1 μ M) aunque significativamente menos que el control LPS y mayor que el control con Pam3CSK4 (TLR1/2). Concentraciones menores de 100 nM no conllevaron a activación del NF-kB ni a producción de IL-8 (Figura 10). Estos resultados se presentan descartando cualquier tipo de contaminación con endotoxina bacteriana, ya que la cuantificación mediante LAL mostro que la proteína purificada usada en

estos experimentos contenía menos de 0.0038 EU/mg. Por otro lado la incubación de las células con LPS y rAI-CPI mostró una disminución significativa de la actividad de SEAP, al contrario la incubación con rAI-CPI y Pam3CSK4 mostro un aumento significativo de dicha actividad.

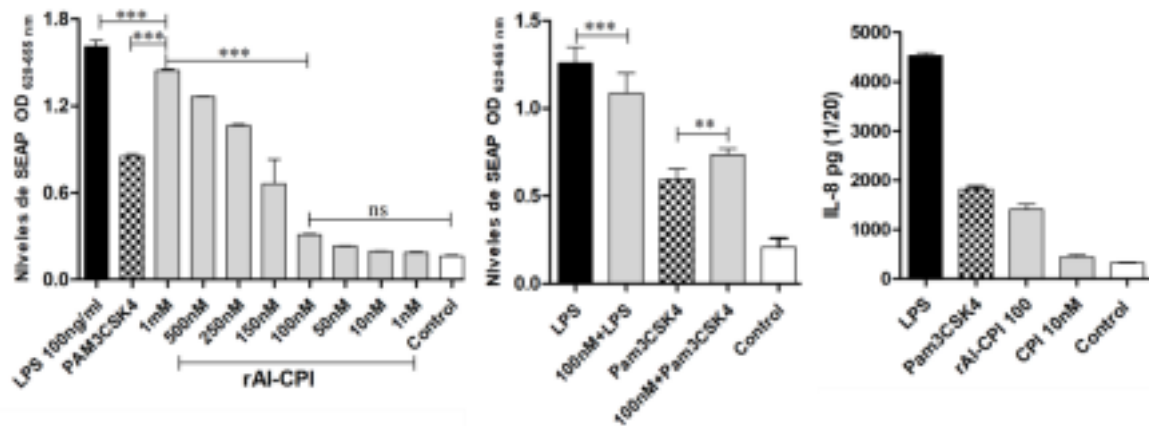


Figura 10. Efecto de rAI-CPI sobre la línea celular THP1-Blue.

rAI-CPI activa células de la línea THP1-Blue-NF- κ B (Izquierda) Concentraciones de rAI-CPI que inducen actividad SEAP (Centro) Influencia de la incubación de las células con los ligandos de TLR4 (LPS) o Pam3CSK4 (TLR1/2) (Derecha) Concentraciones menores a 100 nM de rAI-CPI no conllevan a producción de IL-8. Los datos corresponden a lo observado en cinco ensayos independientes a las 12 horas del cultivo (ANOVA+Dunnett * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 al ser comparados control LPS o Pam3CSK4).

rAI-CPI tiene reactividad IgE e IgG4 en sueros de individuos humanos sensibilizados a áscaris pero no induce activación de basófilos ni liberación de histaminas

Considerando que muchas moléculas derivadas de helmintos tienen reactividad IgE, se evaluó si rAI-CPI une IgE mediante western blot y ELISA. Se encontró que rAI-CPI es reconocida por la IgE del pool de sueros de los individuos sensibilizados a *A. lumbricoides* y no en el pool de los no sensibilizados. La estandarización del ELISA generó un punto de corte en el cual valores de OD \leq a 0,141 se tomaron como resultado positivo para IgE y \leq a 0,138 como resultado positivo para IgG4, se encontró que de los 287 individuos el 54% tienen IgE (62% en los sensibilizados a áscaris) y 93% tienen IgG4 específica a rAI-CPI. La mediana de la OD para la IgE

fue significativamente más alta en los sensibilizados a áscaris *Ascaris* ($p < 0.041$) al igual que se observa con la IgG4 ($p < 0.0001$) (Figura 11).

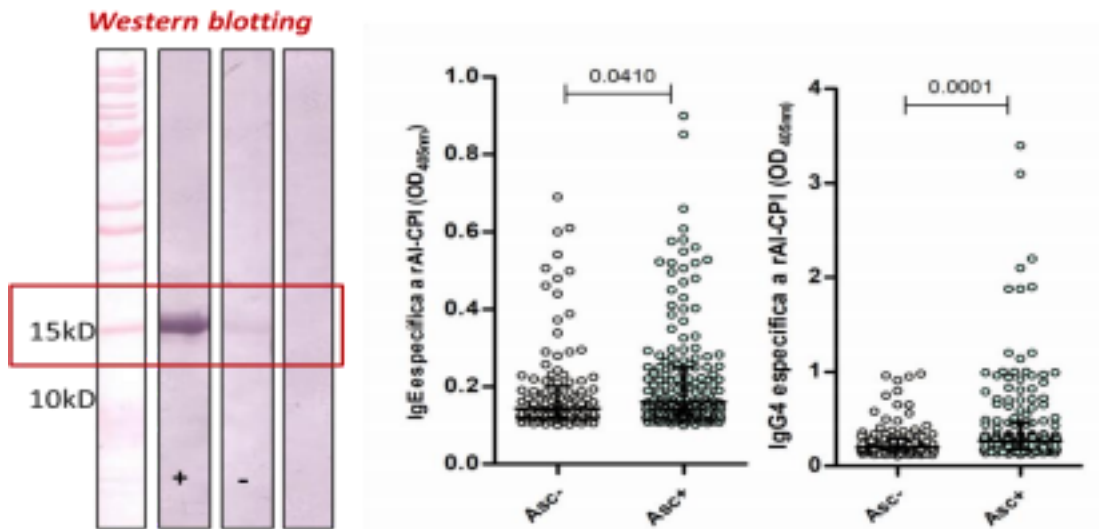


Figura 11. Reactividad IgE a rAI-CPI.

(Izquierda) Western blotting en el que rAI-CPI es reconocida por la IgE humana de un pool de sueros de individuos sensibilizados a *Ascaris*. (Derecha) ELISA en el que se indica que rAI-CPI es reconocida por la IgE y la IgG4 con valores de mediana significativamente mayores en los individuos sensibilizados a *Ascaris*. (Mann Whitney test).

Además de la alta reactividad IgE algunas moléculas de *Ascaris* tienen actividad alérgica, y dado que la cistatina de *Anisakis simplex* es un alérgeno potente [117], se determinó si rAI-CPI induce la activación de basófilos humanos en individuos con IgE a ella. Se encontró que la estimulación de los basófilos con el control (anti-IgE) y con el extracto de *A. lumbricoides* (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) indujo sobre expresión del marcador CD203c (índice de estimulación de 4.9 a 11), mientras que no se observó que rAI

CPI produjera este efecto en ninguna de las muestras de los individuos y en ninguna de las concentraciones usadas (0.1, 1 o 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura 12), resultados similares se observaron en las pruebas de liberación de histaminas (Figura 13),

indicando que rAI-CPI posee baja actividad alérgica.

56

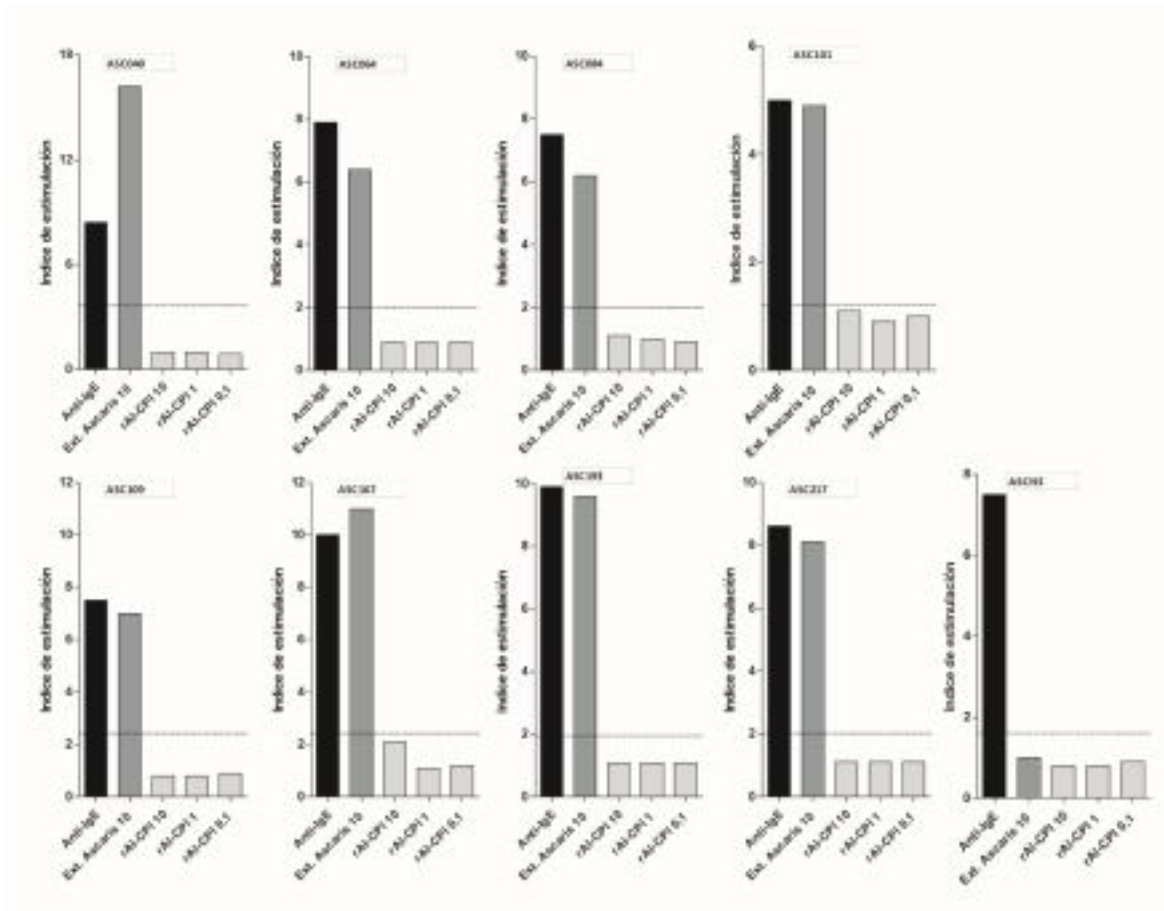


Figura 12. Evaluación de la activación de basófilos por rAI-CPI. Los índices de estimulación se obtuvieron a partir de 8 muestras de individuos con prueba cutánea positiva a extracto de *A. lumbricoides* y un individuo con prueba negativa. (10, 1 y 0.1 son µg/mL).

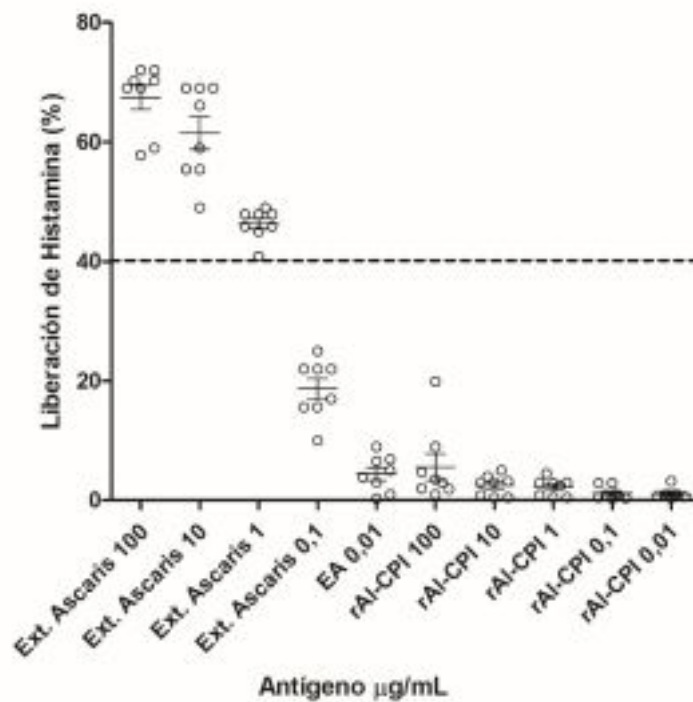


Figura 13. ELISA de Liberación de Histaminas.

Los porcentajes de liberación obtenidos de 8 muestras de individuos con prueba cutánea positiva a extracto de *A. lumbricoides*.

rAI-CPI no causa efectos tóxicos según los marcadores estudiados En los ratones a los que se les administró rAI-CPI para la prueba de toxicidad aguda

no se observaron cambios en la apariencia física, se observó una ligera pérdida de peso en el grupo que recibió rAI-CPI respecto al grupo control, la cual no fue estadísticamente significativa y posteriormente se registró ganancia de peso en función del tiempo. En cuanto a la concentración final de endotoxinas en las dosis de rAI-CPI administradas a los animales; esta fue de 0.00103 EU por aplicación, aproximadamente 0.000515 EU/g de peso tomando como peso promedio de un ratón 20g; este valor se encuentra muy por debajo del valor máximo permitido para investigación en modelos animales de experimentación (0.005 EU/g de peso) por lo que rAI-CPI cumple con este parámetro como requisito para la administración de proteínas recombinantes [118].

58

Tabla 6. Peso de los órganos en el estudio de toxicidad aguda		
Índice (mg/g)	Grupo Control	Grupo rAI-CPI
Colon	13.85 +/- 1.105	17.64 +/- 2.74
Hígado	59.31 +/- 1.96	67.39 +/- 4.57
Bazo	4.93 +/- 0.71	7.55 +/- 1.71
Riñones	16.22 +/- 0.49	17.42 +/- 0.84
Peso corporal total (G)	24.68 +/- 1.38	23.08 +/- 1.32
SEM (n = 6) no hubo diferencias significativas comparando con el grupo control		

Por otro lado, los marcadores macroscópicos (Tabla 6) y bioquímicos medidos (Tabla 7) no muestran diferencias significativas entre el grupo control (no rAI-CPI) y el grupo de estudio (rAI-CPI), ningún animal murió durante los días de este procedimiento (mortalidad de 0%), sugiriendo que la administración de la proteína recombinante era segura para ser utilizada en los modelos *in vivo* de inmunomodulación. Sin embargo, la dosis usada en los modelos nunca superó los 25 µg por ratón en una dosis.

Tabla 7. Parámetros bioquímicos medidos en sangre en el estudio de toxicidad aguda		
Parámetro	Grupo control	Grupo rAI-CPI
Nivel de glucosa en sangre (mg/dL)	91.40 +/- 3.05	103.2 +/- 16.26
Albumina (g/L)	2.94 +/- 0.20	2.92 +/- 0.63
Proteína total (g/dL)	4.64 +/- 0.15	5.00 +/- 0.32
BUN (mg/dL)	12.10 +/- 0.48	13.08 +/- 0.65
Colesterol total (mg/dL)	109.4 +/- 12.50	117.0 +/- 17.69
Creatinina (mg/dL)	1.38 +/- 0.05	1.42 +/- 0.05
Aspartato amino transferasa (U/L)	79.4 +/- 3.74	89.1 +/- 7.89
Alanina amino transferasa (U/L)	60.1 +/- 5.89	72.5 +/- 8.43
Fostatasa alcalina (U/L)	84.56 +/-6.35	90.80 +/-4.71
SEM (n = 6) no hubo diferencias significativas comparando con el grupo control		

Para confirmar las observaciones *in vitro* de la baja alergenicidad de rAI-CPI, se realizó la prueba de PCA, evaluando la extravasación del azul de Evans. Se encontró que comparado con el grupo control (sueros de animales inmunizados con OVA), los sueros de los animales inmunizados con rAI-CPI no indujeron la

59

extravasación del Evans tras el reto intravenoso con la proteína, esto se comprobó además mediante la medida de anticuerpos tipo IgE en los sueros de los ratones inmunizados con OVA o rAI-CPI y un control pre inmune. Adicionalmente se pudo observar que otros antígenos de *Ascaris* como rAI-16 y rAsI3 producen reacciones de anafilaxia cutánea pasiva mientras rAI-CPI no (Figura 14).

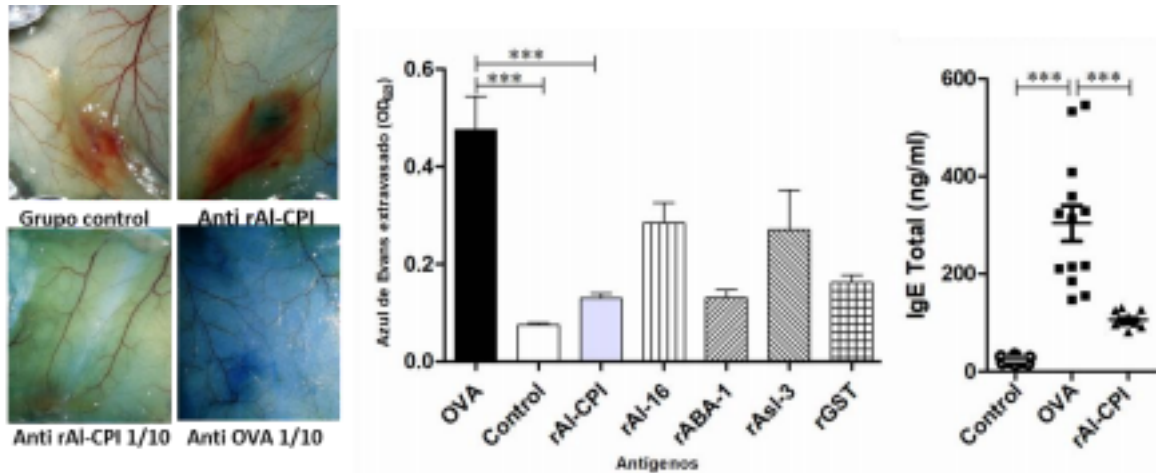


Figura 14. Prueba de Anafilaxia Cutánea Pasiva.

(Izquierda) fotos representativas de la anafilaxia cutánea pasiva. (Centro) Extravasación del azul de Evans mostrando otros antígenos áscaris. (Derecha) Cuantificación por ELISA de la IgE total teniendo como control sueros de ratones pre inmunes. Los datos gráficos son el promedio de los valores (n=6-8 ratones por grupo) de tres experimentos independientes. (ANOVA *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

La inmunización con rAI-CPI genera una respuesta de IgG y producción de altos niveles de IL-10

En el ensayo que se realizó para describir la respuesta inmune a rAI-CPI, se encontró que la proteína induce respuesta humoral, principalmente anticuerpos tipo IgG (IgG2a/IgG1) y no IgE en comparación con el control (PBS) (Figura 15). Al cultivar las células del bazo y re-estimularlas con la rAI-CPI se encontró que esta induce la producción de IFN γ en niveles significativos en comparación con el control (medio), así como altos niveles de IL-10 y TGF β (Figura 16). Los resultados del control de estímulo con PMA-Ionomicina no se muestran debido a que los niveles sobrepasaron en la mayoría de los casos los valores más altos de la curva estándar.



Figura 15. Respuesta humoral inducida por rAI-CPI.
(Superior) Niveles de anticuerpos totales en ng, (Inferior) Se observa la producción de IgG1 e IgG2a específicas a rAI-CPI y no IgE. Los datos son el promedio de los valores de dos experimentos independientes (n=6 ratones por grupo) (T test *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).



Figura 16. Respuesta de citoquinas a rAI-CPI.

Citoquinas detectadas en los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos reestimulados con rAI-CPI o control (medio de cultivo). Los datos son el promedio de los valores de dos experimentos independientes (n=6 ratones por grupo) (T test *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

rAI-CPI induce la expresión de FoxP3 en linfocitos T CD4⁺ CD25⁺ Debido a que se ha reportado que los productos de E/S de los helmintos inducen

Tregs, se midieron los niveles de expresión del factor de transcripción FOXP3 en los linfocitos T CD4⁺ activados CD25⁺ extraídos del bazo de los ratones a los que se les administro rAI-CPI. El porcentaje de Tregs en los ratones control estuvo entre el 3.5 al 6%, mientras que el los ratones que recibieron rAI-CPI este porcentaje aumento significativamente entre el 12 al 16% (Figura 17).

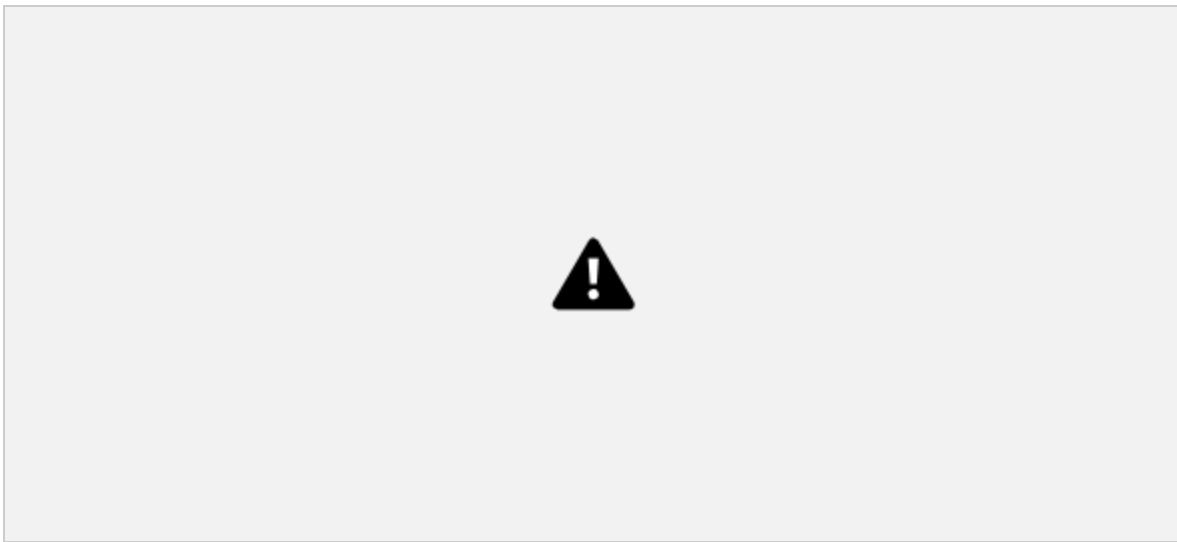


Figura 17. Citometría de flujo de la inducción de FoxP3 por rAI-CPI.

rAI-CPI induce la activación y la diferenciación de linfocitos T CD3⁺ CD4⁺ hacia un perfil regulador como se observa por la expresión del factor de transcripción FoxP3. Los datos son el promedio de los valores de dos experimentos independientes (n=6 ratones por grupo) (T test *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

rAI-CPI atenúa la inflamación intestinal

rAI-CPI mejora los parámetros de la enfermedad inflamatoria intestinal inducida por DSS

En el modelo de enfermedad inflamatoria intestinal inducida por DSS se estudió el

efecto del tratamiento con dos dosis de rAI-CPI (0,5 y 0,25 $\mu\text{ng}/\text{G}$). La enfermedad se caracteriza por una disminución del apetito y su consecuente pérdida de peso, el engrosamiento del colon (el cual se ve reflejado en un aumento de peso del mismo), encogimiento de la pared intestinal (debido a la infiltración de células inmunes y al mismo engrosamiento), pérdida de la arquitectura del epitelio intestinal, hemorragia y aparición de prolapso rectal (en estadios avanzados). En general, se observó una marcada pérdida de peso en el grupo control enfermo (DSS) en comparación al grupo control sano, el grado de pérdida de peso en los grupos tratados con rAI-CPI fue significativamente menor hacia los últimos días del modelo. En los días 12-14, se evidenció una clara mejoría en los grupos tratados con rAI-CPI en cuanto al

63

índice de la enfermedad, disminuyendo visiblemente la frecuencia y consistencia de las deposiciones, la presencia de sangre en las heces y la aparición de prolapso rectal (Figura 18).

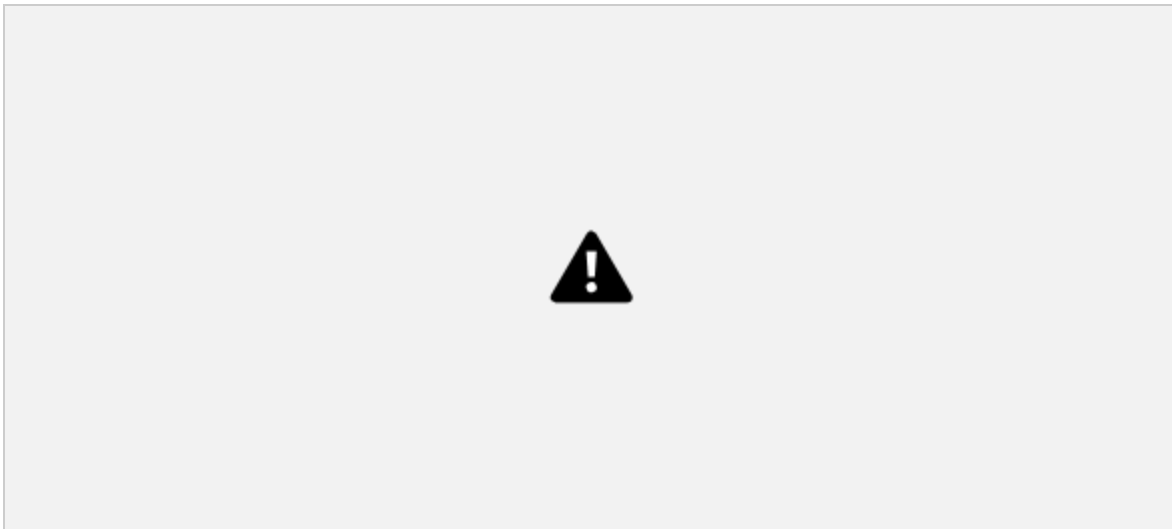


Figura 18. Efecto de rAI-CPI sobre los parámetros de la enfermedad inflamatoria intestinal. (Izquierda) Variación de peso y (Derecha) DAI con las dos dosis usadas de rAI-CPI en el modelo de inflamación intestinal inducida con DSS. Los datos son el promedio de los valores de dos experimentos independientes (n=6 ratones por grupo) (ANOVA *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

En cuanto a la longitud y el peso del colon, se observó que el peso de los animales con enfermedad inflamatoria intestinal inducida por DSS presentaba una menor longitud en comparación con el de los animales a los que se les administro rAI-CPI y al del grupo control sano. De manera similar, el peso del colon de los animales tratados con rAI-CPI mostró una tendencia a ser menor al ser comparados con el grupo control de la enfermedad, por lo que la relación peso/longitud del tejido colónico (índice fiable de daño tisular) en los grupos tratados con rAI-CPI mostró diferencias significativas respecto al grupo control DSS (Figura 19).

64

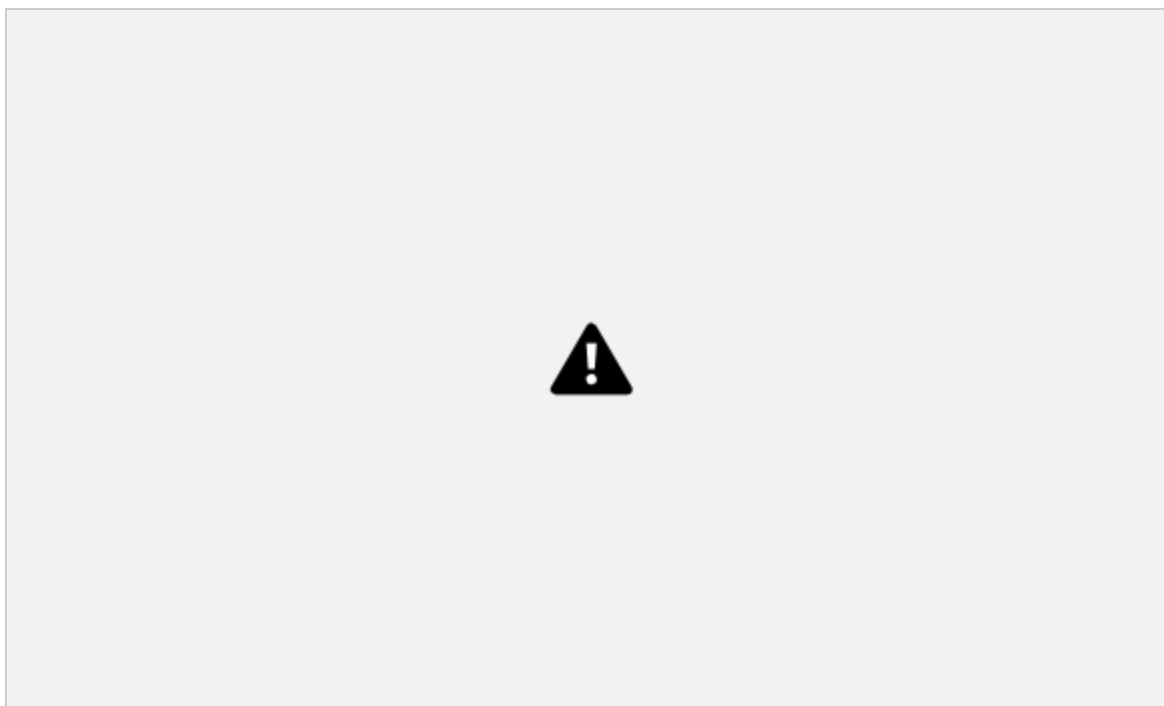


Figura 19. Cambios en la longitud del colón.

Longitud del colon y longitud representativa para cada grupo con las dos dosis usadas de rAI-CPI en el modelo de inflamación intestinal inducida con DSS. Los datos son el promedio de los valores de dos experimentos independientes (n=6 ratones por grupo) (ANOVA *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

El efecto de rAI-CPI también fue evidenciado mediante la cuantificación de la actividad de la enzima MPO (medida indirecta de la infiltración de neutrófilos en el sitio de la inflamación), encontrándose que los grupos tratados rAI-CPI presentaban menores niveles de actividad de esta enzima. Las características histológicas del colon de los animales del grupo control sano eran típicas de una estructura normal, mientras en el grupo DSS se evidenció una pérdida de la arquitectura de la mucosa intestinal, destrucción de las criptas intestinales e infiltración masiva de células inflamatorias. Se pudo observar que el colon de los ratones tratados con rAI-CPI tuvo una recuperación significativa del tejido acompañada de una restauración del epitelio y una reducción de la infiltración celular (Figura 20).

65

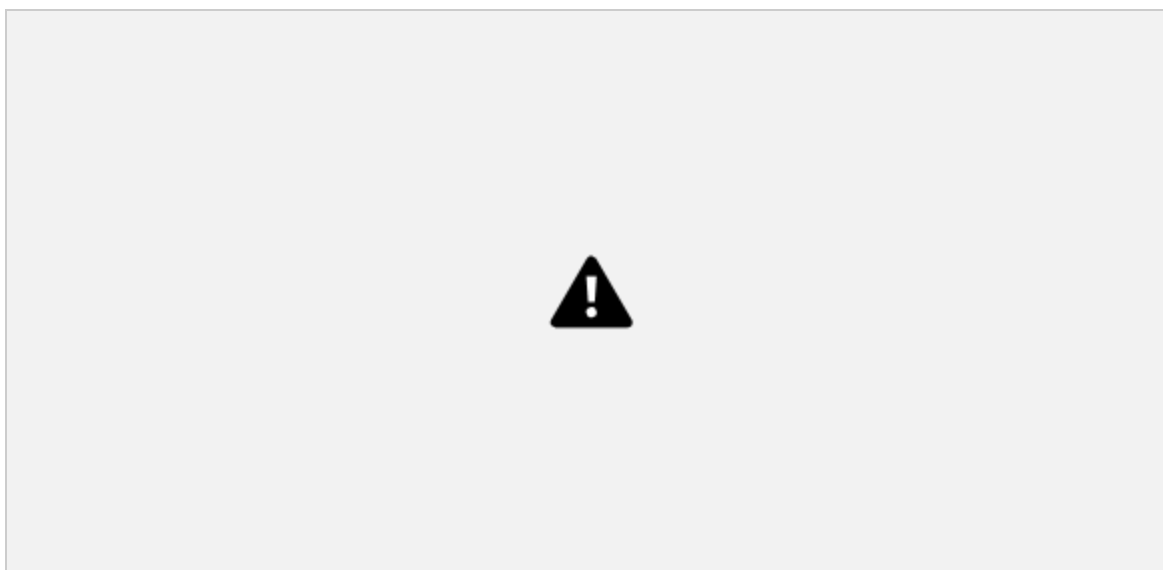


Figura 20. Efectos de rAI-CPI sobre la Mieloperoxidasa y la inflamación en el colon. Efectos observados con las dos dosis usadas de rAI-CPI en el modelo de inflamación intestinal inducida con DSS. (Izquierda) Actividad de la enzima MPO en el tejido colonico. (Centro) Cambios histológicos representativos de lo observado en cada grupo. (Derecho) Score de inflamación según el infiltrado celular observado en cada grupo. Magnificación final de 20x. Los datos son el promedio de los

valores de dos experimentos independientes (n=6 ratones por grupo) (ANOVA *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

rAI-CPI disminuye la expresión de genes y citoquinas pro-inflamatorias y estimula la producción de las citoquinas anti-inflamatorias IL-10 Y TGF-β en el colon

Para elucidar un poco los mecanismos mediante el cual rAI-CPI ayuda reducir la inflamación intestinal, se midió la expresión génica los marcadores inflamatorios en colon. En general, la administración de rAI-CPI indujo la expresión de citoquinas antiinflamatorias e inhibió la expresión de citoquinas pro-inflamatorias. Los ratones tratados con rAI-CPI mostraron una expresión elevada de IL-10 (más de 1000 veces) y TGF-β acompañado de una disminución en los niveles de expresión de IL-6 y TNF-α, IL-12 al compararse con el grupo control DSS. No hubo significancia estadística en reducción de la expresión de IL-1β aunque los datos muestran una tendencia a la baja. También se observó inducción significativa de iNOS (Figura 21). De manera similar a lo observado en los análisis de expresión de genes, cuando se midieron los niveles de citoquinas en el tejido colonico se encontró disminución

66

significativa de TNF-α, IL-6, IFN-γ e IL-12 en los animales que se trataron con rAI-CPI en comparación con el grupo control DSS. Además se observó un aumento importante en la producción de IL-10 y TGF-β (Figura 22).



Figura 21. Expresión relativa de genes en el tejido colonico.

(a) Grupo control DSS, (b) DSS+rAI-CPI1 y (c) DSS+rAI-CPI2. Los cambios se muestran comparando con el grupo control DSS. Los datos son el promedio de los valores de dos experimentos independientes (n=6 ratones por grupo) (ANOVA *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

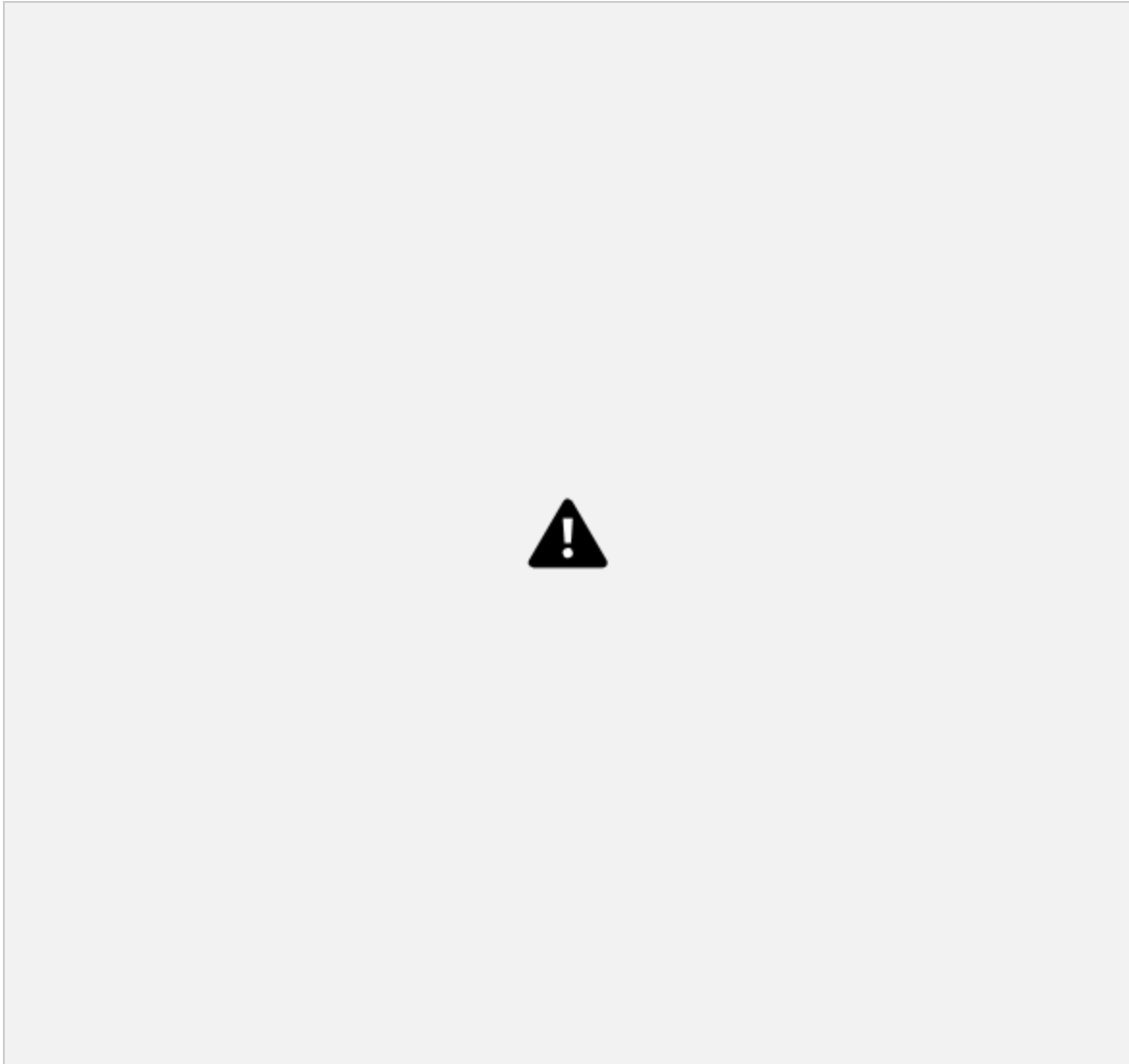


Figura 22. Niveles de citoquinas en tejido colonico.

Niveles de citoquinas por mg de proteína en tejido colonico. rAI_CPI incrementa los niveles de IL-10 y TGF- β y reduce los niveles de las citoquinas pro-inflamatorias en comparación con el grupo control DSS. Los datos son el promedio de los valores de dos experimentos independientes (n=6 ratones por grupo) (ANOVA *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Tratando de dilucidar el del subtipo de células secretoras de IL-10, se cuantificaron los macrófagos y Tregs productores de IL-10 presentes en los MNL de los ratones. Se encontró que tanto el porcentaje de macrófagos como el de Tregs aumentaron significativamente en los MNLs de los ratones tratados con rAI-CPI en comparación

con el grupo control DSS. Sin embargo, en la población de linfocitos T $CD25^+$ $FOXP3^+$ - $IL10^+$ el porcentaje de células productoras de IL-10 no vario significativamente a pesar de observarse una tendencia al aumento, mientras en que la población de macrófagos el porcentaje de células $F4/80^+$ - $IL10^+$ aumento significativamente y de manera dosis dependiente en los animales que recibieron rAI-CPI, sin embargo en el grupo control DSS también aumento este porcentaje en relación al grupo control sano. Estos resultados indican que los macrófagos al parecer son la principal fuente de la IL-10 encontrada en los ratones tratados con rAI-CPI (Figura 23).

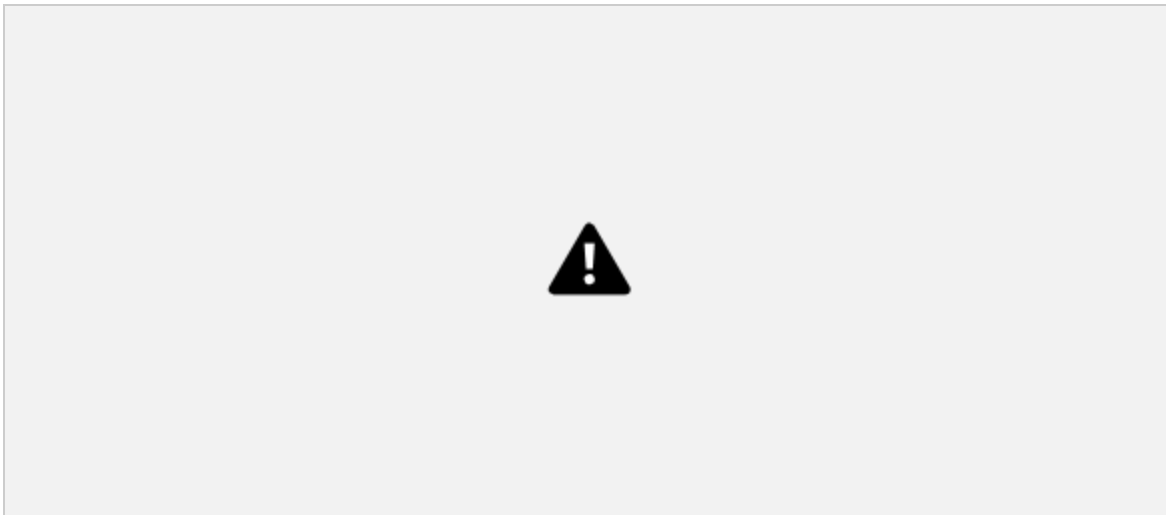


Figura 23. Macrófagos y Tregs productores de IL-10 en MNL. Porcentaje de Macrófagos y Tregs productores de IL-10 en MNL (ganglios linfáticos mesentéricos GLM). rAI-CPI incrementa el porcentaje de macrófagos secretores de IL-10 y la expresión de FOXP3 en los linfocitos T activados ($CD25^+$) en comparación con el grupo control DSS. Los datos son el promedio de los valores para cada ratón por grupo (n=6 ratones por grupo) (ANOVA * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

rAI-CPI previene el desarrollo de la inflamación alérgica inducida por *B. tropicalis*

rAI-CPI previene la inflamación de las vías aéreas

Se quiso determinar si la exposición previa y durante la inducción de la inflamación alérgica de las vías aéreas podía ser influenciada por rAI-CPI. Para esto se trabajó con un modelo de inflamación inducido por *B. tropicalis* que se ha estandarizado en el Instituto de Investigaciones Inmunológicas, se encontró que usando este protocolo de sensibilización y reto intranasal todos los parámetros evaluados y manifestaciones de inflamación fueron positivos. En el grupo control de inflamación se encontró en BAL un contenido celular de eosinófilos y neutrófilos alto (~20% y 15%) los cuales no superan el 3% en el grupo control sano. en el grupo de animales a los que se les administro rAI-CPI antes de la sensibilización por *B. tropicalis* se observó que el porcentaje de eosinófilos y neutrófilos disminuyo significativamente respecto al grupo control sin superar el 5%. En el caso del grupo que se incluyó para determinar si rAI-CPI administrada con hidróxido de aluminio en el mismo esquema que *B. tropicalis* podía generar inflamación similar se encontró que no aumentan significativamente el porcentaje de eosinófilos respecto al control sano, mientras que el porcentaje de neutrófilos llega al ~7% mayor que en el control sano pero significativamente menor a lo observado con el extracto de *B. tropicalis*, indicando que rAI-CPI induce una leve inflamación neutrofilica (Figura 24), se observó también en este grupo aumento significativo

de macrófagos alveolares.



Figura 24. Eosinófilos, neutrófilos y macrófagos en BAL.
(Superior) Número total de eosinófilos y neutrófilos identificados en BAL. (Inferior) Porcentaje de células identificadas en BAL, rAI-CPI induce un aumento significativo del porcentaje de macrófagos alveolares. Las células se identificaron mediante citometría de flujo. Los datos son el promedio de

los valores de tres experimentos independientes (n=6-7 ratones por grupo) (ANOVA+ Dunnet, ***p<0.001).

Estos resultados se confirmaron con los hallazgos histológicos pues no se observó infiltrado inflamatorio ni células caliciformes productoras de moco en el grupo rAI CPI/BtE (Figura 25), de la misma manera el *score* de inflamación es significativamente menor en el grupo rAI-CPI/*B. tropicalis* y rAI-CPI en comparación con el grupo control extracto de *B. tropicalis*.

71

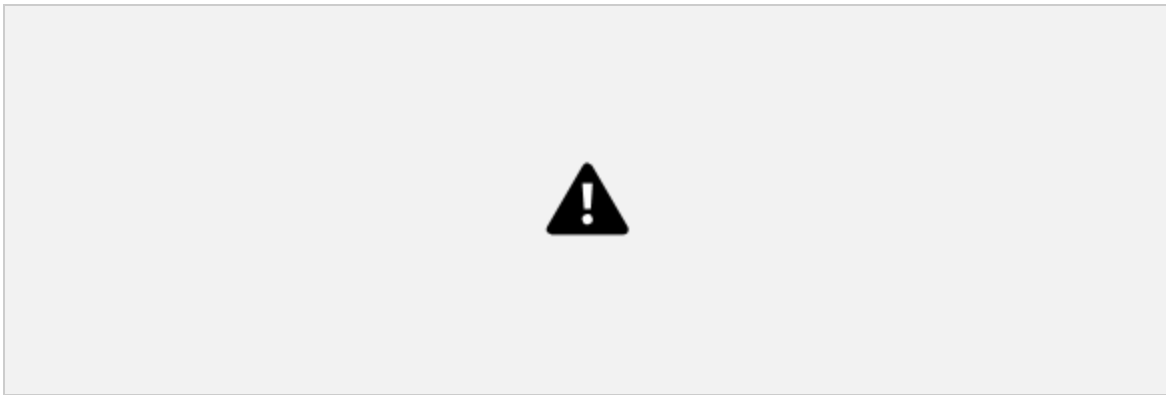


Figura 25. Hallazgos histológicos y score de inflamación pulmonar.

Los datos son el promedio de los valores de tres experimentos independientes (n=6-7 ratones por grupo) (Kruskall Wallis para el *score* de inflamación, ***p<0.001).

En los resultados obtenidos de la pletismografía de cuerpo completo se observan valores de Penh entre 4 y 5 para el grupo control BtE, estos valores se redujeron significativamente en el grupo rAI-CPI/*B. tropicalis* cuando se usaron 25 y 50 mg/ml de metacolina, mientras que en el grupo de rAI-CPI no se observa diferencia significativa en comparación con el grupo control PBS a ninguna de las concentraciones de metacolina. Estos resultados indican que rAI-CPI no produce manifestaciones de inflamación pulmonar y el tratamiento preventivo con rAI-CPI evita el desarrollo de ésta provocado por el extracto de *B. tropicalis* (Figura 26).

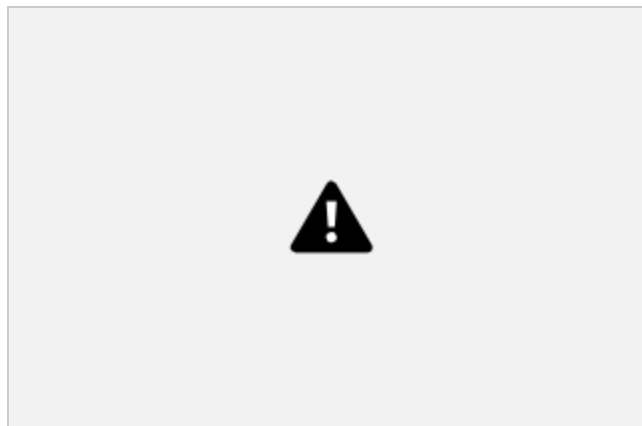


Figura 26. Pletismografía de cuerpo completo (Buxco) y reto con Metacolina Valores de Penh registrados durante el reto con diferentes concentraciones de Metacolina. rAI-CPI no es significativamente diferente del grupo control PBS. Los datos son el promedio de los valores de tres experimentos independientes (n=6-7 ratones por grupo) (ANOVA de dos vías por concentración de metacolina, ***p<0.001).

rAI-CPI inhibe la producción total y específica de IgE al extracto de *B. tropicalis* y promueve la producción de IgG

Los resultados obtenidos acerca de la respuesta humoral muestran que el extracto de *B. tropicalis* lleva a la producción de IgE, IgG, IgG1 e IgG2a total en niveles significativamente más altos que en el grupo control. En contraste, en el grupo rAI CPI/*B. tropicalis* se redujeron significativamente los niveles de IgE e IgG1 total y se

incrementó la respuesta de IgG e IgG2a total.

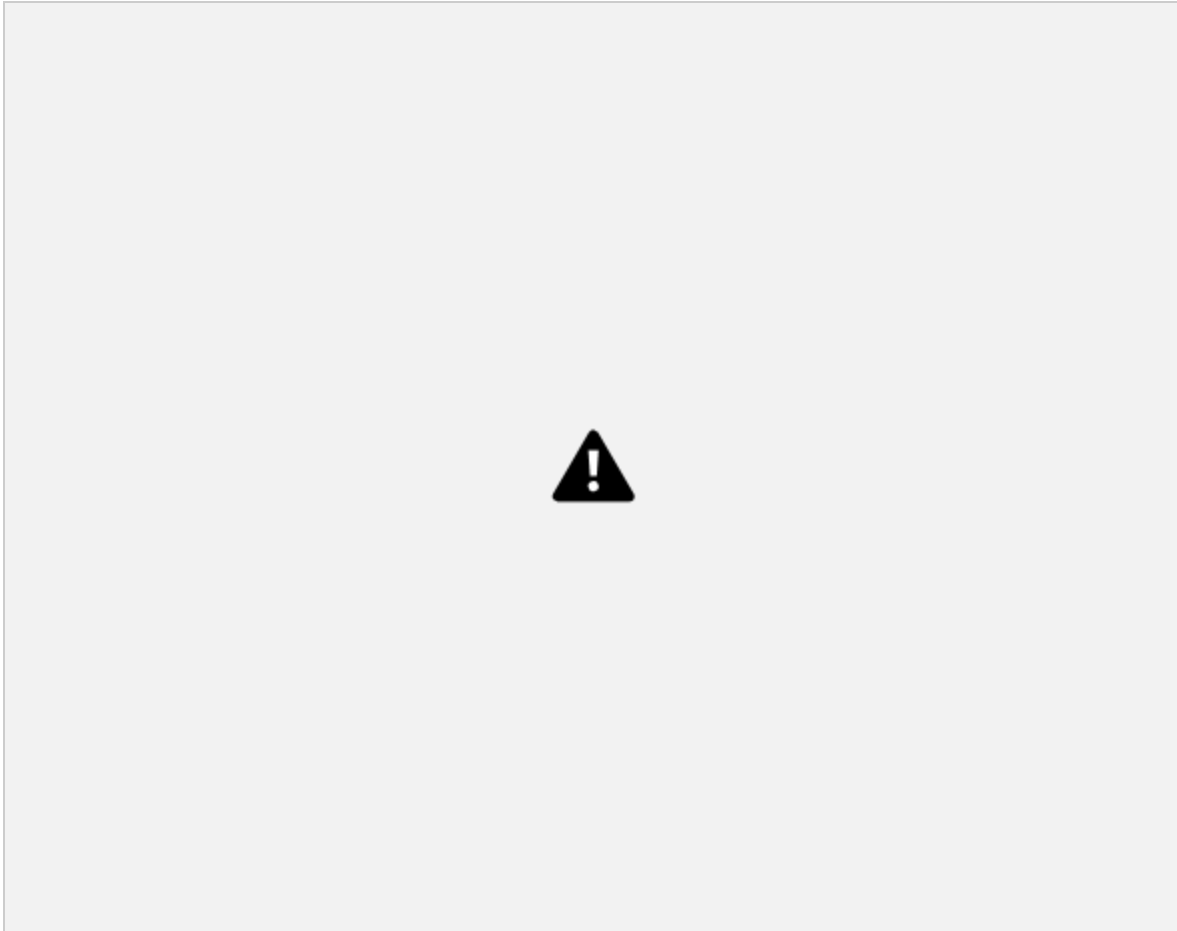


Figura 27. rAI-CPI interfiere con la producción de IgE y potencia la respuesta IgG2a. (Superior) niveles totales de anticuerpos en todos los grupos. (Inferior) niveles de anticuerpos específicos a *B. tropicalis*. Los datos son el promedio de los valores de tres experimentos independientes (n=6-7 ratones por grupo) (ANOVA+ Dunnet, ***p<0.001).

Además en el grupo rAI-CPI/*B. tropicalis* se observó también inhibición de la producción de IgE específica a *B. tropicalis* y reducción significativa de la IgG1 específica, mientras que la IgG2a específica aumento significativamente. La administración de rAI-CPI sola no muestra aumentar los niveles de IgE total, pero si se observa que impulsa la producción de IgG e IgG2a específicas a *B. tropicalis* (Figura 27). De la misma manera que se observó en el modelo de respuesta inmune, la respuesta de anticuerpos a rAI-CPI se caracteriza por elevados niveles de IgG2a.

rAI-CPI modifica la producción de citoquinas a nivel local y sistémico Para evaluar la inhibición de la respuesta Th2 a *B. tropicalis*, se midieron los niveles de citoquinas en BAL, como se esperaba se encontró que los niveles de IL-5 e IL-13 fueron significativamente altos en el grupo al que se le administro extracto de *B. tropicalis* en comparación con el grupo control. En el grupo *rAI-CPI/B. tropicalis* se encontró que los niveles de estas dos citoquinas se redujeron significativamente, esto junto con altos niveles de IL-10 comparado al grupo sensibilizado con el extracto de *B. tropicalis*. La administración de *rAI-CPI* sola no lleva a la producción de IL-5 ni IL-13, pero si IL-10 en niveles mayores a los detectados en los ratones expuestos al extracto de *B. tropicalis*. La medida de los niveles de citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos muestra que el efecto de *rAI-CPI* es similar a lo observado localmente en el pulmón. En el grupo de los ratones que recibieron *rAI-CPI/B. tropicalis*, los esplenocitos respondieron con una disminución muy marcada de las citoquinas Th2 tras la re-estimulación con el extracto de *B. tropicalis*, además de la producción de IL-10, LAP-TGF β e IFN γ . Los esplenocitos del grupo de ratones a los que se les administro solo *rAI-CPI* respondieron con producción de IL-10, LAP-TGF β , IFN γ y no IL-4, IL-5 ni IL-13 tras la re-estimulación con *rAI-CPI* (Figura 28). Estos resultados confirman los obtenidos en el modelo de respuesta inmune.



Figura 28. rAI-CPI modifica la producción de citoquinas Th2 a nivel local y sistémico. (Superior) niveles de citoquinas detectadas en BAL. (Inferior) niveles de citoquinas detectadas en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos re.estimulados con extracto de *B. tropicalis* (para el grupo rAI-CPI los cultivos se re-estimularon con rAI-CPI). Los datos son el promedio de los valores de tres experimentos independientes (n=6-7 ratones por grupo) (ANOVA+ Dunnet, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

rAI-CPI incrementa los niveles de Tregs en bazo

Al analizar la inducción de Tregs midiendo el porcentaje de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ presentes en el bazo, se encontró que en los ratones que recibieron extracto de *B. tropicalis*, esta población celular se encuentra en un porcentaje significativamente mayor comparado con el grupo control (7,25 vs 5,56%, $p < 0,001$). Sin embargo la frecuencia de Tregs se incrementó mucho más en los ratones del grupo rAI-CPI/*B. tropicalis* en comparación con el grupo sensibilizado con extracto de *B. tropicalis* (11,6 vs 7,25% $p < 0,005$), este porcentaje se observó afectado en los animales a los que se les administro el anticuerpo monoclonal anti-IL10R (10%) en comparación con el control de isotipo. Es de

76

resaltar que el grupo al que se le administro solamente rAI-CPI este porcentaje fue mayor (12 a 15.7 %) en promedio rodeo 13.1% (Figura 29), similar a lo observado en el modelo de respuesta inmune.

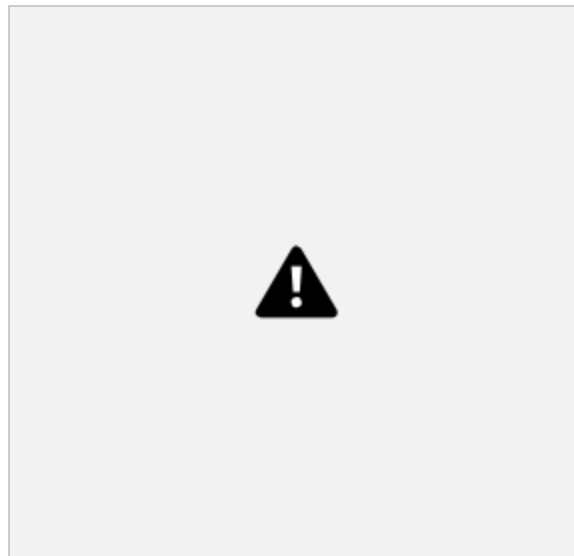


Figura 29. rAI-CPI estimula la diferenciación de Tregs. Porcentaje de Tregs en bazo en cada uno de los grupos. Se observa una disminución en el

porcentaje de esta población celular cuando se usó el anticuerpo monoclonal anti-IL10R. Los datos son el promedio de los valores de tres experimentos independientes, el grupo anti-IL-10R correspondió a un solo experimento (n=6-7 ratones por grupo) (ANOVA+ Dunnet, **p<0.01, ***p<0.001).

La inhibición de la vía de señalización de la IL-10 reduce el efecto de rAI-CPI sobre la respuesta humoral pero no su efecto antialérgico

Para explorar un poco el papel de la IL-10 inducida por rAI-CPI, a un grupo adicional de los ratones rAI-CPI/*B. tropicalis* se les administro sistémicamente el anticuerpo bloqueante anti-IL10R. Como se mencionó anteriormente, el uso del anti-IL10R redujo significativamente el porcentaje de Tregs en bazo respecto al control de isotipo, no se observó alteración del efecto de rAI-CPI en cuanto a la inhibición de la inflamación alérgica (número de eosinófilos y neutrófilos en BAL), ni en cuanto a la reducción en la producción de IL-5 e IL-13, aunque los niveles de IL-10 en BAL si se observaron afectados significativamente en comparación con el grupo control de

77

isotipo (Figura 29-30). Es de resaltar que los anticuerpos IgE total y los anticuerpos IgE/IgG1 específicos a *B. tropicalis* aumentaron significativamente en el grupo de ratones que recibieron el anti-IL10R en comparación con el control de isotipo, sin embargo, este aumento no llego a ser similar a los niveles observados en el grupo de ratones sensibilizados y retados con extracto de *B tropicalis* (Figura 31). Los niveles de citoquinas medidos en los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos no mostraron diferencias significativas, los niveles de IL-10 se observaron disminuidos, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

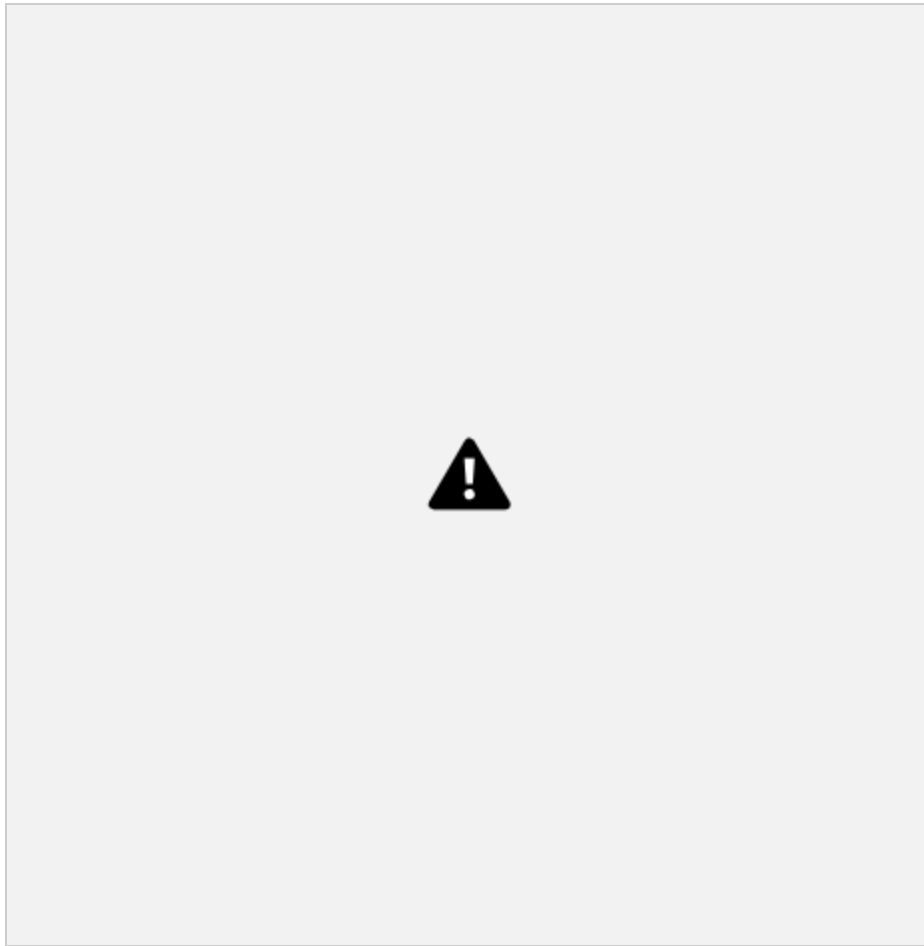
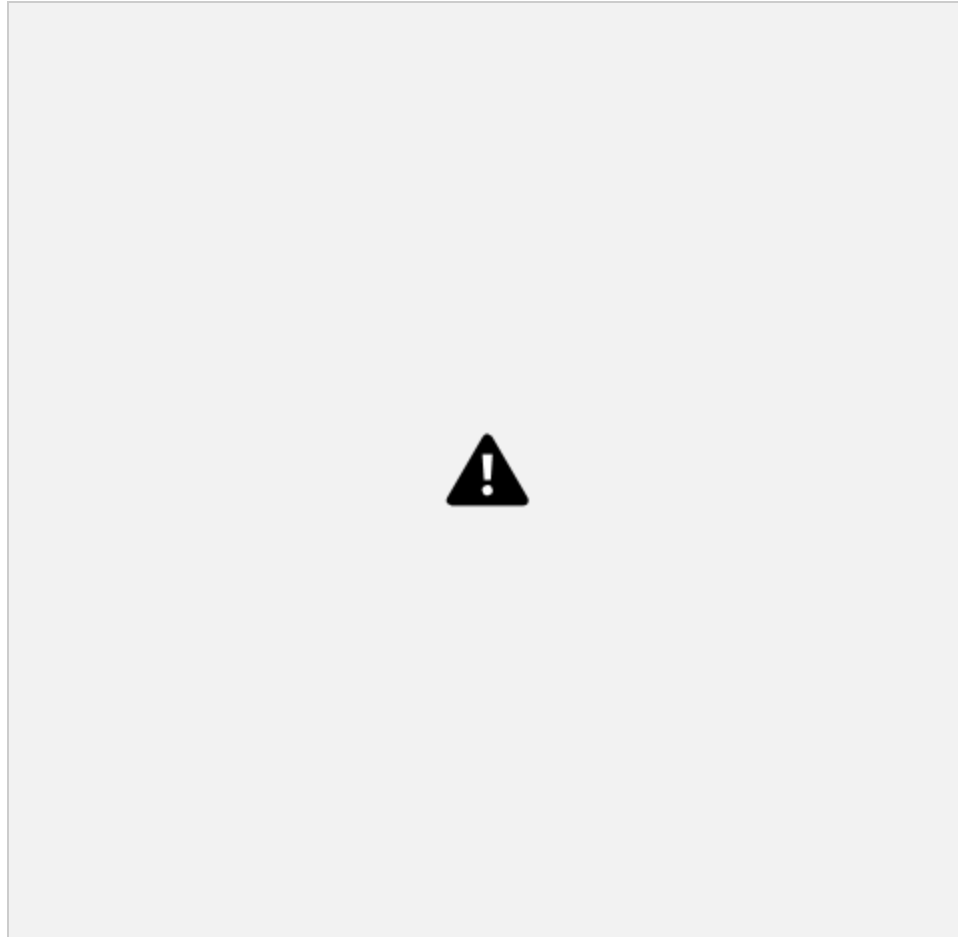


Figura 30. Efecto de la administración sistémica anti-IL10.

(Superior) no varía el reclutamiento de eosinófilos y neutrófilos a los pulmones. (Inferior) se afectan los niveles de IL-10 pero no aumentan los de IL-5 ni IL-13 en comparación con el control de isotipo. Los datos del grupo anti-IL-10R corresponden a un solo experimento (n=6-7 ratones por grupo) (ANOVA+ Dunnet, **p<0.01, ***p<0.001).



Figura

31. Efecto de la administración sistémica anti-IL10 sobre la respuesta humoral. (Superior) se observa un aumento significativo de los niveles de IgE total frente al control de isotipo. (Inferior) se observa un aumento significativo de los niveles de IgE/IgG1 específica a *B. tropicalis*. Los datos del grupo anti-IL-10R corresponden a un solo experimento (n=6-7 ratones por grupo) (ANOVA+ Dunnet, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

rAI-CPI interfiere con la maduración de las HmoDCs

Además de los efectos observados en el modelo murino, se buscó evaluar el efecto de rAI-CPI sobre células dendríticas humanas. Para esto las HmoDCs se expusieron a diferentes concentraciones de la proteína y se observó que la estimulación con rAI-CPI sola no indujo expresión significativa de HLA-DR CD86 y CD83 en comparación con el control (sin estímulo) por el contrario, se observó una tendencia a la disminución en especial de HLA-DR, mientras la expresión de estas moléculas

