



Trabajo de Tesis para optar al título de magíster en inmunología

Estandarización de técnicas experimentales para la evaluación de la actividad eosinofílica en respuesta a *Ascaris spp.*

Eskarly Varela Coneo, MD.

Estudiante de Maestría en inmunología

Josefina Zakzuk, MD, PhD. Tutora

Julio 2021

Instituto de Investigaciones Inmunológicas

Universidad de Cartagena

Agradecimientos

Dedico este trabajo de tesis a mis padres, hermana y a mi hija Alejandra, que han sido pieza fundamental en cada éxito y dificultad que he tenido que afrontar en mi vida.

A mi tutora y amiga, la Dra. Josefina Zakzuk que me ha guiado y enseñado con cariño, paciencia y por su magnífica dedicación.

Al Dr. Luis Caraballo por darme la oportunidad de hacer parte de este prestigioso instituto de investigaciones inmunológicas, por su excelente calidad humana y profesional.

A los amigos incondicionales que me ha dejado esta maestría, José Miguel y Karen Lorena, quienes fueron un apoyo fundamental en este proceso académico.

Y a cada una de las personas que de una u otra manera influyeron y aportaron un granito de arena a mi formación profesional.

Contenido

1. Resumen ejecutivo	5
2. Planteamiento del problema y preguntas de investigación	6
3. Marco Teórico	8
3.1 Infección por <i>Áscaris spp</i> (Ascariasis).....	8
3.1.1 Morfología de huevos de <i>Ascaris spp</i>	9
3.1.2 Etapas del desarrollo embrionario de <i>Ascaris spp</i>	11
3.1.3 Ciclo de vida <i>Ascaris lumbricoides</i> en humanos.....	12
3.1.4 Respuesta inmune en la infección por <i>Ascaris spp</i>	13
3.1.5 Antígenos de <i>Ascaris spp</i> (ABA-1)	15
3.2 Eosinófilos	16
3.2.1 Eosinofilopoyesis.....	17
3.2.2 Activación de eosinófilos.....	18
3.3 Mecanismos efectores del eosinófilo sobre los parásitos	21
3.4 Marcadores de identificación y activación de eosinófilos por citometría de flujo	23
3.5 Técnicas de purificación de eosinófilos.....	24
4. Hipótesis	26
5. Objetivos	26
5.1 Objetivo General	26
5.2 Objetivos específicos.....	26
6. Metodología	27
6.1 Diseño general de estudio.....	27
6.2 Incubación de huevos de <i>Ascaris suum</i> para conseguir el estado larvario L3	27
6.3 Aislamiento y purificación de eosinófilos.....	29
6.3.1 Identificación de eosinófilos purificados por citometría de flujo	32
6.3.2 Identificación del eosinófilo por microscopio óptico	32
6.4 Ensayo de caracterización de la actividad eosinofílica	33
6.4.1 Ensayos con larvas L3 de <i>Ascaris suum</i>	34
6.4.1.1 Visualización de incubación por microscopía óptica.....	34
6.4.1.2 Ensayo de viabilidad de las larvas	34
6.4.2 Ensayos con rABA-1 de <i>Ascaris suum</i>	35
6.4.2.1 Determinación de un producto de degranulación (peroxidasa del eosinófilo - EPO) medido por ensayo ELISA	36
6.4.2.2 Ensayos de identificación marcadores de actividad eosinofílica por citometría de flujo	37
7. Resultados	39

7.1	Incubación de huevos de <i>Ascaris suum</i> para conseguir el estado larvario L3	39
7.2	Aislamiento y purificación de eosinófilos.....	49
7.3	Identificación de eosinófilos purificados por citometría de flujo	50
7.4	Ensayo de caracterización de la actividad eosinofílica	52
7.4.1	Visualización de adherencia e inmovilización de larvas por microscopía óptica después de 16 horas de incubación	53
7.4.2	Ensayo MTT para analizar de viabilidad de las larvas en estadio L3 al cultivarlas con eosinófilos purificados.....	56
7.4.3	Determinación del producto de degranulación (peroxidasa del eosinófilo - EPO) medido por ensayo ELISA.....	57
7.5	Ensayos de identificación marcadores de actividad eosinofílica por citometría de flujo	59
8.	Discusión	61
9.	Conclusiones	66
10.	Referencias	67
11.	Anexos.....	71

1. Resumen ejecutivo

Las infecciones por helmintos se consideran un problema de salud pública a nivel mundial, dado que, aunque estos organismos casi nunca generan mortalidad, los índices de morbilidad son bastante elevados, generando grandes costos en los sistemas de salud, sobre todo en poblaciones endémicas, gracias a su capacidad para manipular y suprimir el sistema inmune del hospedero y generar infecciones crónicas. Durante varios años, el Instituto de Investigaciones Inmunológicas, ha venido estudiando la relación inmunológica entre las células del sistema inmune y los nematodos endémicos de la región caribe colombiana, dadas las bajas condiciones socioeconómicas y sanitarias en diversas poblaciones. Teniendo como base la hipótesis de que los eosinófilos son claves en la respuesta frente a la infección por helmintos y tomando como base de estudio los resultados encontrados en poblaciones rurales cercanas a Cartagena de indias, hemos querido identificar herramientas para estudiar si el eosinófilo es capaz de atacar directamente al nematodo *Ascaris spp* en estado larvario y los eventos de activación que ocurren en la célula al exponerse a ellas o a través del reconocimiento de sus productos secretados. Para esto, se estandarizó la técnica de incubación de huevos de *Ascaris suum* para obtener larvas en estadio L3. Se evaluó la técnica de purificación magnética de eosinófilos humanos a partir de sangre periférica ("*Eosinophil Isolation Kit human*" #130-092-010, Miltenyi Biotec, Alemania), obteniéndose eosinófilos purificados por citometría de flujo y microscopio óptico con un 60% de pureza. Se estudió la actividad larvicida *in vitro* de los eosinófilos purificados frente a *Áscaris spp* y sus antígenos representativos, encontrándose que los eosinófilos de sangre periférica humanos, en presencia de anticuerpos IgE, incubados con larvas L3 de *Ascaris suum*, fueron capaces de adherirse masivamente a las paredes de la larva, pero no se obtuvieron resultados concluyentes sobre la viabilidad de las larvas. Adicionalmente, se observó liberación de proteína citotóxica peroxidasa del eosinófilo (EPO) en presencia del recombinante rABA-1 y de suero de pacientes con IgE a este antígeno. Se evaluó una estrategia de medición de activación de eosinófilos basada en el anticuerpo monoclonal CD69, encontrándose una mayor expresión de CD69 en presencia de ABA-1 y con la adición de sueros positivos a ABA-1, pero no en sueros IgE negativa a ABA-1.

2. Planteamiento del problema y preguntas de investigación

Los helmintos causan infecciones de forma frecuente en países de bajo y mediano ingreso y, aunque estas generalmente no son fatales, están asociadas con altas tasas de morbilidad, generando infecciones crónicas que a menudo conducen a anemia y desnutrición, principalmente en la población infantil. Se estima que los parásitos de tipo helmintos causan infección en el 24% de toda la población humana. Las principales especies que infectan a las personas son los nematodos *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale* y algunos de ellos producen infecciones crónicas que pueden durar hasta 20 años [1]. La alta prevalencia de estas infecciones refleja su capacidad de modular el sistema inmunitario del hospedero y suprimir las respuestas que favorecen su expulsión. Además, la inmunidad del hospedero ha co-evolucionado con los parásitos, persistiendo mecanismos que limitan la infección. Por lo tanto, las respuestas inmunes a menudo permiten una infección continua en lugar de la eliminación completa del parásito, fomentando un daño colateral al huésped [2, 3].

Se plantea que la inmunidad protectora contra los helmintos se basa principalmente en mecanismos asociados a la respuesta tipo 2, caracterizada por la producción de citoquinas tales como IL-4, IL 13 e IL-5. De estas, la IL-5 es fundamental para la inducción de la producción en la médula ósea, la proliferación y supervivencia de los eosinófilos, que son resaltados por algunos autores como pieza fundamental en la protección contra este tipo de parásitos [4]. El aumento de los eosinófilos en sangre periférica en personas con helmintiasis se ha utilizado como argumento para sustentar la idea de que esta célula tiene capacidad de destruir al parásito [5]; sin embargo, específicamente los eventos inmunológicos de cómo el eosinófilo es capaz de atacar directamente a *Ascaris spp* en humanos y de si el reconocimiento de sus productos secretados (antígenos propios) puede inducir activación no se han esclarecido completamente. Se ha planteado la hipótesis de que los eosinófilos depositan el contenido de gránulos de eosinófilos sobre la superficie de los helmintos; esto basado en estudios previos con otras especies de helmintos como el *Schistosoma mansoni* [6] y con datos en cerdos que muestran que las larvas de

Ascaris suum (L3) son capaces de degranular eosinófilos [7]. No hay estudios previos en seres humanos que evalúen directamente el efecto de la infección por *Ascaris spp* en la función de estos granulocitos, desconociéndose, por ejemplo, si este parásito y sus componentes antigénicos inducen activación en los eosinófilos humanos.

En el Instituto de Investigaciones Inmunológicas se ha estudiado de forma tradicional la respuesta IgE a este parásito usando como reactivo diagnóstico extractos preparados de la lombriz adulta. Aunque varios alérgenos importantes están contenidos en este estadio de vida, hay limitaciones para estudiar otros aspectos de la respuesta inmune frente al parásito. Para estudiar si los eosinófilos pueden inducir la muerte del helminto, es necesario evaluar esta actividad en estadios más tempranos tales como los huevos o las larvas, sobre los cuales se espera que sean los puntos de control sobre los que estas células actúan. En el contexto de esta situación nos planteamos en este proyecto de investigación estandarizar herramientas que permitan abordar el estudio del papel de los eosinófilos humanos en la infección contra el nematodo *Ascaris spp* y sus productos secretados, un agente endémico en nuestras comunidades tropicales.

Dada la situación anteriormente planteada, con la ejecución de este proyecto se buscará resolver algunos interrogantes. ¿Pueden estandarizarse técnicas *in vitro* que permitan saber si los eosinófilos humanos son capaces de degranularse en presencia de larvas y antígenos propios del *Ascaris spp*? ¿Se podría estudiar la activación del eosinófilo humano usando antígenos de *Ascaris spp*?

3. Marco Teórico

3.1 Infección por *Áscaris spp* (Ascariasis)

Ascaris spp es un macroparásito de tipo Nemátodo, que se encuentra ampliamente distribuido en las regiones tropicales de todo el mundo, en los países de América del Sur es más común en zonas rurales que en entornos urbanos [3]. Se ha documentado que las especies de *Ascaris lumbricoides* (infecta principalmente humanos) y *Ascaris suum* (infecta principalmente cerdos) son morfológicamente indistinguibles. Estos difieren en solo seis (1,3%) nucleótidos en el primer espaciador transcrito interno (ITS-1) [8] y en un 3-4% en la secuencia del genoma mitocondrial (ADNmt) [9] lo que indica que las especies están estrechamente relacionadas a nivel filogenético. En otros estudios comparativos de ambas especies, se secuenciaron los genomas completos de *Ascaris lumbricoides* y *Ascaris suum* (aislados de China), estos tenían un tamaño de 14.303 pb y 14.311 pb, respectivamente. La identidad de los genomas fue del 98,1%, con genomas circulares y 36 genes [10]. Aunque ambos parásitos muestran una fuerte afinidad por sus huéspedes convencionales, múltiples estudios experimentales de transmisión cruzada han demostrado que *Ascaris lumbricoides* puede infectar a los cerdos y viceversa [11, 12]. Las infecciones intestinales por este tipo de helmintos en humanos son un importante problema de salud pública. A nivel mundial, un estimado de 819 millones de personas se infectaron con *Ascaris lumbricoides* para el año 2010 [1]. Aunque las infecciones por helmintos rara vez provocan la muerte, la morbilidad que causan es significativa, debido a que puede conducir a discapacidad crónica, lo que lleva a un desarrollo físico y cognitivo deficiente. Anne Botelho *et al.* (2008) demostraron en una corte de niños brasileños a los que le realizaron pruebas de inteligencia, que los niños parasitados por *Ascaris lumbricoides* tenían un bajo rendimiento en las pruebas de funcionamiento cognitivo [13].

La morbilidad y la mortalidad aumentan con la carga parasitaria, en la que los pacientes con infección leve tienden a ser asintomáticos y los que albergan gusanos suficientes, suelen precipitar la morbilidad grave o la mortalidad. Esta infección tiene un comportamiento heterogéneo en las poblaciones, en donde solo unos pocos albergan la mayor carga parasitaria (distribución de frecuencia

sobredispersada), la intensidad de la infección también puede estar influenciada por la carga genética [14, 15] las condiciones socioeconómicas, tales como las condiciones de vivienda y las prácticas culturales (prácticas de defecación antihigiénicas) [3, 16].

Las manifestaciones de la Ascariasis pueden caracterizarse ampliamente en síntomas agudos y crónicos. La mayoría de los pacientes parasitados tienden a experimentar inflamación pulmonar aguda, dificultad para respirar y fiebre como resultado de la migración larval a través del tejido pulmonar. La distensión y dolor abdominal, náuseas y la diarrea también son síntomas característicos de la infección. También se ha documentado que los gusanos adultos enredados conducen a una obstrucción intestinal mecánica [17].

3.1.1 Morfología de huevos de *Ascaris spp*

Los huevos de *Ascaris spp* se excretan en las heces de los humanos o cerdos infectados. En condiciones ambientales adecuadas, el huevo se convierte en larva en aproximadamente 2 a 3 semanas y se vuelve infeccioso para el huésped al ingerirlo (figura 4). La ingestión de un solo huevo completamente desarrollado es suficiente para producir una infección [18]. Además de la baja dosis de infección, cuando los huevos de *Ascaris spp* están presentes en el medio ambiente, se vuelven altamente resistentes a las duras condiciones ambientales y al tratamiento de aguas residuales [19].

Los huevos de *Ascaris spp* son de forma redonda a elíptica, estos miden 56–84 μm \times 50–59 μm . La membrana del huevo consta de cuatro capas: La capa uterina mamilada externa que consta de mucopolisacárido y un complejo proteico y se deriva del útero del gusano. Las otras tres capas se derivan del huevo:

- La capa vitelina externa está formada por lipoproteínas y se desconoce la función de esta capa.
- La capa quitinosa media es gruesa y le da resistencia estructural; el daño de esta capa destruye la capa lipídica interna y permite la entrada de sustancias químicas nocivas y la posterior inactivación del huevo.

- La capa lipídica más interna (ascarósido) contiene glicolípidos y es muy impermeable a la mayoría de las sustancias, excepto a los gases y los disolventes lipídicos. (Figura 1) [20].

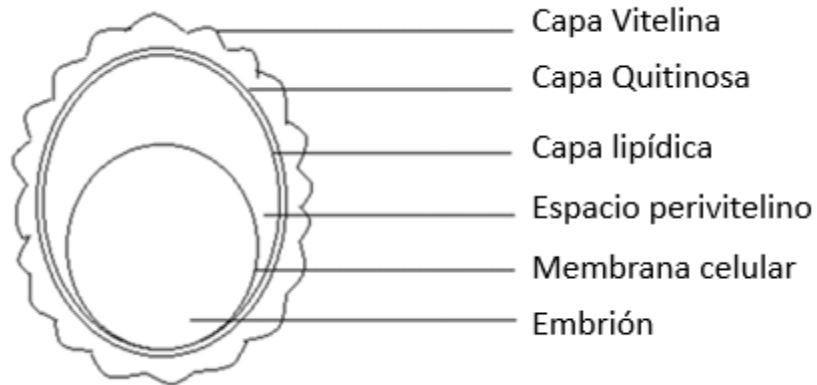


Figura 1 Huevo de *áscaris* spp. Fuente: Construcción propia.

La mayoría de los huevos de *Ascaris* spp (> 90%) mueren un par de meses después de la deposición, pero un número considerable de huevos, pueden sobrevivir y seguir siendo infecciosos en el medio ambiente hasta por 15 años. El desarrollo de los huevos en el medio ambiente está influenciado principalmente por la temperatura, a temperatura mayor a 38°C estos mueren, pero pueden permanecer viables durante períodos prolongados si la temperatura es inferior a 14 ° C [21].

3.1.2 Etapas del desarrollo embrionario de *Ascaris spp*

Desde 1927 se han descrito varios estadios de desarrollo embrionario de *Ascaris spp* visualizados al microscopio, en estos estudios describen de 5 a 10 etapas de desarrollo. Cruz *et al.* en el año 2012 analizó e identificó 2 etapas adicionales de desarrollo (incluyó prelarva 1 y prelarva 2) de los huevos de *Ascaris spp*. En este estudio se incubaron *in vitro* los huevos durante 3 semanas y fueron visualizadas y evaluadas estas 12 etapas de desarrollo por microscopía óptica. Las etapas identificadas fueron: una célula, dos células, tres células, cuatro células, mórula temprana, mórula tardía, blástula, gástrula, prelarva 1, prelarva 2, larva de primer estadio (L1) y larva de segundo estadio (L2) [22]. (Figuras 2 y 3).

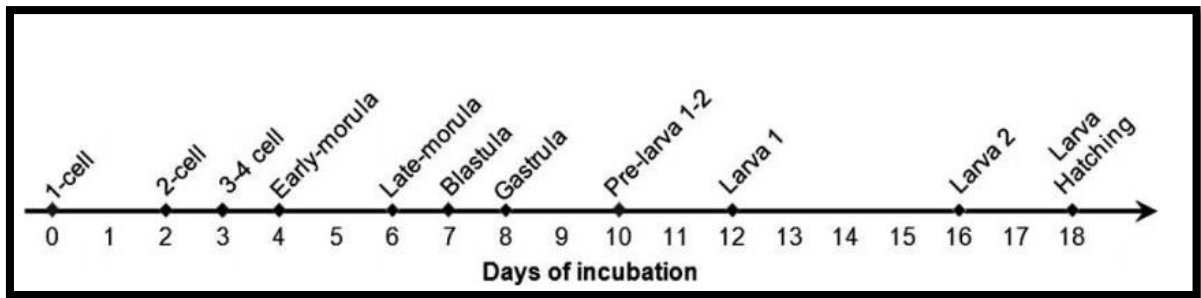


Figura 2 Cronología del desarrollo de *Ascaris spp* a 28 C, *in vitro*. Tomado de Ref. [22] Cruz, L et al, 2012.

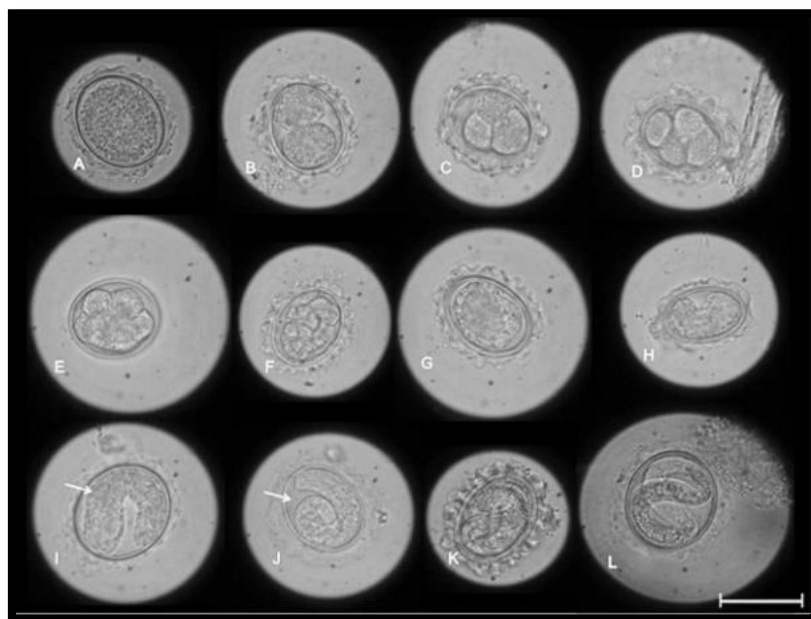


Figura 3 Fotografías al microscopio de las etapas de desarrollo de *Ascaris spp*. (A) 1 célula, (B) 2 células, (C) 3 células, (D) 4 células, (E) mórula temprana, (F) mórula tardía, (G) blástula, (H) gástrula, (I) prelarva 1, (J) prelarva 2, (K) larva 1 y (L) larva 2. Tomado de Ref. [22] Cruz, L et al, 2012.

Según lo documentado, los huevos son ingeridos por el hospedero (cerdo o humano) y al ingresar al intestino delgado eclosionan o liberan la cutícula L2, la larva emerge del huevo y se convierten en L3, durante el período, después de dejar el huevo, las larvas de la tercera etapa crecen inmensamente y se diferencian aún más (crecimiento alométrico continuo). Continúan con su migración hacia el hígado y pulmón (2 a 7 días post-infección) para alcanzar nuevas etapas de desarrollo en su ciclo de vida [11]. Así, La larva de la tercera etapa (L3) que emerge del huevo, eventualmente dará lugar a la larva de cuarta etapa y la etapa adulta en el intestino delgado del huésped [23]

3.1.3 Ciclo de vida *Ascaris lumbricoides* en humanos

El ser humano contrae la infección por vía fecal-oral. Cuando los huevos infecciosos se ingieren, las larvas en estadio L3 cubiertas por la cutícula L2, eclosionan en el intestino delgado y migran al ciego y al colon proximal donde penetran la mucosa. Las larvas luego migran a través de la sangre portal para llegar al hígado, donde se desprende la cutícula L2.

Dentro de las hipótesis de desarrollo documentadas hasta este momento, cuando le libera la cutícula L2 (eclosión de huevo), esta larva se convierte el L3 y es capaz de migrar al pulmón, en los días 6–8 post infección, causando una variedad de síntomas resultado de la respuesta inflamatoria local (sibilancias, disnea, tos y dolor subesternal). Luego estas penetran en el espacio alveolar y se mueven a la faringe donde se tragan y de esta manera retornan al intestino delgado en los días 8-10 post infección. Finalmente las larvas maduran y alcanzan la madurez sexual en el intestino delgado (Estadio L5) [11]. (Figura 4).

Los gusanos adultos pueden vivir en los intestinos durante aproximadamente un año, pero la mayoría de los gusanos son expulsados a la semana 23 de infección. Los gusanos adultos machos y hembras miden 15–25 cm y 20–35 cm respectivamente. Las estimaciones de la producción diaria de huevos de *Ascaris spp* generalmente están en el rango de 200.000 huevos, pero la cantidad de huevos que produce una hembra disminuye con la carga de gusanos. Los

huevo anembrionado entran al medio ambiente a través de las heces y pueden permanecer viables en el suelo hasta por 15 años [11].

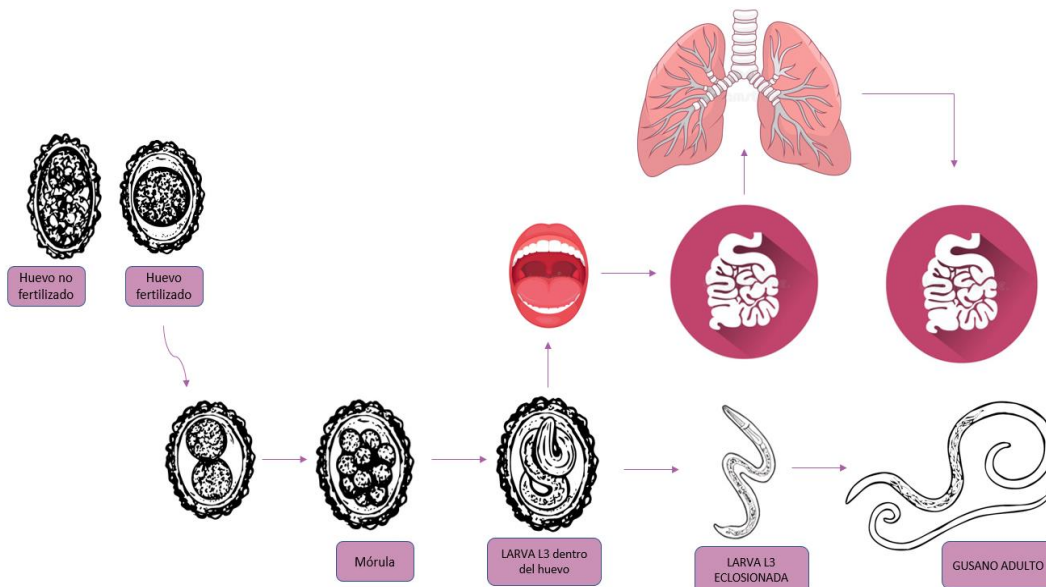


Figura 4. Ciclo de vida *Ascaris*. Fuente: construcción propia.

3.1.4 Respuesta inmune en la infección por *Ascaris spp*

Los mecanismos de eliminación de larvas han sido poco estudiados, se sabe que al principio de la infección, antes del desarrollo y establecimiento del gusano adulto, las células epiteliales de la mucosa intestinal secretan alarminas, como la IL-25, linfopoyetina estromal tímica (TSLP)) e IL-33, que promueven la activación y polarización al perfil de tipo 2: células linfoides innatas (ILC-2) y adaptativas (Th2), lo que lleva a la secreción de citoquinas como la IL-4, IL-5, e IL-13, bajo la influencia de la IL-4, cambio de isotipo en los linfocitos B, con la liberación de IgE específica del antígeno, hiperplasia de células caliciformes, hipersecreción de moco, contracción del músculo liso y finalmente, bajo la fuerte influencia de la IL-5, se produce eosinofilia en sangre periférica [24] (Figura 5).

Dentro de los hallazgos interesantes más recientes con respecto a las alarminas como inductoras de eosinofilia, se ha documentado que la IL-33, además de inducir la producción de citocinas asociadas al tipo 2, afectando la inflamación eosinofílica mediante la inducción de IL-5, también actúa directamente sobre los eosinófilos, regulando su biología, incluida la supervivencia, la activación y la adhesión [25]. Se ha demostrado que la interleucina 33 es un potente activador de los eosinófilos, incluso más que la IL-5 en términos de desencadenar la degranulación y la liberación de superóxido de los eosinófilos humanos [26].

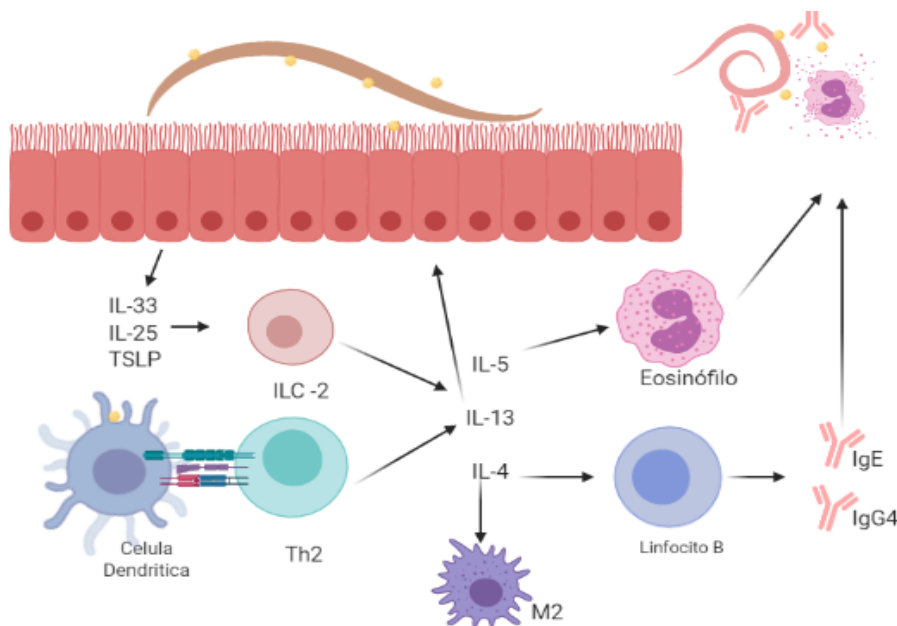


Figura 5 Mecanismos inmunológicos frente a la infección por *Ascaris*. Fuente: construcción propia.

Una respuesta polarizada de tipo 2, permite una modulación significativa de la respuesta Th1 (IL-2 e interferón-gamma [IFN- γ]) [27]. Sin embargo, esta respuesta persistente tipo 2 en el transcurso de la infección por helmintos también induce la expansión de linfocitos T reguladores (productores de IL-10 y TGF- β) y cambio de isotipo de linfocitos B a IgG4. Este nuevo entorno regulador, caracterizado por una baja proliferación de linfocitos específicos de antígeno-parásito, IL-10, TGF- β e IgG4, permite una infección asintomática y con tendencia a la cronicidad [24, 28].

Se ha observado aumento de los niveles de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1 beta (IL-1 β) específicamente en la migración larval al pulmón del *Ascaris lumbricoides*. Así como una producción marcada de IL-6, que se cree que está relacionada con la infiltración prominente de neutrófilos [29]. Cuando las larvas comienzan a abandonar el tejido pulmonar para migrar de regreso al intestino delgado para completar su ciclo de vida, el infiltrado de neutrófilos en el pulmón se reemplaza por macrófagos (AAM) activados alternativamente (o M2) y eosinófilos que juegan un papel clave en la remodelación de tejidos y la prevención de la reinfección. Una vez de vuelta en el intestino delgado, las larvas maduran en gusanos adultos, estableciendo una infección crónica a largo plazo caracterizada por una respuesta específica de helmintos profundamente disminuida [30, 31].

Los gusanos adultos pueden vivir en los intestinos durante aproximadamente un año, pero la mayoría de los gusanos son expulsados a la semana 23 de infección. Los gusanos adultos machos y hembras miden 15–25 cm y 20–35 cm respectivamente. Las estimaciones de la producción diaria de huevos de *Ascaris spp* generalmente están en el rango de 200.000 huevos, pero la cantidad de huevos que produce una hembra disminuye con la carga de gusanos. Los huevos anembrionados entran al medio ambiente a través de las heces y pueden permanecer viables en el suelo hasta por 15 años [11].

3.1.5 Antígenos de *Ascaris spp* (ABA-1)

El conocimiento sobre la composición alérgica de *Ascaris spp* y su impacto clínico en humanos aun es bastante limitado[32]. Se ha demostrado hasta este momento que *Ascaris spp* tiene propiedades alérgicas, dado que varias moléculas presentes en el extracto de su cuerpo son capaces unir IgE e inducir una respuesta inflamatoria. Aunque solo se han caracterizado algunas pocas de ellas como alérgenos reales, tres alérgenos figuran en el sitio oficial de la OMS/IUIS: Asc s 1, también conocido como ABA-1 y dos que tienen reacción cruzada, Asc I 3 (tropomiosina) y Asc I 13 (glutatió- S-transferasa) [33] y recientemente se identificó un nuevo alérgeno asociado a estos 3, el Asc I 5 [34].

Sin embargo, se ha demostrado que todo el extracto tiene al menos nueve componentes de unión a IgE adicionales [35].

Hemos tenido en cuenta el ABA-1 para nuestros ensayos como antígeno clave de este helminto, el cual se produce tanto en fases larvarias como en la lombriz adulta [36, 37]. ABA-1 (*Asc s 1*), aunque está en *Ascaris spp* y otros nematodos, no presenta reactividad cruzada con ninguno de los alérgenos de *Blomia tropicalis* o *Dermatophagoides pteronyssinus*, lo que significa que puede ser muy útil para el diagnóstico de enfermedades alérgicas con resolución de componentes en los trópicos. Adicionalmente, es un miembro de los alérgenos/antígenos de poliproteínas de nematodos (se une a diferentes lípidos y retinoides). Los estudios apoyan que las respuestas inmunitarias (IgG e IgE) a ABA-1 están asociadas con una infección previa e inmunidad a *Ascaris spp*. [32, 33, 35].

3.2 Eosinófilos

Los eosinófilos son granulocitos que se generan en la medula ósea en respuesta al factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), la interleucina 3 (IL-3) y la interleucina 5 (IL-5), citoquinas reguladas a la alta principalmente en infecciones por parásitos helmintos y otras condiciones como inflamación de vías respiratorias en enfermedades como el asma alérgica [38-40]. Los genes que codifican estas citoquinas se localizan en el locus 5q23-31 y tienen una regulación teniendo una regulación común [41].

Estas células miden de 10 a 16 μm de diámetro. Se distinguen de otros leucocitos por sus características morfológicas específicas; poseen núcleo segmentado, bilobulado y dentro de su citoplasma se encuentran además de los orgánulos comunes a todas los demás leucocitos, los cuerpos lipídicos, las vesículas de sombrero y sus particulares gránulos que histológicamente tienen predilección por los tintes de eosina [42]. Estos gránulos acidófilos permiten distinguir al eosinófilo de otros granulocitos, como neutrófilos y basófilos, pueden ser primarios o secundarios y tienen la capacidad de liberar una gran cantidad de mediadores inmunes específicos, revelando las funciones de los eosinófilos

durante situaciones de infección, inflamación de vías respiratorias en situaciones de asma o alergia e inmunorregulación [42]. Dentro de los gránulos específicos o secundarios, se encuentran 4 proteínas muy importantes para las funciones del eosinófilo, estas son: la proteína básica principal (MBP-1 y -2, sigla proveniente del inglés *major basic protein*) que se encuentra en el núcleo, en la matriz se encuentra la proteína catiónica del eosinófilo (ECP), la peroxidasa del eosinófilo (EPO ó EPX) y la neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) [43, 44]. Dentro de los gránulos primarios se encuentra la proteína de Charcot Leiden. La EPO y MBP-2 se expresan exclusivamente en el eosinófilo mientras que las otras se expresan de forma variable (hasta 100 veces menos) en otros leucocitos como los basófilos, tejidos y células de la sangre [45].

3.2.1 Eosinofilopoyesis

Los eosinófilos se han detectado en casi todas las especies de vertebrados [46, 47] y se ha observado una alta conservación de su morfología. Dado que muchos de los estudios relacionados con la respuesta de eosinófilos se realizan en ratones, es importante tener en cuenta que la ontogenia de estas células difiere con la del humano en algunos aspectos. En los seres humanos, una vez que las células madre hematopoyéticas CD34⁺ (HSC) se comprometen a convertirse en progenitores mieloides comunes (CMP) y posteriormente en progenitores de eosinófilos (EoP), suelen pasar por varias etapas antes de transformarse en eosinófilos completamente maduros, que luego van a la circulación y a los tejidos. Estas etapas incluyen en orden de desarrollo: mieloblastos, promielocitos, metamielocitos, eosinófilos en forma de banda y forma segmentada. En cada una de estas etapas actúan diferentes factores de transcripción que afectan la diferenciación y maduración del eosinófilo [48].

En la ontogenia del eosinófilo murino se ha demostrado que existen diferencias en la vía del linaje a través del cual se generan, identificándose una etapa intermedia llamada GMP (Progenitor granulocito- monocito) que está relacionada también con el linaje de eosinófilos, neutrófilos y macrófagos. Los progenitores que darán lugar a eosinófilos expresan el factor de transcripción GATA-1,

mientras que las GMP que no expresan GATA-1 dan lugar a neutrófilos y macrófagos [49] (Figura 6).

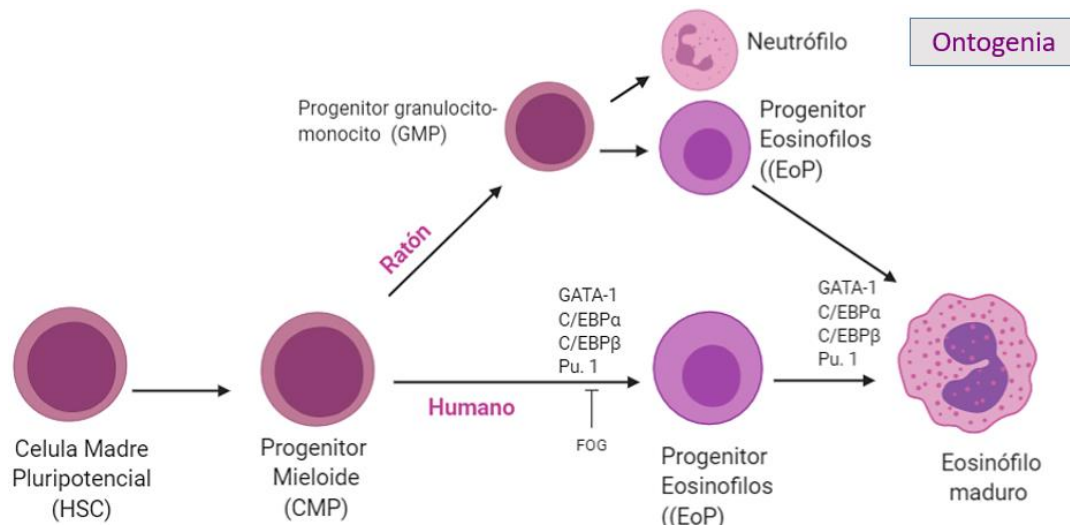


Figura 6 Eosinofilopoyesis. Fuente: construcción propia.

3.2.2 Activación de eosinófilos

Los eosinófilos, a través de sus receptores con capacidad de reconocer directamente patógenos o por moléculas mediadoras de la respuesta inmune, pueden activarse y generar respuestas efectoras de importancia en la defensa contra patógenos. Se ha observado un vínculo entre la respuesta de eosinófilos con la activación de los epitelios. Varias clases de células epiteliales tienen capacidad de producir IL-25, IL-33 y la linfopoyetina estromal tímica (TSLP), conocidas comúnmente como alarminas, en respuesta a agentes como alérgenos, contaminantes y patógenos. Estas citoquinas desencadenan una cascada inflamatoria que activa las células linfoides innatas de tipo 2 (ILC2s) y los linfocitos, con su posterior diferenciación en perfil Th2, lo que resulta en un aumento de la producción de numerosas citoquinas de este perfil como IL-4, IL-5 e IL-13, de estas la IL-5 (junto con IL-3 y GM-CSF) estimula la eosinofilopoyesis, provocando la activación y quimioatracción de los eosinófilos, con la posterior liberación de sus gránulos citoplasmáticos [50].

Además de la degranulación como principal mecanismo efector de los eosinófilos, donde se liberan sus proteínas citotóxicas y una gran cantidad de citoquinas (al menos 35), receptores de adhesión, receptores de quimiocinas,

receptores de complemento, receptores de citoquinas, receptores de inmunoglobulinas, receptores del sistema inmune como receptores tipo Toll (TLR) y NOD, receptores de apoptosis, complejo mayor de histocompatibilidad tipo II y receptores inhibidores, como vemos los eosinófilos humanos muestran un amplio espectro de receptores de superficie que son importantes para sus funciones múltiples en la salud y la enfermedad[51]. También se ha descrito otro mecanismo propio de la inmunidad innata, basado en la liberación de trampas extracelulares que al parecer complementa su función efectora [52]. Los eosinófilos, a diferencia de los linfocitos T, que necesitan días para la generación de sus propias citoquinas, secretan citoquinas que ya se encuentran preformadas en sus gránulos intracelulares cristaloides y poseen actividad funcional al ser liberados [53].

Para la activación celular, las citoquinas eosinofilopoyéticas (IL-3, GM-CSF e IL-5), se unen a receptores presentes en el eosinófilo, denominados *Tipo I* (Familia de receptor para la hematopoyetina), los cuales constan de una cadena alfa (α) específica para cada una de ellas (IL-3R α , GM-CSFR α , IL-5R α) y una cadena beta (β c) común para las tres, la cual no participa directamente en la interacción con la citoquina sino que a través de su porción intracitoplasmática larga transduce señales, activando vías asociadas a las *quinasas Janus* (JAK) y factores de transcripción llamados *transductores de señales y activadores de la transcripción* (STAT), conocida como Vía JAK-STAT. Esta vía de transducción de señales comienza con las enzimas JAK inactivas que están unidas de forma no covalente a los dominios intracitoplasmáticos de los receptores, cuando se une la citoquina al receptor, estos se acercan entre sí activando las JAK que fosforilan las cinasas ubicadas la porción intracitoplasmática, luego estas fosfotirosinas reconocen proteínas STAT citosólicas monoméricas y se unen a ellas, las cinasas unidas al receptor fosforilan las STAT. De esta manera se dimerizan las STAT y migran al núcleo, donde se une a secuencias del ADN en las regiones promotoras de genes que responden a estas 3 citoquinas, activando así la transcripción de genes para la activación del eosinófilo [54] [55].

La migración eosinofílica, incluye varios pasos hasta llegar al lugar donde son requeridos, estos pasos incluyen rodamiento, anclaje, adhesión firme y migración transendotelial. Los estudios *in vivo* en humanos y ratones han

demostrado que los eosinófilos pasan solo un corto tiempo en la circulación (vida media entre 3 y 24 horas), pero en caso de migrar a tejidos, su vida media es más larga (36 horas en el pulmón y hasta 6 días en los intestinos, timo y útero) [56].

Los eosinófilos al salir de la médula ósea se establecen en tejidos como corteza y médula del timo, tracto gastrointestinal inferior, ovario, útero, bazo, ganglios linfáticos y pulmón. Estos son reclutados por las eotaxinas, MIP-1 α (CCL3) y RANTES (CCL5) que son sintetizadas en el epitelio. Las eotaxinas son una variedad de quimiocinas con funciones quimioatrayentes y existen tres subtipos de estas: eotaxina-1 (CCL-11), eotaxina-2 (CCL-24) y eotaxina-3 (CCL-26), las cuales se unen a los receptores CCR3 del eosinófilo. MIP-1 α y RANTES se unen a CCR1 y CCR5 respectivamente, que cuales se encuentran también en las membranas de los eosinófilos [57] [58].

Varios estudios han demostrado que las eotaxinas son reguladores fundamentales del tráfico fisiológico de eosinófilos en estado basal. Matthews *et al.* (1988), demostró, en un modelo *in vivo*, que los ratones deficientes de eotaxina muestran una reducción marcada y selectiva de eosinófilos tisulares [59]. La eotaxina-1 es la principal quimioatrayente de los eosinófilos, es producida por células epiteliales y el endotelio en respuesta a IL-4 e IL-13 a través de un transductor de señales y funciona de manera conjunta con IL-5 para promover el reclutamiento de eosinófilos. Las eotaxinas también promueven la eosinofilo-poyesis y son directamente responsables de la movilización de progenitores de eosinófilos en la médula ósea para salir a la circulación periférica [58].

Los eosinófilos llegan a los lugares donde se necesitan, adhiriéndose al endotelio vascular y rodando a lo largo de él, para luego extravasar el epitelio. El anclaje inicial al endotelio se produce por la unión de la P - selectina (receptor de adhesión de la membrana de los eosinófilos) al ligando PSGL-1 en la membrana del eosinófilo. Posterior a esto, el eosinófilo “rueda” y atraviesa el endotelio, por la unión de la integrina VLA-4 encontrada en la membrana del eosinófilo a la V-CAM1, promoviendo así la activación y extravasación del eosinófilo al interior del tejido [49]. La IL-13 produce una mayor expresión de P

selectina en las células endoteliales aumentando la unión a PSGL-1 del eosinófilo [60].

3.3 Mecanismos efectores del eosinófilo sobre los parásitos

Desde su descubrimiento, los eosinófilos se han asociado a la defensa contra helmintos, dado que se aumentaban en número en el hemograma de pacientes infectados. Existen algunos estudios que evalúan directamente si estas células tienen actividad larvicida. KJ Hamann *et al.* (1990) en ensayos *in vitro* midieron la toxicidad las 4 proteínas del eosinófilo purificadas, que fueron cultivadas con microfilarias de *Brugia pahangi* y *Brugia malayi*, evidenciando la muerte de este parásito en estadio de *Microfilaria* dosis-dependiente. Se observó que la MBP fue al menos 3 a 5 veces más potente que ECP, pero su efecto tóxico fue similar al de la EPO. La EDN requirió más concentración para dañar los parásitos en comparación con las demás proteínas de los gránulos del eosinófilo. La MBP, ECP y EPO fueron inhibidas por la heparina, lo cual sugiere que las características catiónicas de estas moléculas son las responsables de su toxicidad sobre los parásitos [61].

Hay evidencia científica que muestra que los eosinófilos son capaces de mediar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o complemento. Estudios de Glauert *et al.* (1978) de hace más de tres décadas observaron *in vitro* que los eosinófilos pueden adherirse y destruir en estadio de esquistosómula al helminto *Schistosoma mansoni*. En este estudio se incubaron eosinófilos purificados con esquistosómulas aisladas de pacientes africanos, observándose por microscopía electrónica la adhesión del eosinófilo en ausencia de anticuerpos o unidos a través de receptores Fc (con anticuerpos) o complemento (con características aplanadas) a las paredes de la esquistosómula, con la liberación de material granular a la membrana externa del tegumento del parásito, el cual tenía una densidad y una estructura similares a los contenidos de los gránulos de los eosinófilos, desintegrando el tegumento en varios fragmentos y se vio que algunos de estos fragmentos habían sido fagocitados por los eosinófilos, finalmente esta degradación resultó en una pérdida completa de la forma de la esquistosómula [6].

Un estudio realizado con el helminto *Trichinella spiralis*, mostró resultados opuestos sobre las funciones de los eosinófilos en la respuesta anti-parasitaria. Fabre *et al.* (2009) Usaron dos modelos murinos de ablación de eosinófilos, los cuales fueron infectados por vía oral con *Trichinella spiralis* en estadio L1, los eosinófilos fueron prominentes en los infiltrados que rodean las células musculares infectadas de ratones de tipo salvaje; sin embargo, en ausencia de eosinófilos hubo muerte de las larvas dado por macrófagos activados bajo la influencia mejorada del IFN- γ y disminución de IL-4. Además, la supervivencia de las larvas mejoró cuando los ratones fueron tratados con inhibidores de iNOS (enzima óxido nítrico sintasa inducible), lo que evidencia la vía del óxido nítrico en la eliminación del parásito. Estos hallazgos sugirieron que los eosinófilos podrían influir en la respuesta inmune, prolongando la infección crónica del parásito [62].

También se ha observado que los parásitos pueden presentar mecanismos inmunosupresores cuyo blanco directo es el control de la eosinofilia. *Necator americanus* produce metaloproteasas que degradan la eotaxina, un potente quimioatrayente de eosinófilos [63].

La confirmación de su efecto protector y como célula presentadora de antígeno (APC) se ha evidenciado en estudios *in vitro*, Padigel (2006) *et al.* expusieron eosinófilos purificados en presencia de GM-CSF a *Strongyloides stercoralis* y se observó la expresión de varios marcadores de superficie implicados en la activación celular, como CD69, también la expresión de complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase II y CD86, reflejando así la capacidad de los eosinófilos para presentar antígenos a los linfocitos T. Adicionalmente, al cultivar eosinófilos purificados con linfocitos T *in vitro* se vio un aumento de la producción de IL-5, evidenciando su ayuda al sistema inmunitario a iniciar y desarrollar respuestas de linfocitos T específicas contra *S. stercoralis* [64, 65].

La demostración de su papel en la defensa contra helmintos *in vivo* ha sido deficiente y controversial, puesto que la mayoría de los ciclos de vida no se completan en animales como los ratones, en los que comúnmente se hace este tipo de estudios experimentales. Otra falencia en el estudio de la defensa del eosinófilo contra los parásitos *in vivo* es la falta de una enfermedad específica en los seres humanos caracterizado por deficiencia de eosinófilos. La única

condición específica de eosinófilos conocida es la deficiencia de la peroxidasa del eosinófilo (EPO) en la que no se ha demostrado hasta el momento que esté relacionada con una mayor susceptibilidad o gravedad de la infección por helmintos [66]. Así, aun con evidencia de estudios en animales y humanos, el papel definitivo del eosinófilo en la respuesta inmunitaria parasitaria sigue necesitando más evidencia científica [5].

3.4 Marcadores de identificación y activación de eosinófilos por citometría de flujo

Ha sido difícil encontrar un marcador específico para la identificación de eosinófilos por citometría de flujo, dado que los eosinófilos expresan una gran variedad de estructuras en su superficie usadas para adhesión, apoptosis, señalización, receptores para IgG, IgA, citoquinas, quimiocinas, proteínas del complemento y otras estructuras, las cuales son compartidas con otras células del sistema inmune, como mastocitos y basófilos [67].

En estudios como el de Caroline Ethier *et al.* (2014) demostraron que utilizando estrategias de identificación basadas en autofluorescencia para eosinófilos, es posible recolectar eosinófilos altamente purificados por citometría de flujo, mencionan que se deben usar marcadores (mAbs) contra los receptores CD4, CD3, CD8, CD45 y CD25 conjugados con fluoróforos comunes (FITC, PE, PERCP, APC), y así distinguir la población de células CD4(+) del resto de leucocitos, con la fácil identificación de los CD45 que está presente en todos los leucocitos a diferentes intensidades, finalmente mencionan que para identificar los eosinófilos de otros leucocitos se requieren marcadores específicos como son: VLA-4 (CD49), CRTH2 (CD294) y CCR3 (CD193) [67].

Para la identificación de eosinófilos activados, se estudió el marcador de activación aguda CD69, este se expresó *de novo* en eosinófilos de pacientes con enfermedades parasitarias y/o eosinofilia pulmonar, después de cultivarlos con IL-3, IL-5 y GM-CSF [68]. Adicionalmente, Kenji Matsumoto *et al.* (1998) reunieron un panel (350) de anticuerpos monoclonales (mAbs) dirigidos contra una variedad de marcadores de la superficie celular para detectar eosinófilos

después de la activación *in vivo* o cultivo por hasta 72 horas con citocinas eosinofilopoyéticas. Confirmaron que el marcador de superficie CD69 se expresa en eosinófilos activados y no en eosinófilos en reposo, e informaron que también los niveles de CD44 aumentan en eosinófilos activados *in vitro* o *in vivo* [69].

Por otro lado, se ha venido utilizando otro anticuerpo monoclonal que ha sido de gran ayuda en la identificación de eosinófilos, el siglec-8 (su homólogo en ratones es el Siglec-F, los ratones no expresan siglec-8). Esta lectina tiene capacidad para unirse al ácido siálico y es miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas. Se expresa casi exclusivamente en eosinófilos; sin embargo, los basófilos y los mastocitos pueden expresarlo en menor grado [70]. Los estudios *in vitro* proporcionan evidencia funcional de que Siglec-8 actúa como un inductor de muerte (apoptosis) de los eosinófilos, dado que la mayor potencia y eficacia para desencadenar la muerte celular en presencia de citocinas observadas *in vitro*, al menos para los eosinófilos, contribuye a la noción de que Siglec-8 proporciona un mecanismo de “protección segura” para controlar las respuestas alérgicas e infecciones parasitarias [71].

3.5 Técnicas de purificación de eosinófilos

Actualmente, varios métodos están disponibles comercialmente y se usan de manera rutinaria en diferentes laboratorios a nivel mundial, como son:

- *CD16 MicroBeads, human (130-045-701, Miltenyi Biotec)*: este método de selección negativa permite la obtención de eosinófilos después de pasos de sedimentación en gradiente de densidad y lisis de eritrocitos. La población de granulocitos restante se marca con microperlas inmunomagnéticas anti-CD16, y con el uso de una columna magnética se seleccionan los “no eosinófilos”, la fracción enriquecida de eosinófilos fluyen a través de la columna.
- El segundo método también de selección negativa es el “*Eosinophil Isolation Kit human (130-092-010, Miltenyi Biotec)*”, el cual usa los mismos pasos del método anterior, pero en este caso se utiliza un cóctel de anticuerpos con múltiples especificidades como son: anti-CD2, CD14, CD16, CD19, CD56, CD123, CD235a para marcar los no eosinófilos que

quedarán unidos a una columna magnética, al igual que el método anterior la fracción enriquecida de eosinófilos fluirá a través de la columna.

- El tercer método es el “*EasySep (19,256, STEMCELL Technologies INC)*”, el cual permite la obtención de eosinófilos también por selección negativa después pasos de sedimentación en gradiente de densidad y lisis de eritrocitos. En este, los no eosinófilos están destinados a la eliminación con complejos de anticuerpos tetraméricos que reconocen las partículas no eosinófilas, las células etiquetadas se separan utilizando un imán EasySep™ sin el uso de columnas y la fracción enriquecida de eosinófilos queda en un tubo nuevo. [72].
- Por ultimo está disponible el “*MACSxpress isolation kit (130-104-446, Miltenyi Biotec)*”. Lanzado como una evolución del segundo método. En este no se utiliza el requisito de centrifugación en gradiente de densidad. Se obtienen eosinófilos después de la mezcla de sangre periférica con un cóctel de anticuerpos marcados magnéticamente que se dirigen a los marcadores de la superficie celular de los no eosinófilos. Los eosinófilos permanecen en los sobrenadantes mientras que otras poblaciones de células se agregan magnéticamente utilizando el separador MACSxpress (nº 130-098-308). Los eritrocitos residuales se lisan y se extrae una alícuota de la población final con las células enriquecidas.

4. Hipótesis

Los cultivos de eosinófilos con larvas (L3) y de antígenos purificados (ABA-1) de *Ascaris spp* son herramientas útiles para estudiar la actividad de estas células frente a este helminto.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Evaluar la aplicabilidad de técnicas experimentales para el análisis de la respuesta efectora de los eosinófilos humano frente a *Ascaris spp*.

5.2 Objetivos específicos

1. Estandarizar la técnica de incubación de huevos de *Ascaris suum* para conseguir estadio larvario L3.
2. Evaluar el rendimiento de la técnica de purificación de eosinófilos a partir de sangre periférica: “*Eosinophil Isolation Kit human*” basado en perlas magnéticas.
3. Estudiar la actividad larvívica *in vitro* de los eosinófilos purificados frente a larvas estadio L3 de *Ascaris suum*.
4. Estudiar la degranulación de los eosinófilos purificados en presencia de larvas de *Ascaris suum* y la proteína recombinante rABA-1.
5. Analizar los marcadores de activación de eosinófilos posterior a la incubación con la proteína recombinante rABA-1 de *Ascaris spp*.

6. Metodología

6.1 Diseño general de estudio

Corresponde a un estudio piloto que busca principalmente la estandarización de técnicas que permitan el estudio de la actividad eosinofílica sobre *Ascaris spp* en forma larvaria y usando un antígeno purificado (proteína recombinante rABA-1) obtenida del instituto de investigaciones inmunológicas. Estas técnicas consistieron la obtención de larvas en estadio L3 *in vitro* a través de incubación de huevos extraídos de lombrices de *Ascaris suum* y la evaluación del rendimiento de la técnica de purificación de eosinófilos a partir de sangre periférica: “*Eosinophil Isolation Kit human*” basado en perlas magnéticas con su posterior identificación por citometría de flujo.

6.2 Incubación de huevos de *Ascaris suum* para conseguir el estado larvario L3

Con el propósito de estandarizar el procedimiento de obtención de larvas L3 *in vitro* se siguió el protocolo de Urban *et al* (1981) [73] que se resume de forma esquemática en la Figura 7, al cual se le hicieron modificaciones encaminadas a preservar la recuperación de un mayor número de larvas, descritas brevemente a continuación y ampliadas en los resultados de este trabajo de tesis.

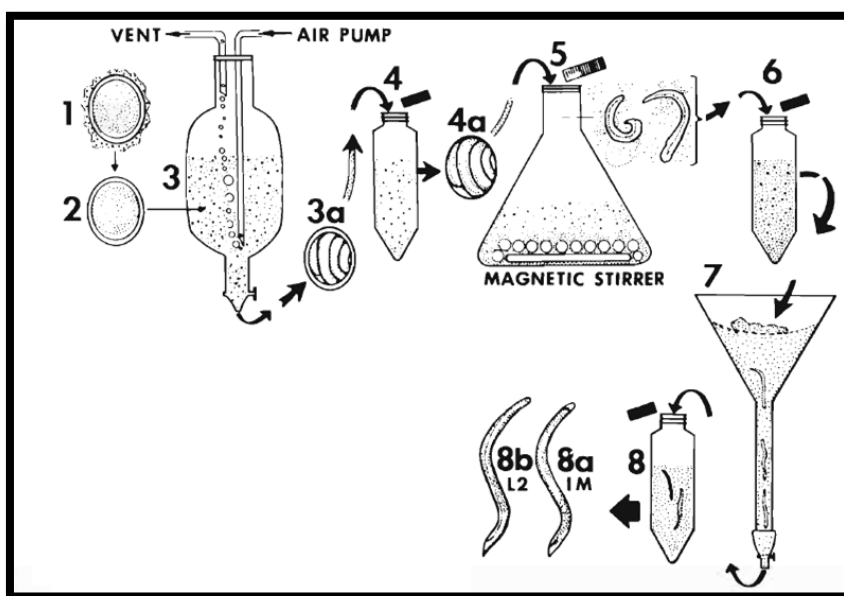


Figura 7. Protocolo de obtención y eclosión de huevos de *A. suum* para obtener larvas. Tomado de Ref [73].

La obtención de los huevos se realizó extrayendo el útero y homogenizándolo en una solución de NaOH al 0,5 N con ayuda de un disruptor de tejido. La suspensión se lavó dos veces mediante centrifugación a 200 g por 5 minutos con NaOH y posteriormente se hicieron 5 lavados más con agua destilada. Los huevos fueron re-suspendidos en una solución de formalina al 0.1% y se incubaron a una temperatura de 25°C dentro de una ampolla de decantación durante 28 a 30 días. Esto se mantuvo aireado mediante burbujeo constante, gracias a una bomba neumática y un sistema de tubos de vidrio.

Posteriormente se comprobó el estadio de los huevos mediante microscopía óptica, teniendo en cuenta las características morfológicas. Luego de comprobar que los huevos estaban en estado “infectivo”, se recolectaron en un tubo falcon y se guardaron a 4° hasta su posterior utilización. Para la eclosión, los huevos se lavaron 1 vez con formalina durante 5 minutos 300 g (des 3), se resuspendió el pellet de huevos en una suspensión de 40 mL en NaCl al 0,85% y se lavaron 3 veces mediante centrifugación de a 200 g durante 1 min sin freno del rotor. El pellet de huevos se resuspendió en 20 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 5.25% (Clorox comercial) a 37 ° C durante 15 minutos, seguido de 3 lavados en NaCl al 0,85%. Este procedimiento eliminó la mayor parte de la capa quitinosa de los huevos. Los huevos tratados con hipoclorito se suspendieron asépticamente en 4 mL de solución salina equilibrada de Earle (BBSS) y luego se transfirieron a un matraz de fondo plano de 250 mL que contenía una capa de perlas de vidrio (4-6 mm de diámetro) y una barra giratoria, el matraz se mantuvo en una incubadora a 37 ° C sobre un agitador magnético que movía lentamente las perlas durante 45 minutos. La suspensión de larvas eclosionadas se transfirió luego a un tubo de centrífuga y se lavó 3 veces en BBSS a 37 ° C para eliminar los restos de huevos. La suspensión que contenía las larvas se puso en capas sobre una gasa de algodón (peso seco de 2,5 g) sumergida en BBSS en un embudo cubierto de 10 cm, y se mantuvo durante 16 horas a 37 ° C en una incubadora. Este sistema permitió que las vivas bajaran a través del embudo y se recogieran asépticamente en alícuotas de 5 mL, luego se lavaron 10 veces con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco estéril y tibia. La suspensión resultante contenía un alto porcentaje de larvas intactas y con

movilidad. Para el conteo de las larvas, se colocaron 30 μ L de suspensión de larvas sobre la cámara Neubauer (figura 8) y se visualizó todo el campo en un microscopio invertido. Este procedimiento se realizó por duplicado y el promedio de las dos mediciones se utilizó como el valor de referencia final sobre el conteo de larvas.

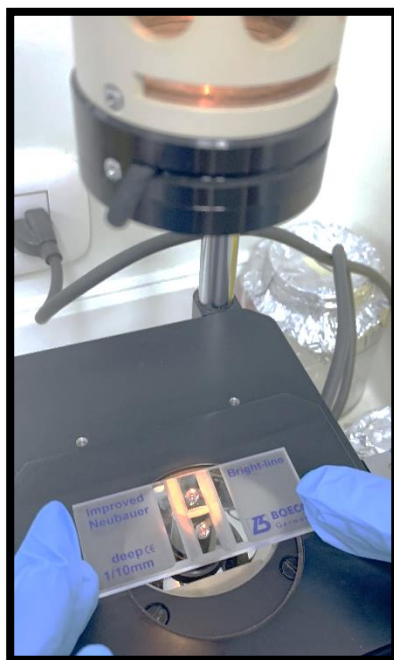


Figura 8 Cámara de Neubauer con larvas antes de observar en microscopio de inversión.

En los resultados de esta tesis se describirá con más detalle cada uno de los pasos y protocolo final adaptado en el Instituto de Investigaciones Inmunológicas.

6.3 Aislamiento y purificación de eosinófilos

Se obtuvo sangre de tres personas sanas (rango de edad: 22 – 34) para estos ensayos, previa firma del consentimiento informado. Se utilizó el estuche Eosinophil Isolation Kit human (Número de catálogo: 130-092-010, Miltenyi Biotec, Alemania) basado en perlas magnéticas (MACS®). Básicamente este aislamiento consistió en una selección negativa de los eosinófilos, marcando el resto de las células con un coctel de anticuerpos monoclonales (anti CD2, CD12, CD16, CD19, CD56, CD123 y CD235a) conjugados con biotina, con posterior contacto con anticuerpos monoclonales anti-biotina que están conjugados con

micro-perlas (2mL). Las células se colocaron la columna magnética de MACS, donde los no eosinófilos quedaron unidos a la columna magnética y la fracción enriquecida de eosinófilos fluyó a través de esta.

Para la obtención de una fracción enriquecida de eosinófilos, se siguieron las recomendaciones del fabricante, adaptándolos a un volumen requerido para purificar aproximadamente 3 millones de eosinófilos.

Los cálculos *a priori* para estimar el volumen de sangre a procesar se basaron en el promedio de eosinófilos en personas sanas a las cuales se les ha realizado hemogramas (0.5 – 3%). Se tomaron 60 mL (en 7 tubos con heparina de litio) de sangre periférica fresca a los participantes del estudio. Se procesó la muestra inmediatamente después de su recolección. Se diluyeron las células agregando un volumen de PBS en la misma cantidad de sangre inicial. Se colocaron cuidadosamente 15 mL de suspensión celular diluida sobre 15 mL Ficoll-Paque ($\rho = 1.077 \text{ g / mL}$) en 4 tubos cónicos de 50 mL (en total 4 tubos con 45 mL de sangre + PBS + Ficoll-hypaque) y se centrifugó a $600 \times g$ durante 30 minutos a 20° C . Luego, se retiró cuidadosamente el plasma y las células mononucleares que formaban una capa en la interfaz, dejando intacto el sedimento de glóbulos rojos para luego suspenderlo en solución de lisis de glóbulos rojos $1 \times$ (Red Blood Cell Lysis Solution ($10\times$) # 130-094-183, Miltenyi Biotec, Alemania). Para esto, se llenó el tubo cónico completo con 50 mL con solución de lisis. Posteriormente se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente ($19\text{--}25^\circ \text{ C}$), se centrifugó a $300 \times g$ durante 8 minutos a 20° C y se retiró con cuidado por completo el sobrenadante. El procedimiento de lisis se realizó 2 veces para obtener un pellet más limpio y eliminar por completo los glóbulos rojos. Luego se lavaron las células agregando 50 mL de buffer MACS. Se centrifugó a $300 \times g$ durante 8 minutos a 20° C , se retiró por completo el sobrenadante y se reconstituyó en 1 mL de buffer MACS.

- Etiquetado magnético

Para la separación magnética, se eligió una columna LS y un separador MidiMACS™.

En este procedimiento se trabajó lo más rápido posible para asegurar la viabilidad de las células, se mantuvieron las muestras en frío así como con el

buffer MACS con el fin evitar un marcaje inespecífico y velar por viabilidad celular.

Antes de iniciar, se procedió al conteo celular para lo cual se tomaron 40 μL de buffer MACS y 10 μL de células (relación 1:5). De esto se tomaron 10 μL de células y 10 μL de colorante azul tripano al 0.4%. Los volúmenes celulares de referencia para el etiquetado magnético usados en este protocolo son basados en una cantidad de 10^7 de células. Los volúmenes de los reactivos se ajustaron al número de granulocitos aislados.

Se centrifugó la suspensión de células a $300 \times g$ durante 10 minutos y se aspiró el sobrenadante completamente. Se resuspendió el sedimento celular en 40 μL de buffer MACS por cada 10^7 de células totales. Se agregó 10 μL de cóctel de biotina-anticuerpo por cada 10^7 de células totales. Se mezcló bien y se incubó durante 10 minutos en frío ($2-8^\circ \text{C}$). Se agregó 30 μL de buffer MACS por cada 10^7 de células en total. Posteriormente, se añadieron 20 μL de microperlas de anti-biotina por cada 10^7 de células en total. Se mezcló bien y se incubó durante 15 minutos más en frío ($2-8^\circ \text{C}$). Luego, se lavaron las células con buffer MACS agregando 1-2 mL de buffer y se centrifugó a $300 \times g$ durante 10 minutos. Se aspiró el sobrenadante completa y finalmente se resuspendió hasta 10^8 células en 500 μL de buffer MACS.

- Separación magnética

Para la separación magnética, se eligió una columna LS y un separador MidiMACS. Se colocó la columna en el campo magnético de un separador MACS adecuado.

Inicialmente se lavó la columna con 3 mL buffer MACS. Se añadió la suspensión celular sobre la columna que recolectó células no marcadas. Se recogió en un falcon de 15 mL el efluente total; esto consistió en la fracción celular sin marcar que representaba la fracción de eosinófilos enriquecida. Finalmente, se realizó un lavado 3 veces de 3 mL de buffer MACS para obtener la mayor cantidad de eosinófilos enriquecidos. Finalmente, se confirmó la pureza de los eosinófilos mediante citometría de flujo.

6.3.1 Identificación de eosinófilos purificados por citometría de flujo

Para evaluar la pureza de los eosinófilos aislados en el procedimiento anterior se identificó que porcentaje dentro de los leucocitos (CD45+) correspondía a eosinófilos. Las células fueron teñidas con una batería de anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromo contra los marcadores de superficie de eosinófilos descritos en la Tabla 1. Posterior a la purificación de las células se lavaron con Stain Buffer (BD, Biosciences, USA) y fueron centrifugadas a 300g por 5 min a 4°C. Luego se agregó en un volumen de 20 µL por muestra, 30 µL de las mezclas de anticuerpos Anti-CD16, CD3, Siglec-8 y CD45 de humanos (Tabla 1). Se incubaron en oscuridad durante 30 minutos para posteriormente, lavar nuevamente las células, re-suspender en 200 µL de Stain Buffer y colocar 2,5 µL de 7AAD para medir viabilidad celular. Finalmente, la lectura de las células se realizó mediante citometría de flujo usando el FACS Aria III (BD Biosciences). El análisis se realizó usando el software de análisis Kaluza (Beckman Coulter Inc, USA). Los eosinófilos se identificaron como células CD3 (-) CD16 (-) Siglec-8 (+) CD-45 (+).

Tabla 1 Marcadores de superficie para la identificación de eosinófilos purificados por citometría de flujo

MARCADOR	FLUOROCROMO	EMPRESA	REFERENCIA
Siglec-8	APC	eBioscience	347105
CD16	FITC	eBioscience	MHCD1601
CD3	PE	eBioscience	555340
CD45	BV510	Biologend	563204
Viabilidad	7-AAD	eBioscience	00-6993-50

6.3.2 Identificación del eosinófilo por microscopio óptico

Para la identificación morfológica por microscopía óptica, se tomaron 10 µl de células que contenían eosinófilos purificados obtenidos en el ensayo anterior se transfirieron a un portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente. Se sumergió la placa en colorante Giemsa y se dejó incubando por 5 minutos. Posteriormente se retiró el colorante y se lavó con abundante agua para retirar

el exceso de este [74]. La identificación celular se hizo por microscopía óptica (LEICA DM500) con lente 100X.

6.4 Ensayo de caracterización de la actividad eosinofílica

Se realizaron ensayos de medición de actividad eosinofílica usando varias estrategias experimentales. La primera de ellas fue el estudio de la activación del eosinófilo en presencia de larvas L3 de *Ascaris suum* midiendo su actividad eosinofílica así como también el efecto de esta interacción, evaluando la viabilidad de las larvas.

La otra estrategia consistió en evaluar la activación del eosinófilo en presencia de rABA-1, midiendo la liberación de EPO y la expresión del marcador de superficie CD69 mediante citometría de flujo.

Los sueros usados en este estudio fueron obtenidos de una base de datos del Instituto de Investigaciones Inmunológicas de participantes residentes en Santa Catalina, Bolívar, reclutados en el marco de un proyecto de investigación financiado por Colciencias y la Universidad de Cartagena (Contrato 590-2013) cuyo investigador principal fue el Dr. Luis Caraballo. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional de la Universidad de Cartagena y los pacientes dieron consentimiento informado para el uso de suero para evaluación de respuesta inmune frente a *Ascaris* (Cartagena, Colombia) (Anexo 1). Se emplearon sueros que tuvieran datos de IgE específica a ABA-1 determinados por ELISA (punto de corte para definir positividad OD: 0.11) e IgE específica al extracto de *Ascaris* por ImmunoCap (punto de corte: 0.3 kU/L)

6.4.1 Ensayos con larvas L3 de *Ascaris suum*

Para esto se sembraron 2×10^5 eosinófilos en una placa de 96 pocillos y se incubaron con 100 Larvas L3 de *Ascaris suum* en presencia de suero humano a una concentración 1/100 por 16 horas a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5%.

6.4.1.1 Visualización de incubación por microscopía óptica

Se observaron las placas de cultivo en un microscopio invertido (CK OLIMPUS TOKIO) con lente 10X. Después de 16 horas de incubación, se buscaba observar la adherencia de los eosinófilos a las paredes de la larva, analizar la movilidad de las larvas y cualquier cambio en el medio posterior a la incubación.

6.4.1.2 Ensayo de viabilidad de las larvas

Para este ensayo colorimétrico de MTT o bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difenil tetrazolio-formazán (MTT-formazán), se tomó como referencia el ensayo hecho por Masure *et al* (2013) [7] basado en el protocolo James *et al* (2007) [75]. Se sembraron eosinófilos 2×10^6 / mL en una placa de 96 pocillos en 100 μ L de RPMI suplementado con 50 μ L/mL de penicilina, estreptomycin 50 mg / mL y glutamina 2 mM. Luego se agregaron 100 larvas en estadio L3 por pocillo a una concentración final de 1/100. Se añadieron 100 μ L de MTT a una concentración final de 1 mg/mL. Después de 3 horas de incubación a 37 C y 5% de CO₂, se recogieron las larvas, se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se adicionó 100 μ L de DMSO, se incubó 15 minutos a temperatura de 37°C. Luego se procedió a lectura de la placa con espectrofotómetro Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific Oy, FI-01620, Vantaa, Finland) ajustado a 562 nm.

6.4.2 Ensayos con rABA-1 de *Ascaris suum*

Las placas se incubaron a 37 °C durante 2 horas en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ para que las células pudieran adherirse a la superficie plástica.

Se eliminó el sobrenadante y se agregaron larvas L3 de *Ascaris suum* (100 aproximadamente) en HBSS en 100 µl de medio de cultivo durante de 16 horas con los estímulos descritos en la tabla 2.

Tabla 2 Condiciones del ensayo de activación de eosinófilos

Sueros + Eosinófilos purificados	LARVAS L3	ABA-1 (1 µM)	ABA-1 (0.01 µM)	ABA-1 (0.001 µM)	IL-5 / GMSF
POOL POSITIVO	X	X	X	X	
POOL POSITIVO A 58°C	X				
POOL NEGATIVO	X	X	X	X	
POOL NEGATIVO A 58°C	X				
CONTROL NEGATIVO (RPMI)	X	X	X	X	
CONTROL POSITIVO (IL-5)					X

La figura 9 muestra de forma esquemática como se desarrolló el experimento

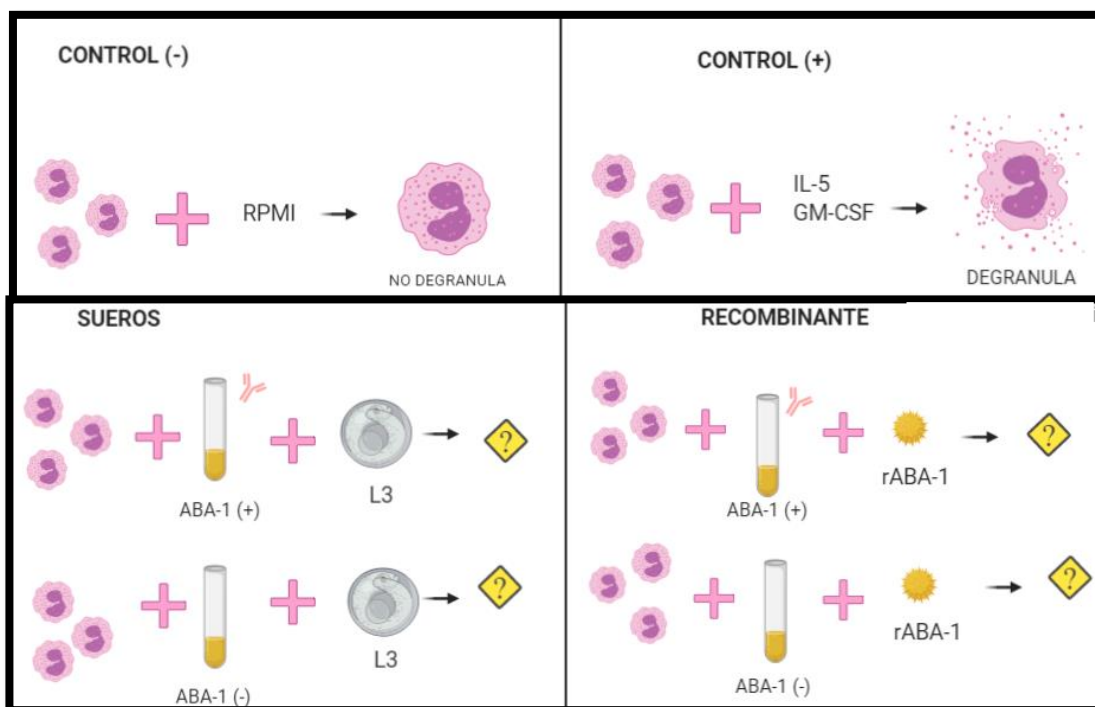


Figura 9 Esquema general del ensayo de activación de eosinófilos

Después de 16 h de incubación, las células se centrifugaron (150 g, 5 min, 4 ° C) y sus sobrenadantes se recolectaron y almacenaron a -80 ° C para su posterior análisis. Luego se analizó la activación y degranulación de los eosinófilos inducida por estos estímulos, mediante:

6.4.2.1 Determinación de un producto de degranulación (peroxidasa del eosinófilo - EPO) medido por ensayo ELISA

Se evaluó la degranulación midiendo la proteína peroxidasa del eosinófilo mediante ensayo de ELISA (Human Eosinophil peroxidase ELISA Kit, Cat. N° MBS9428616, MyBioSource, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se dejó que todos los reactivos alcanzaran la temperatura ambiente. Se añadieron 100 µL de estándar, blanco o muestra en cada pozo. Se cubrieron con el sellador de placas y se incubó durante 2 horas a 37°C. Luego se retiró el líquido de cada pozo, sin lavar. Se añadieron 100 µL de solución de trabajo del reactivo de detección a cada pozo y se cubrió con el sellador de placas. Se incubó durante 1 hora a 37°C. Luego se aspiró cada pozo y se lavó, repitiendo el proceso tres veces para un total de tres lavados. El lavado se realizó llenando cada pozo con buffer de lavado (aproximadamente 300 µL) usando un lavador automático (Micoplate washer marca Thermo Scientific OY, Vantaa, Finland), dejándolo reposar durante 1 a 2 minutos cada lavado. Luego se añadieron 100 µL de solución de trabajo del reactivo de detección B a cada pozo. Se cubrió con un sellador de placas nuevo y se incubó durante 1 hora a 37°C. Se repitió el proceso de lavado 5 veces. Luego se agregaron 90 µL de solución de sustrato a cada pozo, se cubrió con un sellador de placas nuevo, se incubó por 20 minutos a 37 ° C con protección de la luz. Finalmente, se añadieron 50 µL de solución de parada a cada pozo. Se determinó la densidad óptica de cada pocillo a la vez, utilizando un Espectrofotómetro Multiskan GO (marca Thermo Fisher Scientific Oy, FI-01620, Vantaa, Finland) ajustado a 450 nm.

6.4.2.2 Ensayos de identificación marcadores de actividad eosinofílica por citometría de flujo

Para la identificación y estudio de la activación de eosinófilos por citometría de flujo, inicialmente se evaluó si era necesario purificar granulocitos mediante separación por gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque o si se podían determinar directamente desde sangre total como se realiza en la prueba de activación de basófilos. Con cualquiera de las muestras de estudio (Sangre o granulocitos) se procedió de la siguiente manera:

Para la analizar la actividad eosinofílica, se estudió la expresión del marcador de activación CD69 por citometría de flujo. Para esto, inicialmente se tomaron 10 mL de sangre total de un individuo no infectado, se adicionó solución de lisis de glóbulos rojos 1x (Red Blood Cell Lysis Solution (10x) # 130-094-183, Miltenyi Biotech, Alemania) y se llenó el tubo cónico completo de 50 mL con solución de lisis de glóbulos rojos. Posteriormente se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente (19–25 ° C). Se centrifugó a 300 x g durante 8 minutos a 20 ° C y se retiró con cuidado por completo el sobrenadante. Se reconstituyó en 1 mL de RPMI. Se tomó 1 mL de células y se adicionó 2,5 mL de RPMI, se añadieron 100 µL de este cultivo celular a pozos con los estímulos: IL-5 y GMSF (5 ng/µL) como control positivo, RPMI como control negativo, sueros de pacientes con IgE a ABA-1 positivos y negativos (100 µL) y con IgE positiva y negativa al extracto de *Ascaris* por InmunoCAP (tabla 3). Se dejaron incubando 16 horas y luego se analizaron los marcadores de superficie de activación por citometría de flujo.

Tabla 3 Sueros escogidos para incubación con ABA-1

Sueros	Código	IgE ABA-1 (OD)	IgE <i>Ascaris</i> (kU/L)
(+)	ST 063	0,302	2,073
(+)	ST 453	0,352	2,417
(+)	EPI 040	0,380	20,04
(+)	ST 382	0,370	0,296
(-)	ST 274	0,083	0,175
(-)	ST 489	0,079	0,041
(-)	ST 477	0,089	0,007
(-)	ST 544	0,090	0,071

Luego, se tomó una alícuota de 50 µl de las células, se agregó el mix de monoclonales que se observa en la tabla 4 (30 µl del mix a 20 µl de la suspensión celular). Se Incubó por 20 min en oscuridad a 4°C. Se Lavaron las células 1X con Staining Buffer de citometría de flujo. Se dejaron en 100 µl de StainBuffer, con vortex. Se agregó 2,5 µl de 7AAD. Se Incubó durante 5 minutos a 2-8 ° C y se protegió de la luz. Finalmente se pasaron los tubos de citometría para la respectiva lectura.

Tabla 4 Marcadores de superficie de activación de eosinófilos

MARCADOR DE SUPERFICIE	FLUOROCROMO	EMPRESA	REFERENCIA
Siglec-8	APC	eBioscience	347105
CD16	FITC	eBioscience	MHCD1601
CD3	PE	eBioscience	555340
CD45	BV510	Biolegend	563204
7-AAD	APC	eBioscience	00-6993-50
CD69	BV510	Biolegend	400171
CCR3	APC	Invitrogen	1978204

7. Resultados

7.1 Incubación de huevos de *Ascaris suum* para conseguir el estado larvario L3

Para este experimento se desarrolló el protocolo de eclosión de JF Urban *et. al* (1981) que puede producir rápidamente inóculos asépticos, que contienen grandes cantidades de larvas viables de tercera etapa sin el uso de equipo especiales [73]. El procedimiento se describe en la Figura 7, siguiéndose los pasos, con algunos ajustes al protocolo que optimizaron la obtención de las larvas.

Se recolectaron lombrices adultas de *A. suum* de un matadero municipal, las lombrices fueron lavadas varias veces y fueron sumergidas en solución salina normal en un frasco grande de vidrio y transportadas al laboratorio para hacer la disección en menos de 24 horas. Posteriormente, se hizo la identificación morfológica y descarte de las diferentes lombrices que morfológicamente no correspondían a *Ascaris suum*.

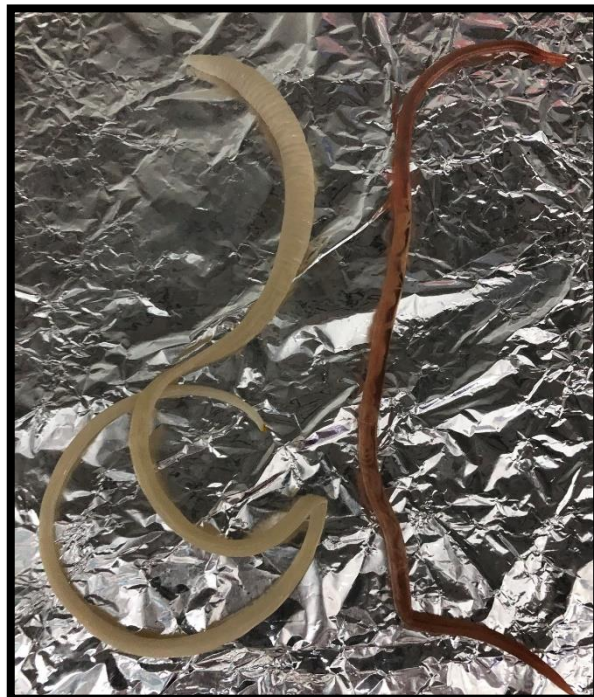


Figura 10 Diferenciación *Ascaris* y otras especies de nematodos. Se observa la lombriz del lado derecho con las características morfológicas de una hembra de *Ascaris suum*

Se eligieron 2 lombrices hembra de 25 y 29 cm respectivamente, se colocaron en la bandeja de disección de forma ventral y con la ayuda de una lupa se identificó la vulva de la lombriz en la parte externa (consiste en una diminuta línea en la mitad del cuerpo), con un bisturí, se cortó la pared del cuerpo a lo largo de la línea media dorsal, teniendo cuidado de no dañar las estructuras internas. Se fueron sujetando las paredes del cuerpo con alfileres para exponer las vísceras, inclinando los alfileres hacia afuera para dejar espacio para la disección.



Figura 11 Ascaris suum diseccionada. Se observan 2 lombrices hembras adultas diseccionadas, la cutícula fue separada con alfileres exponiendo las estructuras internas.

Se identificó el útero, el cual consiste anatómicamente en un conjunto de tubos largos y retorcidos en forma de Y, estos se desenredaron con cuidado con una sonda para liberarlos del resto de estructuras internas como el intestino, entre otros (la base corta de la “Y” y la vagina se conectan del interior al exterior del cuerpo, esto permitió identificar y saber con seguridad que era el útero, el cual contenía los huevos).

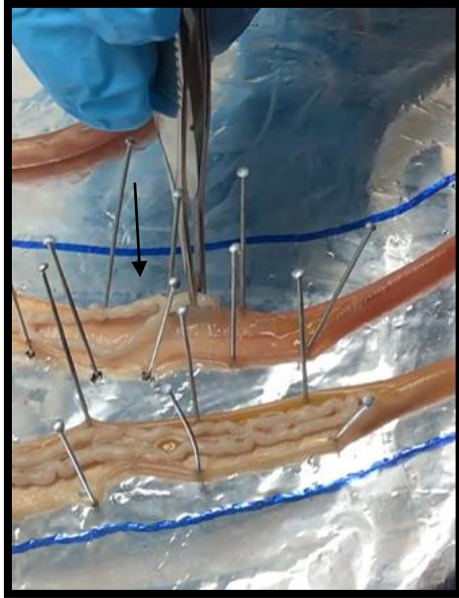


Figura 12. Útero de Ascaris suum. Se observa el útero en forma de Y que contiene los huevos.

Se extrajeron los 3 cm anteriores del útero de las 2 hembras adultas y se procedió a homogeneizar en NaOH 0,5 N utilizando un triturador de tejido de vidrio.



Figura 13. Trituración (homogenización) de úteros de Ascaris suum con disruptor de tejido.

La suspensión resultante se lavó 2 veces mediante centrifugación a 200 g durante 5 min con NaOH 0,5 N y 5 veces en agua destilada; esto eliminó la capa proteica.

Luego los huevos se suspendieron en formalina al 0,1%, se pusieron en un embudo de decantación con aireación continua de una pequeña bomba y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 días. Dos veces por semana se vigiló la cantidad de formalina y se hizo revisión de la funcionalidad del sistema, además de la toma de 1cm de solución contenida en la ampolla de decantación para la identificación por microscopio de los huevos en primera y segunda etapa.

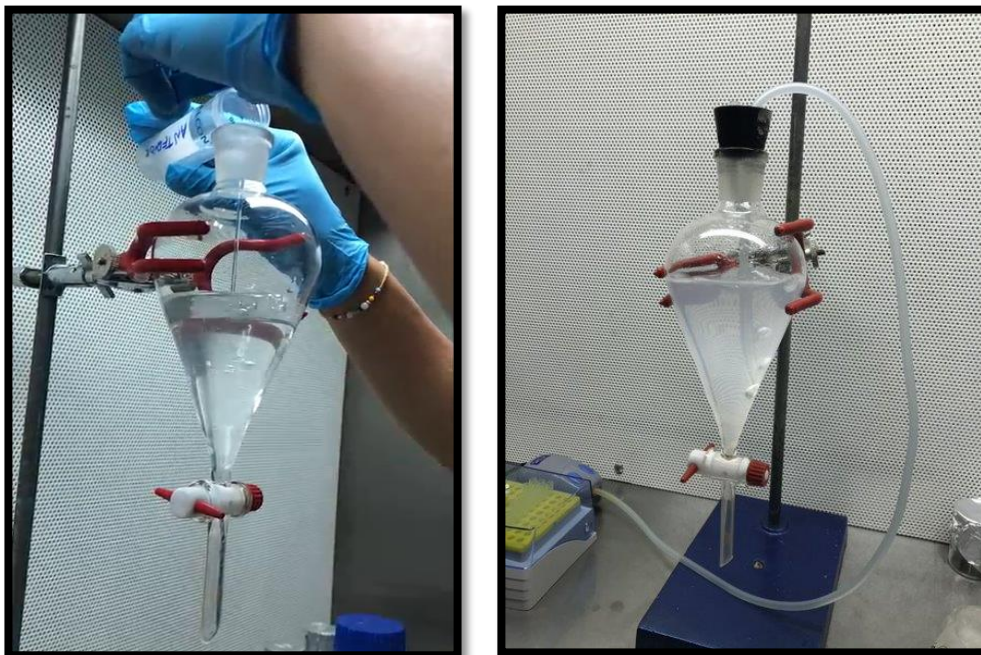


Figura 14. Ampolla de decantación que contenía los huevos de Ascaris suum.

Se recolectó toda la solución contenida en la bomba de decantación y se almacenó en formalina al 0,1% a 4 °C hasta su uso 1 semana después. Con la respectiva identificación de huevos por microscopía.

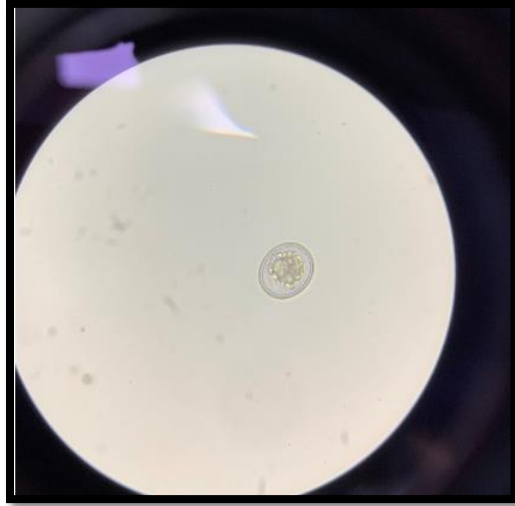


Figura 15 Huevo de *Ascaris suum* en estadio unicelular fertilizado, visualizados al microscopio inmediatamente después de ponerlos en la ampolla de decantación.

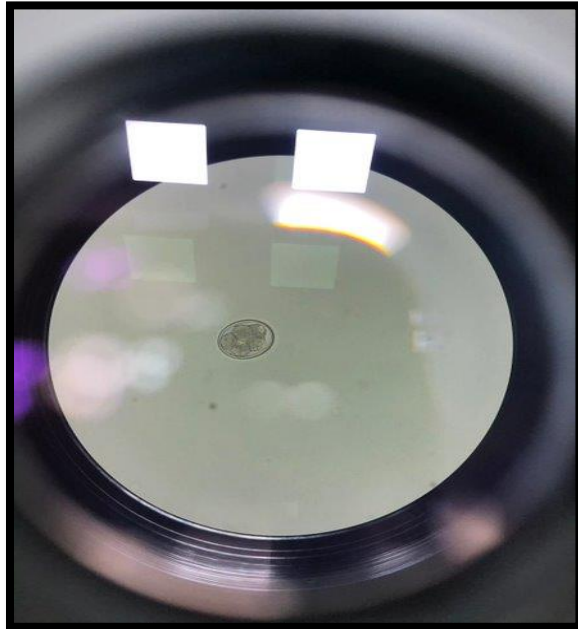
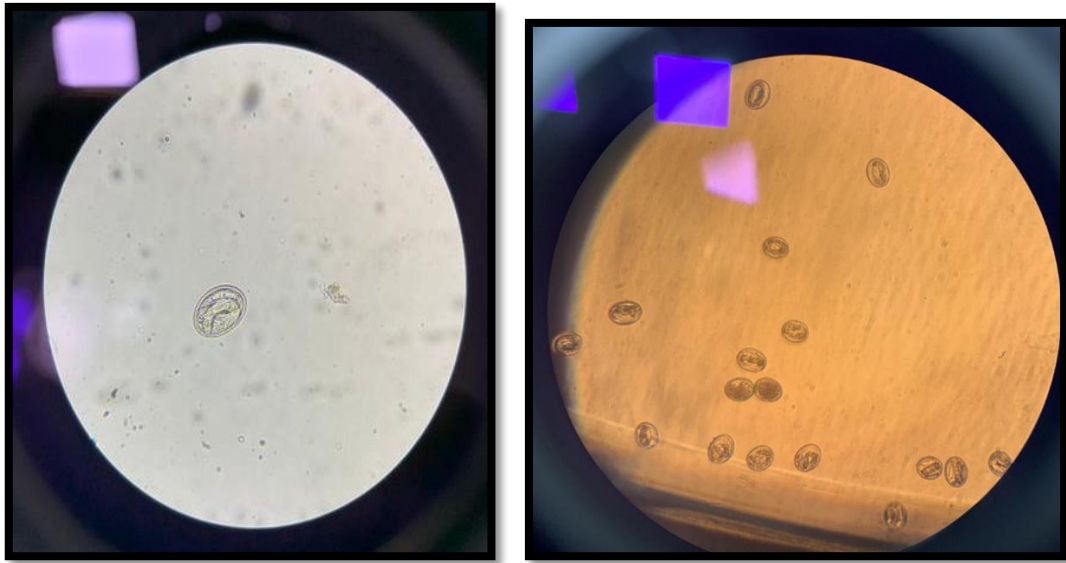
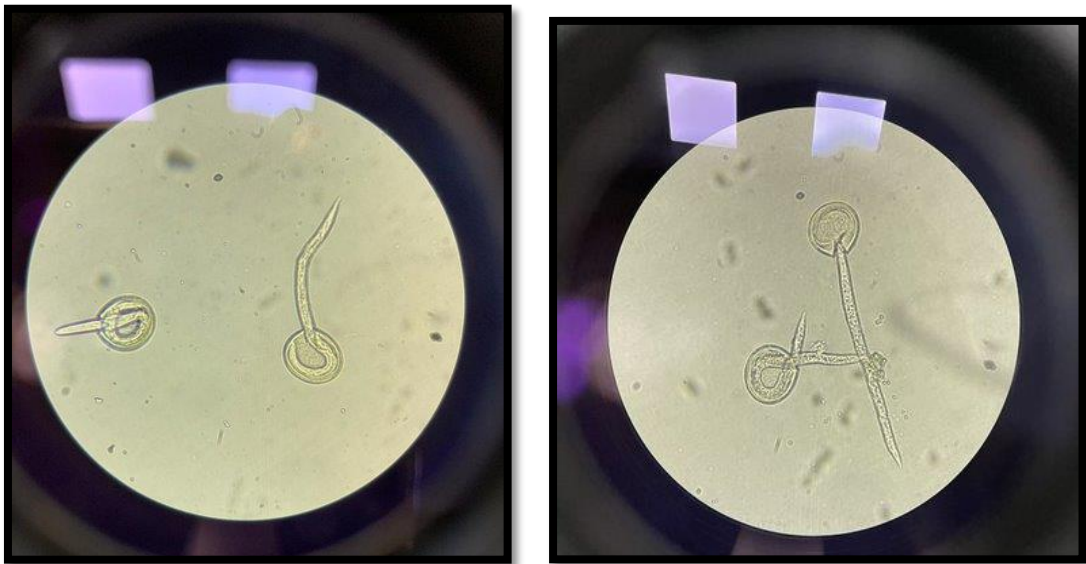


Figura 16 Huevo de *Ascaris suum* observado en microscopio con 1 semana de incubación en ampolla de decantación. Se observa un huevo en mórula al interior (etapa 4-6 células).



Figuras 17. Huevos de Ascaris suum observados al microscopio a los 28 días de incubación en ampolla de decantación. Se observa la larva enrollada en su interior.

Un hallazgo interesante fue que al intentar visualizar las larvas en microscopio, se les puso un cubreobjetos y a aplastarlos accidentalmente, se logró una eclosión que se observó al microscopio.



Figuras 18. Visualización en microscopio de eclosión de huevos de Ascaris suum con liberación de larva al ponerles un cubreobjetos.

Continuando con el protocolo de base, para la eclosión, los huevos se lavaron 1 vez con formalina durante 5 minutos 300 g (des 3), se resuspendió el pellet de huevos en una suspensión de 40 mL en NaCl al 0,85% y se lavaron 3 veces mediante centrifugación de a 200 g durante 1 min sin freno del rotor. El pellet de huevos se resuspendió en 20 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 5.25% (clorox comercial) a 37 ° C durante 15 minutos, seguido de 3 lavados en NaCl al 0,85%. Este procedimiento eliminó la mayor parte de la capa quitinosa de los huevos.

Los huevos tratados con hipoclorito se suspendieron asépticamente en 4 mL de solución salina equilibrada de Earle (BBSS) y luego se transfirieron a un matraz de fondo plano de 250 mL que contenía una capa de perlas de vidrio (4-6 mm de diámetro) y una barra giratoria, el matraz se mantuvo en una incubadora a 37 ° C sobre un agitador magnético que movía lentamente las perlas durante 45 minutos.

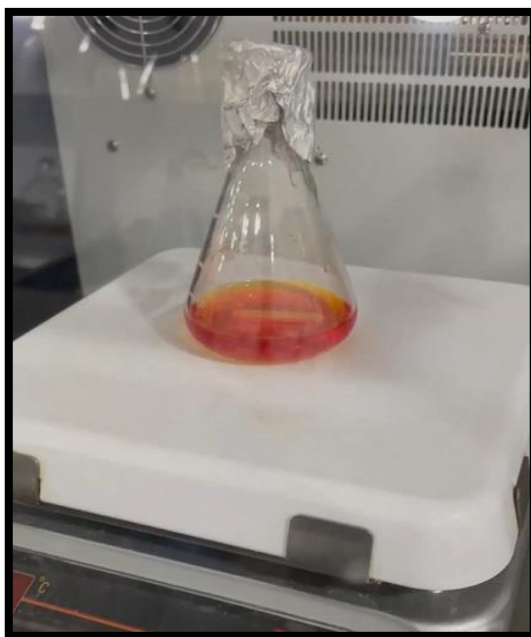


Figura 19. Matraz de fondo plano que contiene los huevos en BBSS, en agitación magnética continua a 37°C.

La suspensión de larvas eclosionadas se transfirió luego a un tubo de centrífuga y se lavó 3 veces en BBSS a 37 °C para eliminar los restos de huevos.

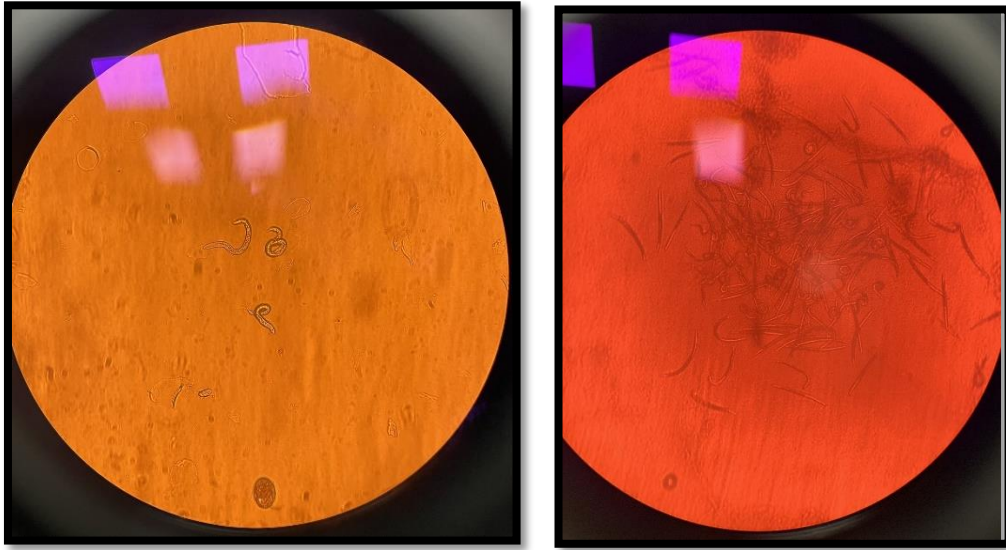


Figura 20. Larvas L3 eclosionadas visualizadas al microscopio.

La suspensión que contenía las larvas se puso en capas sobre una gasa de algodón (peso seco de 2,5 g) sumergida en BBSS en un embudo cubierto de 10 cm, y se mantuvo durante 16 horas a 37 °C en una incubadora. Este sistema permitió que las vivas bajaran a través del embudo y recogieran asépticamente en alícuotas de 5 mL, luego se lavaron 10 veces con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco estéril y tibia. La suspensión resultante contenía un alto porcentaje de larvas intactas y con movilidad.



Figura 21. Método (Baermann). Se muestra el embudo que contenía larvas L2 en incubación por 16 horas para recolectar las que fueron capaces de migrar a través de este.

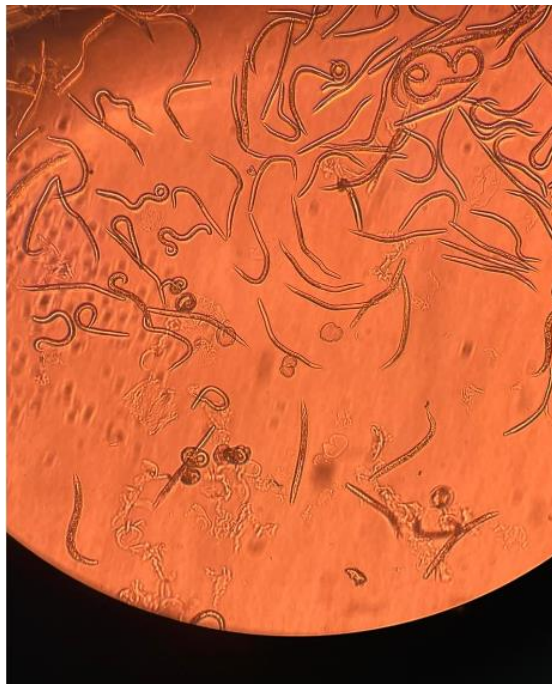
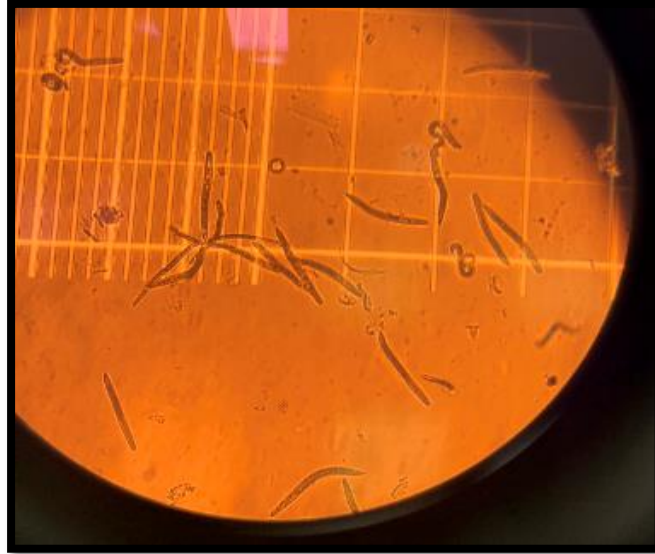


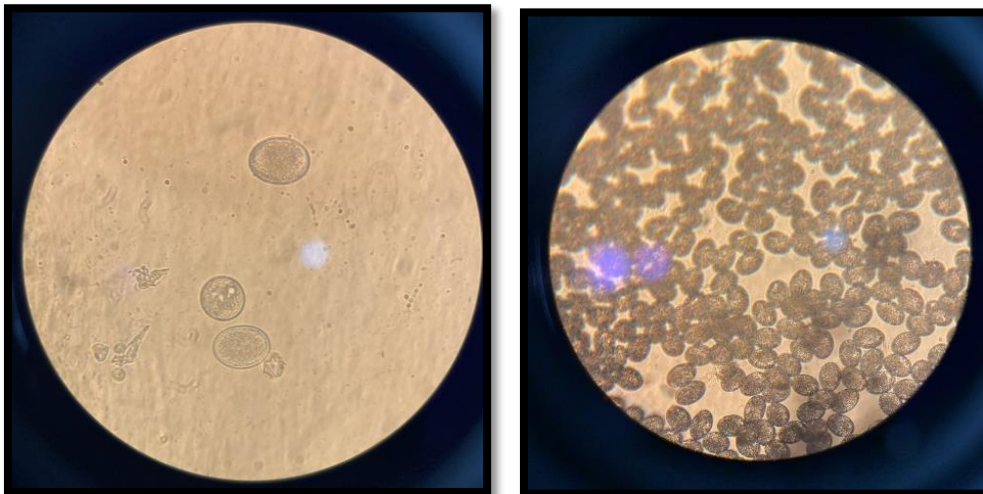
Figura 22 Larvas Eclacionadas vistas al microscopio invertido

Para la medición del tamaño de las larvas se usó la cámara de Neubauer. Estas midieron aproximadamente 0.25 mm.



Figuras 23. Visualización de larvas para aproximar el tamaño en cámara de neubauer.

Un mes después del primer experimento, se intentó replicar la incubación de huevos de *Ascaris suum* con gusanos que habían sido congeladas a -80°C , se siguieron los mismos pasos del protocolo, pero los huevos no completaron el desarrollo embrionario (huevos no fertilizados). Se observaron cómo se ve en la figura 24.



Figuras 24 Visualización de huevos no fertilizados al microscopio.

7.2 Aislamiento y purificación de eosinófilos

Como se mencionó en la metodología, se utilizó el estuche “*Eosinophil Isolation Kit human*” (Número de catálogo: 130-092-010, Miltenyi Biotec, Alemania) basado en perlas magnéticas (MACS®). Este aislamiento consistió en una selección negativa de los eosinófilos, marcando el resto de las células con un coctel de anticuerpos monoclonales (anti CD2, CD12, CD16, CD19, CD56, CD123 y CD235a) conjugados con biotina y posteriormente se pondrán en contacto con anticuerpos monoclonales anti-biotina que estaban conjugados con micro-perlas (2mL). Las células se colocaron la columna magnética de MACS, donde los no eosinófilos quedaron unidos a la columna magnética y la fracción enriquecida de eosinófilos fluyó a través de esta, como se observa en la figura 25.



Figura 25. Purificación de eosinófilos por perlas magnéticas.

De 60 mL de sangre recolectada de un paciente, se obtuvieron aproximadamente 145 millones de granulocitos. El análisis por citometría de flujo de la muestra antes de purificar indica que el porcentaje de eosinófilos era de 1% y la presencia de linfocitos T del 8% (Figura 26).

7.3 Identificación de eosinófilos purificados por citometría de flujo

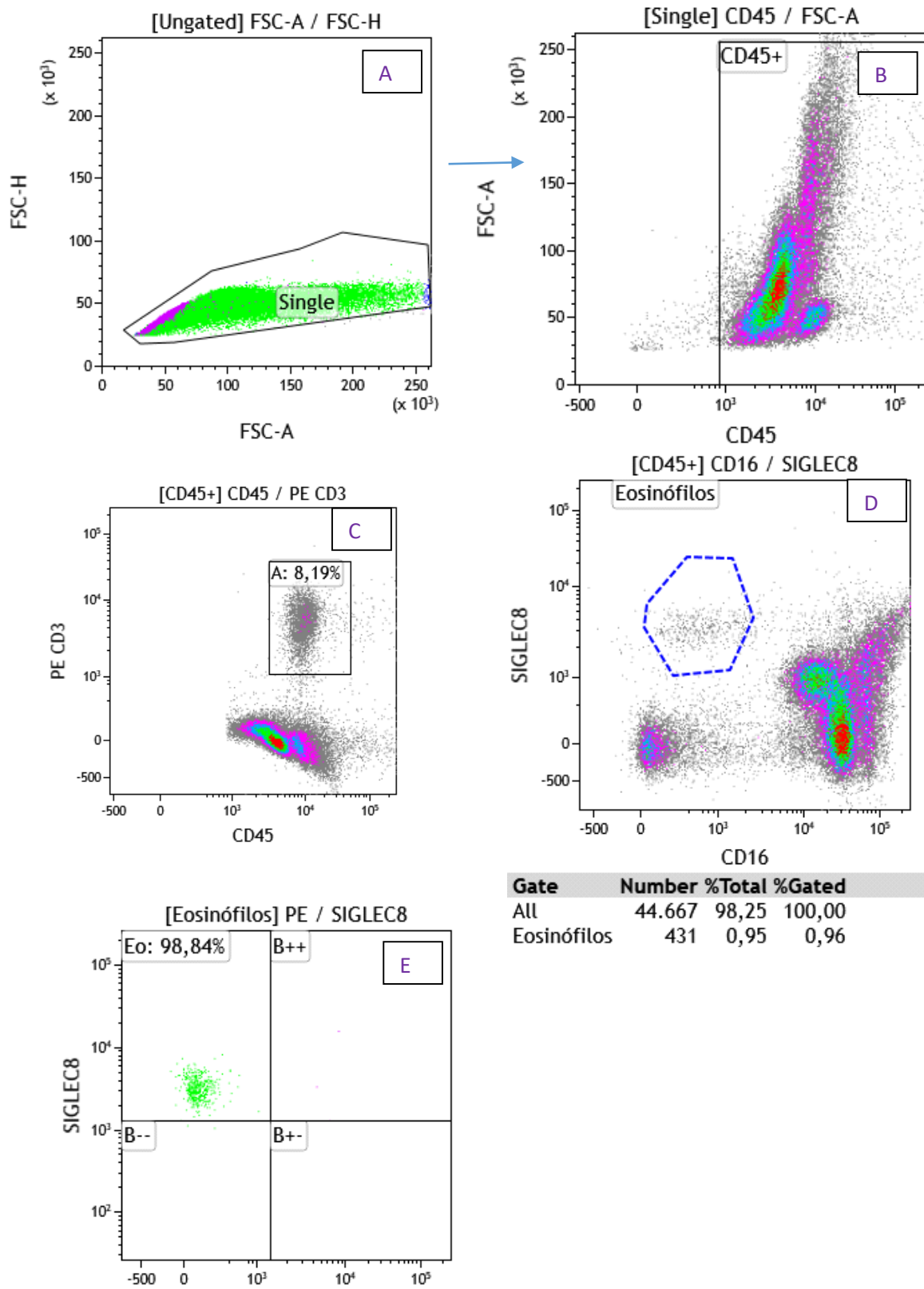


Figura 26 Identificación de eosinófilos purificados por citometría de flujo. (Antes de purificar)

Posterior a la separación magnética, la fracción no unida a la columna analizada contenía aproximadamente 3.5 millones de células. El análisis de esta fracción por citometría indicó que aproximadamente el 64% correspondían a células CD45+CD16+CD3-, compatible con el linaje de eosinófilo (Figura 27). Este porcentaje de pureza fue similar en 2 donadores y en diferentes experimentos realizados dentro del mismo donador.

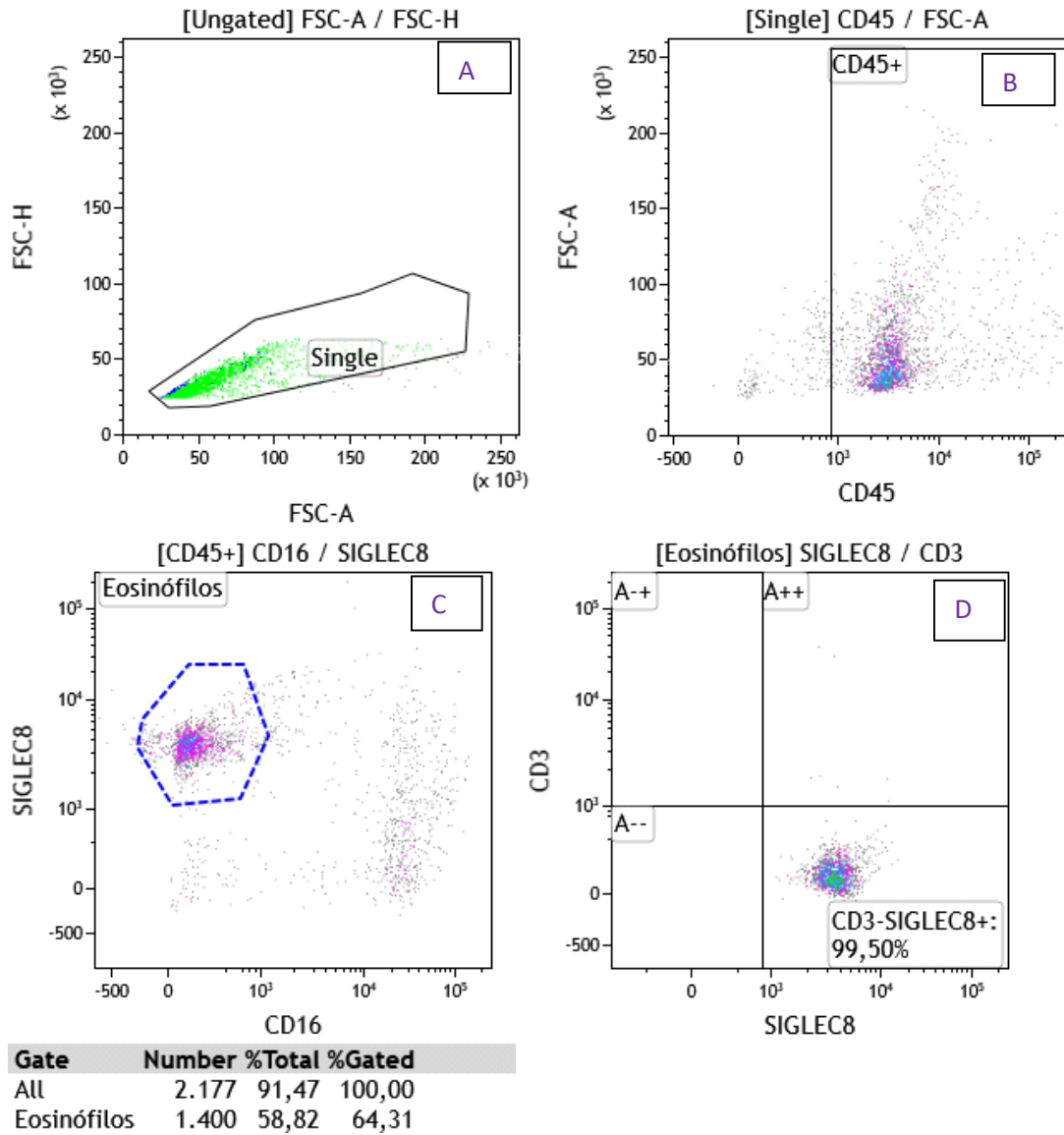


Figura 27 Identificación de eosinófilos purificados por citometría de flujo. Datos representativos de un paciente.

Una parte de la fracción purificada se analizó por microscopía óptica. Se observaron células con las características típicas de eosinófilo al teñirlos con Giemsa: núcleo bilobulado y citoplasma granular por microscopía óptica como se observa en la figura 28.

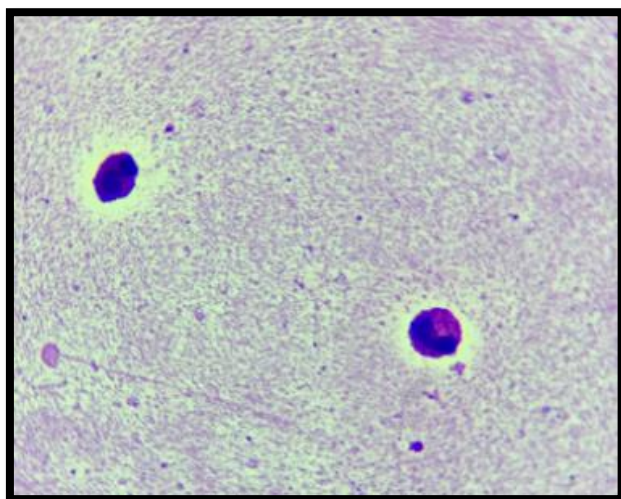


Figura 28 Identificación de eosinófilos por microscopio óptico. Tinción por Giemsa (100x).

7.4 Ensayo de caracterización de la actividad eosinófilica

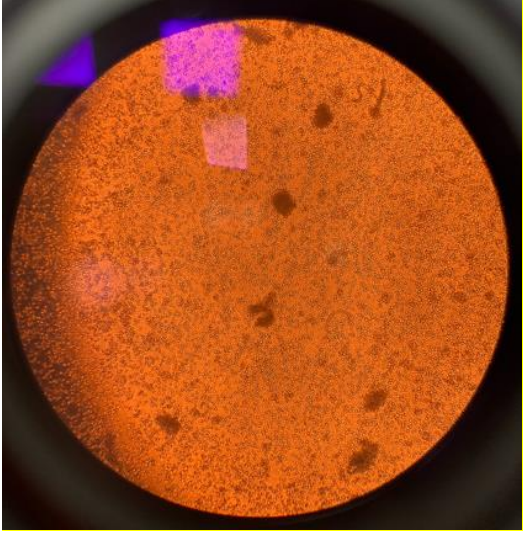
Para analizar la actividad de eosinófilos purificados frente a las larvas L3 previamente obtenidas en nuestro laboratorio se hicieron cultivos celulares en presencia de suero humano. Se realizaron dos “pools” de sueros, el pool (+) contenía 4 sueros con altos títulos de IgE (O.D. > 0.2) y el pool (-) dos sueros de O.D. negativa para estos antígenos. La Tabla 4 muestra los valores de OD medida por ensayo ELISA para IgE específica a ABA-1 y Ascaris.


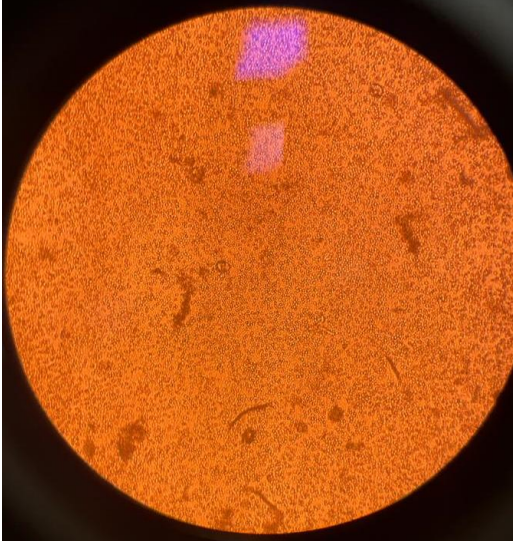
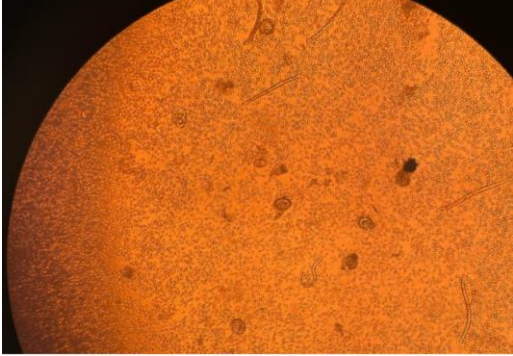
Tabla 2 Sueros escogidos con IgE positiva y negativa a ABA-1

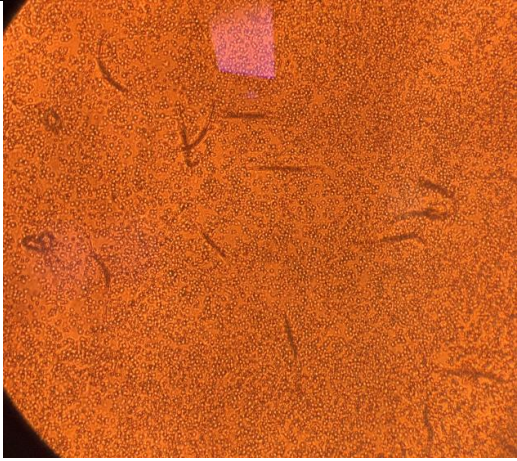
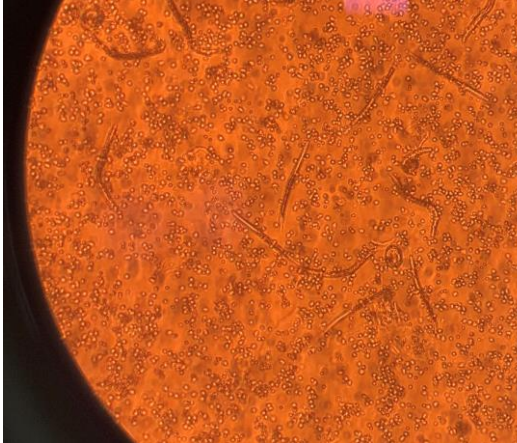
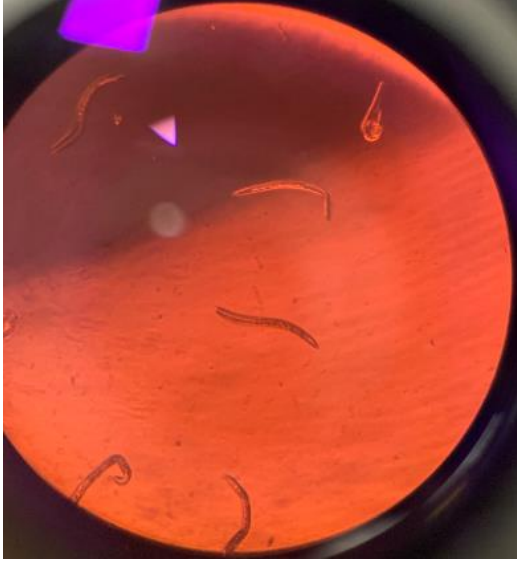
Sueros	Código	IgE ABA-1 (OD)	IgE Ascaris ((kU/L)
(+)	EPI 040	0,380	20,04
(+)	EPI 046	0,370	2,02
(+)	EPI 049	0,27	8,45
(+)	EPI 038	0,210	11,66
(-)	ST 472	0,10	0,30
(-)	ST 733	0,09	0,07

7.4.1 Visualización de adherencia e inmovilización de larvas por microscopía óptica después de 16 horas de incubación

Al visualizar las larvas, posterior a 16 horas de incubación, por microscopio de inversión, se observó una adherencia masiva de los eosinófilos sobre las larvas cuando se añadió el pool de suero con IgE positiva para ABA-1. Es imposible determinar el porcentaje de células que forman los grumos por la metodología de visualización directa, pero de forma cualitativa fue evidente que, en ausencia de suero, no hay agregación de los eosinófilos sobre la larva. Se observó que en la mayoría de las condiciones con presencia de eosinófilos y anticuerpos provenientes del pool (+) las larvas estaban inmóviles y estiradas (signo de muerte). El calentamiento del pool (+) redujo este patrón de grumos observado en el suero sin calentar y un mayor número de larvas enroscadas y móviles (signo de larvas con vitalidad). Sin embargo no fue posible determinar con certeza la muerte de las larvas ni de forma cualitativa ni cuantitativa (*ver resultados de ensayo MTT*).

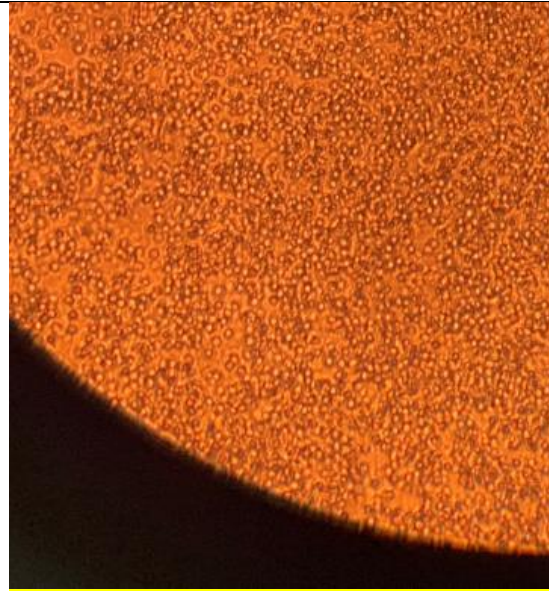
Eosinófilos purificados con diferentes estímulos	Imagen al microscopio
<p>Eosinófilos + Pool de sueros con IgE positiva a ABA-1</p> <p>Se observó la adherencia masiva de los eosinófilos a las paredes de las larvas, inmovilizándolas Completamente (Imagen 4X).</p>	

<p>Eosinófilos + Pool de sueros de sueros con IgE positiva a ABA-1 calentados a 58°C</p> <p>Se observó que hubo también adherencia de los eosinófilos, pero menor cantidad de estos rodeando el cuerpo de las larvas (Imagen 4X).</p>	
<p>Eosinófilos + Pool de sueros con IgE negativa a ABA-1</p> <p>Se observó adherencia de eosinófilos en poca cantidad al cuerpo de las larvas (Imagen 4X).</p>	
<p>Pool de sueros con IgE negativa a ABA-1 calentados a 58°C</p> <p>Se observó mínima adherencia de eosinófilos al cuerpo de las larvas (Imagen 4X).</p>	

<p>CONTROL NEGATIVO (RPMI)</p> <p>Aquí se muestra la mezcla de eosinófilos y larvas sin suero agregado. No hubo adherencia de eosinófilos al cuerpo de las larvas (Imagen 4X).</p>	
<p>CONTROL POSITIVO (IL-5) 5 ng/mL</p> <p>No hubo adherencia de eosinófilos al cuerpo de las larvas (Imagen 4X).</p>	
<p>LARVAS SOLAS</p> <p>Se observaban larvas libres y móviles (Imagen 10X)</p>	

EOSINOFILOS SOLOS

Imagen control (Imagen 4X).



7.4.2 Ensayo MTT para analizar de viabilidad de las larvas en estadio L3 al cultivarlas con eosinófilos purificados

Basados en los experimentos anteriores de visualización, nos propusimos evaluar la viabilidad de las larvas de acuerdo con la positividad IgE ABA-1 del suero empleado, para esto repetimos los cultivos de eosinófilos con larvas, pero esta vez empleado sueros individuales. Se adicionó un tercer suero (-) que corresponde a una muestra de un individuo alemán como control no expuesto además de ser IgE- para Ascaris y ABA-1. También se empleó como control (+) la IL-5 a 5 ng/mL.

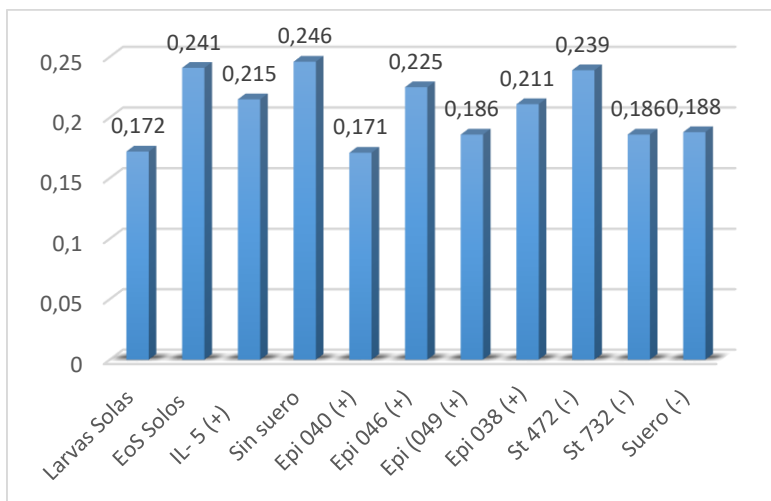


Figura 29 Ensayo de viabilidad de larvas. Se muestra la OD de las diferentes muestras

Los valores de O.D. obtenidos en cada una de las muestras del experimento fueron similares entre sí sin diferencias estadísticas entre las OD de los sueros + o – ($p > 0.05$). Este experimento no arrojó datos consistentes que permitieran establecer la viabilidad de las larvas al incubarlas con eosinófilos purificados en presencia de anticuerpos IgE específicos al antígeno ABA-1.

7.4.3 Determinación del producto de degranulación (peroxidasa del eosinófilo - EPO) medido por ensayo ELISA

Se evaluó la degranulación de los eosinófilos midiendo los niveles de la proteína peroxidasa del eosinófilo (EPO). En la incubación de eosinófilos purificados con larvas de *Ascaris suum* en estadio L3, sueros IgE positiva a ABA -1 (y extracto de *Ascaris*) se evidenció un aumento significativo de los niveles de la EPO en comparación con las demás condiciones experimentales descritas en la Figura 30 ($p < 0.01$).

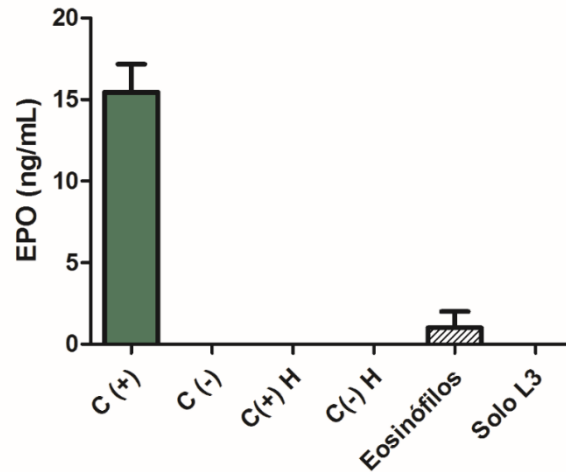


Figura 30. Niveles de EPO en las distintas condiciones del experimento. C (+): Pool de sueros positivos, C (-): Pool de sueros negativos, C (+) H: Pool de sueros positivos calentados a 58°C. C (-) H: Pool de sueros negativos calentados a 58°C, Eosinófilos: corresponde a eosinófilos solos, Solo L3: Larvas solas. Todas las muestras se leyeron por duplicado

Para evaluar si el producto ABA-1 inducía directamente la producción de EPO en eosinófilos expuestos, se incubaron a dosis distintas de esta proteína los eosinófilos en presencia o no de suero. Como se observa en la Figura 31, hubo aumento gradual de los niveles de EPO a medida que se aumentaban las dosis de ABA-1 (1 μ M, 0.1 μ M y 0.01 μ M) en presencia del pool de sueros positivos, mientras que los niveles fueron indetectables o muy bajos en presencia del pool negativo o la condición control sin adición de sueros.

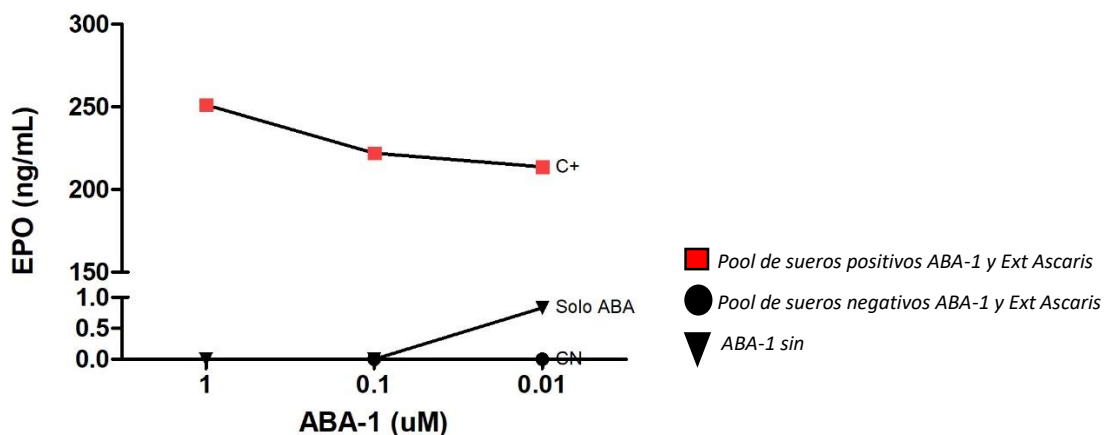
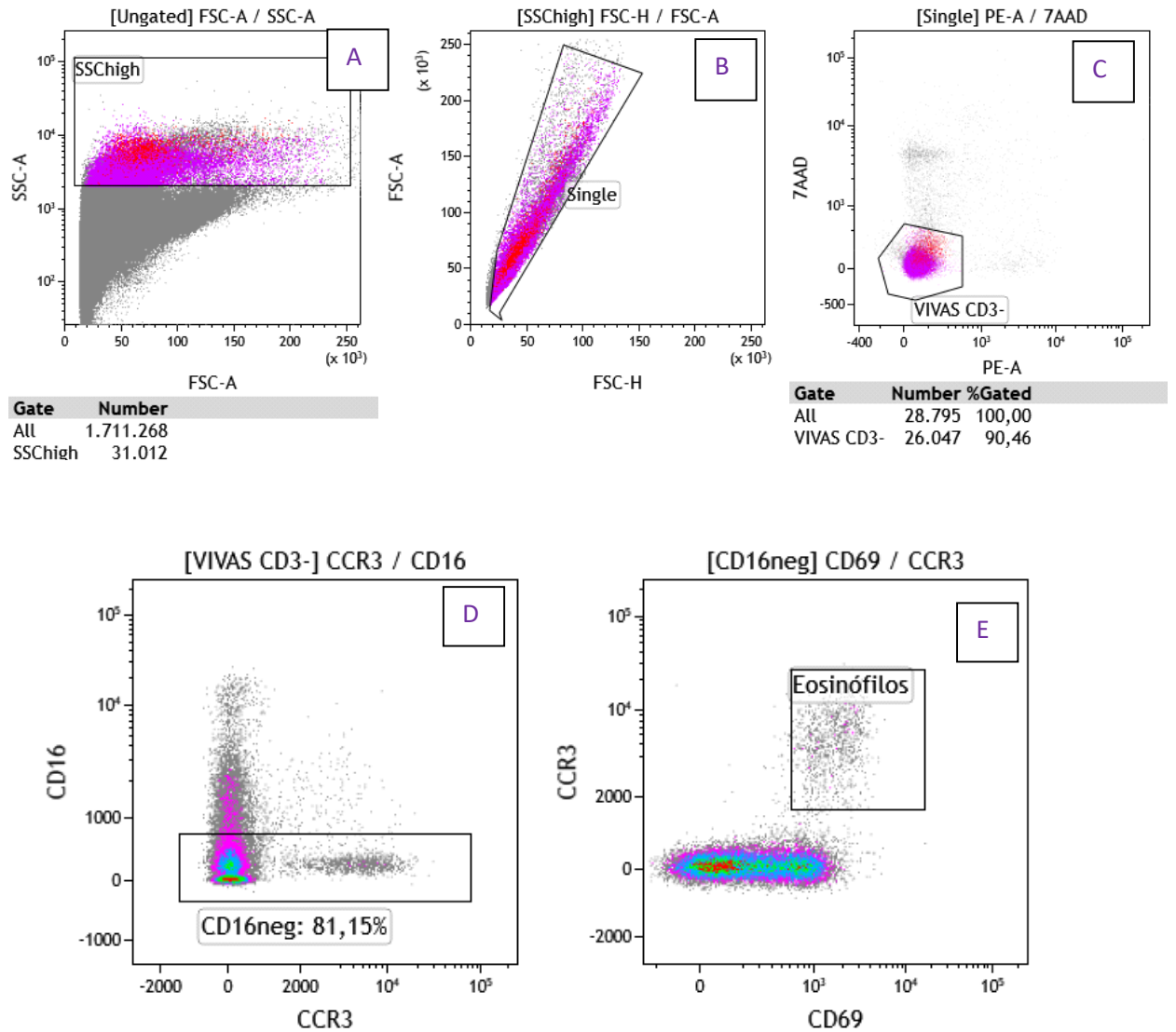


Figura 31 Niveles de EPO con la proteína ABA-1 a diferentes concentraciones. Cuadrados rojos corresponden a C+: pool de sueros positivos + ABA-1, CN: Pool de sueros negativos (círculos negros). Solo ABA: ABA-1 sin suero (triángulos negros)

7.5 Ensayos de identificación marcadores de actividad eosinofílica por citometría de flujo

El *gating* para la identificación de eosinófilos activados por citometría de flujo se muestra en la gráfica 32. Dentro de las células CD16 (-) CCR3 (+), se midió la intensidad de fluorescencia media (IFM) de CD69.



Gráfica 32 **Gating para la identificación de eosinófilos activados.** Esta estrategia de selección parte de sangre total en donde se seleccionan (A) las células SSC^{hi} , se eliminan las dupletas (B) y se seleccionan las células vivas (7AAD-) y CD3- (C). Posteriormente se identifican las células CD16- CCR3+ (D y E) para medir en esta población la intensidad media de fluorescencia del marcador CD69.

La figura 33 muestra los resultados de la expresión de CD69 en ausencia y presencia de ABA-1- 1 uM. En la gráfica 33A se observa que en los sueros positivos a ABA-1 se aumenta la expresión de CD69 con diferencias significativas con respecto al control no estimulado, aumentando en promedio un 63% la expresión del marcador ($p=0,02$). En la gráfica 33B se observa que en los sueros negativos también hay aumento en 3 de 4 pacientes, con un promedio de 41% de alza, pero esta diferencia no fue significativa con respecto al control negativo ($p=0,08$). En la gráfica C se detalla el índice de estimulación de los eosinófilos, haciendo un análisis similar a la prueba de activación de basófilos, sin encontrar diferencias en los índices entre los grupos comparados (1.6 en ABA-1 IgE (+) versus 1.42 en ABA-1 IgE (-) $p = 0.5$).

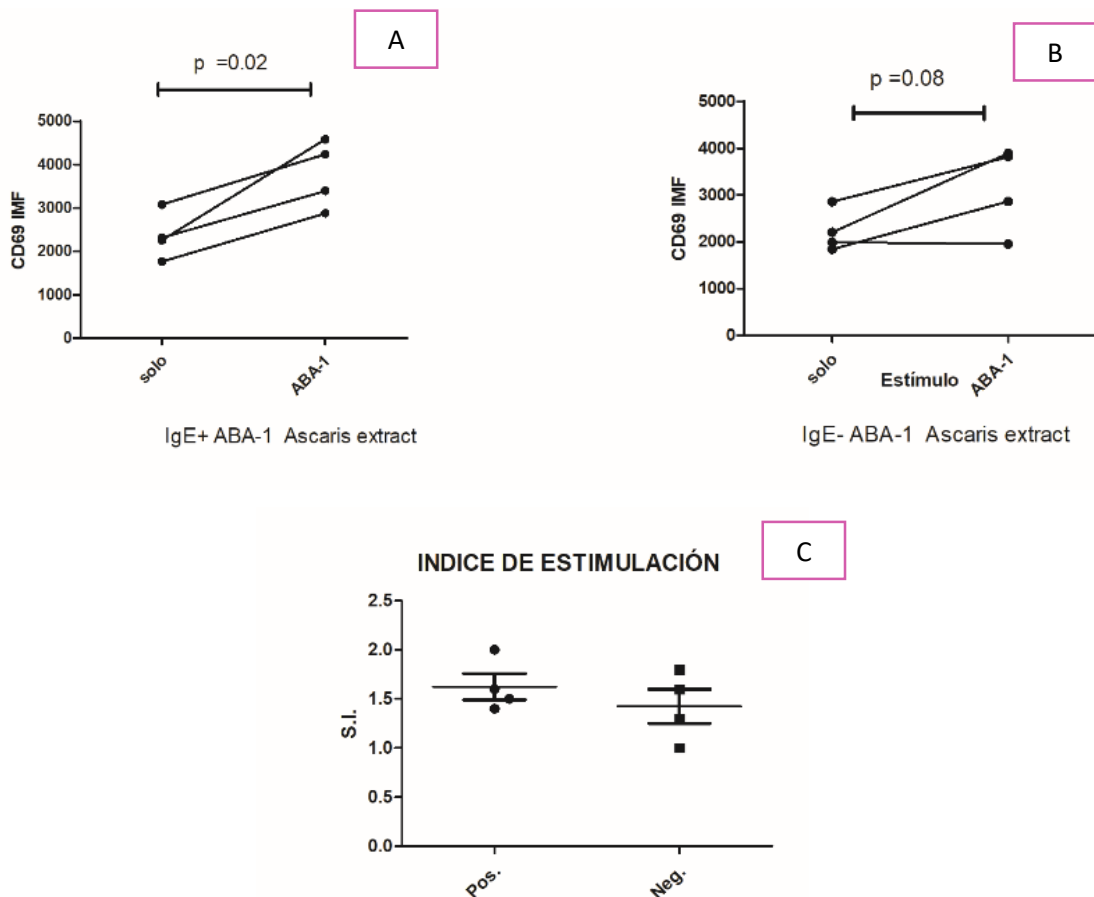


Figura 33 Resultados de expresion de activacion de CD69 a traves de la intensidad de fluorescencia media.

8. Discusión

El estudio de los eosinófilos como célula granulocítica crítica en el desarrollo de la inmunidad de tipo 2 frente a enfermedades como parasitosis intestinal y asma alérgica, es fundamental para profundizar los mecanismos inmunológicos y entender mejor cómo se comportan estas células en los procesos de salud y enfermedad. Este trabajo de tesis se realizaron experimentos destinados a la evaluación de técnicas que permitan el estudio de la respuesta de eosinófilos humanos frente a *Ascaris spp.* Dentro de las técnicas analizadas se encuentra: la de purificación de eosinófilos humanos a partir de sangre periférica mediante un método magnético, la incubación de huevos de *A. suum* para conseguir estadio L3 y estudiar la actividad larvicida *in vitro* de los eosinófilos purificados frente a *Áscaris spp* y sus antígenos representativos, con el fin generar herramientas de trabajo en el Instituto de Investigaciones Inmunológicas que permitan entender la relación inmunológica de los eosinófilos y las helmintiasis, y de esta manera contribuir a generar nuevo conocimiento de posibles tratamientos y mejorar el impacto económico de estas enfermedades de importancia en salud pública a nivel mundial.

Consideramos que el aporte más importante de esta tesis es que se logró estandarizar la técnica de Incubación de huevos de *Ascaris suum* para conseguir el estado larvario L3 [73], al obtener de úteros grávidos por disección de hembras de *Ascaris suum* en las primeras 24 horas de recolección. Estas larvas en estadio L3 fueron abundantes y móviles y se mantuvieron intactas incluso después de 8 días en cultivo en condiciones sencillas. Adicionalmente, se guardaron sobrenadantes de los medios de cultivo para evaluar el contenido de los productos de excreción/secreción (E/S), los cuales son de bastante interés en este campo de estudio por contener moléculas inmunomoduladoras.

Para medir la viabilidad de las larvas se tomó como referencia el ensayo hecho por Masure *et al* (2013) [7], basado en el protocolo de Catherine E. James *et al* (2007) [75]. Este consistió en un ensayo colorimétrico de MTT formazán o bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolio-formazán, el cual utiliza la actividad metabólica del nematodo como marcador de viabilidad. Las larvas metabólicamente activas pudieron absorber y reducir el tinte MTT para producir

formazán que es detectado por espectrofotometría, mientras que los gusanos muertos no lo hacen [75]. A diferencia del referente del estudio de Masure *et al* (2013), el cual demostró que la combinación de eosinófilos circulantes purificados del huésped natural (cerdo) y suero de animales inmunizados, fue eficaz para matar las larvas L3, nuestro experimento no arrojó datos consistentes que permitieran establecer la viabilidad de las larvas L3 al incubarlas con eosinófilos purificados y sueros de pacientes con IgE positiva al antígeno ABA-1 de *Ascaris spp*. Consideramos que el hecho de que las larvas incubadas con suero IgE (+) estuvieran rodeadas por un gran número de eosinófilos pudo opacar el fenómeno de muerte celular dada la actividad metabólica aportada por el gran número de eosinófilos adheridos. Otra opción es que la inmovilización de las larvas no sea suficiente para su destrucción y, por lo tanto, esto no se reflejó en la medición hecha con MTT. Cabe recordar que este experimento fue realizado con *Ascaris suum* que infecta principalmente a cerdos, a pesar de la similitud extremadamente alta entre estos dos parásitos a nivel molecular (identidad de genomas del 98,1%) [10] y la demostración experimental que existe transmisión cruzada en ambas especies [11, 12]. Otro punto a considerar es que este experimento depende de algunas variables como la integridad de la membrana de la cutícula que permitiría la difusión del MTT, porque el colorante no es capaz de penetrar las membranas celulares no comprometidas y también, la cantidad de larvas en la muestra (cada gusano necesita ser escaneado en busca de tinte de fluorescencia que debe estar distribuido por todo el cuerpo). Se hizo este ensayo como experimento único dado que no había suficientes larvas para duplicar el experimento, a futuro se necesita repetir este experimento para analizar las condiciones del medio donde se incubaron las larvas y probar con *Ascaris lumbricoides*.

Aunque no pudimos estandarizar o aplicar una técnica confiable que nos permitiera determinar la viabilidad de las larvas, la observación directa de larvas por microscopía óptica sugirió que el patrón de grumos de eosinófilos era más evidente en presencia de sueros con IgE (+) a ABA-1 y *Ascaris*, pero se reducía si el suero se calentaba. Adicionalmente, el ensayo de medición de EPO también indica que el eosinófilo liberaba la enzima en concentraciones detectables solamente en presencia de suero IgE (+) a ABA-1 y sin calentar.

De acuerdo con estos hallazgos, se justifica estudiar el papel del complemento en la activación del eosinófilo, así como su actividad larvicida. En el estudio de Masure *et al* (2013) se infiere que la disminución de la actividad larvicida de los eosinófilos porcinos se debe al complemento a partir de los hallazgos observados con el calentamiento del suero. No obstante, tampoco se evalúa directamente si la actividad del complemento llega a ser larvicida. Hay antecedentes en estudios realizados en cobayos en los cuales los animales deficientes de complemento tenían mayor daño tisular por la presencia de larvas L3 migrantes a pulmón. Otro estudio realizado en ratones compara el proteoma de dos cepas distintas infectadas con *A. suum* y encuentra que la cepa de ratones susceptible a la infección sobre-expresa proteínas inhibitoras del complemento mientras que la resistente, proteínas asociadas a la activación de la vía de las lectinas [76].

Se ha evidenciado que la actividad del complemento no ha sido suficiente para la destrucción de larvas de otras especies de nemátodos. En estudios en ratones que carecían de vías clásicas (deficientes en C1q) y alternativas (deficientes en factor B) o de todas las vías de activación del complemento (deficientes en C3) en donde se evaluaba el papel del complemento en la inmunidad al nematodo *Nippostrongylus brasiliensis*, con el fin de determinar si se requiere complemento para la fuerte resistencia dependiente de eosinófilos a este parásito, se encontró que los eosinófilos pueden limitar la infección de manera independiente del complemento [77]. En el caso de la filaria *Loa loa*, se ha demostrado en humanos que a pesar de que hay adherencia de C3 a la cutícula de la larva circulante, hay bloqueo de productos posteriores que llevan a la formación del complejo de ataque de membrana. También se observó en este estudio adherencia de eosinófilos probablemente por los productos quimioatrayentes intermedios, pero esto no culminó en la destrucción del parásito [78]. En este sentido, de acuerdo a nuestros resultados, los cambios en la adherencia de eosinófilos sobre las larvas al calentamiento agregan más interrogantes sobre las vías biológicas que deben estudiarse en el humano para conocer si el eosinófilo tiene actividad larvicida y cómo se sustenta inmunológicamente la misma.

Ha sido fundamental en los últimos años purificar los eosinófilos humanos de sangre periférica *in vitro*, dado que los datos de eosinófilos en ratones han sido

inconsistentes para investigar los mecanismos subyacentes de reclutamiento, supervivencia, migración, degranulación y otras funciones efectoras en las parasitosis y enfermedades alérgicas[5]. En general, la principal desventaja de purificar eosinófilos está dada porque estos granulocitos constituyen una fracción diminuta de la reserva total de leucocitos. Desafortunadamente, el nivel de pureza obtenido no fue lo esperado para lo publicado para este estuche (>90%)[79]. Es posible que esto se deba al tamaño de la columna empleada (LS #130-042-401, Miltenyi Biotech, Alemania) dado que nosotros ajustamos el método a números grandes de células, las cuales, aunque estaban dentro de los límites sugeridos por el fabricante puede que no coincidan con los empleados para definir pureza. Por lo tanto, se necesitan técnicas mejoradas con recuperaciones más eficientes y la obtención de células sensibles intactas, que permitan obtener un número adecuado de eosinófilos de donantes sanos y enfermos para ensayos funcionales posteriores. Actualmente, varios métodos están disponibles comercialmente y se usan de manera rutinaria en diferentes laboratorios a nivel mundial, el primero de selección negativa es el “*CD16 MicroBeads, human*” (130-045-701, Miltenyi Biotec), el segundo método también de selección negativa es el “*Eosinophil Isolation Kit human*” (130-092-010, Miltenyi Biotech), el tercer método también de selección negativa es el “*EasySep (19,256, STEMCELL Technologies INC)*” y finalmente, el “*MACSxpress isolation kit (130-104-446, Miltenyi Biotec)*”, lanzado como una evolución del segundo método.) Sin embargo, quisimos seguir analizando la eficiencia de este kit y encontramos que Kiho Son *et al* (2017) realizaron un estudio comparativo de diversos los metodos para purificar eosinofilos y demostraron con respecto a la pureza de eosinófilos, que el método más eficiente de aislamiento de eosinófilos es el MACSxpress, el cual produjo poblaciones más puras (95%) en comparación con los métodos basados en columnas magnéticas (73,1%) [72]. Según este estudio, si se compara MACSxpress con el usado en este trabajo de tesis, la eficiencia de rendimiento de eosinófilos de sangre total se mejora en aproximadamente en un 75% (P = 0,002) [72]. En general, el estudio demuestra que el método MACSxpress permitió consistentemente mayores rendimientos por mL de sangre periférica en comparación con los métodos convencionales (P <0.001), con altas purezas de aislamiento para eosinófilos (95%). Adicionalmente, con respecto a la duración del protocolo y el costo del

aislamiento de eosinófilos, el MACSxpress es más económico, utiliza menos sangre por muestra y es mucho más eficiente en comparación con los métodos estándar basados en columnas, como el usado en este trabajo de tesis. La razón probable por la que probablemente los eosinófilos purificados mediante varios métodos muestran variabilidad en la pureza y en sus perfiles de activación, con una tendencia a que las células se vuelvan refractarias a la estimulación, puede estar dada por la sedimentación de sangre completa (con dextrano, Lymphoprep o histopaque), en caso de demorar un período demasiado largo (30 min), la lisis de glóbulos rojos y todos los pasos de centrifugación requeridos (manipulación mecánica excesiva) pueden ser dañinos para las células [72].

Los estudios con larvas ofrecen respuestas a interrogantes relacionados con la infección natural y son necesarios para obtener conclusiones sobre el papel de los eosinófilos en la inmunidad celular. No obstante, hay otras preguntas por resolver que se relacionan con la actividad eosinofílica inducida por productos de E/S del parásito. Teniendo en cuenta que ABA-1 es uno de los principales productos de E/S de *Ascaris* en términos de abundancia, nos preguntamos si este antígeno/alergeno puede provocar la activación del eosinófilo a través de un ensayo de medición de EPO en sobrenadantes de cultivos y otro basado en la medición del marcador CD69 mediante citometría de flujo. Al incubar eosinófilos con ABA-1 se observó que a medida que se aumentaban las dosis del recombinante rABA-1 (1 μM , 0.1 μM y 0.01 μM) se liberaba más EPO y que esto se presentaba en presencia de suero con títulos detectables de anticuerpos contra esta proteína. Ni la proteína sola, ni la presencia de suero sin anticuerpos IgE indujeron niveles de EPO detectables con el estuche.

También, el desarrollo de un método de medición de activación de eosinófilos mediante el marcador CD69 con una muestra de sangre total, abre la posibilidad de estudiar con mayor profundidad el papel de la respuesta a ABA-1 en la activación del eosinófilo. Matsumoto *et al* (1998) identificó a CD69 como un marcador de activación sobre-expresado en pacientes infectados con parásitos [69]. En las muestras analizadas en esta tesis, las cuales se agruparon de acuerdo con sus niveles de IgE a ABA-1 y *Ascaris*, observamos un nivel significativamente mayor de expresión del marcador CD69 en los que tenían IgE, pero también este comportamiento se observó en sueros de sujetos sin IgE a

ABA-1. Se debe aumentar el tamaño de la muestra para estimar con mayor precisión si hay diferencias en la expresión de CD69 en presencia de ABA-1.

9. Conclusiones

- Se ha estandarizado un método eficiente para la generación *in vitro* de larvas L3 de *Ascaris suum*, lo cual es un logro importante en nuestro laboratorio para impulsar los estudios de inmunoparasitología aplicados a esta especie.
- Se recomienda emplear otro estuche de purificación de eosinófilos que ofrezcan mayor grado de pureza y rendimiento, en especial, especialmente si se emplearan para posteriores aplicaciones tales como estudios de expresión génica.
- Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que el complemento tiene participación en la actividad larvicida de los eosinófilos humanos, razón por la cual, se debe estudiar de manera más directa la activación de este sistema a través de sus diferentes vías.
- La prueba de activación de eosinófilos basada en CD69 es una técnica prometedora para el estudio de la respuesta a alérgenos derivados de *Ascaris spp.*

10. Referencias

1. Pullan, R.L., et al., *Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010*. Parasites & vectors, 2014. **7**(1): p. 37.
2. Brooker, S., *Estimating the global distribution and disease burden of intestinal nematode infections: adding up the numbers—a review*. International journal for parasitology, 2010. **40**(10): p. 1137-1144.
3. Agudelo-Lopez, S., et al., *Prevalence of intestinal parasitism and associated factors in a village on the Colombian Atlantic Coast*. Revista de Salud Publica, 2008. **10**(4): p. 633-642.
4. Moreau, E. and A. Chauvin, *Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections*. BioMed Research International, 2010. **2010**.
5. Klion, A.D. and T.B. Nutman, *The role of eosinophils in host defense against helminth parasites*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2004. **113**(1): p. 30-37.
6. Glauert, A.M., et al., *The mechanism of antibody-dependent, eosinophil-mediated damage to schistosomula of Schistosoma mansoni in vitro: a study by phase-contrast and electron microscopy*. Journal of cell science, 1978. **34**(1): p. 173-192.
7. Masure, D., et al., *A role for eosinophils in the intestinal immunity against infective Ascaris suum larvae*. PLoS neglected tropical diseases, 2013. **7**(3): p. e2138.
8. Zhu, X., et al., *Characterisation of Ascaris from human and pig hosts by nuclear ribosomal DNA sequences*. International journal for parasitology, 1999. **29**(3): p. 469-478.
9. Anderson, T., M. Romero-Abal, and J. Jaenike, *Genetic structure and epidemiology of Ascaris populations: patterns of host affiliation in Guatemala*. Parasitology, 1993. **107**(3): p. 319-334.
10. Liu, G.-H., et al., *Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of Ascaris lumbricoides and Ascaris suum from humans and pigs*. Gene, 2012. **492**(1): p. 110-116.
11. Dold, C. and C.V. Holland, *Ascaris and ascariasis*. Microbes and infection, 2011. **13**(7): p. 632-637.
12. Takata, I., *Experimental infection of man with Ascaris of man and the pig*. Kitasato Archives of Experimental Medicine, 1951. **23**(4): p. 49-59.
13. Jardim-Botelho, A., et al., *Hookworm, Ascaris lumbricoides infection and polyparasitism associated with poor cognitive performance in Brazilian schoolchildren*. Tropical Medicine & International Health, 2008. **13**(8): p. 994-1004.
14. Holland, C., *Predisposition to ascariasis: patterns, mechanisms and implications*. Parasitology, 2009. **136**(12): p. 1537-1547.
15. Williams-Blangero, S., et al., *Genetic analysis of susceptibility to infection with Ascaris lumbricoides*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 1999. **60**(6): p. 921-926.
16. Wright, J.E., et al., *Current epidemiological evidence for predisposition to high or low intensity human helminth infection: a systematic review*. Parasites & vectors, 2018. **11**(1): p. 1-12.
17. Baba, A.A., S.M. Ahmad, and K.A. Sheikh, *Intestinal ascariasis: the commonest cause of bowel obstruction in children at a tertiary care center in Kashmir*. Pediatric surgery international, 2009. **25**(12): p. 1099.
18. Katakam, K.K., *Ecology and viability of eggs of the pig round worm (Ascaris suum)—on-farm and laboratory studies*. 2014, University of Copenhagen.

19. Soller, J.A., et al., *Risk-based approach to evaluate the public health benefit of additional wastewater treatment*. Environmental science & technology, 2003. **37**(9): p. 1882-1891.
20. Wharton, D., *The production and functional morphology of helminth egg-shells*. Parasitology, 1983. **86**(4): p. 85-97.
21. Seamster, A.P., *Developmental studies concerning the eggs of Ascaris lumbricoides var. suum*. The American Midland Naturalist, 1950. **43**(2): p. 450-470.
22. Cruz, L.M., et al., *Morphological changes of Ascaris spp. eggs during their development outside the host*. Journal of Parasitology, 2012. **98**(1): p. 63-68.
23. Fagerholm, H.-P., et al., *Differentiation of cuticular structures during the growth of the third-stage larva of Ascaris suum (Nematoda, Ascaridoidea) after emerging from the egg*. Journal of Parasitology, 2000. **86**(3): p. 421-427.
24. Maizels, R.M., et al., *Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections*. Journal of Experimental Medicine, 2009. **206**(10): p. 2059-2066.
25. Johnston, L.K. and P.J. Bryce, *Understanding interleukin 33 and its roles in eosinophil development*. Frontiers in medicine, 2017. **4**: p. 51.
26. Cherry, W.B., et al., *A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils*. Journal of allergy and clinical immunology, 2008. **121**(6): p. 1484-1490.
27. Cortés, A., et al., *Th2 and Th1 responses: clear and hidden sides of immunity against intestinal helminths*. Trends in parasitology, 2017. **33**(9): p. 678-693.
28. Gazzinelli-Guimaraes, P.H. and T.B. Nutman, *Helminth parasites and immune regulation*. F1000Research, 2018. **7**.
29. Gazzinelli-Guimarães, P.H., et al., *Parasitological and immunological aspects of early Ascaris spp. infection in mice*. International journal for parasitology, 2013. **43**(9): p. 697-706.
30. Nogueira, D.S., et al., *Multiple exposures to Ascaris suum induce tissue injury and mixed Th2/Th17 immune response in mice*. PLoS neglected tropical diseases, 2016. **10**(1): p. e0004382.
31. Paterson, J.C., et al., *Modulation of a heterologous immune response by the products of Ascaris suum*. Infection and immunity, 2002. **70**(11): p. 6058-6067.
32. Caraballo, L. and N. Acevedo, *New allergens of relevance in tropical regions: the impact of Ascaris lumbricoides infections*. World Allergy Organization Journal, 2011. **4**(5): p. 77-84.
33. Caraballo, L., N. Acevedo, and J. Zakzuk, *Ascariasis as a model to study the helminth/allergy relationships*. Parasite immunology, 2019. **41**(6): p. e12595.
34. Ahumada, V., et al., *Identification and Physicochemical Characterization of a New Allergen from Ascaris lumbricoides*. International journal of molecular sciences, 2020. **21**(24): p. 9761.
35. Acevedo, N., et al., *IgE cross-reactivity between Ascaris and domestic mite allergens: the role of tropomyosin and the nematode polyprotein ABA-1*. Allergy, 2009. **64**(11): p. 1635-1643.
36. Kennedy, M. and F. Qureshi, *Stage-specific secreted antigens of the parasitic larval stages of the nematode Ascaris*. Immunology, 1986. **58**(3): p. 515.
37. Xia, Y., et al., *The ABA-1 allergen of Ascaris lumbricoides: sequence polymorphism, stage and tissue-specific expression, lipid binding function, and protein biophysical properties*. Parasitology, 2000. **120**(2): p. 211-224.
38. Sastre, B., et al., *Eosinophils: Old Players in a New Game*. J Investig Allergol Clin Immunol, 2018. **28**(5): p. 289-304.
39. Walsh, G.M., et al., *Ligation of CD69 induces apoptosis and cell death in human eosinophils cultured with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. Blood, 1996. **87**(7): p. 2815-2821.

40. Klion, A., *Recent advances in understanding eosinophil biology*. F1000Research, 2017. **6**.
41. Van Leeuwen, B., et al., *Molecular organization of the cytokine gene cluster, involving the human IL-3, IL-4, IL-5, and GM-CSF genes, on human chromosome 5*. *Blood*, 1989. **73**(5): p. 1142-1148.
42. McBrien, C.N. and A. Menzies-Gow, *The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma*. *Frontiers in Medicine*, 2017. **4**(93).
43. McBrien, C.N. and A. Menzies-Gow, *The biology of eosinophils and their role in asthma*. *Frontiers in medicine*, 2017. **4**: p. 93.
44. Muniz, V.S., P.F. Weller, and J.S. Neves, *Eosinophil crystalloid granules: structure, function, and beyond*. *Journal of leukocyte biology*, 2012. **92**(2): p. 281-288.
45. Acharya, K.R. and S.J. Ackerman, *Eosinophil granule proteins: form and function*. *Journal of Biological Chemistry*, 2014. **289**(25): p. 17406-17415.
46. Lieschke, G.J., et al., *Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish*. *Blood*, 2001. **98**(10): p. 3087-3096.
47. Stacy, N.I. and R.E. Raskin, *Reptilian Eosinophils: Beauty and Diversity by Light Microscopy*. *Veterinary clinical pathology*, 2015. **44**(2): p. 177.
48. Uhm, T.G., B.S. Kim, and I.Y. Chung, *Eosinophil development, regulation of eosinophil-specific genes, and role of eosinophils in the pathogenesis of asthma*. *Allergy, asthma & immunology research*, 2012. **4**(2): p. 68-79.
49. Rosenberg, H.F., S. Phipps, and P.S. Foster, *Eosinophil trafficking in allergy and asthma*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2007. **119**(6): p. 1303-1310.
50. Choi, Y., et al., *Eosinophil extracellular traps activate type 2 innate lymphoid cells through stimulating airway epithelium in severe asthma*. *Allergy*, 2019.
51. Varricchi, G., et al., *Interleukin-5 pathway inhibition in the treatment of eosinophilic respiratory disorders: evidence and unmet needs*. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 2016. **16**(2): p. 186.
52. Hogan, S.P., et al., *Eosinophils: biological properties and role in health and disease*. *Clinical & Experimental Allergy*, 2008. **38**(5): p. 709-750.
53. Melo, R.C., et al., *Eosinophil-derived cytokines in health and disease: unraveling novel mechanisms of selective secretion*. *Allergy*, 2013. **68**(3): p. 274-284.
54. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and molecular immunology E-book*. 2014: Elsevier Health Sciences.
55. Rådinger, M. and J. Lötvall, *Eosinophil progenitors in allergy and asthma—Do they matter?* *Pharmacology & therapeutics*, 2009. **121**(2): p. 174-184.
56. Carlens, J., et al., *Common γ -chain-dependent signals confer selective survival of eosinophils in the murine small intestine*. *The Journal of Immunology*, 2009. **183**(9): p. 5600-5607.
57. Young, B., P. Woodford, and G. O'Dowd, *Wheater's Functional Histology E-Book: A Text and Colour Atlas*. 2013: Elsevier Health Sciences.
58. Palframan, R.T., et al., *Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow*. *Blood*, 1998. **91**(7): p. 2240-2248.
59. Matthews, A.N., et al., *Eotaxin is required for the baseline level of tissue eosinophils*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998. **95**(11): p. 6273-6278.
60. Woltmann, G., et al., *Interleukin-13 induces PSGL-1/P-selectin-dependent adhesion of eosinophils, but not neutrophils, to human umbilical vein endothelial cells under flow*. *Blood*, 2000. **95**(10): p. 3146-3152.
61. Hamann, K., et al., *In vitro killing of microfilariae of *Brugia pahangi* and *Brugia malayi* by eosinophil granule proteins*. *The Journal of Immunology*, 1990. **144**(8): p. 3166-3173.
62. Fabre, V., et al., *Eosinophil deficiency compromises parasite survival in chronic nematode infection*. *The Journal of Immunology*, 2009. **182**(3): p. 1577-1583.

63. Culley, F.J., et al., *Eotaxin is specifically cleaved by hookworm metalloproteases preventing its action in vitro and in vivo*. The Journal of Immunology, 2000. **165**(11): p. 6447-6453.
64. Akuthota, P., et al., *Immunoregulatory roles of eosinophils: a new look at a familiar cell*. Clinical & Experimental Allergy, 2008. **38**(8): p. 1254-1263.
65. Padigel, U.M., et al., *Eosinophils can function as antigen-presenting cells to induce primary and secondary immune responses to Strongyloides stercoralis*. Infection and immunity, 2006. **74**(6): p. 3232-3238.
66. Romano, M., et al., *Hereditary eosinophil peroxidase deficiency: immunochemical and spectroscopic studies and evidence for a compound heterozygosity of the defect*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994. **91**(26): p. 12496-12500.
67. Ethier, C., P. Lacy, and F. Davoine, *Identification of human eosinophils in whole blood by flow cytometry*, in *Eosinophils*. 2014, Springer. p. 81-92.
68. Bochner, B.S., *Systemic activation of basophils and eosinophils: markers and consequences*. Journal of allergy and clinical immunology, 2000. **106**(5): p. S292-S302.
69. Matsumoto, K., et al., *CD44 and CD69 represent different types of cell-surface activation markers for human eosinophils*. American journal of respiratory cell and molecular biology, 1998. **18**(6): p. 860-866.
70. Foussias, G., G.M. Yousef, and E.P. Diamandis, *Molecular characterization of a Siglec8 variant containing cytoplasmic tyrosine-based motifs, and mapping of the Siglec8 gene*. Biochemical and biophysical research communications, 2000. **278**(3): p. 775-781.
71. Bochner, B.S., *Siglec-8 on human eosinophils and mast cells, and Siglec-F on murine eosinophils, are functionally related inhibitory receptors*. Clinical & Experimental Allergy, 2009. **39**(3): p. 317-324.
72. Son, K., et al., *Improved recovery of functionally active eosinophils and neutrophils using novel immunomagnetic technology*. Journal of immunological methods, 2017. **449**: p. 44-55.
73. Urban Jr, J., F. Douvres, and F. Tromba, *A rapid method for hatching Ascaris suum eggs in vitro*. Proceedings of the Helminthological Society of Washington, 1981. **48**(2): p. 241-243.
74. Sarma, N.J., A. Takeda, and N.R. Yaseen, *Colony forming cell (CFC) assay for human hematopoietic cells*. JoVE (Journal of Visualized Experiments), 2010(46): p. e2195.
75. James, C.E. and M.W. Davey, *A rapid colorimetric assay for the quantitation of the viability of free-living larvae of nematodes in vitro*. Parasitology research, 2007. **101**(4): p. 975-980.
76. Deslyper, G., et al., *The liver proteome in a mouse model for Ascaris suum resistance and susceptibility: evidence for an altered innate immune response*. Parasit Vectors, 2019. **12**(1): p. 402.
77. Giacomini, P.R., et al., *The role of complement in innate, adaptive and eosinophil-dependent immunity to the nematode Nippostrongylus brasiliensis*. Molecular immunology, 2008. **45**(2): p. 446-455.
78. Haapasalo, K., T. Meri, and T.S. Jokiranta, *Loa loa Microfilariae Evade Complement Attack In Vivo by Acquiring Regulatory Proteins from Host Plasma*. Infection and Immunity, 2009. **77**(9): p. 3886-3893.
79. Matsuyama, W., et al., *Discoidin domain receptor 1 contributes to eosinophil survival in an NF- κ B-dependent manner in Churg-Strauss syndrome*. Blood, 2007. **109**(1): p. 22-30.

11. Anexos

Anexo 1. Aval comité de ética médica Universidad de Cartagena



Universidad de Cartagena
Vice-Rectoría de Investigaciones

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

HACE CONSTAR:

Que, el proyecto titulado **ASCARIASIS, TRATAMIENTO ANTI-HELMÍNTICO Y SUS EFECTOS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE DE TIPO ALÉRGICA EN UNA POBLACIÓN RURAL DE BOLÍVAR**, presentado por el doctor **LUIS R. CARABALLO**, docente del Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena, no presenta impedimentos éticos, de acuerdo a lo contemplado en la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y en el Reglamento de Ética de la Universidad de Cartagena, tal como consta en el Acta N° 45 del Comité de Ética en Investigaciones del 17 de mayo de 2012.

Para constancia se firma en la Ciudad de Cartagena, a los diecisiete (17) días del mes de mayo del año dos mil doce (2012).


ALVARO OLIVERA DIAZ, MD
Presidente

Mayra Martínez

Siempre a la altura de los tiempos!

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