



Caracterización alérgica de Blo t 21, un alérgeno de *Blomia tropicalis*

Trabajo de grado para optar al título de Magister en Inmunología

Karen Margarita Hernández Villar, MD.

Josefina Zakzuk Sierra, MD, PhD.

Tutora

Maestría en Inmunología

Instituto de Investigaciones Inmunológicas

Universidad de Cartagena

Cartagena de Indias, DT y C, mayo de 2022

Agradecimientos

Este trabajo está dedicado a mis hijas Mariana y Mia, a mis padres, hermanos y amigos.

Agradezco a mi tutora, a quien admiro profundamente, la Dra. Josefina Zakzuk, gracias por creer en mí, abrirme camino y dedicarse a mi formación, al Dr. Luis Caraballo investigador principal del proyecto y a los profesores del I.I.I por compartir su gran experiencia y conocimientos,

A los pacientes y controles por su voluntad para participar en el estudio,

A Dilia, Victoria y especialmente a Ronald por su dedicación, enseñanzas y ayuda invaluable en la realización de los experimentos,

A la Dra. Inés Benedetti por la realización de los estudios histopatológicos,

A Ana que siempre estuvo dispuesta a enseñarme y orientarme, Karen Lorena y Luis por su valiosa ayuda en la realización del modelo animal; a Alejandra, Kevin y Jonathan por su incondicionalidad, apoyo y valiosa amistad.

Tabla de contenido

| | | |
|----|--|----|
| 1. | Abreviaturas | 7 |
| 2. | Resumen | 9 |
| 3. | Introducción | 11 |
| 4. | Marco teórico | 14 |
| | 4.1 Fundamentos fisiopatológicos de la reacción alérgica..... | 14 |
| | 4.2 Diagnóstico de alergias basado en componentes | 16 |
| | 4.3 Consideraciones genéticas de la predisposición alérgica a HDM..... | 19 |
| | 4.4 Alergenos de importancia epidemiológica en el trópico..... | 20 |
| | 4.5 Componentes de unión a IgE de <i>Blomia tropicalis</i> | 21 |
| | 4.6 Generalidades de Blo t 21 | 21 |
| | 4.7 Evaluación de la actividad alérgica..... | 23 |
| | 4.8 Estado del arte: la medicina personalizada en alergología clínica..... | 24 |
| 5. | Hipótesis | 26 |
| 6. | Objetivo general | 27 |
| 7. | Objetivos específicos | 27 |
| 8. | Metodología | 27 |
| | 8.1 Diseño general del estudio | 27 |
| | 8.2 Evaluación de la actividad alérgica..... | 28 |
| | 8.2.1 Expresión del recombinante Blo t 21 | 28 |
| | 8.2.2 Remoción de endotoxina a rBlo t 21..... | 30 |
| | 8.2.3 Cuantificación de endotoxina..... | 31 |
| | 8.3 Ensayo de inhibición de Elisa de <i>B. tropicalis</i> con Blo t 21 | 32 |
| | 8.4 Determinación de la reactividad IgE específica a rBlo t 21 en humanos..... | 33 |
| | 8.4.1 Detección de IgE humana específica contra Blo t 21 mediante ELISA | 33 |
| | 8.4.2 Western Blotting (WB)..... | 34 |
| | 8.4.3 Prueba cutánea de alergia (SPT)..... | 35 |
| | 8.4.4 Prueba de activación de basófilos (BAT)..... | 36 |
| | 8.5 Modelo animal de inflamación respiratoria | 38 |
| | 8.5.1 Medición de la hiperreactividad de las vías respiratorias..... | 38 |
| | 8.5.2 Eutanasia y recolección de muestras..... | 39 |
| | 8.5.3 Lavado broncoalveolar (BAL) | 39 |

| | | |
|----------|--|----|
| 8.5.4 | Histología | 40 |
| 8.5.5 | Determinaciones serológicas..... | 41 |
| 9. | Análisis estadísticos..... | 42 |
| 10. | 10. Consideraciones éticas | 43 |
| | Resultados | |
| | | 44 |
| 11. | | 44 |
| 11.1 | Optimización de la producción de rBlo t 21 | 44 |
| 11.2 | La contraparte natural de rBlo t 21 está presente dentro del extracto de <i>B. tropicalis</i> | 45 |
| 11.3 | rBlo t 21 se une a IgE en sueros de individuos humanos sensibilizados e induce activación de basófilos..... | 46 |
| 11.3.1 | rBlo t 21 induce activación de basófilos..... | 48 |
| 11.4 | rBlo t 21 no induce inflamación en las vías aéreas en un modelo de sensibilización en ratones..... | 50 |
| 11.4.1 | Ausencia de hiperactividad bronquial ante el reto con metacolina..... | 50 |
| 11.4.2 | Ausencia de infiltrado eosinofílico en BAL en ratones tratados con rBlo t 21..... | 51 |
| 11.4.3 | La respuesta humoral inducida por rBlo t 21 sugiere la necesidad de un adyuvante para su polarización TH2..... | 53 |
| 11.4.3 | rBlo t 21 no induce inflamación tisular, pero induce leve hipersecreción de moco en las vías respiratorias. | 55 |
| 12. | Discusión..... | 55 |
| 13. | Conclusiones..... | 62 |
| 14. | Perspectivas futuras | 62 |
| 15. | Bibliografía..... | 63 |
| 16. | Material suplementario..... | 68 |
| 17. | Anexos | 72 |
| Anexo 1. | Aval ético..... | 72 |
| Anexo 2. | Consentimiento informado..... | 73 |
| 18. | Fuentes de financiación..... | 75 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 NIVELES DE IGE ESPECÍFICA A UN PANEL DE COMPONENTES DE BLOMIA TROPICALIS. | 14 |
| FIGURA 2. MAPA DEL PLÁSMIDO VECTOR PET45B (+). | 29 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 3. VISTA AMPLIADA DE LA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS INSERTADA EN EL PLÁSMIDO PET45B (+) | 31 |
| FIGURA 4. PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE BLO T 21 | 45 |
| FIGURA 5. INHIBICIÓN DEL ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA) | 46 |
| FIGURA 6. REACTIVIDAD IGE A RBLO T 21 | 48 |
| FIGURA 7. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ALERGÉNICA A RBLO T 21 MEDIANTE SPT | 50 |
| FIGURA 8. EVALUACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE BASÓFILOS POR RBLO T 21 | 51 |
| FIGURA 9. MODELO DE INFLAMACIÓN DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS EN RATÓN POR HDM | 52 |
| FIGURA 10. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE PULMONES DEL MODELO DE INFLAMACIÓN ALÉRGICA | 54 |

Índice de Tablas

| | |
|--|----|
| TABLA 1 ENSAYOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ALERGÉNICA Y LA RELEVANCIA CLÍNICA DE LOS ALERGENOS . | 24 |
| TABLA 2. CARACTERÍSTICAS DE LOS SUEROS USADOS PARA REALIZACIÓN DE WESTERN BLOT | 35 |
| TABLA 3. DESCRIPTIVA DE LAS MUESTRAS UTILIZADAS EN BAT | 37 |
| TABLA 4. CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS UTILIZADAS PARA MEDIR NIVELES DE IGE | 46 |
| TABLA 5. CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO PRUEBAS DE UNIÓN A IGE . | 49 |

1. Abreviaturas

AA: Asma alérgica
AR: Rinitis alérgica
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario
BAL: Lavado bronco alveolar
BAT: Prueba de activación de basófilos
BPM: Buenas prácticas de manufactura
BSA: Albúmina sérica bovina
CD: Células dendríticas
CPA: Células presentadoras de antígeno
DBC: Diagnóstico Basado en Componentes
DS: desviación estándar
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
EU: Unidades de Endotoxina
FSC: Dispersión frontal
FcεRI: Receptor de alta afinidad de la cadena pesada de IgE
HDM: Ácaros del polvo domestico
i. d.: Intradérmico
III: instituto de investigaciones inmunológicas
i. n.: Intranasal
i. p.: Intraperitoneal
IC: Intervalo de confianza
IEA: inmunoterapia específica basada en alérgenos
IgE: inmunoglobulina E
IgG: inmunoglobulina G
IL: Interleuquina
IPTG: Isopropil-β-D-1- tiogalactopiranosido
ISAAC: Estudio Internacional sobre Alergia y Asma en la Niñez
IUIS: Unión Internacional de Sociedades de Inmunología
KCl: Cloruro de potasio
kDa: Kilodalton
LB: Luria Bertani
LBA: Luria Bertani con ampicilina (100 µg/mL)
LPS: lipopolisacárido
mAb: Anticuerpo monoclonal
MgCl₂: Cloruro de magnesio
NaCl: Cloruro de Sodio
NaH₂PO₄: Fosfato de sodio di-hidrogenado

NBB: Buffer nativo de unión
NEB: Buffer nativo de elución
Ni-NTA: Resina de níquel
NWB: Buffer nativo de lavado
OD: Densidad óptica
ON: *Overnight* (incubación durante 16 horas en la noche)
OR: Odds Ratio
ORa: Odds Ratio ajustado
PB: Peribronquial
PBMC: Células mononucleares de sangre periférica
PBS: Buffer fosfato salino
PV: Perivascular
pNPP: p-Nitrofenil Fosfato
PRR: Receptores de reconocimiento de patrones
rpm: revoluciones por minuto
SSC: Dispersión lateral
SDS-PAGE: Electroforesis en Gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio
TA: Temperatura ambiente
TH2: Células T colaboradoras tipo 2
TLR: Receptores tipo Toll

2. Resumen

La prevalencia de enfermedades alérgicas respiratorias, principalmente asma, ha aumentado en todo el mundo durante las últimas décadas, siendo un problema de importancia en salud pública; se ha descrito una relación entre la sensibilización a los ácaros del polvo doméstico (HDM) y el desencadenamiento del asma y otras enfermedades alérgicas, constituyéndose en el factor de riesgo independiente más fuerte asociado con el asma. Existe un número importante de alergenos de ácaros descritos, pero se conoce poco sobre su potencial para inducir inflamación (actividad alérgica) y síntomas. Hasta el momento, la importancia clínica de los alergenos está determinada por su alergenidad, definida como la frecuencia e intensidad de su unión a anticuerpos IgE, este es un parámetro limitado ya que algunos alergenos, además de sus propiedades de unión a anticuerpos IgE, pueden inducir inflamación a través de vías no mediadas por IgE, que pueden aumentar su actividad alérgica; para evaluar la actividad alérgica se usan varias pruebas, entre ellas las pruebas de provocación in vivo e in vitro, la demostración de vías de inflamación no mediadas por IgE, estudios de casos y controles de frecuencias de unión a IgE, y modelos animales de alergia respiratoria, entre otros.

Blomia tropicalis es un ácaro del polvo doméstico, con alta prevalencia en regiones tropicales y subtropicales, se asocia con enfermedades alérgicas como rinitis y asma y es una fuente primaria de alergenos, se han identificado 25 proteínas de unión a la IgE, uno de estas es el alergeno Blo t 21, perteneciente al grupo 21 de los HDM, que a pesar de ser considerado un sensibilizante frecuente e importante en las poblaciones donde se ha evaluado su capacidad de unión IgE, cuenta solamente con información básica como sus características estructurales, su frecuencia de unión y homología estructural con Blo t 5; actualmente no se dispone de bibliografía sobre la capacidad que este pueda tener de producir síntomas, ni estudios que confirmen o descarten su alergenidad, por lo tanto, en este proyecto nos propusimos realizar la caracterización alérgica de Blo t 21, para lo cual, se analizó su actividad alérgica mediante su caracterización en términos de actividad alérgica para lo se obtuvo en primer lugar este alergeno en forma recombinante, con un alto nivel de pureza y bajos niveles de endotoxina para llevar

a cabo ensayos que midieron su capacidad de unir IgE mediante western blot y ensayos de ELISA, pruebas epicutáneas de alergia (SPT) y pruebas de activación de basófilos basada en el marcador CD63, en pacientes alérgicos y controles sanos; además para probar su actividad alérgica en un modelo de alergia respiratoria en ratones BALB/c.

Los resultados de esta tesis de grado mostraron que se optimizó la expresión de la proteína rBlo t 21 en condiciones nativas a partir de una clona de *E. coli*, en el vector pET 45 b + con buen rendimiento y alta pureza; este alérgeno mostró su capacidad de unir IgE en WB y en ensayos de ELISA; se pudo demostrar mediante ensayo de inhibición que su contraparte natural está representada en el extracto de *B. tropicalis*. Se encontró una alta positividad a rBlo t 21 en la SPT realizada a voluntarios alérgicos a HDM; además, este alérgeno indujo la sobreexpresión del marcador CD63 en la membrana de basófilos de pacientes alérgicos. En el modelo murino de asma alérgica en términos generales este alérgeno no generó inflamación ni hiperreactividad en las vías respiratorias.

En conclusión, se demostró con ensayos *in vitro* e *in vivo* que rBlo t 21 tiene actividad alérgica, lo que sugiere que es un alérgeno clínicamente importante en enfermedades alérgicas como el asma.

Palabras claves: *Blomia tropicalis*, alérgeno, alergenidad, actividad alérgica, rBlo t 21, IgE, inflamación alérgica.

3. Introducción

El aumento en la prevalencia de enfermedades alérgicas respiratorias en todo el mundo durante las últimas décadas [1] probablemente debido a influencias ambientales y genéticas, principalmente del asma, se considera un problema de importancia en salud pública a nivel mundial [2]. En Colombia, el asma tiene una prevalencia del 10% en adultos y 17% en niños, siendo el 76% de los asmáticos alérgicos a los ácaros del polvo doméstico (HDM), razón por la cual es importante enfocarse en hacer un adecuado diagnóstico, oportuna prevención y tratamiento [3] de esta condición que tiene un profundo impacto en la calidad de vida de los pacientes [4] y conlleva una carga económica importante en costos directos para el manejo de la enfermedad y costos indirectos debido a los altos niveles de ausentismo [5]; en un estudio se observó que el 56% de los asmáticos tenían gastos mensuales cercanos a \$350.000 por causa de la enfermedad y en un 7% la cifra fue superior [6].

Existe una relación entre la sensibilización a los HDM y el desarrollo de enfermedades alérgicas [7] [8] en las personas genéticamente predispuestas, como la rinoconjuntivitis alérgica (AR), el asma alérgica (AA) y la dermatitis atópica (DA). Los alergenos HDM más relevantes en todo el mundo son los gránulos fecales de las especies *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Euroglyphus maynei* y *Blomia tropicalis* [9].

La prevalencia de alergia a HDM es alta, se estima que del 1% al 2% de la población mundial puede presentarla, lo que equivale a unas 65 a 130 millones de personas [10]. La hipersensibilidad a los alergenos de HDM afecta hasta al 85% de los asmáticos, constituyéndose en el factor de riesgo independiente más fuerte asociado con el asma [11]; además, más del 50% de los niños y adolescentes con asma están sensibilizados a HDM [12].

De los tratamientos disponibles para el asma solo la inmunoterapia específica de alergen (IEA) puede modificar el curso de la enfermedad [13] y su éxito depende de la identificación precisa de las causas de la inflamación bronquial, por lo cual hay un gran

interés por llevar el diagnóstico de las alergias al nivel molecular, usando componentes alergénicos purificados (generalmente en forma recombinante) en vez de extractos naturales de las fuentes alergénicas[14], esto reviste de importancia el concepto de medicina de precisión, en el que mediante un diagnóstico más preciso se pueda tratar de manera personalizada a cada paciente, teniendo en cuenta tanto el fenotipo de la enfermedad, como los factores de riesgo genéticos y ambientales [15]

A la fecha hay descritos un número importante de alergenos de ácaros, pero se conoce poco sobre su potencial para inducir inflamación (actividad alergénica) y síntomas. Hasta el momento, la importancia clínica de los alergenos está determinada por su alergenicidad, definida como la frecuencia e intensidad de su unión a anticuerpos IgE, este es un parámetro limitado considerando los conceptos de los últimos 20 años en alergología experimental y los criterios que sustentan la medicina personalizada, tales como que algunos alergenos, además de sus propiedades de unión a anticuerpos IgE, pueden inducir inflamación a través de vías no mediadas por IgE, que pueden aumentar su actividad alergénica; para demostrar la actividad alergénica, son necesarias otras pruebas que confirmen la participación de moléculas candidatas en la reacción alérgica inflamatoria[16].

Blomia tropicalis es un ácaro del polvo doméstico de almacenamiento, con alta prevalencia en regiones tropicales y subtropicales, se asocia con enfermedades alérgicas como rinitis y asma y es una fuente primaria de alergenos, se han identificado 25 proteínas de unión a la IgE [17] [18], de las cuales 14 han sido oficialmente reconocidas y nombradas por el subcomité de nomenclatura de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS) y registradas en la base de datos de alergenos ([www. Allergen.org](http://www.Allergen.org)) [19]; son estas moléculas y no el acaro en sí, las que causan alergenicidad, y es identificando cuál es el alergeno que está ocasionando los síntomas en cada paciente individualizándolo, que se puede realizar un diagnóstico basado en componentes y realizar medicina de precisión en asma.

Por muchos años se ha dado por hecho que si un paciente está sensibilizado (es decir que produce IgE específica contra algún alergeno), ese alergeno le causa los síntomas cuando se expone. En esta línea de pensamiento hoy en día la importancia clínica de

los alergenicos se define simplemente por la frecuencia con que unen IgE, clasificándolos como “mayores” o “menores”, lo que podría interpretarse erróneamente como si solo los primeros fueran clínicamente importantes [20], clasificación que es objeto de debate teniendo en cuenta que al estudiar individualmente los componentes de unión IgE, se ha descubierto que varios de ellos tienen baja frecuencia de unión IgE en la población, pero son capaces de inducir fuerte inflamación [21] y otros unen IgE con mucha frecuencia, presentan una actividad alérgica baja [22]. La solución de estos problemas requiere de una investigación detallada de la actividad alérgica de cada uno de los componentes.

La caracterización de un alérgeno implica desde el análisis de su capacidad de unión a anticuerpos IgE hasta la demostración de su relevancia clínica. La caracterización de los alergenicos de *B. tropicalis* es escasa, concentrándose mayoritariamente en la descripción de sus propiedades estructurales, bioquímicas y en términos de su frecuencia de unión a IgE [23]. Del alérgeno Blo t 21, que es uno de los componentes de unión a IgE de *B. tropicalis*, perteneciente al grupo 21 de los HDM, se ha investigado poco, a pesar de ser considerado ser un sensibilizante frecuente en las poblaciones donde se ha evaluado su capacidad de unión IgE, contando solamente con información básica como sus características estructurales, su frecuencia de unión y homología estructural con Blo t 5 [24, 25]. Recientemente, en el marco de un proyecto de investigación que busca la identificación de alergenicos de importancia clínica de *B. tropicalis* se detectó que Blo t 21 es el alérgeno hacia el cual se presentan los mayores niveles de IgE específica dentro una batería compuesta por 8 alergenicos de *Blomia tropicalis* (Blo t 2, Blo t 5, Blo t 7, Blo t 8, Blo t 10, Blo t 12, Blo t 13 y Blo t 21) (**Figura 1**).

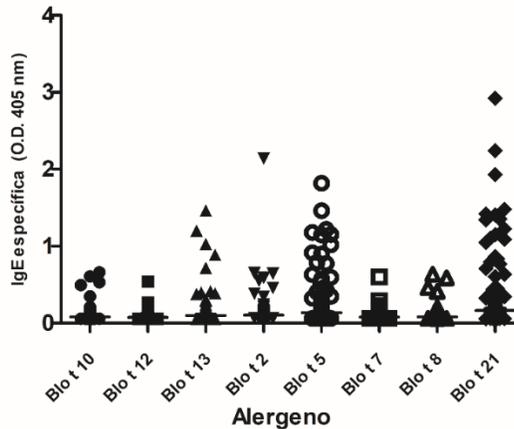


Figura 1 Niveles de IgE específica a un panel de componentes de *Blomia tropicalis*. Los resultados que se muestran en esta gráfica corresponden a datos no publicados derivados del proyecto “Determinación de la actividad alérgica de productos recombinantes del ácaro *Blomia tropicalis* y su impacto clínico en asma”, Contrato “807 - 2018”. Se muestran los datos de O.D. obtenidos para cada alergeno en una muestra de 272 pacientes asmáticos reclutados en el proyecto “Asma y otras enfermedades alérgicas en Colombia, están aumentando en frecuencia.” Código: 223945921557.

Actualmente no se dispone de bibliografía sobre la capacidad que este pueda tener de producir síntomas, ni estudios que evalúen su relación con la presentación de asma, su alergenidad, por lo tanto, la investigación que se plantea en este proyecto estará orientada por las siguientes preguntas:

¿Tiene Blo t 21 una actividad alérgica?

¿Es Blo t 21 un alergeno clínicamente relevante para asma?

4. Marco teórico

4.1 Fundamentos fisiopatológicos de la reacción alérgica

El componente fundamental de las enfermedades alérgicas es la inflamación alérgica cuya molécula principal es la inmunoglobulina E (IgE), un anticuerpo que se une por receptores de alta afinidad en mastocitos y basófilos y baja afinidad en linfocitos B y eosinófilos, cuando esta unión es específicamente con el alergeno sobre la superficie de estas células se va a desencadenar una cascada inflamatoria que libera sustancias vaso

activas y es amplificada por la participación de células del sistema inmune adaptativo y liberándose citoquinas como la IL-4, IL-5 e IL-13. El establecimiento de células portadoras de IgE, principalmente mastocitos, en la mucosa nasal o bronquial durante la fase de sensibilización prepara el escenario para su activación en un posterior contacto con el alérgeno, momento en el que el antígeno se une a dos anticuerpos adyacentes que se entrecruzan físicamente, desencadenando la degranulación y la liberación de mediadores proinflamatorios tales como histamina, triptasa, leucotrienos y prostaglandinas. Estos son responsables de los síntomas inmediatos de broncoconstricción en asma. También hay mediadores que contribuyen a las reacciones que ocurren de 4 a 8 h después de una respuesta inmediata [26]; los eosinófilos liberan una variedad de mediadores proinflamatorios como la proteína básica mayor (PBM), la peroxidasa de eosinófilos, la proteína catiónica eosinofílica (PCE) y la neurotoxina derivada de eosinófilos, que han demostrado tener efectos sobre las células epiteliales de las vías respiratorias, al favorecer la hiperreactividad bronquial y broncoconstricción, sugiriendo un papel central de esta célula y sus mediadores en la patogénesis del asma [27].

Los efectos alérgicos a los HDM están dados a través de la sinergia de la respuesta inmune innata y la adaptativa mediante las células CD4 + Th2 que inducen e impulsan la respuesta alérgica dependiente de IgE [12, 21] [10, 28] Los componentes que pueden activar el sistema inmunológico incluyen epítomos inmunogénicos, el polisacárido estructural quitina del exoesqueleto, compuestos coadyuvantes microbianos y ligandos que se originan a partir de compuestos asociados a ácaros[21],[28].

Los aeroalérgenos inhalados penetran en el epitelio de las vías respiratorias, lo que estimula la migración de células dendríticas a los ganglios linfáticos en los sujetos con predisposición alérgica [29], la inflamación en las vías respiratorias luego es dirigida por células dendríticas y estimulación de la inmunidad mediada por células Th2. La perpetuación de esta respuesta inmune es crítica y se sabe que aumenta en pacientes con alergia a la HDM.

Se conocen como alergenos a los antígenos con capacidad de activar la cascada inflamatoria descrita, aunque la definición más amplia de un alergeno es cualquier molécula que se une a IgE [30], sin embargo, no todos los alergenos van a tener la misma capacidad inflamatoria, y esto viene dado o no por la frecuencia de reconocimiento en una población [21]. Entre las razones para no inducir inflamación a pesar de unir IgE está la presencia de IgG (particularmente IgG4), la cual es capaz de bloquear la unión IgE-antígeno. No se conoce claramente porqué algunas moléculas inducen mayor producción de IgG que de IgE, causando que algunos componentes no tengan actividad alérgica a pesar de inducir IgE. Esto parece tener un componente genético importante, toda vez que el mismo alergeno puede inducir inflamación en algunas personas (o en algunas edades) y en otras no. Si bien, se ha dado por hecho que todas las moléculas que unen IgE tienen importancia clínica como alergeno, actualmente se conoce que esto no siempre ocurre, por lo tanto un resultado positivo de IgE específica de alergeno representa un estado de sensibilización alérgica (riesgo de enfermedad alérgica), pero no una prueba de enfermedad alérgica [31, 32]; una respuesta positiva de anticuerpos IgE solo es clínicamente relevante en el caso de que existan síntomas alérgicos correspondientes definidos objetivamente que estén asociados temporalmente con una exposición al alergeno conocida.

En los últimos años también se ha demostrado el papel predominante de las células innatas tipo 2 en el proceso y del poder inflamatorio de varios componentes estimulando la vía innata [21], sin la participación de IgE y con la producción de citoquinas como la IL-25 e IL-33, muchos de ellos con baja frecuencia de unión a IgE, por lo que equivocadamente se conocen como “alergenos menores” [16, 33]

4.2 Diagnóstico de alergias basado en componentes

El diagnóstico *in vitro* de la alergia a los HDM se ha basado durante mucho tiempo en la detección de anticuerpos IgE específicos en suero contra todo el extracto, que es una mezcla de proteínas, polisacáridos y lípidos alérgicos y no alérgicos obtenidos por extracción de una fuente natural y su contenido relativo varía de un extracto a otro, lo cual puede comprometer la interpretación de sus resultados; la sensibilización a los

componentes se puede medir individualmente, lo que ayuda a identificar en un nivel molecular exacto a qué componente está sensibilizado el paciente. A la luz de esto, los extractos de alergenios están siendo reemplazados paso a paso por productos basados en moléculas [34]. Con la introducción de microarreglos de alergenios, se han probado las respuestas de IgE contra un gran número de moléculas naturales o recombinantes, lo que obliga al diagnóstico *in vitro* de alergia en la era de la llamada medicina de precisión, la cual promueve tratamientos personalizados basados en el fenotipo detallado de la enfermedad del paciente.

Cada vez más los nuevos avances en ciencias dirigen a la alergología clínica al diagnóstico y tratamiento personalizado. La secuenciación de un número creciente de alergenios clonados ha permitido clasificarlos en grupos de acuerdo a su fuente y homología de secuencia, con lo que se orienta el estudio de los fenómenos de reactividad cruzada de la respuesta IgE. Se conocen entonces que hay alergenios con epítopes IgE "únicos" que son especie-específicos y otros con una gran conservación de secuencia que les confiere una alta reactividad cruzada con moléculas homólogas en otras especies [35]. El uso de moléculas alergénicas individuales (en lugar de extractos) ha generado una nueva área de diagnóstico de alergia molecular de alta resolución, también denominada 'diagnóstico basado en componentes' (DBC) y consiste en la detección de IgE contra moléculas alergénicas para determinar el perfil molecular de la sensibilización a IgE del paciente [36], el DBC tiene un impacto importante en las decisiones clínicas sobre IEA. En la actualidad casi la todas las preparaciones que están legalmente aprobadas para hacer IEA son extractos alergénicos, en los cuales las proteínas alergénicas más sensibilizantes se pueden encontrar en concentraciones bajas, lo que requiere el uso de dosis más altas de extracto total, lo que no siempre es conveniente en la práctica clínica; se espera que el DBC ayude a definir cuántos y cuáles son los que deben usarse cuando se detecta polisensibilización. Es importante anotar que la sola sensibilización no define la importancia clínica de los componentes, se debe investigar la actividad alergénica real de cada componente que une IgE para que el DBC continúe su desarrollo. La máxima utilidad del DBC se espera que se presente cuando este vaya seguido de IEA basada en los componentes hacia los cuales se detectó la sensibilización y que tengan una actividad alergénica comprobada experimental y

epidemiológicamente, disminuyendo así el riesgo de desarrollar nuevas sensibilizaciones al evitar la exposición a antígenos innecesarios, toda vez que está bien aceptado que la IEA es la modalidad de tratamiento más racional y modificadora de la enfermedad para los trastornos alérgicos, especialmente para la AR, el asma alérgica y la alergia al veneno de insectos [37, 38].

El DBC puede ayudar a detectar patrones de sensibilización asociados con fenotipos clínicos [39], como por ejemplo que la sensibilización a Der p 2 se asociaba fuertemente con síntomas de asma [40]. Aún falta determinar si existen alergenos de *B. tropicalis* que se asocien con la severidad de la enfermedad, aunque hay datos que lo sugieren [41]. El éxito del DBC depende de una buena selección de alergenos [14]. Se debe tener en cuenta que, al contener cada fuente varios alergenos, la complejidad diagnóstica aumenta, y también sus costos. Por lo tanto, el número de alergenos incluidos en una batería de DBC debería contener los clínicamente relevantes y representativos de la fuente completa al menor número posible de componentes. El primer paso para lograr este propósito es identificar los alergenos individuales relevantes en una población, ya que existen alergenos con diferencias importantes en cuanto a las cifras sensibilización en comunidades distintas, e incluso con variación entre pacientes [42, 43].

Aunque Los alergenos de HDM tienen una alta prevalencia, solo una minoría de las personas expuestas a ellos presentan síntomas clínicos, notándose una tendencias familiares a esto lo que sugiere que la predisposición genética hace que algunos pacientes sean más vulnerables a la sensibilización que otros; por lo anterior, es pertinente hacer estudios locales de sensibilización. Con el grupo 4 de alergenos de ácaros se han observado diferencias importantes en cuanto a las cifras sensibilización alérgica en comunidades distintas [42] [43]. Una vez consideradas estas variaciones geográficas, se pueden lograr combinaciones de pocos alergenos que representen muy bien a la fuente por ejemplo, con la mezcla Der p 1, Der p 2, Der p 5 y Der p 10 se detecta el 93% de los alérgicos a *D. pteronyssinus* [44]. Es necesaria realizar la caracterización de los alergenos de *B. tropicalis*, para pretender realizar una adecuada selección de los componentes relevantes clínica y epidemiológicamente que deban incluirse en una batería diagnóstica e inmunoterapia específica para la alergia a *B. tropicalis*.

4.3 Consideraciones genéticas de la predisposición alérgica a HDM

Las razones genéticas de la predisposición a reaccionar de forma exagerada contra moléculas inocuas aún no están claras. parece que la respuesta IgE del huésped genéticamente predispuesto (y no cualquier propiedad intrínseca particular de las moléculas) es el principal determinante de si una molécula es o no un alérgico; se demostró una mayor heredabilidad en los niveles de IgE específica de alérgico para la descendencia masculina que para la descendencia femenina. [45]

En cuanto a los alérgicos de los HDM, existen asociaciones tanto positivas como negativas entre diferentes variantes genéticas y la respuesta específica de IgE, involucran diferentes alelos y loci y, generalmente, no muestran replicación entre los diferentes estudios. Se han implicado los alelos HLA-DPB1*0401 [46]; el DPB1 (*0201); Otras asociaciones incluyen la hipersensibilidad de IgE a alérgicos purificados de *B. tropicalis* y *D. pteronyssinus* con HLA-DRB1*03 [47] y otros alelos HLA, genes de la región 6p21 se han asociado con el riesgo de sensibilización a los ácaros, los polimorfismos en los genes Th2, por ejemplo, los del gen que codifica la interleucina 4 en el locus 5q31 y el STAT6; polimorfismos en los genes que codifican interleucina-18 (IL-18), leucotrieno C4 sintasa (LTC4S), óxido nítrico sintasa 1 (NOS1), receptor alfa de interleucina-4 (ILR4A), proteína nuclear asociada a células dendríticas 1 (DCNP1), factor regulador de interferón 1 (IRF-1), CD14, JAK2, proteína de unión a GATA 3, CD40 y el receptor de interleucina-5 alfa (IL5RA), entre otros. [48].

Dado que la exposición a los alérgicos varía según la región geográfica, se puede anticipar que los estudios de epidemiología genética sobre los mismos genes, pero en distintas ubicaciones pueden obtener resultados diferentes, como por ejemplo los genes que codifican IL-4 e IL-10.

En la población colombiana se encontró que el SNP rs12584136 del gen del sustrato del receptor de insulina 2 (IRS2) se asoció con una respuesta alta de IgE a *D. pteronyssinus*, y el rs3783118 del dominio AB hidrolasa que contiene la proteína 13 (ABHD13) se asoció con una baja respuesta de IgE a este ácaro. [49]

Se ha sugerido que los HDM, además de inducir inflamación bronquial mediada por IgE, también pueden alterar los patrones epigenéticos de las células involucradas en la homeostasis bronquial, induciendo inflamación. Por lo tanto, las exposiciones ambientales que afectan el epigenoma o los polimorfismos que influyen en la interacción entre el genoma y la maquinaria epigenética puede desempeñar un papel en la modulación de las señales gen-ambientales que conducen a la sensibilización de los ácaros al modificar la metilación del ADN en las células B [50] y la hipometilación del gen de la interleucina 13; los HDM puede inducir modificaciones epigenéticas en la inflamación experimental de las vías respiratorias en ratones, cambiando el patrón de metilación de genes importantes como la fosfodiesterasa 4 D y *tgfb1* . Además, los HDM inducen las mismas modificaciones epigenéticas que los gases de escape diésel; sin embargo, aunque la sensibilización a los ácaros es uno de los factores de riesgo de asma más confirmados, queda por establecer el impacto de los polimorfismos implicados en relación con otros rasgos hereditarios que también influyen en la patogenia de la enfermedad, lo que dificulta la detección del efecto real y heredabilidad de todo el componente genético.[48]

4.4 Alergenos de importancia epidemiológica en el trópico

La sensibilización a los alergenos de los ácaros del polvo doméstico (HDM) es un factor de riesgo importante para el asma en todo el mundo, particularmente en los trópicos, donde predominan diferentes alergenos y crecen abundantemente durante todo el año, por lo que el grado de exposición a ciertos alergenos puede ser mayor [51].

Hay más de 30 especies de ácaros clínicamente relevantes; dos de ellos *D. pteronyssinus* (familia Pyroglyphidae) y *B. tropicalis* (familia Echimyopodidae) están ampliamente distribuidos y son las fuentes más importantes de sensibilización alérgica en el trópico, siendo el primero el más estudiado [52], por su distribución en países industrializados con mayor actividad científica, mientras que *B. tropicalis* es más común en áreas tropicales[53] (Asia, sur de los Estados Unidos y América Latina) [17, 54]. *B. tropicalis* es la principal fuente de alergenos en el interior de las casas en Singapur,

Malasia, Brasil [55], Colombia y Puerto Rico, en donde existe una alta prevalencia de sensibilización y está fuertemente asociada con la presentación de enfermedades alérgicas [24, 25, 56]; es una causa de sensibilización en cerca del 70% de los asmáticos del trópico [57] y su inclusión en baterías diagnósticas de alergia en el trópico es indispensable [58]. Si bien varios de sus alergenicos se han producido en forma recombinante, se ha publicado poco de su actividad alérgica y relevancia clínica, de manera que todavía no está totalmente claro que componentes deberían incluirse en una batería para DBC [59].

El primer estudio descriptivo de alergenicos de *B. tropicalis* a nivel proteómico, reveló un repertorio completo de alergenicos y el impacto de la endogamia en la expresión de proteínas alérgicas en *B. tropicalis*: Blo t 2 fue el alergenico más abundante en extracto de *B. tropicalis* con un porcentaje total del 35,2%. Blo t 10 fue el segundo alergenico más destacado (14,7%), seguido por Blo t 5 (10,0%), Blo t 13 (9,9%) y Blo t 21 (8,7%).

4.5 Componentes de unión a IgE de Blomia tropicalis

El subcomité de nomenclatura de alergenicos de la OMS / IUIS (www.allergen.org/) reconoce 14 proteínas alérgicas de *B. tropicalis*, la mayoría de los cuales se han caracterizado a nivel molecular, revelando diversas estructuras y funciones bioquímicas [23]. Blo t 5 y Blo t 21 son los que con mayor frecuencia unen IgE entre los alérgicos a este ácaro [60, 61] pero en nuestra población las cifras de sensibilización no superan el 50% [44]; otros alergenicos de *B. tropicalis* (Blo t 1, Blo t 2, Blo t 3, Blo t 4, Blo t 6, Blo t 8, Blo t 11 y Blo t 12) muestran una reactividad de IgE de moderada a alta (superior al 50%) en individuos atópicos. Se demostró una baja reactividad de IgE (inferior al 30%) para Blo t 7, Blo t 10, Blo t 13 y Blo t 19[18]; de estos componentes de unión, 7 (Blo t 5, Blo t 21, Blo t 8, Blo t 12, Blo t 2 Blo t 13 y Blo t 10) son producidos en el I.I.I.

4.6 Generalidades de Blo t 21

Fook Tim chew y col. identificaron por primera vez en 2007 el alergenico Blo t 21, una proteína con peso de 13 kDa, formada por 129 aminoácidos, localizada en

los contenidos del intestino medio y posterior de *B. tropicalis*, así como en las partículas fecales.

producto de un gen de copia única que comparte algunas similitudes con los genes que codifican los alérgenos del grupo 5, tales como las estructuras primarias y secundarias determinadas por resonancia magnética (RMN), la cual consta de tres hélices α antiparalelas, ensambladas en un haz helicoidal. A pesar del hecho de que algunos residuos de epítomos de IgE putativos se conservan en las estructuras tridimensionales de Blo t 5 y Blo t 21, ambos tienen más del 40% de residuos cargados y 20% de residuos polares en toda la secuencia, este alto nivel de residuos accesibles a los disolventes podría permitir que los anticuerpos se unieran más fácilmente a ellos y constituir la base de su alergenicidad [56], encontrando en algunas poblaciones una reactividad IgE mayor al 90% [24, 56], se ha demostrado que los anticuerpos IgE séricos en el 42% al 98% de los individuos sensibilizados a *B. tropicalis* reaccionan con Blo t 5 y Blo t 21.

Blo t 21 comparte 41% y 39% de identidad de aminoácidos con Der p 21 y Blo t 5, respectivamente [24]. En un estudio, 253 niños fueron evaluados con Der p 21 y Blo t 21 se informó una frecuencia de reactividad IgE del 64 % y el 56 %, respectivamente [62]. Blo t 21 tiene una reactividad cruzada de baja a moderada con Blo t 5 y Der p 5. Blo t 5 y Blo t 21 se consideran alérgenos principales, A pesar de compartir una estructura tridimensional (3D) extremadamente similar, estos alérgenos no reaccionan de forma cruzada, por RMN se mapearon los epítomos de unión a IgE de Blo t 21 casi en la misma región que Blo t 5 pero con un epítomo conformacional adicional [25], pero la co-sensibilización entre estos 2 alérgenos es común, actualmente una molécula híbrida denominada BTH2 que es una versión hipoalérgica de los recombinantes Blo t 5 y Blo t 21 es un prometedor candidato a vacuna para la inmunoterapia de la alergia a *B. tropicalis* [63].

A pesar de su importancia de este componente de unión a IgE de *B. tropicalis* se desconoce su función biológica y actividad alérgica, por lo que es importante caracterizarlo y definir si debe o no ser incluido al realizar DBC para este HDM.

4.7 Evaluación de la actividad alérgica.

Existe relativamente poca información disponible sobre los alérgenos de HDM, es probable que el nivel de expresión, la estabilidad y la posibilidad de permanecer en el aire de estas proteínas, entre otras características físicas y bioquímicas, no sean las mismas [26]. Por lo tanto, se espera que la respuesta alérgica contra los HDM sea heterogénea, siendo la capacidad que tiene cada uno de inducir IgE específica, el fenotipo más conocido resultante de este proceso. Se ha asumido que la IgE específica representa casi todas las propiedades y circunstancias que hacen que un componente sea alérgico, sin embargo, el reconocimiento por anticuerpos IgE específicos (unión a IgE) es necesario pero no suficiente para ser un alérgeno, ya que estos también inducen reactividad y síntomas de alergia; en este sentido, el impacto clínico de la alergia a HDM ha sido documentado consistentemente por estudios epidemiológicos y experimentos de provocación en modelos humanos y animales [26].

Lo anterior ha obligado a replantearse los criterios para definir un verdadero alérgeno y a sugerir pruebas que ayuden a definir si una molécula, además de tener alergenidad, tiene también actividad alérgica. Se han empleado diferentes metodologías (**Tabla 1**), como la evaluación de la frecuencia e intensidad de unión a la IgE mediante técnicas de inmunoensayo como el ELISA, pruebas de provocación *in vivo* como retos orales o las pruebas cutáneas e *in vitro*, como la prueba de activación de basófilos o de liberación de histamina, estas últimas ofrecen numerosas ventajas, como cuantificación precisa, ausencia de interferencia farmacológica y mayor seguridad [64], también son útiles la capacidad inducir inflamación a través de modelos animales o mediante ensayos de anafilaxia cutánea pasiva.

Estos estudios, se han realizado con alérgenos alimentarios, del polen o con extractos de ácaros, principalmente del *D. pteronyssinus*.; de los 14 componentes de *B. tropicalis* reconocidos como alérgenos por el Comité de Nomenclatura de alérgenos de la OMS/IUIS, solo Blo t 8 tiene comprobada su actividad alérgica por las pruebas mencionadas [65], en el I.I.I se están estudiando actualmente Blo t 13 [66] y Blo t 2 [67]; es esencial realizar este tipo de pruebas al resto de alérgenos de *B. tropicalis* si se quiere

aprovechar al máximo el DBC (el cual apunta a la medicina de precisión) ya que no tendría sentido identificar supuestos alérgenos cuya participación real en la fisiopatología de la enfermedad no está confirmada[16].

Tabla 1 Ensayos para evaluar la actividad alérgica y la relevancia clínica de los alérgenos.

| Ensayo | Comentario |
|---|--|
| Capacidad de unión a IgE | Evalúa la alergenidad, un componente importante de la actividad alérgica |
| Prueba de provocación <i>in vivo</i> : cutáneas, nasales, conjuntivales, bronquiales | La prueba más representativa de relevancia clínica |
| Pruebas de provocación <i>in vitro</i> : liberación de histamina, activación de basófilos | Evaluar la activación celular dependiente de IgE |
| Estudios de casos y controles | Soporte estadístico de relevancia clínica |
| Mecanismos de acción | Evaluar vías inflamatorias adicionales no mediadas por IgE |
| Modelo animal de alergia | Apoya la hipótesis de relevancia clínica |
| Anafilaxia cutánea pasiva | Inducción de una respuesta IgE específica |
| Estudios de evitación | Una forma indirecta de confirmar los efectos clínicos |
| Inmunoterapia específica de componentes | Apoya la causalidad y confirma la relevancia clínica |

Tomado de [59]

4.8 Estado del arte: la medicina personalizada en alergología clínica

Clásicamente se han manejado varias enfermedades con el enfoque tradicional en medicina basado en protocolos y guías de manejo aplicadas de manera generalizada a diversos grupos poblacionales, pero existen condiciones como las enfermedades alérgicas, como el asma, que ameritan otros enfoques para tratarlas dada la heterogeneidad en su expresión clínica. El gran progreso científico derivado de la Genómica y la Proteómica ha impulsado la idea de la aplicación masiva de un modelo de medicina personalizada o de precisión, que tenga en cuenta, además de los agentes causales de origen ambiental, la influencia de la condición genética del individuo en la escogencia y respuesta al tratamiento [68].

En alergología clínica ha sido una necesidad la personalización del diagnóstico de sensibilización IgE y el tratamiento de las alergias. Actualmente se utilizan extractos

completos (mezclas de alérgenos y no alérgenos) para diagnosticar sensibilización IgE y hacer la inmunoterapia, lo cual, por varias razones, ha mostrado limitaciones [69]. Aunque los extractos son la representación más general y natural del proteoma de una fuente alérgica, su empleo se limita porque el contenido de cada alérgeno varía mucho entre lotes dependiendo del protocolo de preparación del extracto, el origen de la fuente, y de las características fisicoquímicas de la proteína (como solubilidad y estabilidad). Por eso no ha sido posible estandarizar los extractos alérgicos, lo cual genera problemas en el diagnóstico y el tratamiento de alergias, por ejemplo, cuando en la preparación con la que se realiza la inmunoterapia no está bien representado el alérgeno relevante para el paciente en particular, además de aumentar el riesgo de efectos adversos y nuevas sensibilizaciones por contener más proteínas de las necesarias [70]. Por todo esto se requiere reemplazar los extractos por los componentes verdaderamente relacionados con la patogénesis de la enfermedad, lo cual representará un real avance en el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades alérgicas.

El DBC consiste en la determinación, *in vitro* o *in vivo*, de sensibilización IgE hacia los componentes alérgicos relevantes de las fuentes de importancia epidemiológica en una región, definiéndose al nivel molecular el perfil de sensibilización en cada paciente [14]. El problema de la estandarización se resuelve usando alérgenos purificados, a la vez que se conoce si la respuesta a una fuente es mediada o no por alérgenos de reactividad cruzada, teniendo por estas razones el DBC una mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica [71]. La purificación de alérgenos de fuentes naturales es un proceso laborioso y costoso, lo que hace que sea más ventajoso producir estas moléculas de forma recombinante, lo cual permite mayor producción a menor costo; varios estudios han demostrado que pueden producirse alérgenos recombinantes con características físico-químicas e inmunológicas similares a su contraparte natural [72], por lo cual podrían reemplazarlos como reactivos de uso clínico. Esto conlleva a que deban definirse aspectos básicos de la estructura molecular en cada recombinante, como su correcto plegamiento y estructura secundaria, lo cual corrientemente se hace mediante difracción de rayos X.

Ahora bien, aunque el DBC se considera un avance en el reemplazo de los extractos alergénicos como reactivos diagnósticos, esta parte de la suposición de que la sola sensibilización es la que indica el impacto clínico. De hecho, actualmente se emplean ensayos multiplex como una opción costo efectiva, ya que en una sola prueba se evalúan cientos de alérgenos usando una mínima cantidad de muestras de sangre; actualmente se encuentran disponibles la plataforma ISAC que cuenta con 112 componentes moleculares [73], siendo la más usada en clínica, aunque de *B. tropicalis* solo incluye el componente Blo t 5; más recientemente se lanzó la plataforma ALEX que contiene 208 componentes (incluyendo extractos y componentes purificados) [74]; desde enero del año 2020, está disponible una versión actualizada de esta analítica, ALEX² que amplió el panel de alérgenos a 295 (157 extractos alergénicos y 125 componentes moleculares incluidos Blo t 5, Blo t 10 y Blo t 21); hasta ahora la selección de los alérgenos para armar estas plataformas se realiza teniendo en cuenta únicamente la capacidad de sensibilización de los alérgenos, sin importar si estos componentes que unen IgE son también capaces de inducir inflamación por acción directa en el sistema inmune innato, mediada por IgE, o por ambas, lo cual es necesario para que la estrategia de DBC sea realmente de medicina personalizada y de precisión.

Como se ha descrito, el DBC se perfila en el inmediato futuro como una de las aplicaciones de la medicina personalizada en alergología, sin embargo, existe todavía una grave limitación y es que desconocemos la relevancia clínica de cada alérgeno individual. Esto obstaculiza el diagnóstico y por supuesto el tratamiento mediante inmunoterapia, investigar en este campo es un paso esencial para avanzar en esta estrategia de diagnóstico, manejo y el diseño de posibles vacunas contra la alergia.

5. Hipótesis

Blo t 21 tiene actividad alérgica.

6. Objetivo general

Determinar la actividad alérgica de Blo t 21.

7. Objetivos específicos

1. Optimizar la producción de Blo t 21 en un sistema de expresión procariótico.
2. Determinar y cuantificar la presencia de Blo t 21 dentro del extracto de *Blomia tropicalis* como componente de unión a IgE
3. Evaluar la actividad alérgica de Blo t 21 en humanos
4. Estudiar si Blo t 21 tiene la capacidad de inducir inflamación en las vías aéreas en un modelo de sensibilización en ratones

8. Metodología

8.1 Diseño general del estudio

Este trabajo de tesis hace parte de un proyecto más general titulado “*Determinación de la actividad alérgica de productos recombinantes del ácaro Blomia tropicalis y su impacto clínico en asma*”, Contrato “807 - 2018”, financiado por Minciencias (investigador principal: Luis Caraballo) y que tiene como objetivo principal: determinar la actividad alérgica e impacto clínico de productos recombinantes del ácaro *Blomia tropicalis*. El presente proyecto cuenta con aval del Comité de Ética en Investigaciones de la Universidad de Cartagena.

8.2 Evaluación de la actividad alérgica

8.2.1 Expresión del recombinante Blo t 21

Con el fin de optimizar la expresión de Blo t 21 se produjo una nueva versión del recombinante. Inicialmente se había aislado de la biblioteca de ADNc del Instituto de Investigaciones Inmunológicas la secuencia codificante del alérgeno, la cual se clonó directamente desde la reacción de amplificación al vector pET100 [54]. La desventaja de este sistema de clonaje es la adición de 26 amino ácidos extra, lo cual puede afectar la solubilidad y estabilidad de la proteína. El diseño optimizado de Blo t 21 se logró eliminando el péptido señal que consta de 16 aminoácidos (determinado por el programa Signalip 5.0) y cambiando el vector pET100 por pET45. Adicionalmente, la secuencia fue optimizada mediante servicio técnico ordenado a GenScript (Piscataway, USA) quienes realizan un cambio en los codones del gen, utilizando los sinónimos de mayor uso en el organismo de expresión (*E. coli* cepa BL21 DE3). La secuencia optimizada fue subclonada por GenScript en el vector pET45b+ el cual contiene una cola de 6 aminoácidos de histidina en el extremo N-terminal con el fin de purificar la proteína de manera más sencilla mediante una columna de Ni-NTA. La secuencia del alérgeno dentro del plásmido se muestra en las **Figuras 2 y 3**, esta nueva versión del recombinante de denomino rBlo t 21-opt. Para la expresión se realizó un repique por agotamiento de una clona en una placa de Petri con medio Luria Bertani suplementado con ampicilina a 100 µg/mL (LBA), se incubó a 37°C durante 16 horas ON. Al día siguiente se inoculó una de las colonias aisladas del cultivo anterior en medio LBA, se incubó a 37°C, 250 rpm y ON. Posterior a esto, se realizó una dilución 1:20 del cultivo en medio líquido LBA, se incubó por 2 horas a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a una longitud de onda de lectura de 600 nm (OD_{600}) entre 0,5 y 0,8, al lograr la OD, se indujo la expresión de la proteína con Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Sigma Aldrich, cat. 16758-10G) 1 mM durante 5 horas a 37°C y 250 rpm. Se estudió la cinética de la expresión tomando una alícuota de cultivo durante cada hora durante la inducción. Las bacterias se recolectaron por

centrifugación y los pellets se almacenaron a -20°C . Se reconstituyeron los pellet agregando por cada 10 mL de cultivo usado para la extracción 1 mL de buffer NBB 1x pH 8,0, se realizaron 4 ciclos de congelación y descongelación y 5 ciclos de sonicación en el equipo Sonic Dismembrator 705 (Fisher Scientific, Estados Unidos), con una amplitud de 10 en intervalos 1 minuto. La muestra se llevó a rotación 20 rpm durante 4 horas a TA y luego se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante final correspondiente al lisado nativo Blo t 21 pET45 b(+) DE 21, el cual se purificó mediante cromatografía de afinidad usando la resina de níquel, Ni-NTA Agarose Qiagen (cat. 30230) durante 1 hora en rotador vertical Fisher científica a TA; se realizaron 4 lavados con 1 ml de buffer por cada ml de lisado utilizado, de la siguiente manera: lavado 1 con buffer NBB 1X, los siguientes 3 lavados con NWB pH 8,0 (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM), luego se realizaron 6 eluciones con 1 ml de NEB pH 8,0 (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 250 mM) por cada 10 ml de la muestra de lisado inicial usada.

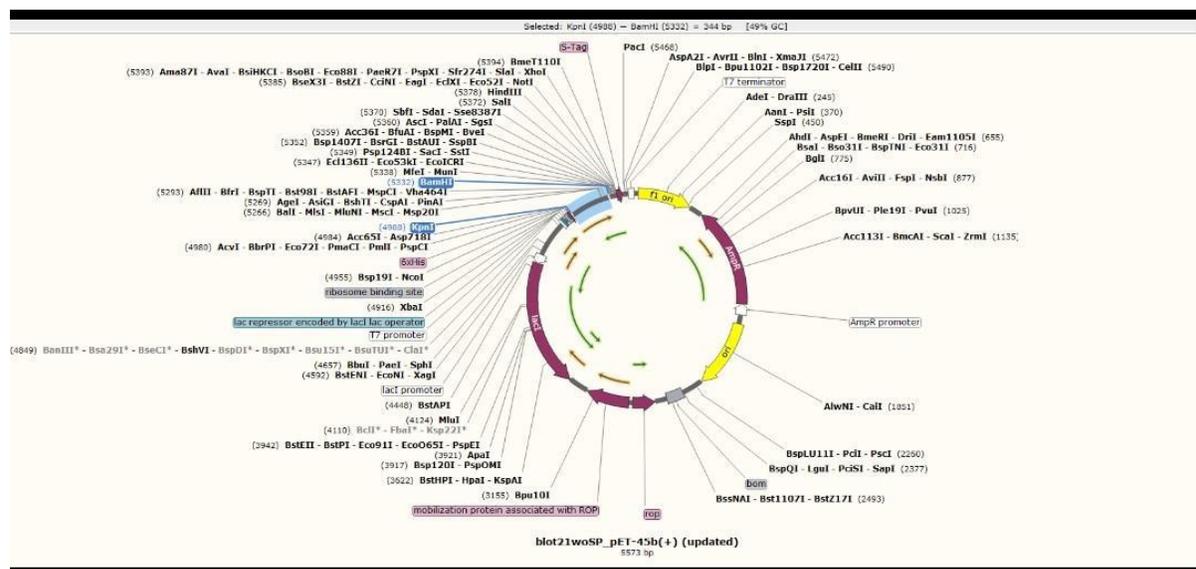


Figura 2. Mapa del plásmido vector pET45b (+). Se representa en azul la inserción de la secuencia de nucleótidos de interés que expresará la proteína recombinante Blo t 21; este plásmido contiene un gen de resistencia antibiótica a la ampicilina graficado en color morado.

Posteriormente se realizó diálisis de la proteína a buffer Tris usando una membrana para diálisis de 6-8 kDa (Spectra/Por™, Spectrum Lab, cat. 08670C) haciendo cambio de buffer cada 2 horas hasta completar 8 horas. La proteína se filtró con un filtro de 0.2 µm, se liofilizó y se conservó a -20 grados con la etiqueta **Blo t 21 WOSP 6x his lote EB 1001**. Cada uno de los pasos: expresión, lisis, purificación y diálisis de la proteína se verificó mediante SDS-PAGE 15% y tinción con azul de Coomassie. La concentración de rBlo t 21 se determinó por densitometría usando como referencia una curva de calibración estándar de albúmina sérica bovina (BSA) y Bradford.

8.2.2 Remoción de endotoxina a rBlo t 21

La depleción de endotoxina se realizó usando el estuche ToxinEraser™ Endotoxin Removal (GenScript, Estados Unidos, catalogo: L00338 Versión: 09092015) siguiendo las indicaciones del fabricante. El principio de este método está basado en hacer correr la muestra a través una matriz de afinidad que contiene polimixina B modificada (PMB) y así lograr una disminución eficaz de los niveles de endotoxinas con el uso repetido del método; inicialmente, la columna se lavó con 5 mL de Buffer de regeneración contenido en el estuche a una velocidad de 0.25 mL/min, este proceso se repitió 2 veces más; luego, la columna se equilibró con 6 mL del “Equilibrium 17 Buffer” (formula del fabricante) a una velocidad de 0.5 mL/min, esto se repitió 3 veces. Por último, se colocó 5 mL de rBlo t 21 en la columna y se ajustó la velocidad a 0.25 mL/min. fueron necesarios tres ciclos de remoción. Después del procedimiento se realizó densitometría usando como referencia una curva de calibración estándar de BSA para estimar la concentración de las proteínas antes y después de la disminución de endotoxinas, la proteína recolectada se guardó a 4°C para la posterior medición de la endotoxina.



Figura 3. Vista ampliada de la secuencia de nucleótidos insertada en el plásmido pET45b (+) depositada en GenBank. la secuencia madura de Blo t 21 comienza en el aminoácido Leu 10, con solo 2 aminoácidos adicionales en este vector entre la secuencia de hexahistidina (flecha morada) y la secuencia de la proteína madura (resaltada en azul).

8.2.3 Cuantificación de endotoxina

La medición de la endotoxina se realizó mediante un ensayo colorimétrico cuantitativo usando el kit ToxinSensor™ Endotoxin Detection System de Genscript (Cat. L00350) de acuerdo a indicaciones del fabricante, este método está basado en la reacción del Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL) y un sustrato cromogénico que permite detectar las concentraciones de endotoxinas de las muestras mediante la generación de color. Brevemente, se usaron estándares de endotoxina de *E. coli* en un rango de 1 – 0.06 EU/mL. Se utilizaron diferentes diluciones de rBlo t 21 antes y después de la disminución de endotoxina en las

muestras; se colocaron 100 µl de estándar, proteína o blanco (agua libre de endotoxina) en viales libres de endotoxinas; se agregaron 100 µl del lisado de LAL reconstituido a cada vial, se incubaron las muestras por 10 minutos a 37 °C. Luego, se agregaron 100 µl del sustrato cromogénico y se incubó a 37°C durante 6 minutos. Por último, se agregó estabilizador de color. Para la medición de la endotoxina, se colocaron las muestras y estándares por duplicado en una placa enzimática de 96 pozos y se midió la OD a 545 nm en el espectrofotómetro Multiskan™ (Thermo Fisher Scientific).

8.3 Ensayo de inhibición de Elisa de *B. tropicalis* con Blo t 21

Para la inhibición ELISA entre rBlo t 21 y el extracto de *B. tropicalis*, usamos un pool de sueros los cuales tenían OD positiva tanto a extracto de *B. tropicalis* como a Blo t 21 a una dilución previa titulación 1:20 (**Tabla 2**) se incubaron con los inhibidores rBlo t 21 , extracto de *B. tropicalis* (Lote EB029) y BSA como control de inhibidor no relacionado respectivamente, a diferentes concentraciones (0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 y 100 µg/mL). Después de la adsorción durante 7 h en rotación continua a 4 °C, se cargaron 100 µL del pool inhibido en cada pocillo la microplaca de 96 pozos (Immunolon® 4HBX-Thermo Fisher Scientific, cat. 6404) recubierto con extracto de *B. tropicalis* en fase sólida (Se usó suero sin inhibir diluido 1:20 en buffer de bloqueo, Como controles positivos y negativos se escogieron sueros previamente habían demostrado presencia o ausencia, respectivamente, de IgE frente a extracto de *B. tropicalis* y Blo t 21 y también PBS para validar la absorbancia base en cada placa). Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Los anticuerpos IgE unidos a la fase sólida se midieron mediante ELISA y los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición, calculado así: porcentaje (%) de inhibición = $\frac{\text{OD suero sin inhibidor} - \text{OD suero inhibido}}{\text{OD suero sin inhibidor}} \times 100$. [35, 75, 76].

8.4 Determinación de la reactividad IgE específica a rBlo t 21 en humanos.

Para la evaluación de la actividad alergénica de rBlo t 21 se emplearon muestras derivadas de pacientes asmáticos alérgicos residentes en la ciudad de Cartagena de Indias que fueron reclutados en el programa ASA (Áscaris y Severidad del Asma), proyecto de investigación (602-2009, Departamento Administrativo de Ciencia y Tecnología e Innovación y Universidad de Cartagena).

8.4.1 Detección de IgE humana específica contra Blo t 21 mediante ELISA

La reactividad de anticuerpos IgE específicos a la nueva versión del recombinante Blo t 21 se determinó mediante ELISA indirecto en 28 sueros de individuos sensibilizados y no sensibilizados a *B. tropicalis*, pertenecientes al estudio ASA.

Se usó el rBlo t 21 lote EB 1001 (380 µg/mL) y extracto de *B. tropicalis* (Lote eB029, 2280 µg/mL) que fueron reconstituidos en PBS y filtrados con un filtro de 0.22 µm para luego cuantificar su concentración mediante densitometría (rBlo t 21) y Bradford (Extracto de *B. tropicalis*).

Se usó el protocolo estandarizado en el I.I.I de ELISA indirecto para medir IgE específica humana para rBlo t 21 [77]. Brevemente, en una microplaca de 96 pozos (Immunolon® 4HBX-Thermo Fisher Scientific, cat. 6404) se recubrieron con 0,5 µg de rBlo t 21 y 1 µg de extracto de *B. tropicalis* por pozo (100 µL por pozo) en buffer carbonato/bicarbonato pH 9.2 ON a 4°C; luego de 5 lavados con PBS- Tween 20 0.1%, se bloquearon los pozos con PBS- BSA 1% más azida de sodio al 0,02% (buffer de bloqueo) por 3 horas a TA y en cámara húmeda, posteriormente se agregaron 50 µL de sueros humanos diluidos 1:5 en buffer de bloqueo y se dejaron incubando ON a TA (se escogieron sueros que previamente habían demostrado presencia o ausencia de IgE frente a extracto de *B. tropicalis* mediante ELISA), Posteriormente se agregaron 50 µL de anti-IgE humana marcada con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, cat. A3525) diluida 1:1000 en buffer conjugado y se incubó por 2 horas a TA. El revelado de la reacción se hizo con p-nitrofenil fosfato (pNPP)

(Sigma-Aldrich, cat. N2640) diluido en dietanolamina/MgCl₂ 0,5 M pH 9,8 a una concentración de 1mg/ml. Se incubó por 60 minutos y se realizó la lectura de la OD a 405 nm en el espectrofotómetro Multiskan™ (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). Todos los experimentos se realizaron por duplicado, previa titulación del ELISA, como controles positivos y negativos se escogieron sueros que previamente habían demostrado presencia o ausencia, respectivamente, de IgE frente a extracto de *B. tropicalis* y Blo t 21 y PBS para validar la absorbancia base en cada placa. Se tomó como punto de corte 0,11 [77] , utilizando para esto el promedio de la OD de los controles negativos más 2 DS.

8.4.2 Western Blotting (WB)

Se realizó un WB usando sueros de pacientes sensibilizados a *B. tropicalis* para evaluar la reactividad IgE rBlo t 21. El protocolo se realizó como se describe antes [35]. Se utilizó un conjunto de sueros de 6 pacientes sensibilizados a *B. tropicalis* con IgE específica para *B. tropicalis* entre 1,835 y 2,909 OD según lo determinado por ELISA y 6 controles no alérgicos con IgE específica para *B. tropicalis* con OD por debajo de 0,1 y el control de tampón PBS para evaluar la reactividad de rBlo t 21, en la **Tabla 2**, se describen los sueros empleados.

Se realizó una electroforesis de acrilamida SDS-PAGE al 15% con rBlot 21 en una celda electroforética Mini-Protean 3 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU). Se usó la celda Mini Trans-Blot (Bio-Rad) para transferir las proteínas desde el gel de electroforesis a una membrana de nitrocelulosa con poro de 0,45 µm, en buffer de transferencia pH 8,3 (tris HCL 0.25mM, glicina 192 mM, metanol 20% y SDS 0,1%) a 180 mA constantes durante 90 minutos. La eficiencia de la transferencia se evaluó mediante tinción de Ponceau. La membrana con las proteínas transferidas se bloqueó con PBS 1x-BSA 3%, durante una hora en agitación constante. Posteriormente, la membrana se cortó en 3 partes, y se incubó en agitación lenta ON cada fracción marcada con una de las condiciones: pool de sueros positivo, pool de sueros negativos o PBS (previamente se absorbieron 2 ml de cada pool de suero o PBS durante 5 H con 100 µg / ml de inhibidor extracto de *E. coli*); al día

siguiente se realizaron 3 enjuagues y 2 lavados de PBS tween 20 0,1% y 2 enjuagues y 2 lavados de PBS 1x. Posteriormente, las membranas se incubaron durante 3 H en agitación lenta con anti-IgE humana marcada con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, cat. A3525) diluida 1:500 en buffer conjugado PBS 1x-BSA 0,2%; luego se realizaron 3 enjuagues y 4 lavados con tampón 0,15 M NaCl 0,05 M Tris-HCl (pH 7,5). La reacción se reveló utilizando nitro-azul-tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indoil-fosfato disueltos en tampón de fosfatasa alcalina (pH 9,5) protegida de la luz, se detectó señal a los 65 segundos por lo que se paró la reacción.

Tabla 2. Características de los sueros usados para realización de western blot.

| Pool positivo | | Pool negativo | |
|---------------|-------|---------------|-------|
| código | OD | código | OD |
| ASC 027 | 2,844 | AL | 0,087 |
| ASC 079 | 1,654 | EM | 0,087 |
| ASC 191 | 2,714 | JB | 0,099 |
| ASC 274 | 2,795 | DM | 0,091 |
| ASC 332 | 1,835 | LAC | 0,092 |
| AH | 2,909 | MCMA | 0,096 |

8.4.3 Prueba cutánea de alergia (SPT)

Se produjo bajo BPM en el I.I.I un extracto glicerinado con el rBlo t 21 expresado y purificado según se detalló, a una concentración de 25 µg / ml, la concentración óptima se definió mediante titulación en sujetos con niveles altos y bajos de IgE específica utilizando 6 diluciones del recombinante rBlo t 21 en glicerol al 50% (1,6; 3,12 6,25; 12,5; 25 y 50 µg / ml) (**Figura 7 a**).

La prueba se realizó por personal médico entrenado a 27 voluntarios con previo diagnóstico de rinitis alérgica y/o asma que hubieran tenido crisis desencadenadas por el polvo doméstico, y 5 controles sanos (se interrogó sobre la presencia de síntomas de asma en la actualidad y en el pasado, definiendo un caso como cualquier sujeto que respondiera “sí” a tener síntomas de asma y/o rinitis y un control

como cualquier sujeto que ni tuviera síntomas ni un diagnóstico médico previo de asma y/o rinitis confirmado por el médico investigador). La prueba se realizó en el antebrazo con una batería de aeroalergenos que incluyó el extracto de *B. tropicalis*, rBlot21 25 µg / ml, *D. pteronyssinus*, epitelio de gato, perro, *Periplaneta americana* y *Aspergillus fumigatus*, fosfato de histamina (1 mg / ml) como control positivo y una solución de glicerol al 50% como control negativo. La prueba se consideró positiva si el diámetro medio de la pápula a los 15 minutos es 3 mm mayor al control negativo. Se pidió a los pacientes que no hubieran tomado antihistamínicos o corticosteroides orales o tópicos durante al menos 1 semana antes de la prueba cutánea.

A los voluntarios participantes se les tomo muestra de sangre para posterior determinación de niveles de anticuerpos IgE específicos para Blo t 21 mediante ELISA indirecto siguiendo el protocolo antes detallado.

8.4.4 Prueba de activación de basófilos (BAT)

Para la realización de la BAT se seleccionaron 5 casos de pacientes asmáticos y/o riniticos reclutados en nuestro estudio que tuvieran IgE y prueba cutánea al extracto de *B tropicalis* y a rBlo t 21 (**Tabla 3**) y 4 controles sanos sin antecedentes de síntomas alérgicos y una respuesta SPT negativa a alergenitos inhalantes comunes como controles negativos. Brevemente, se tomó una muestra de 10 ml de sangre periférica en tubo heparinizado, para cada paciente, se añadieron 20 µL de una combinación optimizada de tres anticuerpos monoclonales fluorescentes CD63-FITC / CCR3 APC / CD3-PECY 7 y 50 µL de sangre entera y 20 µL de cada estímulo a diferentes concentraciones: rBlo t 21 0,1 µg/mL (1 ug/ ml, 0,1 ug/ ml y 0,01 ug/ ml); extracto de *B. tropicalis* 1 µg/mL, PBS o Anti-IgE dilución 1:20 como control negativo y positivo respectivamente, se incubo durante 30 minutos a 37 °C en un baño de maría, protegidos de la luz, posteriormente se paró la reacción con 50 µL de solución de parada (PBS-EDTA 20 mM) y luego se realizó la lisis celular con la mezcla “Fix-and-Lyse” contenida en el kit Allergenicity Kit (Beckman Coulter, cat. A17116), se centrifugo durante 5 minutos a 200 g, se descartó el sobrenadante

mediante aspiración y luego se realizó un lavado con PBS mediante centrifugación durante 5 minutos a 200 g, finalmente se resuspendió el pellet celular en 250 µL de PBS y se analizó por citometría de flujo utilizando el equipo FACS-ARIA III (Becton Dickinson, Estados Unidos). La lectura de los basófilos en el equipo se detuvo cuando se adquirieron 500 basófilos para cada condición. El análisis de los datos se realizó utilizando el software Kaluza versión 2.1 (Beckman Coulter, Estados Unidos). Se usó para la identificación de basófilos activados la estrategia CD3-CCR3+CD63+ (**Figura suplementaria 1**), los resultados se expresaron como % de células CD3-CCR3+CD63+. Se consideró una prueba positiva cuando este porcentaje supero el 15% de todos los basófilos seleccionados (eventos SSClow CD3-CCR3+) [78].

Tabla 3. Descriptiva de las muestras utilizadas en BAT

| Código | Sexo | Edad | DX | IgE Blo t 21 (OD) | SPT Blo t 21 * | SPT BT * |
|-------------------------------|-------------|-------------|-----------|------------------------------|---------------------------|-----------------|
| Pacientes alérgicos | | | | | | |
| BT14 | M | 24 | AR | 0,1943 | 9 | 8 |
| BT 28 | M | 10 | AR | 0,2779 | 11 | 11 |
| BT 33 | M | 35 | AS | 0,3243 | 20 | 11 |
| BT 35 | F | 35 | AR | 0,2424 | 16 | 5 |
| BT 36 | M | 22 | AR | 0,2183 | 7 | 12 |
| Controles no alérgicos | | | | | | |
| BT 29 | M | 25 | CS | 0,0993 | 1 | 1 |
| BT 37 | F | 35 | CS | 0,0957 | 1 | 1 |
| BT 34 | F | 22 | CS | 0,0906 | 1 | 1 |

*Abreviaturas: M: masculino; F: femenino; DX: diagnostico; AR: rinitis alérgica; AS: asma; CS: control sano; SPT: prueba epicutánea alergia; BT: Blomia tropicalis; *: pápula en mm.*

8.5 Modelo animal de inflamación respiratoria

Se realizó un modelo de inflamación respiratoria con rBlo t 21 en ratones hembra de la cepa BALB/c de 8 semanas de edad, con peso 20 ± 2 g, comprados al Instituto Nacional de Salud (Bogotá, Colombia). Los ratones se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos a una temperatura de 18-25°C, 50–90% de humedad relativa y ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Se alimentaron con una dieta estándar de alimento concentrado y agua potable a libre demanda.

Para generar inflamación alérgica de las vías respiratorias se llevó a cabo un protocolo de inmunización y retos nasales realizado en un estudio anterior [79]: se dividieron los ratones en cinco grupos experimentales : 1) PBS + Alum; 2) rBlo t 21 + Alum; 3) Extracto de *B. tropicalis* + Alum; 4) PBS solo y rBlo t 21 solo (**Figura 9 a**). Los ratones recibieron tres inyecciones intraperitoneales (i.p) los días 0, 7 y 14 según el grupo asignado se administró PBS, rBlo t 21 o extracto de *B. tropicalis* con o sin hidróxido de aluminio en 50 μ L (Imject® Alum, Thermo Fisher Scientific, Cat. 77161). Se administraron 20 microgramos del alérgeno cada vez. Siete días después de la última inmunización, los ratones se expusieron bajo sedación con sevoflurano al 100%, diariamente (3X) a 20 μ g de rBlo t 21 (contenido de endotoxina 2,83 EU/mg), 40 μ g de extracto de *B. tropicalis* (contenido de endotoxina 1,9 EU/mg) o PBS, por vía intranasal (i.n). Cada grupo experimental contenía 5 a 6 ratones. Los grupos PBS y extracto de *B. tropicalis* se definen como control negativo y positivo respectivamente del experimento. Se realizó réplica de estos experimentos con diferencia de 1 semana en su realización.

8.5.1 Medición de la hiperreactividad de las vías respiratorias

La función pulmonar se evaluó mediante la obstrucción del flujo de aire inducida por metacolina, utilizando un pletismógrafo de cuerpo completo (Buxco® Troy Electronics, Estados Unidos). El ensayo se realizó al día siguiente de finalizados los retos nasales (día 24); la hiperreactividad bronquial se evaluó indirectamente en los ratones conscientes mediante la medición de valores de pausa aumentada (Penh)

[80], luego de nebulizarlos con 200 μ L de metacolina (Sigma-Aldrich, cat. A2251-25G) a concentraciones en ascenso: 3,125 mg/mL, 6,25 mg/mL, 12,5 mg/mL y 25 mg/mL. Se utilizó un protocolo de 5 minutos de aclimatamiento, 1 minuto de nebulización, 3 minutos de medición y 2 minutos de recuperación por cada grupo de ratones.

8.5.2 Eutanasia y recolección de muestras

Se realizó eutanasia de los animales 24 horas después del reto con metacolina (día 25) (**Figura 9 a**), administrando por vía i. p 200 μ L de Eutanex (INVET, cat. IE-083, Pentobarbital sódico 390 mg y Difenilhidantoína sódica 50 mg) asegurando el cumplimiento de las normas relacionadas con el bienestar del animal. Se realizó la disección del abdomen y se tomó muestra de sangre total de la aorta abdominal que fue depositada en tubos con 50 μ L de EDTA 0,5 M, se centrifugaron a 5.000 g durante 5 minutos a 4°C, se separó el plasma y se almacenó a -80°C hasta realizar medición de anticuerpos específicos (IgG1, IgG2a, IgE). Se recolectó el lavado broncoalveolar (BAL) en 1 mL PBS al 1% con inhibidor de proteasas para análisis celular por citometría de flujo y de citoquinas. Se extrajo el pulmón derecho y se colocó en 3 mL de formalina tamponada al 10% para los análisis histológicos y el pulmón izquierdo se almacenó una parte en RNA Later para análisis transcriptómico y la otra se congeló para análisis epigenéticos. Finalmente se obtuvo el bazo y se depositó en 3 mL de medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino inactivado al 5% para realizar cultivo de esplenocitos y estimulación con rBlo t 21, extracto de *B tropicalis*, medio y PHA (Fitohemaglutinina-M) para el posterior análisis de citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos.

8.5.3 Lavado broncoalveolar (BAL)

El BAL se realizó introduciendo un catéter periférico neonatal 24G x3/4 por la boca del ratón hasta llegar a las vías respiratorias, se tomó 1 mL de PBS frío con coctel inhibidor de proteasas 1x (PeroteoGuard™ EDTA-Free Protease Inhibitor, Clontech,

cat. 635673) con una jeringa. Se adaptó el catéter a la jeringa, se administró el contenido en los pulmones y se aspiró completamente el contenido 3 veces. Se depositó el BAL en tubos de 1.5 mL y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se almacenó a -80°C hasta la medición de citoquinas. El sedimento se resuspendió en 1 mL de buffer de lisis 1x (BD Pharm Lyse™, cat. 555899) durante 5 minutos a 4°C, se lavó mediante centrifugación y luego se resuspendió en 500 µL de Stain Buffer, se centrifugó a 300 g durante 7 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se dejó en 60 µL de Stain Buffer. La muestra se dividió en dos alícuotas de 30 µL cada una. Luego se incubó una de las alícuotas con 30 µL del coctel de anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos para la identificación de macrófagos alveolares (CD170+ CD11b low), eosinófilos (CD170+ CD11b hi), neutrófilos (Ly6G+ CD11bhi) y linfocitos (CD3+) durante 20 minutos a 4°C y protegidos de la luz (**Tabla suplementaria 1**). La otra alícuota se incubó con 30 µL de una mezcla de anticuerpos utilizados como control de isotipo (**Tabla suplementaria 2**). Se realizó un lavado con PBS mediante centrifugación, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en Stain Buffer. Luego se procedió con la lectura en el citómetro de flujo FACS-ARIA III (BD, Estados Unidos) y se usó para el análisis el software Kaluza versión 2.1 (Beckman Coulter, USA).

8.5.4 Histología

Se tomaron los pulmones sumergidos en formalina al 10% y se introdujeron en parafina y se cortaron en secciones de 4 µm de espesor y se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE) (Thermo Shandon, Ref. 6765015) y ácido Peryódico de Schiff (PAS) (Merck, Ref. HX99153846) en el Laboratorio de Histología de la Universidad de Cartagena (Dra. Inés Benedetti). Los cortes se visualizaron mediante microscopía óptica para evaluar la inflamación pulmonar y la producción de moco; Para determinar la gravedad de la infiltración de células inflamatorias, se realizaron recuentos de células inflamatorias peribronquiales (PB) y perivasculares (PV), basados en una modificación del sistema de puntuación de 5 puntos descrito por Myou et al [81]. La inflamación pulmonar total se definió como la suma de las

puntuaciones de inflamación PB y PV. El grado de producción de moco se determinó mediante el recuento de células caliciformes PAS positivas en las vías respiratorias (identificadas por una tinción de color magenta), utilizando el sistema de puntuación de 5 puntos descrito por Tanaka et al [82] (**tabla suplementaria 3**). Las imágenes se capturaron con un aumento final de 10x y 40x en un microscopio Leica DM500 conectado a una cámara Leica ICC50 HD (Suiza). Las imágenes se procesaron con el software Leica Application Suite versión 3.0.

8.5.5 Determinaciones serológicas

Los niveles de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos de alérgeno se determinaron en ratones mediante ELISA. Las placas de microtitulación de 96 pozos (Immunolon® 4HBX-Thermo Fisher Scientific, cat. 6404) se recubrieron con los alérgenos a 0,25 µg/mL rBlo t 21 y 1 µg/mL extracto de *B. tropicalis* mediante incubación ON a 4 °C; al día siguiente, los pozos se bloquearon con PBS-BSA 1% durante 2 horas a TA. Posterior a 5 lavados con PBS-Tween 20 1%, se agregaron los plasmas de los ratones tratados con rBlo t 21, extracto de *B. tropicalis* o PBS diluidos 1:500 (ELISA IgG1) o 1:250 (ELISA IgG2a) en buffer de bloqueo y se incubaron por 2 horas a 37°C. Después de 5 lavados con PBS-Tween 20 1%, los pocillos se incubaron con el anticuerpo biotilado anti-mouse IgG1 (BD Pharmigen™, cat.553441) o anti-mouse IgG2a (BD Pharmigen™, 550332) diluidos 1:1.000 en buffer conjugado durante 2 H a TA; luego de lavar 5 veces con PBS-Tween 20 1%, se agregó la Extravidin/fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, cat. E2636) a una dilución 1:3000 en buffer conjugado durante 1 hora a TA. La reacción se reveló incubando los pozos en oscuridad durante 60 minutos con pNPP 1mg/mL diluido en dietanolamina/MgCl₂ 0,5 mM pH 9.8 a TA; se realizó la lectura en un lector de ELISA a 405 nm (Multiskan™ Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

Con el fin de aumentar la sensibilidad del ELISA de IgE se redujeron los niveles de anticuerpos IgG en el plasma de los ratones; para esto los plasmas diluidos 1:6 se incubaron con 50 µL de proteína G Sepharose™ 4 Fast Flow (GE Healthcare, ref. 17-0618-01) durante 30 minutos a TA en rotación, luego se recuperó el sobrenadante,

este procedimiento se repitió 3 veces, luego se centrifugo a 2000 g por 2 minutos para recuperar la fracción con IgE.

La cuantificación de IgE específica contra rBlo t 21 y *B. tropicalis* se realizó fijando el antígeno a una concentración de 0,25 µg/50 µL y 0,5 µg/50 µL por pozo (respectivamente) en una placa de 96 pozos mediante incubación ON a 4°C. Los pozos luego se bloquearon con PBS-BSA 1% durante 3 horas a TA. Posterior a 5 lavados con PBS-Tween 20 1%, se agregaron los plasmas de los ratones tratados con proteína G y se dejaron en incubación ON a 4°C. Después de 5 lavados con PBS-Tween 20 1%, se incubó con el anticuerpo biotinilado anti-mouse IgE (eBioscience™, Clon 23G3 ref. 13-5992-82) a una dilución 1:1000 en buffer de bloqueo por 1 hora a TA. Posteriormente se realizaron 5 lavados con PBS-Tween 20 1%, y se incubó con el conjugado Extravidin/fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, cat. E2636) a una dilución 1:2000 en buffer conjugado durante 1 hora a TA. Finalmente se agregó como sustrato de color pNPP 1mg/mL diluido en dietanolamina/MgCl₂ 0,5 mM pH 9,8 incubado en oscuridad a TA. Se realizó la lectura de la OD a 405 nm a los 60 minutos usando el lector de ELISA (Multiskan™ Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

9. Análisis estadísticos

Los análisis se llevaron a cabo utilizando SPSS versión 17.0 (SPSS Chicago, IL, Estados Unidos) Y GraphPad Prism versión 5.01 para Windows (GraphPad Software, SanDiego, CA, Estados Unidos). Para los análisis epidemiológicos de la serología IgE se describieron los datos dependiendo de su distribución, ya sea usando media más desviación estándar o mediana más rango intercuartílico. Para evaluar la intensidad de la respuesta IgE de las muestras independientes, también se escogieron las pruebas de acuerdo con la distribución de los datos, usando la prueba t-student en caso de ser paramétrica, o la prueba U de Mann-Whitney si es no paramétrica. Para la comparación de las proporciones de sensibilización entre los grupos de casos y controles se usó la prueba de chi-cuadrado.

Se realizó la prueba de Wilcoxon para comparar las diferencias entre el % de activación de los basófilos de los sueros no estimulados y los estimulados con rBlo t 21 y *B. tropicalis*. La diferencia del % de activación de basófilos después de la estimulación con rBlo t 21 incubados con sueros de los sujetos alérgicos vs controles sanos se evaluó con la prueba U de Mann-Whitney. Se utilizó ANOVA unidireccional con análisis *post hoc* de Dunnett para evaluar las diferencias en el tamaño de las pápulas en la SPT, el contenido de células en el BAL, niveles de anticuerpos IgG1, IgG2a e IgE en suero, la puntuación de la inflamación pulmonar y de células caliciformes. Se utilizó ANOVA bidireccional con análisis *post hoc* de Bonferroni para evaluar la reactividad bronquial al reto con metacolina entre los grupos experimentales.

10.10. Consideraciones éticas

El presente estudio como parte de un estudio más amplio cuenta con el aval del Comité de Ética de la Universidad de Cartagena (**Anexo 1**). Se emplearon sueros de humanos recolectados en estudios previos que contaron con consentimiento informado ; de acuerdo con el artículo 11 de la resolución 8430 de 1993 expedida por el Ministerio de Salud: "Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en Salud", este trabajo se clasifica como investigación con riesgo mínimo al realizar registro de datos a través de procedimientos comunes, que consistieron en la extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud y realización de SPT; estas fueron realizadas por personas entrenadas especialmente para llevar a cabo estos procedimientos. Todos los datos de los pacientes recolectados fueron tratados de forma anónima, sólo utilizada con fines académicos y fueron revisados solo por el equipo de investigación como datos grupales, sin entrar a identificar sujetos puntuales. A los pacientes donadores que se les tomó muestra de sangre y realización de SPT se les solicitó un consentimiento informado (**Anexo 2**).

Los modelos experimentales que contemplan el uso de ratones de laboratorio se rigen por las regulaciones vigentes establecidas en la Ley 84 de 1989 de la República de Colombia, Capítulo VI y la Resolución 08430 de 1993 del Ministerio

de Salud referente al uso de animales vivos en experimentos e investigación por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los animales. De igual manera, contamos con toda la infraestructura y condiciones necesarias para el cuidado y uso de los animales de laboratorios, en concordancia con las legislaciones y recomendaciones estipuladas por el CCAC (Committee on Care and Use of Laboratory Animals, U.S), al igual el manual operativo establecido por el bioterio de la universidad de Cartagena.

11. Resultados

11.1 Optimización de la producción de rBlo t 21

Como se describió en la metodología, la secuencia madura de Blo t 21 fue insertada en un vector recombinante que permitió obtenerla con pocos aminoácidos adicionales a su secuencia. En la **Figura 4 a**, se muestran los resultados de la inducción de la expresión de la proteína rBlo t 21-opt la cual migró a una masa molecular de ~14,6 KDa (este peso molecular coincidió con el peso molecular teórico del recombinante marcado de 15 kDa calculado a partir de la secuencia de aminoácidos de Blo t 21 y es menor que el observado para la versión anterior de Blo t 21/pET100). Esta banda se observó en el cultivo inducido con IPTG 1 μ M, pero no en la condición sin el estímulo. Los resultados de la cinética de la expresión apoyan que son necesarias 5 horas de inducción con IPTG para obtener los resultados óptimos. La proteína rBlo t 21 pudo obtenerse en forma soluble bajo condiciones de purificación nativas. No fue necesaria la solubilización del pellet con detergentes (como se realizaba con Blo t 21/pET100) y el proceso de purificación usando resina Ni-NTA e imidazol 250 mM fue bastante eficiente. El porcentaje de pureza de rBlo t 21-opt determinado en un gel de electroforesis SDS-PAGE teñida en azul de coomasie fue mayor al 99% (**Figura 4 b**). El rendimiento del proceso producción para Blo t 21-opt fue de 14.2 mg/L de cultivo.

En la **Figura 4 c**, se muestran los resultados del WB realizado donde se observa que el conjunto de sueros de individuos IgE positivos para *B. tropicalis* reconoció rBlo t 21-opt, confirmando que existe una fuerte reactividad a la proteína en sueros de pacientes alérgicos a *B. tropicalis*.

El método de remoción de endotoxina con la matriz de polimixina B tuvo una eficiencia del 97,1%; después del tratamiento el nivel de endotoxina en la proteína fue de 2,83UE/mL, en comparación con la proteína sin tratar que mostró un nivel de endotoxina de 98,6 UE/mL. La concentración de proteína medida por densitometría con estándares de BSA no se vio afectada después de la remoción de endotoxina. La proteína con niveles reducidos de endotoxina fue utilizada en los experimentos del modelo de inflamación respiratoria de ratón.

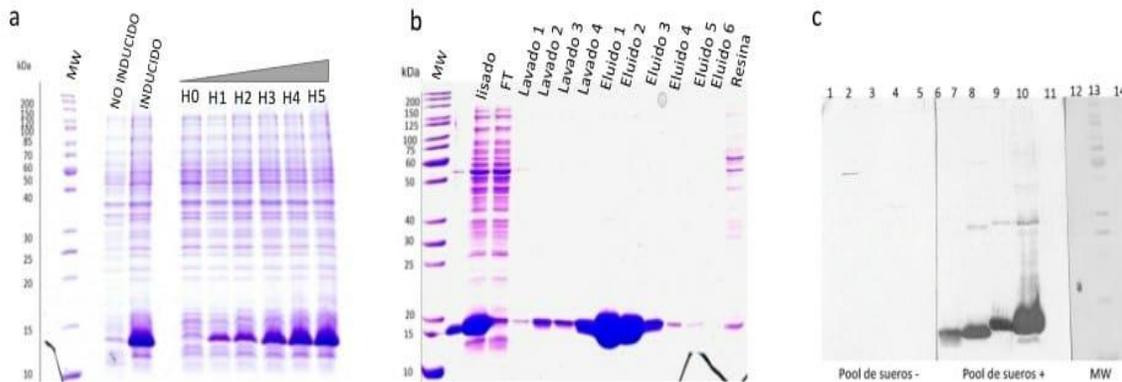


Figura 4. Producción de la proteína recombinante Blo t 21. (a). SDS-PAGE 15% de la expresión de rBlo t 21 pET 45 b+ en *E. coli* BL21 (DE3), nótese la cinética de expresión donde se observa que la expresión óptima se obtiene a las 5 horas; **(b).** SDS-PAGE 15% de la purificación de rBlo t 21 pET 45 b+ con la resina de níquel, Ni-NTA Agarose Qiagen (cat. 30230); **(c).** Western blot de la rBlo t 21 pET 45 b+ probado con sueros de humanos sensibilizados a *B. tropicalis* (pool de sueros +) o solución salina tamponada con fosfato (PBS) (pool de sueros -). Abreviaturas: MW: Marcador de peso molecular 26614 (Thermo unstained Protein ladder); H0: hora cero, H1: hora 1, H2: hora 2, H3: hora 3, H4: hora 4, H5: hora 5; FT: flow through.

11.2 La contraparte natural de rBlo t 21 está presente dentro del extracto de *B. tropicalis*

El rBlo t 21-opt purificado inhibió alrededor del 40 % de la unión de IgE al extracto de *B. tropicalis*, según se determinó en la inhibición del ensayo inmunoabsorbente

ligado a enzimas (ELISA) (**Figura 5**). Además, se realizó un punto de inhibición con 100 µg/ml de extracto de heces de *B. tropicalis*, encontrando que rBlo t 21 inhibió alrededor del 24,3% de la unión de IgE al extracto de heces de *B. tropicalis* (datos no graficados).

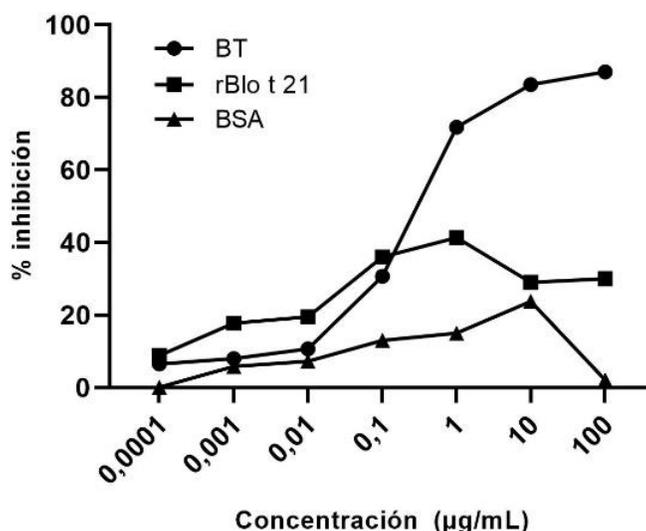


Figura 5. Inhibición del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) usando un pool de sueros con IgE positiva para *B. tropicalis*; extracto de *B. tropicalis* en fase sólida.

11.3 rBlo t 21 se une a IgE en sueros de individuos humanos sensibilizados e induce activación de basófilos

Se encontró que rBlo t 21-opt en este trabajo es reconocida por la IgE de los sueros de los individuos sensibilizados a Blo t 21 y no en los sueros de los individuos no sensibilizados (**Figura 6**). El punto de corte obtenido en el sistema de ELISA fue de OD > 0,11. Se encontró que, de los 22 individuos, 95,4 % (21) tienen positividad en IgE específica a rBlo t 21 (**Tabla 4**).

Tabla 4. Características de las muestras utilizadas para medir niveles de IgE

| CODIGO | SEXO | EDAD | DX | IgE a Blo t 21 (OD) | SPT Blo t 21 |
|--------|------|------|----|---------------------|--------------|
| Bt1 | F | 26 | RA | 0,141 | POSITIVO |
| Bt4 | M | 20 | AS | 0,197 | POSITIVO |
| Bt5 | F | 43 | RA | 0,091 | NEGATIVO |

| | | | | | |
|------|---|----|----|-------|----------|
| Bt6 | F | 24 | RA | 0,112 | POSITIVO |
| Bt8 | M | 25 | AS | 0,150 | POSITIVO |
| Bt9 | F | 17 | RA | 0,114 | POSITIVO |
| Bt10 | F | 17 | AS | 0,234 | POSITIVO |
| Bt12 | F | 26 | AS | 0,115 | POSITIVO |
| Bt14 | M | 24 | RA | 0,194 | POSITIVO |
| Bt16 | F | 38 | AS | 0,122 | POSITIVO |
| Bt18 | F | 29 | AS | 0,333 | POSITIVO |
| Bt19 | F | 20 | RA | 0,167 | POSITIVO |
| Bt20 | M | 26 | RA | 0,167 | POSITIVO |
| Bt21 | F | 37 | RA | 0,350 | POSITIVO |
| Bt22 | F | 36 | RA | 0,140 | POSITIVO |
| Bt23 | F | 38 | RA | 0,133 | POSITIVO |
| Bt25 | F | 37 | RA | 0,165 | NEGATIVO |
| Bt26 | M | 33 | RA | 0,165 | POSITIVO |
| Bt28 | M | 10 | RA | 0,278 | POSITIVO |
| Bt29 | M | 25 | CS | 0,993 | NEGATIVO |
| Bt30 | F | 36 | RA | 0,107 | POSITIVO |
| Bt31 | M | 25 | RA | 0,127 | POSITIVO |
| Bt32 | F | 32 | CS | 0,089 | NEGATIVO |
| Bt33 | M | 35 | AS | 0,324 | POSITIVO |
| Bt34 | F | 22 | CS | 0,091 | NEGATIVO |
| Bt35 | F | 35 | RA | 0,242 | POSITIVO |
| Bt36 | M | 22 | RA | 0,218 | POSITIVO |
| Bt37 | F | 35 | CS | 0,096 | NEGATIVO |
| Bt38 | F | 27 | CS | 0,088 | NEGATIVO |
| Bt39 | F | 65 | CS | 0,088 | NEGATIVO |
| Bt40 | M | 27 | CS | 0,090 | NEGATIVO |

Abreviaturas: M: masculino; F: femenino; DX: diagnóstico; AR: rinitis alérgica; AS: asma; CS: control sano; SPT: prueba epicutánea alergia; las muestras C1-C3 corresponden a donantes sanos que se usaron para determinar el punto de corte del ensayo. las 3 últimas muestras fueron tomadas de voluntarios no alérgicos para establecer el punto de corte del ensayo y no incluidos en los análisis estadísticos posteriores

Para evaluar la actividad alérgica de rBlo t 21 se realizó la determinación de la frecuencia de unión de la inmunoglobulina E (IgE) mediante realización de SPT y ELISA indirecto a 27 individuos de la ciudad de Cartagena con diagnóstico previo de asma y/o rinitis, cuyos síntomas se exacerbaban al exponerse al polvo doméstico y 4 controles sanos no alérgicos. **(Tabla 5).**

De los 27 pacientes alérgicos a *B. tropicalis*, 23 (85.2%) mostraron una SPT positiva a rBlo t 21. La media del tamaño de la pápula entre los positivos para rBlo t 21 fue de 9,83 mm, como se observa en la **Figura 7 b-c** el diámetro de la pápula inducido

paciente BT 36 (% activación 60), el cual estaba altamente sintomático al momento de la prueba, presentando además un nivel de activación basal de basófilos relativamente elevada con relación al resto de pacientes, pero por debajo del punto de corte establecido (15%). No se observó activación en las células de los 3 controles no sensibilizados con rBlo t 21 (representados en color verde en la **Figura 8 b**).

Tabla 5. Características sociodemográficas de la población de estudio pruebas de unión a IgE

| Característica | Alérgicos (n:27) | Sanos (n: 4) |
|--------------------------------|------------------|--------------|
| Edad en años (rango) | 29,4 (10-43) | 28,5 (22-35) |
| Sexo M [n (%)] | 10 (37) | 1(25) |
| Diagnostico [n (%)] | | |
| Asma | 7 (25,9) | 0(0) |
| Rinitis | 20 (74,1) | 0(0) |
| Sensibilización a BT (%) | 24 (88.9) | 1(25) |
| Sensibilización a Blo t 21 (%) | 23 (85.2) | 0 (0) |

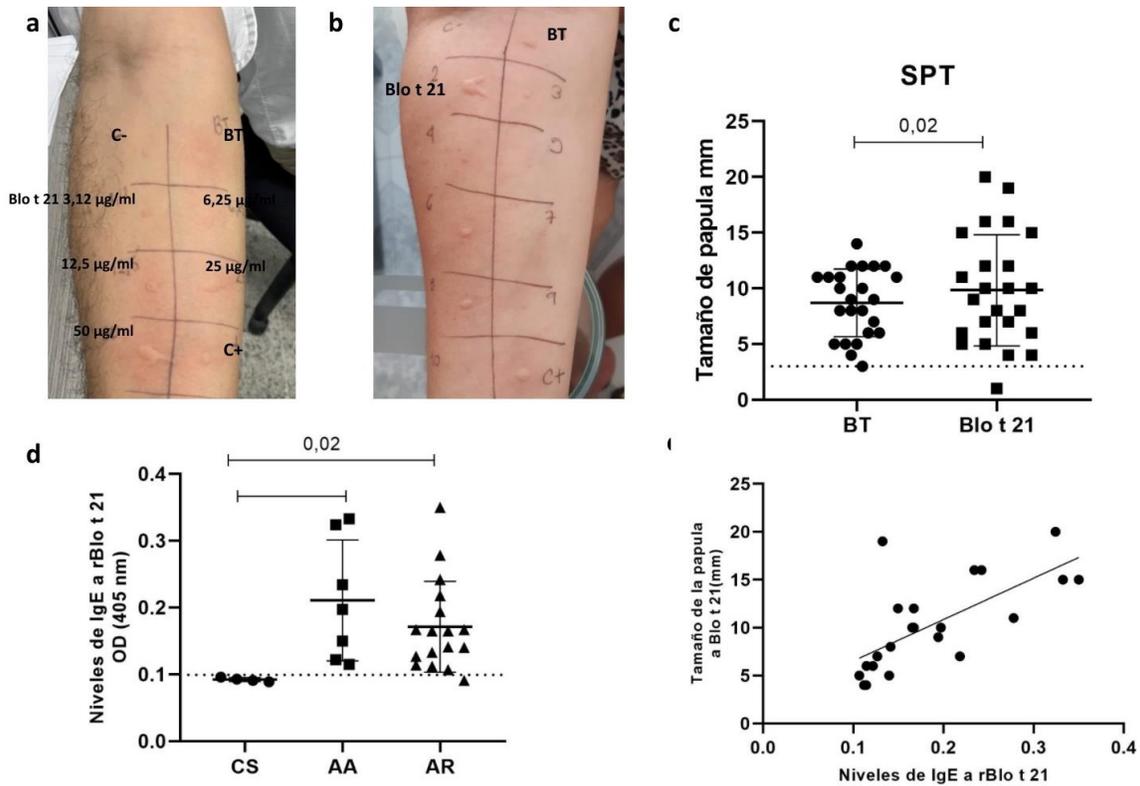


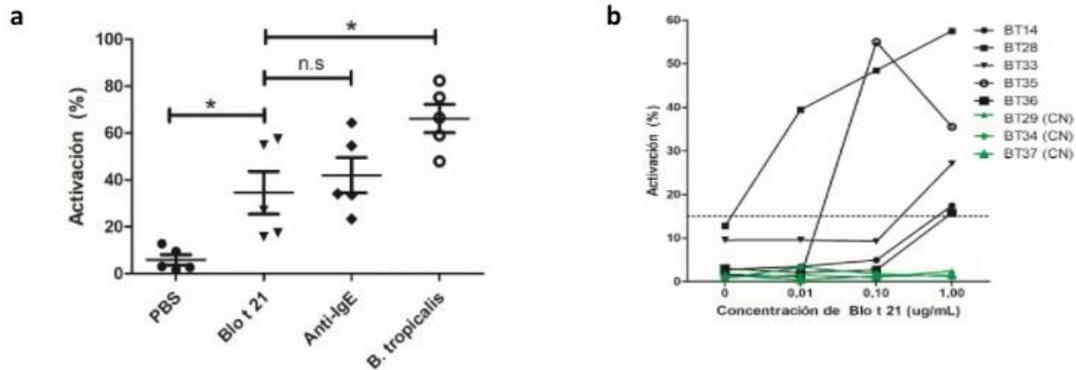
Figura 7. Evaluación de la actividad alérgica a rBlo t 21 mediante SPT. (a). Titulación del extracto glicerinado; **(b).** características de la pápula de rBlo t 21; **(c).** Positividad de la SPT, de los sujetos positivos al extracto de *B. tropicalis* solo uno no fue positivo a rBlo t 21(%) la línea punteada corresponde al punto de corte de 3 mm de tamaño de la paula para considerar positiva la prueba (se tomaron los valores corregidos posterior a restar el valor obtenido con el control negativo); **(d).** Niveles de IgE específica a rBlo t 21 medida por ELISA indirecto en los diferentes grupos de pacientes (línea punteada corresponde al punto de corte para positividad establecido en 0,98 medido a una OD de 405 nm); **(e).** Análisis de correlación entre los resultados obtenidos en la SPT y los niveles de IgE a rBlo t 21 por ELISA, todos los pacientes con SPT positiva tuvieron niveles de IgE medidos a una OD de 405 nm por encima del punto de corte establecido para considerarse positivos (r de 0,683 p : 0,0005). Abreviaturas: BT: extracto de *B. tropicalis*; CS: controles sanos; AA: asma alérgica; AR: rinitis alérgica; SPT: prueba epicutánea de alergia; mm: milímetros.

11.4 rBlo t 21 no induce inflamación en las vías aéreas en un modelo de sensibilización en ratones

11.4.1 Ausencia de hiperactividad bronquial ante el reto con metacolina.

No se encontraron diferencias significativas en los valores de Penh entre los grupos de ratones no sensibilizados (PBS) y los que recibieron rBlo t 21. Los ratones

tratados con extracto de *B. tropicalis* mostraron hiperreactividad bronquial significativamente mayor a la dosis de 25 mg/mL de metacolina comparado con los ratones del grupo PBS (**Figura 12 b**).



11.4.2 Ausencia de infiltrado eosinofílico en BAL en ratones tratados con rBlo t 21

Los análisis de citometría de flujo indican que el grupo tratado con rBlo t 21 no tuvo diferencias significativas con relación al PBS en el número de eosinófilos, neutrófilos ni macrófagos alveolares, el grupo de ratones inmunizados con *B. tropicalis* mostró un número significativamente mayor de eosinófilos que los otros dos grupos (**Figura 9 c**) y no mostró cambios significativos en el recuento de neutrófilos, macrófagos alveolares (**Figura 9 d**). La estrategia de selección usada en este experimento se muestra en la **Figura S1** a partir de las células CD45+ que incluyeron macrófagos alveolares, eosinófilos y neutrófilos.

Estos resultados sugieren que rBlo t 21 no induce inflamación alérgica de las vías respiratorias en los ratones inmunizados y desafiados con este alérgeno.

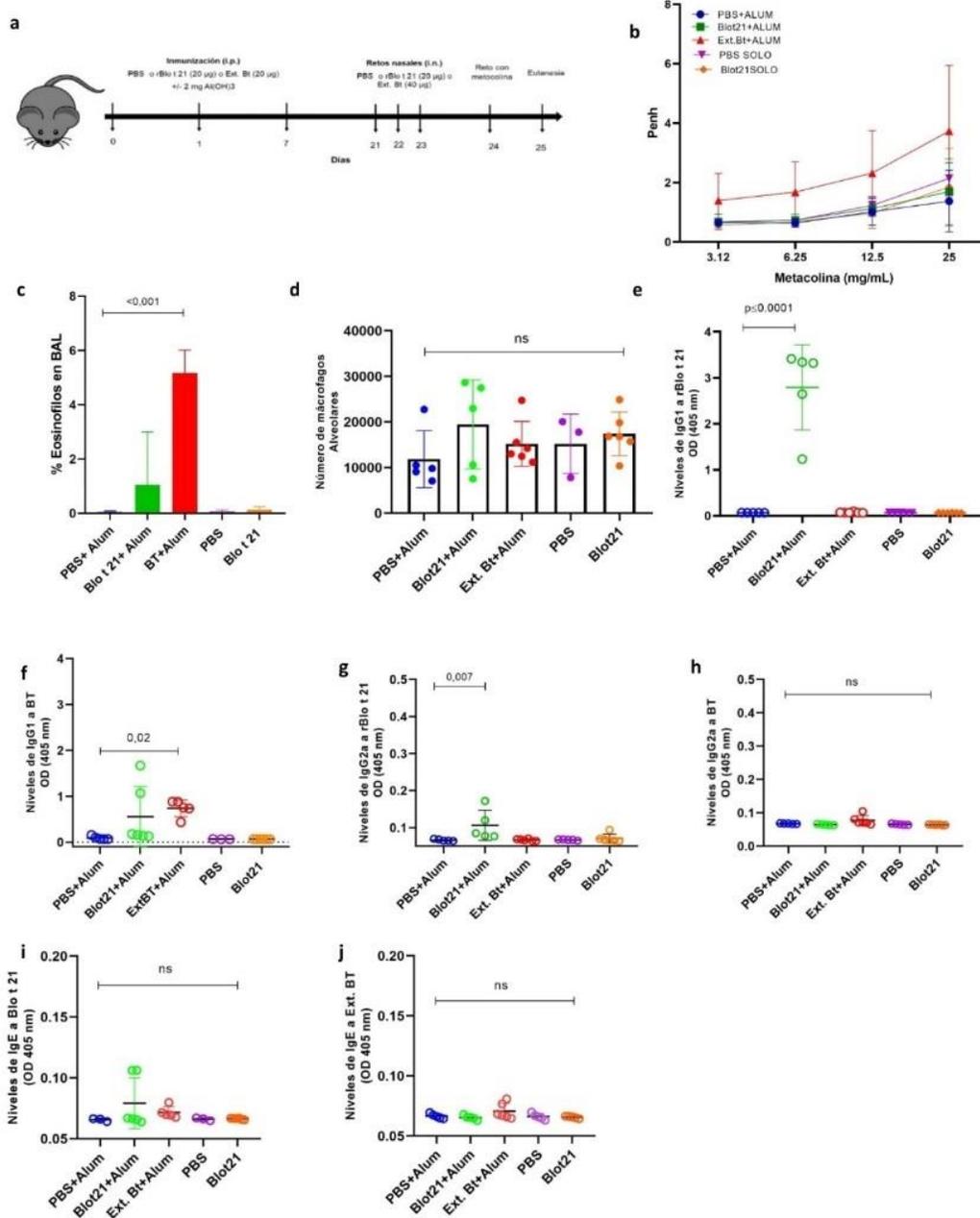


Figura 9. Modelo de inflamación de las vías respiratorias en ratón por HDM. (a) Se sensibilizaron 5 grupos de ratones BALB/c por vía intraperitoneal con rBlo t 21, extracto de *B. tropicalis* o PBS adsorbidos o no en alumbre en los días 0, 7, 14. Los días 21, 22 y 23 se retó por vía intranasal a cada grupo con su estímulo específico, y se sacrificaron 24 h después del reto con metacolina (b) Los gráficos de líneas muestran la resistencia de las vías respiratorias en respuesta a dosis crecientes de metacolina. (c) Porcentaje de eosinófilos en BAL (n= 4-6 ratones por grupo). (d) Número total de macrófagos alveolares en BAL (n= 4-6 ratones por grupo). (e) Los niveles de IgG1 específica de Blo t 21. (f) Niveles de IgG1 específica de extracto de *B. tropicalis*. (g) Niveles de IgG2a específica de Blo t 21. (h) Niveles de IgG2a específica de *Blomia tropicalis*. (i) Niveles de IgE específica de *Blomia tropicalis*. (j) Niveles de IgE específica de *Blomia tropicalis*; todos los anticuerpos se midieron en suero de ratones mediante ELISA, los resultados se muestran como la absorbancia a 405 nm (valor OD 405). Las barras

y las barras de error representan la media \pm desviación estándar; se representa el valor de *p* solo cuando es estadísticamente significativa por *T* de Student para datos no apareados o ANOVA unidireccional con análisis post hoc de Dunnett para la comparación de los datos entre los grupos. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

11.4.3 La respuesta humoral inducida por rBlo t 21 sugiere la necesidad de un adyuvante para su polarización TH2

Se midió la reactividad de las inmunoglobulinas IgG1, IgG2a e IgE de ratón contra rBlo t 21 mediante ELISA, se encontró que este alérgeno unido al adyuvante alum induce un aumento significativo en la IgG1 cuando se compara con el grupo PBS y además el aumento es mayor que el inducido por el extracto de la *B. tropicalis* (**Figura 9 e**); mientras que los títulos de anticuerpos IgG2a en los ratones tratados con rBlo t 21 + alum fueron significativamente más altos que en los otros grupos no fueron lo suficientemente elevados para considerarse positivos (**Figura 9 g**).

En los ratones inmunizados con rBlo t 21 + alum se observaron anticuerpos IgG1 contra *B. tropicalis*, en los ratones inmunizados con el extracto de *B. tropicalis* no se observaron anticuerpos IgG1 contra rBlo t 21 (**Figura 9 h**). Estos resultados sugieren que rBlo t 21 + alum induce una respuesta humoral polarizada al fenotipo TH2, mas no lo hace sin un adyuvante, lo cual podría considerarse un componente importante en su actividad alérgica.

Los niveles de anticuerpos IgE en los ratones inmunizados con Blo t 21 (**Figura 9 i**) y con el extracto de *B. tropicalis* (**Figura 9 j**) en el grupo experimental no fueron significativamente diferentes a los ratones del grupo PBS, solo 2 ratones del grupo inmunizado con Blo t 21 + alum tuvieron un nivel de anticuerpos IgE significativamente más altos que los demás grupos.

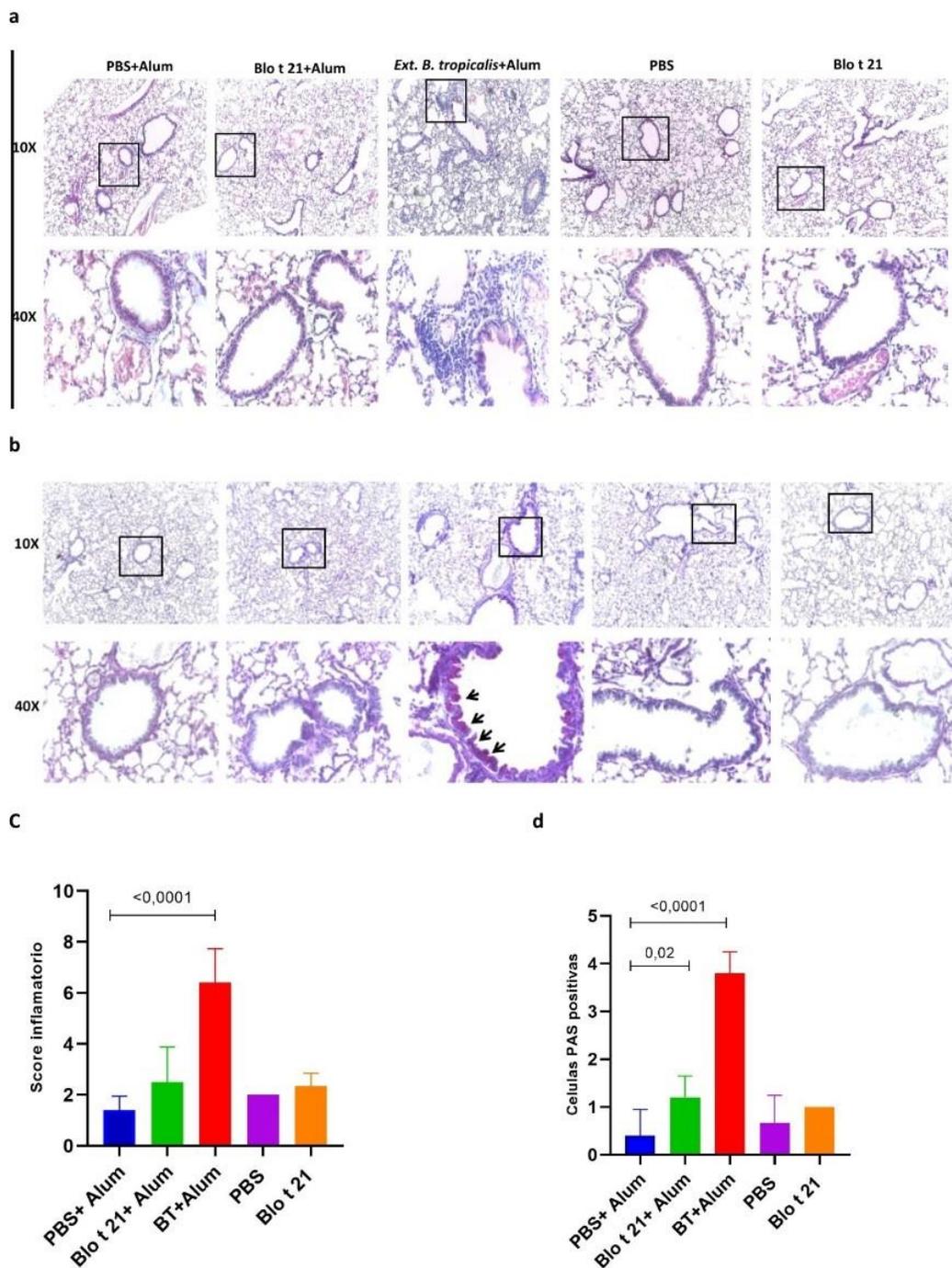


Figura 10. Análisis histológico de pulmones del modelo de inflamación alérgica. (a). Análisis histológicos en cortes de tejido pulmonar. Se muestran microfotografías representativas (x10 fila superior y x40 fila inferior) de la inflamación PB o PV teñidos con H/E. **(b)** Microfotografías representativas (x10 fila superior y x40 fila inferior) tinción con PAS que se observan en color magenta (flechas). **(c).** Puntuación total de la inflamación pulmonar de los análisis histológicos mediante tinción con HE de los cortes de tejido pulmonar. **(d).** Puntuación de células PAS positivo de los análisis histológicos mediante tinción con ácido peryodico de shift

de los cortes de tejido pulmonar. Las barras y las barras de error representan la media \pm desviación estándar ANOVA unidireccional con análisis post hoc de Dunnet para la comparación de los datos entre los grupos. Los valores de media \pm desviación estándar se muestran para 4-6 ratones por grupo. Se colocan los valores de cuando esta es estadísticamente significativa. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

11.4.3 rBlo t 21 no induce inflamación tisular, pero induce leve hipersecreción de moco en las vías respiratorias.

El análisis histológico de los pulmones de los ratones tratados con rBlo t 21 muestra que no hubo cambios significativos en respuesta inflamatoria tisular según se observó en el infiltrado peribronquial y perivascular en comparación con los ratones tratados con PBS, aunque el grupo tratado con rBlo t 21 + alum mostraron valores más elevados en estas mediciones sin alcanzar la significancia estadística (**Figura 10 a-c**), se observa que rBlo t 21 + alum presenta un conteo mayor de células PAS positivas en los análisis histológicos que el grupo tratado con PBS (**Figura 10 b-d**). Se observó en los ratones tratados con el extracto de *B. tropicalis* una respuesta inflamatoria tisular con un alto contenido en infiltrado peribronquial y perivascular en comparación con los otros grupos.

12. Discusión

B. tropicalis es el HDM con mayor prevalencia de sensibilización en Colombia y varios países del trópico [24, 25, 56, 57, 59], el conocimiento sobre la actividad alérgica de sus componentes de unión a IgE aún es limitado, no estando totalmente definido que componentes deben incluirse en una batería para DBC [59], lo que dificulta el manejo de la alergia con enfoque en la medicina de precisión. En este estudio evaluamos la actividad alérgica de Blo t 21 mediante diferentes métodos experimentales. Los resultados obtenidos indican que este alérgeno es capaz de inducir reacciones clínicas importantes en los individuos sensibilizados.

Si bien la frecuencia de unión de anticuerpos IgE específicos es necesaria, esta no es suficiente para que un alérgeno sea clínicamente relevante, el impacto clínico de

la alergia a HDM se debe documentar por experimentos de provocación en modelos humanos y animales [26];

La primera parte de este trabajo consistió en optimizar la producción del recombinante de Blo t 21 para los experimentos que permitieran evaluar la actividad alérgica del mismo. Optimizamos la expresión de la proteína rBlo t 21 en condiciones nativas a partir de una clona de *E. coli*, en el vector pET 45 b +, logrando un recombinante sin péptido señal y con menos aminoácidos adicionales, características que lo hacen más similar a la proteína natural que el recombinante del cual disponíamos en el I.I.I, con buen rendimiento y alta pureza como se muestra en la **Figura 7 b**. Las proteínas recombinantes obtenidas en bacterias gram negativas como la *E. coli* generalmente contienen altos niveles de lipopolisacárido (LPS) o endotoxina. La exposición experimental a LPS ha generado algunos resultados contradictorios, a veces opuestos, en las respuestas del huésped a la estimulación con alérgenos [83]. El LPS es un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP) que dependiente de la concentración es capaz de inducir una respuesta inmune innata al interactuar con el receptor TLR-4 induciendo la secreción de citocinas proinflamatorias [84, 85]. Por tanto, es importante disminuir los niveles de endotoxina en las preparaciones de recombinantes con el fin de evitar respuestas inmunitarias por el efecto del LPS en los cultivos celulares o en experimentos in vivo, con este fin en este estudio utilizamos un método basado en hacer correr la muestra a través una matriz de afinidad que contiene polimixina B modificada (PMB) y así logramos disminuir eficazmente los niveles de endotoxinas del recombinante en 97,1%, posterior a 3 ciclos de remoción; la proteína administrada en los ratones a una concentración 20-25 µg/100 µL contenía 2,83 UE, se ha establecido un límite para el nivel de endotoxina aceptado en las soluciones a administrar en ratones de experimentación para vacunas por cualquier vía de 1,5 UE/mL [86], sin embargo el límite es un poco mayor en los fármacos probados en ratones en fases preclínicas los cuales contienen hasta 3 UE/mL[87]; se puede concluir que en nuestro estudio los niveles de endotoxina administrados son bastante reducidos y aceptables, teniendo en cuenta que, en condiciones naturales la exposición a los extractos y alérgenos se hace en un contexto donde también

existen niveles de endotoxina, ya que al igual que los aeroalergenos, el LPS es omnipresente en nuestro entorno de vida, incluso, estudios de la microbiota en extractos de HDM se asociaron con miembros de bacterias gram negativas [88].

Los experimentos de inhibición ELISA mostraron que rBlo t 21 inhibe alrededor del 40 % de la capacidad de unión de IgE de los sueros de pacientes dirigidos contra el extracto de *B. tropicalis* lo que indica que la respuesta a Blo t 21 puede ser aproximadamente más de una tercera parte de la reactividad total del extracto, lo que respalda la utilidad potencial de Blo t 21 en matrices para el diagnóstico resuelto por componentes y en vacunas para la alergia a el *HDM* con más prevalencia en nuestro medio *B. tropicalis*.

De los voluntarios con diagnóstico previo de asma o rinitis alérgica que participaron en este estudio 88,9% presento una SPT positiva para *B. tropicalis*, y entre estos el 85,2% estaba sensibilizado al componente Blo t 21-opt. Aunque el tamaño de muestra es pequeño para definir prevalencia, estos hallazgos sugieren que hay una sub-estimación de las cifras de prevalencia de sensibilización al usar la versión recombinante Blo t 21/pET100.

La prueba de activación de basófilos es una prueba de provocación in vitro [59] que depende tanto de la reactividad como de la sensibilidad, una BAT con alergenos moleculares no solo identifica el alergeno al que el paciente está sensibilizado por IgE, sino también la actividad alérgica de estos anticuerpos IgE específicos. Un alergeno induce una respuesta en los basófilos a través de FcεRI (esta es la reactividad de los basófilos), en concentraciones en las que los pacientes no alérgicos no reaccionarían (esta es la sensibilidad de los basófilos). Se ha demostrado que la reactividad de los basófilos se correlaciona con los síntomas [89] y aumenta en las exacerbaciones de asma [90]; en este estudio demostramos que rBlo t 21 induce activación de basófilos en los pacientes alérgicos sensibilizados, medida por la sobrerregulación del marcador CD63 [78, 91] al comparar el porcentaje de activación [92] tomando como punto de corte el ya establecido de 15% [78], pero no lo hace con los controles sanos. Esto sugiere la capacidad de Blo

t 21 de generar inflamación en el contexto de enfermedades alérgicas como el asma y la rinitis.

A pesar de opiniones de algunos investigadores sobre la limitada confiabilidad predictiva de los modelos de asma en ratones [93], mediante estos modelos se ha podido definir mejor la respuesta inflamatoria a los antígenos y los aeroalergenos aun estando lejos de ser réplicas perfectas del asma humana; confirmar que experimentalmente un alérgeno es capaz de inducir inflamación de las vías respiratorias en modelos animales de asma alérgica apoya la hipótesis de relevancia clínica de este alérgeno [59]. La caracterización de las moléculas de unión a IgE de *B. tropicalis* mediante modelos de inflamación alérgica de las vías respiratorias se ha realizado para los componentes Blo t 12 [79], Blo t 5 [94], Blo t 8 [65] y más recientemente en el III Blo t 2 [67] y Blo t 13 [66]; en esta tesis informamos el primer modelo animal experimental que evaluó la inflamación de las vías respiratorias inducida por el componente Blo t 21 en ratones Balb/c.

El protocolo de inmunización con rBlo t 21, con o sin alum, no generó hiperreactividad bronquial al reto con metacolina en las pruebas de función pulmonar; el valor de Penh es una medida indirecta que mide el cambio de presión en el flujo de aire dentro de una cámara (flujo de caja) debido a la respiración del animal [95]. Este medida puede afectarse por factores como el estrés del animal, el calentamiento o la humidificación de la cámara [96] haciendo que con frecuencia se obtengan valores atípicos o inesperado, se observaron valores basales y posterior al reto con metacolina de Penh en algunos ratones del grupo PBS bastante elevados por lo que no se observaron diferencias significativas en la medición de la resistencia a la vía aérea en relación con el grupo inmunizado con rBlo t 21, cabe anotar que estos ratones que mostraron hiperreactividad de la vía aérea no tuvieron otras características de asma alérgica en los demás experimentos realizados. La realización de pruebas de función pulmonar que midan directamente la resistencia a la vía aérea [97], o la realización de modelos de asma que incorporen exacerbaciones inducidas por patógenos, incluidos el tabaco, los virus respiratorios

y las bacterias permitiría tener una mayor certeza de los resultados de esta medición.

Consistentemente con los hallazgos de la pletismografía, rBlo t 21 tampoco indujo una respuesta inflamatoria de tipo Th2, aumento en el número de eosinófilos en el BAL, presencia de infiltrado celular inflamatorio, aumento en el número de células calciformes en los pulmones, producción de anticuerpos IgG1 ni IgE específicos, aunque en todos los casos hubo una medición superior al grupo de control negativo, esta no fue estadísticamente significativa; un hallazgo interesante fue observar que los ratones tratados con rBlo t 21 + alum tuvieron un aumento en la producción de moco pulmonar demostrado por el aumento del número de células calciformes en los cortes histológicos pulmonares, este es uno de los cambios que conducen a la remodelación en los pulmones característicos de asma, junto con la hipertrofia del músculo liso, fibrosis subepitelial, y la deposición de colágeno [98]; además, estos ratones tuvieron altos niveles de anticuerpos IgG1 junto con niveles significativamente más bajos de anticuerpos IgG2a, lo cual sugiere la capacidad de rBlo t 21 para inducir una respuesta humoral polarizada hacia el fenotipo Th2, siempre y cuando este acompañado con un adyuvante, en este caso hidróxido de aluminio, esto difiere a lo observado con otros componentes como Blo t 12, el cual en un modelo murino de asma alérgica igual al realizado en este trabajo, indujo inflamación alérgica al inmunizar los ratones con o sin el uso de alum como adyuvante. [79]

El hidróxido de aluminio (alum) es un conocido adyuvante que proporciona una inmunogenicidad mejorada e inducción de inflamación proalérgica de tipo II [99], por su efecto depósito, activación del inflammasoma (NALP3/NLRP3) [100] lo que resulta en la producción de IL-1, IL-13 e IL-18. [101], mejorar en la captación y presentación de antígenos a CPA [102] [103].

Cabe destacar que alergenos rBlo t 21 se preparó en base a una traducción directa de su información genómica, *in vivo*, los alergenos sufren modificaciones antes de entrar en contacto con las células del hospedero. Algunas de las modificaciones son procesos bioquímicos intracelulares bien caracterizados conocidos como

modificaciones co-traduccionales o postraduccionales, como homo y heterooligomerización, glicosilación, escisión de un péptido líder, propéptido y otros eventos proteolíticos, unión de cofactores metálicos o ligandos orgánicos y oxidación de prolina a hidroxiprolina; otros se deben a procesos extracelulares más aleatorios, a menudo influenciados por las condiciones ambientales (humedad, UV, ozono). Estas modificaciones de la estructura del alérgeno pueden aumentar su alérgenicidad, aunque este tema requiere de mayor investigación. [104]

Por otra parte, contrario a lo que se hace en los modelos de inflamación experimental, los componentes alérgicos no ingresan al individuo genéticamente predispuestos como una molécula aislada, lo hacen en conjunto con otras proteínas, alérgenos y heces; las heces de HDM tienen enzimas con actividad proteolítica, capaces de degradar una amplia gama de sustancias, incluidas otras proteínas y alérgenos, que parece jugar un papel importante en la alérgenicidad de ciertos ácaros, ya que puede facilitar el acceso del alérgeno al sistema inmunológico y tiene un papel coadyuvante proalérgico influyendo en su inmunogenicidad [105]. Los alérgenos con actividad enzimática se encuentran en los grupos 1, 3, 4, 6, 8, 9, 15, 18 y 20 [106, 107]. Mientras que las proteasas de serina (tripsina y quimotripsina) parecen ser más abundantes en los extractos fecales que en los de cuerpo entero [108]. Estas enzimas proteolíticas al interactuar con la elastasa pulmonar, inactivan un inhibidor de la elastasa humana *in vivo*, el cual tiene actividad antimicrobiana y antielastasa; la inactivación de estos componentes innatos del sistema de defensa pulmonar puede aumentar la susceptibilidad de los pacientes con inflamación alérgica a las infecciones y, por lo tanto, exacerbar las enfermedades respiratorias alérgicas [109].

Por último, en nuestro medio tropical es posible estar expuesto a un número variable de epítomos de al menos 40 componentes alérgicos potenciales de los ácaros; además, se sabe que el genotipo individual y la exposición a otras condiciones ambientales influyen en la respuesta inmunitaria final [16]; todo lo anterior puede explicar en parte porque rBlo t 21 a pesar de demostrar en este estudio características que indican su actividad alérgica, como capacidad de inducir una

fuerte y frecuente respuesta IgE en humanos expuestos a *B. tropicalis* y su capacidad de generar activación celular, no indujo inflamación alérgica pulmonar en ratones, probablemente, por la necesidad de un cofactor que estaría presente en la sensibilización natural y puede potenciar su actividad alérgica; aunque sería interesantes teniendo en cuenta la alta co-sensibilización con Blo t 5 realizar estudios locales de reactividad cruzada con este componente.

Los ratones inmunizados con el extracto de *B. tropicalis* no desarrollaron anticuerpos IgG1, IgG2a ni IgE contra rBlo t 21, a pesar de haber demostrado en este mismo estudio que el alérgeno Blo t 21 está bien representado en el extracto utilizado para inmunizar a los ratones; una explicación sería que los niveles de anticuerpos en suero de los ratones inmunizados con rBlo t 21 podrían estar por debajo de los niveles detectables por el ensayo [34]. Estos resultados indican que es pertinente y de gran valor realizar medición de citoquinas Th2 en las muestras biológicas conservadas de estos ratones, para confirmar el tipo de respuesta observada.

Los resultados de modelos animales de inflamación alérgica de las vías respiratorias con alérgenos como Blo t 5 [110], rBlo t 8 [111], rBlo t 2 [67] y rBlo t 13 [66], muestran diferencias significativas en la inflamación de la vía respiratoria y la hiperreactividad bronquial y respuesta humoral entre los grupos experimentales tratados con el alérgeno al compararlos con los controles negativos. En este trabajo no encontramos que *in vivo* rBlo t 21 causara inflamación en un modelo murino, lo cual puede indicar que este alérgeno no tiene una actividad intrínseca que estimule componentes de la respuesta inmune innata, sin embargo, los modelos deben continuarse explorando a dosis mayores del alérgeno en la inmunización o investigando la interacción de este alérgeno con otros componentes de unión a IgE u otros tipos de adyuvantes.

Los hallazgos de esta investigación respaldan la importancia clínica de rBlo t 21 en la presentación de asma, por lo que se podría recomendar seguir usando en paneles diagnósticos, para ayudarnos a identificar con gran sensibilidad la alergia a *B.*

tropicalis, en combinación con otros componentes de unión a IgE de este acaro [112] y para uso de vacunas de IEA.

13. Conclusiones

- Blo t 21 tiene actividad alérgica en humanos.
- El estudio con ratones sugiere que Blo t 21 solo no tiene la capacidad de inducir inflamación de la vía aérea ni hiperreactividad bronquial al reto con metacolina.

14. Perspectivas futuras

1. Estudiar la respuesta IgE total a rBlo t 21 y su relación con el posible efecto de la sensibilización con el desarrollo de asma.
2. Realización de pruebas *in vivo* de provocación como estimulación conjuntival o nasal en humanos, así como la prueba de anafilaxia cutánea pasiva en ratones
3. Medir los niveles de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) y de alarminas en sobrenadantes de cultivos de células de bazo y BAL, que se mantienen congelados, lo cual permitiría definir mejor el tipo de perfil que induce el alérgeno Blo t 21.
4. Realización de pruebas de reactividad cruzada entre Blo t 21 y Blo t 5 en individuos de nuestra región.

15. Bibliografía

1. Bousquet, J., R. Dahl, and N. Khaltaev, *Global alliance against chronic respiratory diseases*. *Pneumonologia i alergologia polska*, 2008. **76**(3): p. 160-169.
2. Eder, W., M.J. Ege, and E. von Mutius, *The asthma epidemic*. *New England Journal of Medicine*, 2006. **355**(21): p. 2226-2235.
3. Dennis, R.J., et al., *Prevalence of asthma and other allergic conditions in Colombia 2009–2010: a cross-sectional study*. *BMC pulmonary medicine*, 2012. **12**(1): p. 1-9.
4. Linneberg, A., et al., *Burden of allergic respiratory disease: a systematic review*. *Clinical and Molecular Allergy*, 2016. **14**(1): p. 1-14.
5. Tavakoli, H., et al., *Ten-year trends in direct costs of asthma: a population-based study*. *Allergy*, 2017. **72**(2): p. 291-299.
6. Dennis, R., et al., *Asthma and other allergic conditions in Colombia: a study in 6 cities*. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 2004. **93**(6): p. 568-574.
7. Erwin, E.A. and T.A. Platts-Mills, *Allergens*. *Immunology and Allergy Clinics*, 2005. **25**(1): p. 1-14.
8. Gandhi, V.D., et al., *House dust mite interactions with airway epithelium: role in allergic airway inflammation*. *Current allergy and asthma reports*, 2013. **13**(3): p. 262-270.
9. Sánchez-Borges, M., et al., *International consensus (ICON) on: clinical consequences of mite hypersensitivity, a global problem*. *World Allergy Organization Journal*, 2017. **10**(1): p. 1-26.
10. Calderón, M.A., et al., *Respiratory allergy caused by house dust mites: What do we really know?* *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2015. **136**(1): p. 38-48.
11. Marks, G., *House dust mite exposure as a risk factor for asthma: benefits of avoidance*. *Allergy*, 1998. **53**: p. 108-114.
12. Wang, J.-Y., *The innate immune response in house dust mite-induced allergic inflammation*. *Allergy, asthma & immunology research*, 2013. **5**(2): p. 68-74.
13. Möller, C., et al., *Pollen immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinoconjunctivitis (the PAT-study)*. *Journal of allergy and clinical immunology*, 2002. **109**(2): p. 251-256.
14. Valenta, R., et al., *The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT)*. *Clinical and experimental allergy*, 1999. **29**(7): p. 896-904.
15. Chung, K.F., *Precision medicine in asthma: linking phenotypes to targeted treatments*. *Current opinion in pulmonary medicine*, 2018. **24**(1): p. 4-10.
16. Caraballo, L., *Mite allergens*. *Expert Review of Clinical Immunology*, 2017. **13**(4): p. 297-299.
17. Caraballo, L., et al., *Identification of allergens from the mite *Blomia tropicalis**. *Clinical & Experimental Allergy*, 1994. **24**(11): p. 1056-1060.
18. da Silva, E.S., et al., *Proteomic analysis reveals allergen variability among breeds of the dust mite *Blomia tropicalis**. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2019. **180**(3): p. 159-172.
19. Breiteneder, H., et al., *Allergen nomenclature*, in *Allergens and Allergen Immunotherapy*. 2020, CRC Press. p. 49-63.
20. Berrens, L., *What is a 'major' allergen?* *Clinical & Experimental Allergy*, 1994. **24**(7): p. 606-609.
21. Jacquet, A., *Innate immune responses in house dust mite allergy*. *International Scholarly Research Notices*, 2013. **2013**.

22. Westritschnig, K., et al., *Different allergenic activity of grass pollen allergens revealed by skin testing*. European journal of clinical investigation, 2008. **38**(4): p. 260-267.
23. da Silva, E.S., et al., *Allergens of Blomia tropicalis: an overview of recombinant molecules*. International archives of allergy and immunology, 2017. **172**(4): p. 203-214.
24. Gao, Y.F., et al., *Identification and characterization of a novel allergen from Blomia tropicalis: Blo t 21*. Journal of allergy and clinical immunology, 2007. **120**(1): p. 105-112.
25. Tan, K.W., et al., *NMR structure and IgE epitopes of Blo t 21, a major dust mite allergen from Blomia tropicalis*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(41): p. 34776-34785.
26. Thomas, W.R., et al., *Pyroglyphid house dust mite allergens*. Protein and peptide letters, 2007. **14**(10): p. 943-953.
27. Stone, K.D., C. Prussin, and D.D. Metcalfe, *IgE, mast cells, basophils, and eosinophils*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2010. **125**(2): p. S73-S80.
28. Gregory, L.G. and C.M. Lloyd, *Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung*. Trends in immunology, 2011. **32**(9): p. 402-411.
29. Lambrecht, B.N. and H. Hammad, *The role of dendritic and epithelial cells as master regulators of allergic airway inflammation*. The Lancet, 2010. **376**(9743): p. 835-843.
30. Aalberse, R.C., *Structural biology of allergens*. Journal of allergy and clinical immunology, 2000. **106**(2): p. 228-238.
31. Matricardi, P.M. and J. Kleine-Tebbe, *Molecular allergology between precision medicine and the choosing wisely initiative*. 2016, Wiley Online Library. p. 664-667.
32. Kleine-Tebbe, J. and T. Jakob, *Molecular allergy diagnostics using IgE singleplex determinations: methodological and practical considerations for use in clinical routine*. Allergo journal international, 2015. **24**(6): p. 185-197.
33. Satitsuksanoa, P., et al., *The minor house dust mite allergen Der p 13 is a fatty acid-binding protein and an activator of a TLR2-mediated innate immune response*. Allergy, 2016. **71**(10): p. 1425-1434.
34. Matricardi, P., et al., *EAACI molecular allergology user's guide*. Pediatric Allergy and Immunology, 2016. **27**: p. 1-250.
35. Acevedo, N., et al., *Allergenicity of Ascaris lumbricoides tropomyosin and IgE sensitization among asthmatic patients in a tropical environment*. International Archives of Allergy and Immunology, 2011. **154**(3): p. 195-206.
36. Posa, D., et al., *Evolution and predictive value of IgE responses toward a comprehensive panel of house dust mite allergens during the first 2 decades of life*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2017. **139**(2): p. 541-549. e8.
37. Dhimi, S., et al., *Allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis: a systematic review and meta-analysis*. Allergy, 2017. **72**(11): p. 1597-1631.
38. Huang, Y., et al., *Efficacy and safety of subcutaneous immunotherapy with house dust mite for allergic rhinitis: a meta-analysis of randomized controlled trials*. Allergy, 2019. **74**(1): p. 189-192.
39. Shek, L.P.C., et al., *Specific profiles of house dust mite sensitization in children with asthma and in children with eczema*. Pediatric Allergy and Immunology, 2010. **21**(4p2): p. e718-e722.
40. Lynch, N.R., et al., *Association between allergic disease and reactivity to recombinant Der p 2 allergen of house dust mites in a tropical situation*. Journal of allergy and clinical immunology, 1998. **101**(4): p. 562-564.
41. Buendía, E., et al., *The IgE response to Ascaris molecular components is associated with clinical indicators of asthma severity*. World Allergy Organization Journal, 2015. **8**: p. 8.

42. Hales, B., et al., *Distinctive immunoglobulin E anti-house dust allergen-binding specificities in a tropical Australian Aboriginal community*. *Clinical & Experimental Allergy*, 2007. **37**(9): p. 1357-1363.
43. Cheong, N., et al., *Mite amylase from *Blomia tropicalis* (Blo t 4): differential allergenicity linked to geographical regions*. *International archives of allergy and immunology*, 2009. **149**(1): p. 25-32.
44. Jimenez, S., et al., *IgE antibody responses to recombinant allergens of *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus* in a tropical environment*. 2007.
45. Manolio, T.A., et al., *Sex differences in heritability of sensitization to *Blomia tropicalis* in asthma using regression of offspring on midparent (ROMP) methods*. *Human genetics*, 2003. **113**(5): p. 437-446.
46. Caraballo, L., et al., *Frequency of DPB1* 0401 is significantly decreased in patients with allergic asthma in a Mulatto population*. *Human immunology*, 1991. **32**(3): p. 157-161.
47. Caraballo, L., et al., *HLA-DR3 is associated with the IgE immune responsiveness to a recombinant allergen from *Blomia tropicalis* (BT)*, in *New Horizons in Allergy Immunotherapy*. 1996, Springer. p. 81-83.
48. Fernández-Caldas, E., et al., *Mite allergens*. Vol. 14. 2020: CRC Press Publishers Boca Raton, FL, USA.
49. Acevedo, N., et al., *Genetic variants in CHIA and CHI3L1 are associated with the IgE response to the ascaris resistance marker ABA-1 and the Birch pollen allergen Bet v 1*. *PloS one*, 2016. **11**(12): p. e0167453.
50. Shang, Y., et al., *Epigenetic alterations by DNA methylation in house dust mite-induced airway hyperresponsiveness*. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 2013. **49**(2): p. 279-287.
51. Puerta, L., et al., *Sequential determinations of *Blomia tropicalis* allergens in mattress and floor dust samples in a tropical city*. *Journal of allergy and clinical immunology*, 1996. **97**(2): p. 689-691.
52. Caraballo, L., et al., *Particularities of allergy in the Tropics*. *World Allergy Organization Journal*, 2016. **9**(1): p. 1-44.
53. Cao, H. and Z. Liu, *Clinical significance of dust mite allergens*. *Molecular Biology Reports*, 2020. **47**(8): p. 6239-6246.
54. Yan Chua, K., et al., *The *Blomia tropicalis* allergens*. *Protein and peptide letters*, 2007. **14**(4): p. 325-333.
55. Baqueiro, T., et al., *Dust mite species and allergen concentrations in beds of individuals belonging to different urban socioeconomic groups in Brazil*. *Journal of Asthma*, 2006. **43**(2): p. 101-105.
56. dos Anjos Carvalho, K., et al., **Blomia tropicalis* Blo t 5 and Blo t 21 recombinant allergens might confer higher specificity to serodiagnostic assays than whole mite extract*. *BMC immunology*, 2013. **14**(1): p. 1-9.
57. Caraballo, L., et al., *Sensitization to mite allergens and acute asthma in a tropical environment*. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*, 1998. **8**(5): p. 281-284.
58. Puccio, F., et al., *Importance of including *Blomia tropicalis* in the routine diagnosis of Venezuelan patients with persistent allergic symptoms*. *Allergy*, 2004. **59**(7): p. 753-757.
59. Caraballo, L., et al., *The allergenic activity and clinical impact of individual IgE-antibody binding molecules from indoor allergen sources*. *World Allergy Organization Journal*, 2020. **13**(5): p. 100118.

60. Yi, F., et al., *Immunoglobulin E reactivity of native Blo t 5, a major allergen of Blomia tropicalis*. Clinical & Experimental Allergy, 2004. **34**(11): p. 1762-1767.
61. Arruda, K., et al., *Identification of Blomia tropicalis allergen Blo t 5 by cDNA cloning*. International archives of allergy and immunology, 1995. **107**(1-3): p. 456-457.
62. Kidon, M.I., et al., *Mite component-specific IgE repertoire and phenotypes of allergic disease in childhood: The tropical perspective*. Pediatric allergy and immunology, 2011. **22**(2): p. 202-210.
63. da Silva, E.S., et al., *A hybrid of two major Blomia tropicalis allergens as an allergy vaccine candidate*. Clinical & Experimental Allergy, 2020. **50**(7): p. 835-847.
64. Araujo, L., N. Rosario, and A. Mari, *Molecular-based diagnosis of respiratory allergic diseases in children from Curitiba, a city in Southern Brazil*. Allergologia et immunopathologia, 2016. **44**(1): p. 18-22.
65. Bustillo, J., et al., *Evaluation of the allergenic activity of the Glutathione Transferase from Blomia tropicalis (Blo t 8) in a mouse model of airway inflammation*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2019. **143**(2): p. AB187.
66. Donado Rangel, K.L., *Análisis de la actividad alérgica de rBlo t 13, un alérgeno recombinante del ácaro blomia tropicalis*. 2021, Universidad de Cartagena.
67. Mondol Miranda, E.C., *Determinación de la actividad alérgica de Blo t 2, un alérgeno del ácaro del polvo Blomia tropicalis*. 2021, Universidad de Cartagena.
68. Yu, X., N. Schneiderhan-Marra, and T.O. Joos, *Protein microarrays for personalized medicine*. Clinical chemistry, 2010. **56**(3): p. 376-387.
69. Passalacqua, G., E. Compalati, and G.W. Canonica, *Advances in allergen-specific immunotherapy*. Current drug targets, 2009. **10**(12): p. 1255-1262.
70. Van Ree, R., et al., *Measurement of IgE antibodies against purified grass pollen allergens (Lol p 1, 2, 3 and 5) during immunotherapy*. Clinical & Experimental Allergy, 1997. **27**(1): p. 68-74.
71. Chapman, M.D., et al., *Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease*. Journal of allergy and clinical immunology, 2000. **106**(3): p. 409-418.
72. Ma, Y., et al., *Comparison of natural and recombinant forms of the major fish allergen parvalbumin from cod and carp*. Molecular nutrition & food research, 2008. **52**(S2): p. S196-S207.
73. Melioli, G., et al., *The ImmunoCAP ISAC molecular allergology approach in adult multi-sensitized Italian patients with respiratory symptoms*. Clinical biochemistry, 2011. **44**(12): p. 1005-1011.
74. Heffler, E., et al., *Extended IgE profile based on an allergen macroarray: a novel tool for precision medicine in allergy diagnosis*. World Allergy Organization Journal, 2018. **11**(1): p. 1-8.
75. 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.
76. 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.
77. Lopez, J., et al. *Sensitization to Blomia tropicalis and Ascaris spp. components in recurrent wheezing children living in a tropical city*. in ALLERGY. 2019. WILEY 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA.
78. Sanz, M., et al., *Allergen-induced basophil activation: CD63 cell expression detected by flow cytometry in patients allergic to Dermatophagoides pteronyssinus and Lolium perenne*. Clinical & Experimental Allergy, 2001. **31**(7): p. 1007-1013.

79. Zakzuk, J., et al., *The influence of chitin on the immune response to the house dust mite allergen Blo T 12*. International archives of allergy and immunology, 2014. **163**(2): p. 119-129.
80. Lomask, M., *Further exploration of the Penh parameter*. Experimental and Toxicologic Pathology, 2006. **57**: p. 13-20.
81. Myou, S., et al., *Blockade of inflammation and airway hyperresponsiveness in immune-sensitized mice by dominant-negative phosphoinositide 3-kinase-TAT*. The Journal of experimental medicine, 2003. **198**(10): p. 1573-1582.
82. Tanaka, H., et al., *The effect of allergen-induced airway inflammation on airway remodeling in a murine model of allergic asthma*. Inflammation Research, 2001. **50**(12): p. 616-624.
83. Zhu, Z., et al., *Immunomodulating effects of endotoxin in mouse models of allergic asthma*. Clinical & Experimental Allergy, 2010. **40**(4): p. 536-546.
84. Park, B.S. and J.-O. Lee, *Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes*. Experimental & molecular medicine, 2013. **45**(12): p. e66-e66.
85. Giordano, N.P., M.B. Cian, and Z.D. Dalebroux, *Outer membrane lipid secretion and the innate immune response to Gram-negative bacteria*. Infection and Immunity, 2020. **88**(7): p. e00920-19.
86. Brito, L.A. and M. Singh, *Commentary: acceptable levels of endotoxin in vaccine formulations during preclinical research*. Journal of pharmaceutical sciences, 2011. **100**(1): p. 34-37.
87. Malyala, P. and M. Singh, *Endotoxin limits in formulations for preclinical research*. Journal of pharmaceutical sciences, 2008. **97**(6): p. 2041-2044.
88. Yahia, S.A., et al., *NOD1 sensing of house dust mite-derived microbiota promotes allergic experimental asthma*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2021. **148**(2): p. 394-406.
89. Ansotegui, I.J., et al., *IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper*. World allergy organization journal, 2020. **13**(2): p. 100080.
90. Ono, E., et al., *CD203c expression on human basophils is associated with asthma exacerbation*. Journal of allergy and clinical immunology, 2010. **125**(2): p. 483-489. e3.
91. Yoshimura, C., et al., *Activation markers of human basophils: CD69 expression is strongly and preferentially induced by IL-3*. Journal of allergy and clinical immunology, 2002. **109**(5): p. 817-823.
92. Sturm, E.M., et al., *CD203c-based basophil activation test in allergy diagnosis: characteristics and differences to CD63 upregulation*. Cytometry Part B: Clinical Cytometry, 2010. **78**(5): p. 308-318.
93. Persson, C.G., *Mice are not a good model of human airway disease*. American journal of respiratory and critical care medicine, 2002. **166**(1): p. 6-7.
94. Chua, Y.L., et al., *Blomia tropicalis-Specific TCR Transgenic Th2 Cells Induce Inducible BALB and Severe Asthma in Mice by an IL-4/IL-13-Dependent Mechanism*. The Journal of Immunology, 2016. **197**(10): p. 3771-3781.
95. Rosenberg, H.F. and K.M. Druey, *Modeling asthma: Pitfalls, promises, and the road ahead*. Journal of leukocyte biology, 2018. **104**(1): p. 41-48.
96. Sly, P.D., D.J. Turner, and Z. Hantos, *Measuring lung function in murine models of pulmonary disease*. Drug Discovery Today: Disease Models, 2004. **1**(3): p. 337-343.
97. Verheijden, K.A., et al., *Measurement of airway function using invasive and non-invasive methods in mild and severe models for allergic airway inflammation in mice*. Frontiers in pharmacology, 2014. **5**: p. 190.
98. Cheng, S.-L., *Immunologic pathophysiology and airway remodeling mechanism in severe asthma: focused on IgE-Mediated pathways*. Diagnostics, 2021. **11**(1): p. 83.

99. Alvaro-Lozano, M., et al., *Allergen immunotherapy in children user's guide*. Pediatric Allergy and Immunology, 2020. **31**: p. 1-101.
100. Hornung, V., et al., *Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization*. Nature immunology, 2008. **9**(8): p. 847-856.
101. Eisenbarth, S.C., et al., *Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants*. Nature, 2008. **453**(7198): p. 1122-1126.
102. Mannhalter, J., et al., *Modulation of the human immune response by the non-toxic and non-pyrogenic adjuvant aluminium hydroxide: effect on antigen uptake and antigen presentation*. Clinical and experimental immunology, 1985. **61**(1): p. 143.
103. Ghimire, T.R., et al., *Alum increases antigen uptake, reduces antigen degradation and sustains antigen presentation by DCs in vitro*. Immunology letters, 2012. **147**(1-2): p. 55-62.
104. Ackaert, C., et al., *The impact of nitration on the structure and immunogenicity of the major birch pollen allergen Bet v 1.0101*. PloS one, 2014. **9**(8): p. e104520.
105. Kikuchi, Y., et al., *Crucial commitment of proteolytic activity of a purified recombinant major house dust mite allergen Der p1 to sensitization toward IgE and IgG responses*. The journal of immunology, 2006. **177**(3): p. 1609-1617.
106. Fernández-Caldas, E., L. Puerta, and L. Caraballo, *Mites and allergy*, in *History of allergy*. 2014, Karger Publishers. p. 234-242.
107. Flores, I., et al., *Cloning and molecular characterization of a cDNA from Blomia tropicalis homologous to dust mite group 3 allergens (trypsin-like proteases)*. International archives of allergy and immunology, 2003. **130**(1): p. 12-16.
108. Ando, T., et al., *Trypsin-like protease of mites: purification and characterization of trypsin-like protease from mite faecal extract Dermatophagoides farinae. Relationship between trypsin-like protease and Der f III*. Clinical & Experimental Allergy, 1993. **23**(9): p. 777-784.
109. Brown, A., et al., *House dust mite Der p 1 downregulates defenses of the lung by inactivating elastase inhibitors*. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2003. **29**(3): p. 381-389.
110. Chan, S.L., et al., *Nuclear magnetic resonance structure and IgE epitopes of Blo t 5, a major dust mite allergen*. The Journal of Immunology, 2008. **181**(4): p. 2586-2596.
111. Bustillo Arias, J., *Allergenic activity of Glutathione Transferase derived from Blomia tropicalis (Blo t 8)*. 2018, Universidad de Cartagena.
112. Pinheiro, C.S., et al., *En route to personalized medicine: uncovering distinct IgE reactivity pattern to house dust mite components in Brazilian and Austrian allergic patients*. Clinical and Translational Allergy, 2021. **11**(1): p. e12004.

16. Material suplementario

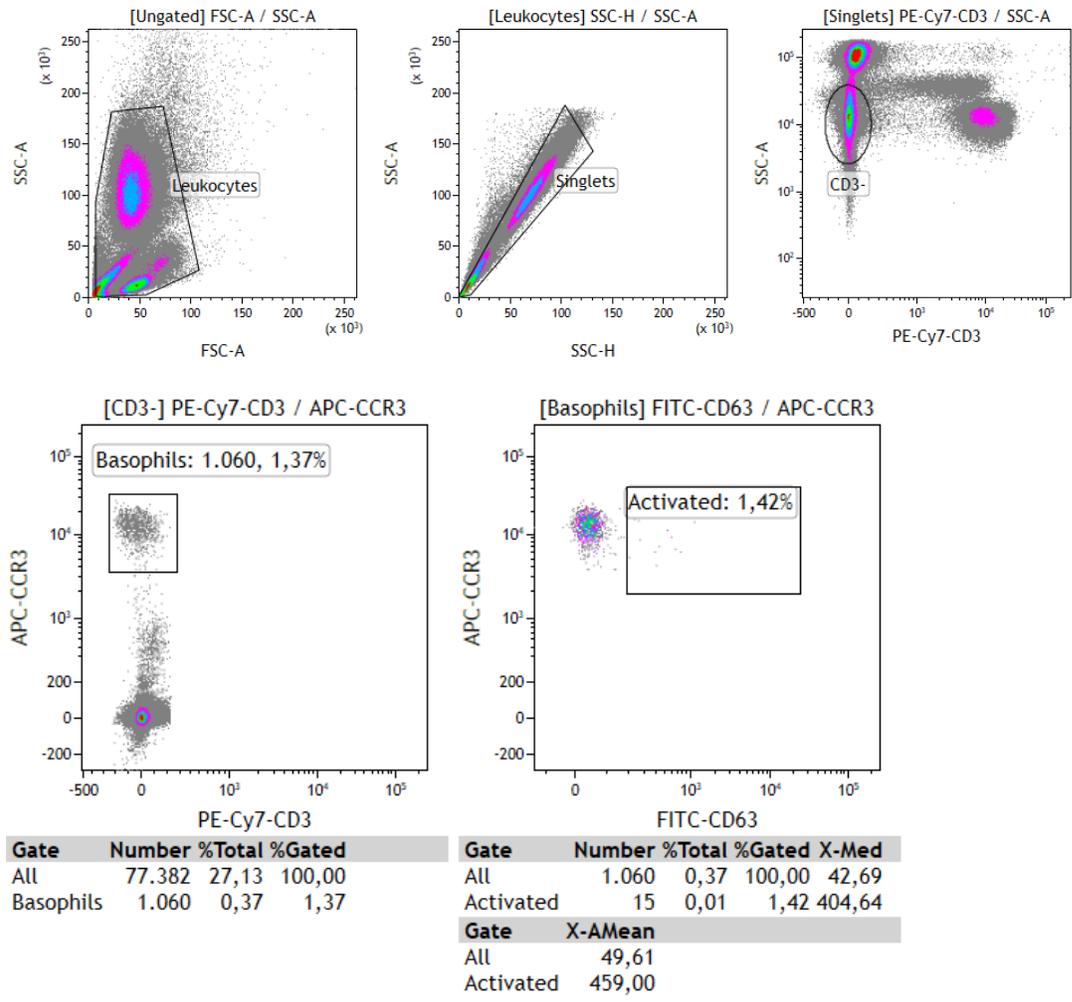
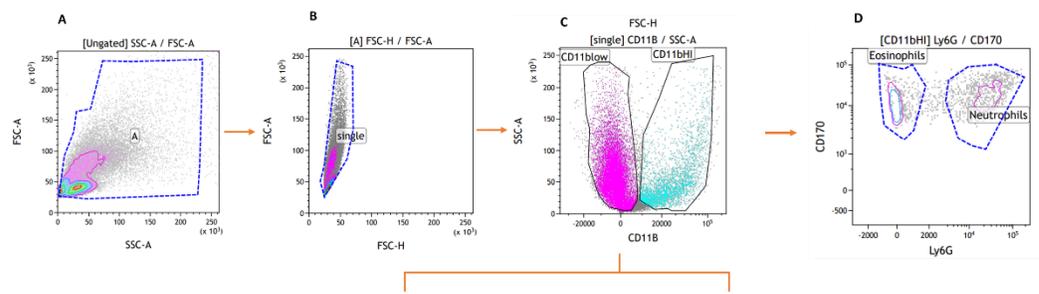


Figura suplementaria 1 Estrategia de gating para la identificación de basófilos activados. Del total de eventos se seleccionaron las poblaciones que correspondían por parámetros morfológicos y de complejidad (SSC y FSC) a los leucocitos. Se eliminaron las dupletas. De los CD3 neg se identificaron como basófilos a las células que expresaban los marcadores de superficie CCR3 y como marcador de activación CD63.



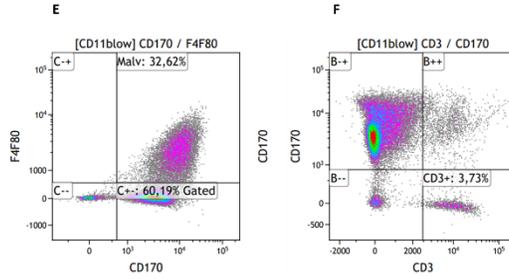


Figura suplementaria 2. Estrategia de gating para la identificación de células inmunes en BAL. Estrategia de gating para la identificación de células inmunes en BAL. La dispersión frontal (FSC) y la dispersión lateral (SSC) se usó para incluir todos los leucocitos (A) y eliminar los restos y dobletes de células (B). Las células inmunes se identificaron dentro de las células individuales (C) como CD11b low y CD11b hi. Los neutrófilos se identificaron como Ly6G+ y los eosinófilos como CD170+ dentro del grupo de células CD11bhi (D). Los macrófagos alveolares se identificaron como F4/80+ CD170+ (E) y los linfocitos como CD3+ (F) dentro de las células CD11b low.

Tabla suplementaria 1. Anticuerpos monoclonales y fluorocromos utilizados para identificación de células en BAL

| MARCADOR | FLUOROCROMO | EMPRESA | REFERENCIA |
|------------------|-------------------|-------------|------------|
| CD3e | PECy7 | eBioscience | 25-0031-82 |
| CD11b | PE | eBioscience | 12-0112-81 |
| CD170 (Siglec-F) | PerCP/e-Fluor 710 | eBioscience | 46-1702-82 |
| F4/80 | FITC | eBioscience | 11-4801-81 |
| Ly6G | APC | eBioscience | 17-5931-81 |

Tabla suplementaria 2. Anticuerpos monoclonales y fluorocromos utilizados como control de isotipo para la identificación de células en BAL

| MARCADOR | FLUOROCROMO | EMPRESA | REFERENCIA |
|-----------------------|-------------------|-------------|------------|
| CD45 | e-flour 450 | eBioscience | 40-0451-82 |
| Armenian Hamnster IgG | PECy7 | eBioscience | 25-4888-82 |
| CD11b | PE | eBioscience | 12-0112-82 |
| Rat IgG2a k (CD170) | PerCP/e-Fluor 710 | eBioscience | 46-4321-82 |
| Rat IgG2a k | FITC | eBioscience | 11-4321-80 |
| Rat IgG2b k | APC | eBioscience | 17-4031-82 |

tabla suplementaria 3. Puntuaciones de la inflamación pulmonar y células caliciformes PAS positivo de los análisis histológicos del pulmón.

| Infiltración peribronquial (PB) y perivascular (PV) | Células caliciformes PAS positivas |
|---|------------------------------------|
|---|------------------------------------|

| Parámetro | Puntuación | Parámetro | Puntuación |
|---|------------|-----------|------------|
| Células inflamatorias ausentes | 0 | Ausentes | 0 |
| Pocas células sueltas | 1 | <25% | 1 |
| Un anillo de células de 1-2 capas de espesor | 2 | 25-50% | 2 |
| Un anillo de células de 3 a 5 capas de espesor | 3 | 50-75% | 3 |
| Un anillo de células de más de 5 capas de espesor | 4 | >75% | 4 |

17. Anexos

Anexo 1. Aval ético



Universidad
de Cartagena
Fundada en 1827



Asociación Institucional de Alta Calidad
Resolución 2144 del 26 de febrero de 2014. Ministerio de Educación Nacional

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

HACE CONSTAR

Que, el proyecto titulado "Determinación de la actividad alergénica de productos recombinantes del ácaro *Blomia tropicalis* y su impacto clínico en asma", presentado por Luis Caraballo Gracia, docente adscrito (a) al Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena, se ajusta a los requerimientos de los referentes éticos contemplados en la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y por no tratarse de un proyecto relacionado con ensayos clínicos farmacológicos, se omite el requerimiento contemplado en la resolución 2378 de 2008.

El presente proyecto requiere de Consentimiento Informado, de acuerdo al riesgo inherente, según la interpretación del artículo 11 de la resolución 08430 de 1993, tal como consta en el Acta N° 108 del Comité de Ética en Investigaciones con fecha 10/05/2018.

Para constancia se firma en la ciudad de Cartagena, el diez (10) de mayo del año dos mil dieciocho (2018).



ALVARO OLIVERÁ DIAZ, MD.
PRESIDENTE



Vicerrectoría de Investigaciones
Centro – Cra. 4 No. 38-40, Claustro de la Merced Telefax: 5042663
E-mail: comitedetica@unicartagena.edu.co
web: www.unicartagena.edu.co
Cartagena de Indias, D.T. y C. – Colombia

Anexo 2. Consentimiento informado



UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES INMUNOLÓGICAS

CONSENTIMIENTO INFORMADO

En este documento expreso mi consentimiento para participar en el Proyecto “**Determinación de la actividad alergénica de productos recombinantes del ácaro *Blomia tropicalis* y su impacto clínico en asma**”, el cual hace parte del Programa de Prevalencia y Factores de Riesgo de Asma y Alergias adelantado por el Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena y dirigido por el Dr. Luis Caraballo. En esta ocasión se me ha informado que en esta investigación se buscan identificar los componentes del ácaro *Blomia tropicalis*, una fuente importante de sustancias alergénicas en Colombia, que pueden inducir la presentación de asma. De esta manera, se puede contribuir a un mejor diagnóstico de la causa de la enfermedad y a un posterior tratamiento dirigido.

Se me han explicado los objetivos de esta investigación, los procedimientos y actividades que se necesitan para realizarla, los beneficios y los posibles riesgos. Sé que sus resultados ayudarán a mejorar el diagnóstico de alergias en mi población. También se me ha informado que los exámenes y procedimientos serán realizados por personal experto, no tendrán ningún costo para mí y sus resultados serán confidenciales.

Tengo conocimiento que esta investigación es de riesgo mínimo, pero algunos procedimientos pueden generar molestias. Que la realización de la prueba cutánea puede generarme ardor, prurito, aparición de ronchas en brazo y otras partes del cuerpo, será realizada por un médico con entrenamiento en el área ; que la toma de sangre se realizará como se hace rutinariamente en los laboratorios clínicos, por una persona debidamente entrenada. Que los riesgos de la venopunción son leves (formación de hematoma, infección) y se evitan si quien la realiza utiliza una buena técnica. Que la prueba de activación de basófilos es una prueba diagnóstica de sensibilización alérgica que no confiere ningún riesgo o efecto adverso en mi persona, aparte de lo relacionado con la toma de muestra de sangre venosa.

Se me ha garantizado que cualquier pregunta o duda que tenga sobre los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación puedo preguntarlos a los teléfonos

6698491 y 3215328844 del Instituto de Investigaciones Inmunológicas, los investigadores han colocado a mi disposición toda la información disponible sobre otras investigaciones como esta que se han realizado en otros países y cualquier material educativo que me interese revisar. Se me ha explicado que puedo retirar mi consentimiento cuando desee y dejar de participar en el estudio sin que por ello tenga ningún perjuicio o se afecten mis derechos legales, mi reputación o mi acceso a los servicios de salud. De acuerdo con lo establecido por la ley, en caso de que se generen daños a mi persona como consecuencia de los procedimientos realizados durante esta investigación, el tratamiento o la indemnización a la que legalmente tendría derecho será asumida por la institución responsable de la investigación.

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

1. Que se me realice una prueba de sensibilización cutánea a aeroalergenos que incluye ácaros del polvo doméstico, epitelios animales y hongos, con el fin de determinar si estoy sensibilizado a alguno de estos.
2. Que se me tome una muestra de 20 cc de sangre venosa con la cual se realizará una prueba de activación de basófilos con alergenos de *Blomia tropicalis*, esto con el fin de saber si esta actividad alérgica sobre estas células.

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

ACEPTO Y FIRMO EN SEÑAL DE APROBACION:

Nombre _____ **CC:** _____

Firma: _____

Firma del Testigo # 1: _____ **Parentesco:** _____

Nombre del Testigo # 2: _____ **CC:** _____

Firma del Testigo # 2: _____ **Parentesco:** _____

Firma: _____ **Parentesco:** _____

18. Fuentes de financiación

Este trabajo fue financiado por el proyecto de Colciencias “*Determinación de la actividad alergénica de productos recombinantes del ácaro Blomia tropicalis y su impacto clínico en asma*”, Contrato “807 - 2018”, del cual el investigador principal es el Dr. Luis Caraballo, y el proyecto estudios sobre la patogénesis del asma en el trópico: oportunidades de generación de conocimientos e innovación en biomedicina – Bolívar, BPIN: 2020000100405 (IP: L Caraballo) para la compra de materiales y reactivos y apoyo de sostenimiento; y la Universidad de Cartagena, entidad que además financio el segundo año de mi maestría con una beca de matrícula por semillero de investigación.