



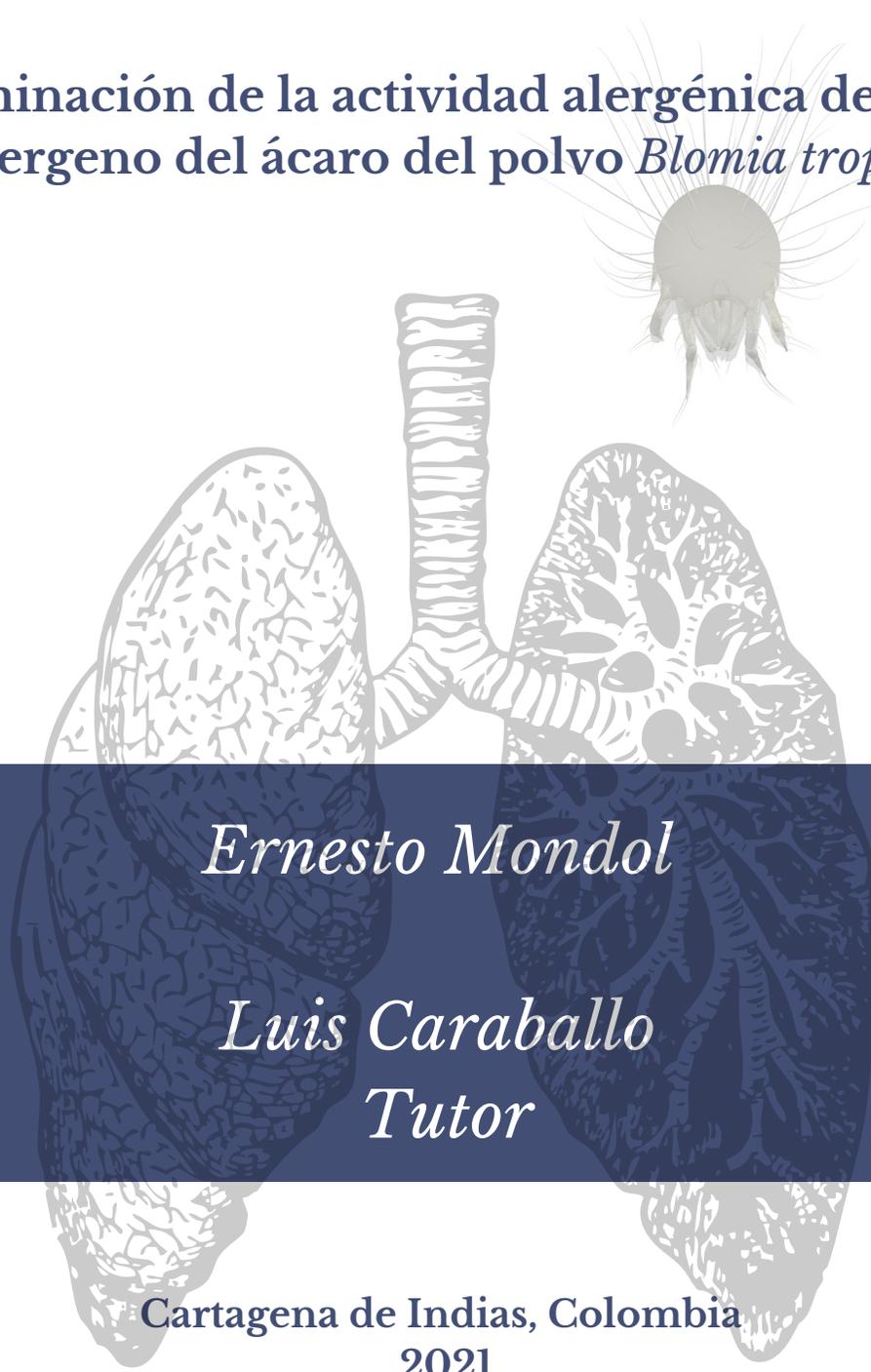
Universidad  
de Cartagena  
Fundada en 1827

iii Instituto de  
Investigaciones  
Inmunológicas



## Trabajo de grado para optar el título de Magíster en Inmunología

Determinación de la actividad alérgica de Blo t 2,  
un alérgeno del ácaro del polvo *Blomia tropicalis*



*Ernesto Mondol*

*Luis Caraballo*  
*Tutor*

Cartagena de Indias, Colombia  
2021





Universidad  
de Cartagena  
Fundada en 1827

iii Instituto de  
Investigaciones  
Inmunológicas



UNIVERSIDAD DE CARTAGENA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES INMUNOLÓGICAS

**Determinación de la actividad alérgica de Blo t 2, un alérgeno del ácaro del  
polvo *Blomia tropicalis***

**Trabajo de grado para optar el título de Magíster en Inmunología**

Ernesto Mondol

Luis Caraballo  
Tutor

Cartagena de Indias, Bolívar

2021

**Nota de Aceptación:**

---

---

---

---

---

**Firma del Jurado**

---

**Firma del Jurado**

**Cartagena de Indias, Bolívar – julio de 2021**

## **Agradecimientos**

Agradezco a mis padres, porque quien soy y lo que he alcanzado, es por mucho, el producto de su amor abnegado. A mis hermanos y demás familiares, por sus diferentes formas de apoyo durante los años de mi formación.

A mi tutor, el Dr. Luis Caraballo, por su apoyo, consejos, pero sobre todo por ayudarme a moldear una percepción sobre la vida y la ciencia que me han ayudado a definir mi vocación. A la Dra. Josefina Zakzuk, por su paciencia y supervisión en el desarrollo de los experimentos que contempla este trabajo. A los demás profesores del Instituto por sus valiosas enseñanzas.

A mis compañeros Karen Donado, Skarly Varela y José Miguel Escamilla, por su compañía en este viaje. A Juan Felipe López, Ana Milena Lozano, Victoria Marrugo y Dilia Mercado, por su colaboración desinteresada en mis trabajos de laboratorio. A todos los miembros del Instituto quienes me ofrecieron su amistad y me ayudaron a sentirme cómodo durante este proceso.

A mis amigos de la vida, Mileth y Marco, por darme ánimo e impulso en los momentos de duda y celebrar mis momentos de alegría.

## Contenido

1. Resumen.....	9
2. Introducción .....	11
3. Marco teórico.....	13
3.1. Los fundamentos fisiopatológicos de la reacción alérgica .....	13
3.2. Diagnóstico de alergias basado en componentes.....	16
3.3. La Medicina Personalizada en alergología clínica .....	18
3.4. Evaluación de la actividad alérgica.....	20
3.5. Alergenos de importancia epidemiológica en el trópico .....	22
3.6. Blo t 2 .....	22
4. Hipótesis.....	25
5. Objetivo general.....	25
6. Objetivos específicos.....	25
7. Metodología general del estudio .....	25
8. Metodología específica del estudio .....	27
8.1. Preparación del rBlo t 2.....	27
8.1.1. Purificación final de rBlo t 2 .....	27
8.1.2. Remoción de endotoxina .....	27
8.1.3. Cuantificación de endotoxina.....	28
8.1.4. Expresión y purificación del Blo t 2 .....	29
8.2. Evaluación de la asociación de Blo t 2 con asma .....	30
8.2.1. Escogencia de casos y controles.....	30
8.2.2. Medición de IgE específica contra rBlo t 2 mediante prueba de ELISA .....	31
8.3. Evaluación de la actividad alérgica de rBlo t 2 .....	32
8.3.1. Prueba de activación pasiva de basófilos (PAB).....	32
8.3.2. Modelo murino de asma alérgica.....	32
8.3.3. Prueba de anafilaxia cutánea pasiva .....	35
8.4. Análisis estadístico .....	35
8.5. Consideraciones éticas .....	36
9. Resultados.....	38
9.1. Producción del rBlo t 2 .....	38

9.2.	Características demográficas de la población estudiada .....	42
9.3.	Sensibilización a Blo t 2 en pacientes asmáticos.....	43
9.4.	rBlo t 2 induce inflamación en un modelo murino de asma alérgica.....	45
9.5	rBlo t 2 induce anafilaxia cutánea pasiva .....	49
9.6	rBlo t 2 produce la activación de basófilos .....	51
10.	Discusión .....	54
11.	Conclusiones y recomendaciones .....	59
12.	Referencias.....	60
13.	Material suplementarias .....	67
14.	Anexos .....	71

## Índice de tablas

<i>Tabla 1. Ensayos de actividad alérgica realizados en alérgenos del ácaro del polvo doméstico .....</i>	<i>21</i>
<i>Tabla 2. Estadísticas descriptivas de la población de estudio.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 3. Porcentaje de pacientes sensibilizados a B. tropicalis y a rBlo t 2 .....</i>	<i>44</i>
<i>Tabla 4. Mediana de los niveles de IgE específicas contra el extracto de B. tropicalis y de rBlo t 2 .....</i>	<i>44</i>
<i>Tabla 5. Análisis univariado y multivariado mediante regresión logística binaria. .</i>	<i>44</i>
<i>Tabla 6. Porcentaje de pacientes y controles sensibilizados rBlo t 2. ....</i>	<i>44</i>

## Índice de figuras

<i>Figura 1. Cambios en la prevalencia del diagnóstico de asma y síntomas de asma en el tiempo en niños y adultos jóvenes.....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 2. Vías inflamatorias T2-high desencadenadas en asma.....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 3. Los alérgenos individuales pueden usarse como reactivo para la determinación de IgE específica. ....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 4. Alergenos de ácaros del polvo de relevancia epidemiológica. ....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 5. Diagrama de flujo de los sujetos utilizados para el estudio de casos y controles en pacientes asmáticos y la prueba de activación pasiva de basófilos .</i>	<i>26</i>
<i>Figura 6. Purificación final del recombinante Blo t 2.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 7. Remoción de endotoxina con Tritón X-114. ....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 8. Producción del segundo lote de rBlo t 2.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 9. Protocolo de inmunización y retos usados en el modelo murino de asma alérgica.....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 10. Análisis histológicos de cortes del tejido pulmonar .....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 11. Pletismografía de cuerpo completo de ratones sensibilizados con rBlo t 2. ....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 12. Conteo de células en el lavado broncoalveolar.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 13. Niveles de inmunoglobulinas en suero de ratón.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 15. MFI de la medición del CD203c en basófilos .....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 16. Índice de estimulación de la prueba de activación de basófilos basada en CD203c. ....</i>	<i>53</i>

## Abreviaturas

DBC:	Diagnóstico basado en componentes
ELISA:	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
IgE:	inmunoglobulina E
IgG:	inmunoglobulina G
IL:	Interleucina
BAL:	Lavado broncoalveolar
IUIS:	Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas
ACP:	Anafilaxia cutánea pasiva
OD:	Densidad óptica
Ni-NTA:	Nickel-Nitrilotriacetic Acid
FPLC:	cromatografía líquida de rendimiento rápido
BSA:	albúmina de suero bovino
Ext. Bt:	Extracto de <i>Blomia tropicalis</i>
LB:	Luria Bertani
IPTG:	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
IP:	Investigador principal
PAB:	Pruebas de activación de basófilos
Penh:	pausa mejorada
HE:	hematoxilina eosina
PAS:	ácido Peryódico de Schiff
OR:	Odds Ratio
aOR:	Odds Ratio Ajustado
ANOVA:	Análisis de Varianza
MFI:	intensidad mediana de fluorescencia
LAL:	lisado de amebocitos de Limulus
SI:	Índice de estimulación

## 1. Resumen

La incidencia de las enfermedades alérgicas, entre las que se encuentran el asma, la rinitis y la dermatitis atópica, ha aumentado en las últimas décadas, tanto en países desarrollados como en vía de desarrollo; ocasionando una gran morbilidad entre los pacientes y gastos para los organismos de seguridad social. La genética de los individuos alérgicos juega un papel importante en el desarrollo de estas enfermedades; además, a lo largo de la vida los individuos se exponen tanto a factores de riesgo como protectores, que en conjunto van a determinar la presentación de enfermedades alérgicas. La exposición a los ácaros del polvo como lo es *Blomia tropicalis* es un importante factor de riesgo para la presentación del asma alérgica, este ácaro posee proteínas alergénicas, con diferencias en su estructura, propiedades biológicas, estabilidad y nivel de expresión, por lo tanto, se espera que la respuesta inmune a los diferentes alérgenos de *B. tropicalis*, sea heterogénea. La capacidad de producir IgE es una de las características más conocidas resultante de este proceso, lo que se ha asumido como una de las propiedades esenciales que hacen que un componente sea alergénico. Sin embargo, la inducción de IgE específica es necesaria, pero no suficiente para ser un alérgeno, pues estos también deben inducir síntomas de alergia.

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 (es decir que induce la síntesis de IgE y se une a dicho anticuerpo) tiene también actividad alergénica, es decir, que induce un proceso inflamatorio. Entre estas pruebas encontramos la evaluación de la frecuencia e intensidad de unión a la IgE; pruebas de provocación *in vivo* o *in vitro*, como la prueba de activación de basófilos o de liberación de histamina, ensayos de anafilaxia cutánea pasiva, o la evaluación de su capacidad de inducir cambios epigenéticos, entre otros. Lo anterior es esencial si se quiere sacar verdadero provecho al fundamento del diagnóstico basado en componentes (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 es dudosa o por el contrario infravalorar alergenos que por no tener una alta reactividad IgE son ignorados, aunque tengan una gran capacidad de inducir síntomas.

Por lo anterior en este proyecto nos propusimos la caracterización del alergeno del grupo 2 de *Blomia tropicalis* (Blo t 2) en términos de su actividad alérgica. Para lo cual, 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 de ELISA y pruebas de activación pasiva de basófilos, en pacientes y controles sanos; además para probar su actividad alérgica en dos modelos murinos, uno de alergia respiratoria y otro de anafilaxia cutánea pasiva. Se obtuvo proteína suficiente para el desarrollo de los experimentos con un nivel de pureza adecuado. Los resultados de los trabajos muestran que aunque el 30% de los asmáticos estaban sensibilizados a Blo t 2, este porcentaje no fue significativamente superior al de los sujetos sanos. Dentro de los sujetos sensibilizados a *B. tropicalis* el 40% reaccionó a rBlo t 2. Este alergeno demostró su capacidad de generar inflamación en el modelo murino de asma alérgica, evidenciado en el infiltrado inflamatorio pulmonar, aumento de eosinófilos en el lavado broncoalveolar, la generación de hiperreactividad en las vías respiratorias y el aumento de la IgE, IgG1 e IgG2a; en la prueba de anafilaxia cutánea pasiva también provocó el aumento de la extravasación de azul de Evans; además, indujo la sobre expresión del marcador CD203c en la membrana de basófilos sensibilizados con sueros de asmáticos. En conclusión, rBlo t 2 tiene actividad alérgica demostrada por ensayos *in vitro* e *in vivo* que podrían indicar que este es un alergeno clínicamente importante en enfermedades alérgicas como el asma.

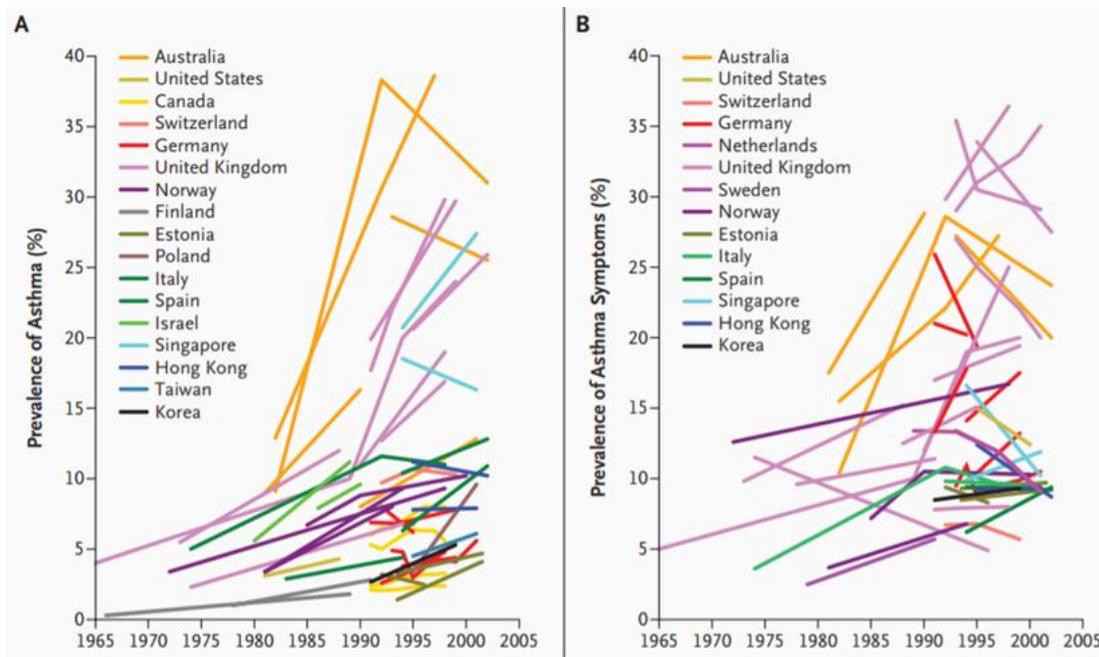
## 2. Introducción

El asma, al igual que otras enfermedades alérgicas, es un problema de salud creciente a nivel mundial (**Figura 1**), más de 300 millones de personas en todo el mundo presentan esta enfermedad (1, 2), lo que ocasiona una gran morbilidad en la población y grandes costos a los sistemas públicos de salud de los países, por lo que el desarrollo de pruebas de diagnóstico y mejoras en el tratamiento ayudaría en gran medida a disminuir las consecuencias de esta afección (3). En los últimos años ha avanzado aceleradamente la 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 (4). En el asma se conoce que la exposición a los alérgenos de los ácaros es uno de los factores de riesgo principales (5). *Blomia tropicalis* es un ácaro del polvo doméstico, en regiones tropicales y subtropicales este presenta una alta prevalencia, siendo asociado con enfermedades alérgicas como rinitis y asma (6). *B. tropicalis* es una fuente primaria de alérgenos, de las 25 proteínas que unen IgE identificadas (7), 14 han sido oficialmente reconocidas y nombradas por el subcomité de nomenclatura de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS por sus siglas en inglés). Estas proteínas están registradas en la base de datos de alérgenos ([www. Allergen.org](http://www.Allergen.org)). Siendo estas en específico, y no el ácaro completo, quienes ocasionan la reactividad y los síntomas. Si se quiere realizar una verdadera medicina de precisión en asma, es necesario implementar el diagnóstico basado en componentes, donde se identifique cuál es el alérgeno que está ocasionando los síntomas en cada paciente y de esta manera darles un manejo dirigido.

Es necesario definir la importancia de cada componente alérgico, ya que a pesar de que todos puedan inducir la expresión de IgE en mayor o menor frecuencia, esto no siempre se relaciona con su capacidad real de inducir síntomas; por ejemplo, componentes considerados como alérgenos menores pueden inducir una respuesta inmune importante (8), o por el contrario, alérgenos con una alta frecuencia de

reactividad IgE, presentan una actividad alergénica baja (9). En general, la caracterización de los alergenos de *B. tropicalis* es pobre, concentrándose mayoritariamente en la descripción de sus propiedades estructurales, bioquímicas y en términos de su frecuencia de unión a IgE (10). Dado esto, es necesario saber si además de inducir la producción y de unir IgE, estos alergenos son capaces de generar síntomas inflamatorios, es decir, si tienen o no actividad alergénica.

Los alergenos del grupo 2 de los ácaros del polvo se conocen por ser proteínas de unión a lípidos, entre estos, Der p 2 se ha evaluado en diferentes modelos, encontrándose que tiene la capacidad de inducir además de la IgE, diferentes citoquinas inflamatorias por vías innatas (11, 12). Por su parte Blo t 2, que es el alergeno del grupo 2 de *B. tropicalis*, presenta una homología estructural con Der p 2, sin embargo, su estudio ha sido limitado, contando solamente con información básica como sus características estructurales, su frecuencia de unión a IgE y su reactividad cruzada con otros alergenos del grupo 2 (13). Teniendo en cuenta este contexto, en este trabajo nos propusimos evaluar la actividad alergénica de Blo t 2 mediada por mecanismos IgE para evidenciar su capacidad de producir síntomas dando luces sobre su importancia en el asma y su uso potencial en el diagnóstico basado en componentes.



**Figura 1.** Cambios en la prevalencia del diagnóstico de asma y síntomas de asma en el tiempo en niños y adultos jóvenes. Tomado de referencia (1). Se observa una tendencia al aumento tanto en la prevalencia del asma como de los síntomas de asma, aunque luego de 1990 la prevalencia en algunos de estos países se haya estancado o incluso descendido.

### 3. Marco teórico

#### 3.1. Los fundamentos fisiopatológicos de la reacción alérgica

El asma es una enfermedad heterogénea, con varios endotipos, usualmente desencadenada por interacciones entre la genética del individuo y el medio ambiente (14, 15). Es la enfermedad crónica más frecuente en niños y adolescentes. La mayoría de los pacientes asmáticos presentan IgE específica contra distintos alérgenos como reflejo de un perfil Th2 (16). Una vez el alérgeno ingresa al cuerpo y logra traspasar las barreras epiteliales, son captados, procesados y presentados a los linfocitos por las células presentadoras de antígeno, lo que ocasiona su activación, principalmente hacia un perfil Th2, liberando mediadores como la IL-4 e IL-13, inductores de la producción de IgE. Estos anticuerpos se unen a receptores de superficie de alta afinidad en mastocitos y basófilos o a receptores de baja

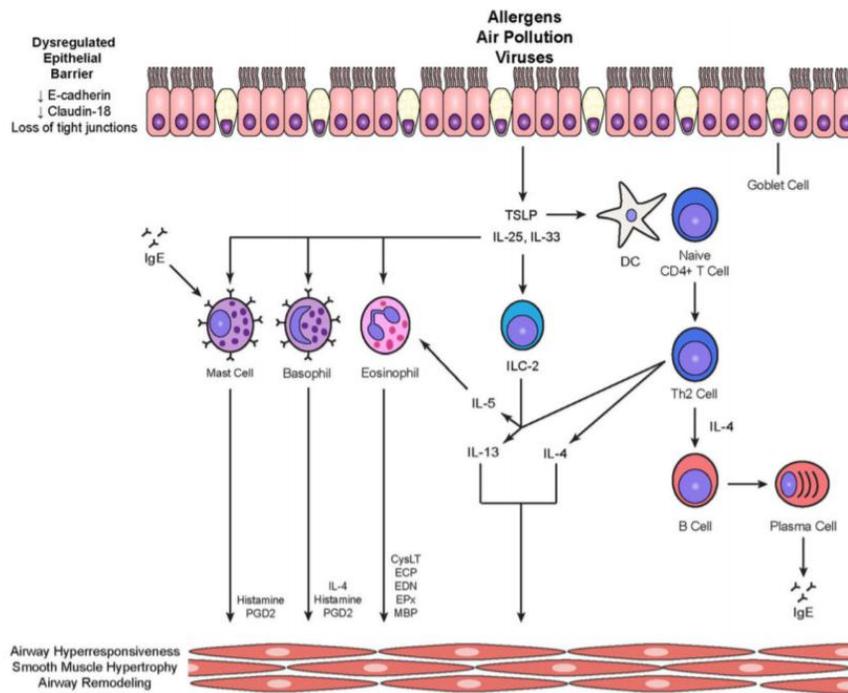
afinidad en Linfocitos B y eosinófilos. El asentamiento de células portadoras de IgE, principalmente mastocitos, en la mucosa nasal o bronquial durante la fase de sensibilización prepara el escenario para su activación en un posterior contacto con el alérgeno, momento en el que el antígeno se une a dos anticuerpos adyacentes que se entrecruzan físicamente, desencadenando la desgranulación y la liberación de mediadores proinflamatorios tales como histamina, triptasa, leucotrienos y prostaglandinas (**Figura 2**). Se desconocen las razones por las cuales algunas personas tienen este tipo de respuesta Th2 y otras no, ante la exposición a los mismos antígenos, pero la hipótesis más conocida es que esta susceptibilidad hacia la alergia está determinada por el genotipo de las personas. En este sentido, en los últimos años, los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS) representan un gran esfuerzo para explicar el componente genético de estos problemas, y han identificado varios marcadores genéticos y loci asociados con el asma y algunos de sus fenotipos. Por ejemplo, los marcadores cercanos a los genes ORMDL3 / GSDMB se asociaron con el asma de inicio en la infancia (17), los SNP en los genes de la IL-33 e IL1RL1 se asociaron con el asma atópica (18), y SNP en el gen del TSLP que se identificó como protector contra el riesgo de asma TH2 (19). Aún es necesario precisar los mecanismos moleculares por los cuales cambios en estos loci afectan el riesgo de desarrollar asma.

De todas maneras esta respuesta es responsable de los síntomas inmediatos de broncoconstricción en asma y también de la producción de mediadores que contribuyen a la inflamación que se extiende de 4 a 8 h después de una respuesta inmediata (20).

Por su parte, los eosinófilos liberan una variedad de mediadores proinflamatorios como la proteína básica mayor, la peroxidasa de eosinófilos, la proteína catiónica eosinofílica 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 (21).

Adicionalmente, hay evidencia de que los alérgenos de ácaros también tienen la capacidad de activar el sistema inmunitario por otras vías, principalmente vías de la inmunidad innata, principalmente a través de la inducción de señales mediante los receptores para el reconocimiento de patógenos, como los TLR, por proteínas de unión a lípidos, o la activación de receptores activados por proteasas por alérgenos proteolíticos (22, 23).



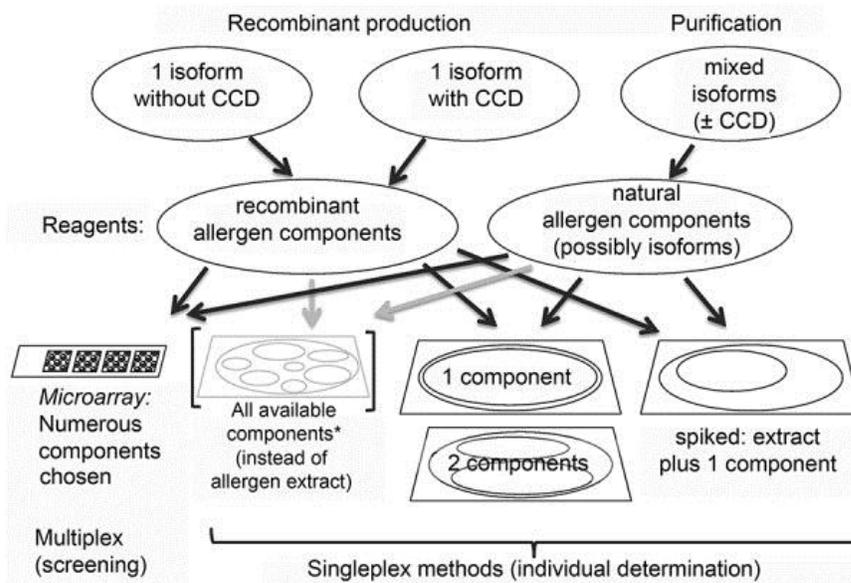
**Figura 2.** Vías inflamatorias T2-high desencadenadas en asma. Tomado de referencia (14). En la fisiopatología de esta enfermedad intervienen una variedad importante de células, las cuales se activan posterior a la irrupción del alérgeno en la barrera epitelial y continúa con la liberación de mediadores que generan las características clínicas cardinales del asma.

### 3.2. Diagnóstico de alergias basado en componentes

El diagnóstico basado en componente (DBC) es un enfoque que utiliza los alérgenos nativos purificados o recombinantes para detectar la respuesta de IgE específica contra las moléculas alérgicas individuales (**Figura 3**) (24, 25). El DBC tiene como objetivo caracterizar el perfil de sensibilización molecular de un paciente alérgico, con el fin de mejorar la especificidad del diagnóstico de alergia a los alérgenos seleccionados. El DBC ofrece mayor sensibilidad diagnóstica que los extractos, especialmente aquellos que contienen alérgenos fácilmente degradables (26). Otro aspecto importante es que puede ayudar a detectar patrones de sensibilización asociados con fenotipos clínicos (27), o incluso, estos patrones pueden ser específicos para un alérgeno de una fuente, pudiendo diferenciar el sensibilizador primario en caso de que un individuo presente reactividad cruzada entre alérgenos del mismo grupo (28). Para el caso del DBC de alergia al maní, un estudio detectó que es el alérgeno Ara h 2 el único capaz de predecir enfermedad (29). Lynch et al. detectaron que la sensibilización a Der p 2 se asociaba fuertemente con síntomas de asma (30). Hace falta determinar si existen alérgenos de *B. tropicalis* que se asocien con la severidad de la enfermedad, aunque hay datos que lo sugieren (31).

La información sobre la sensibilización IgE de cada paciente, que solo puede discriminarse haciendo DBC, tiene un impacto importante en las decisiones clínicas sobre la inmunoterapia específica de alérgeno (IEA) (32). Teniendo en cuenta que casi la totalidad de las preparaciones que están legalmente aprobadas para hacer inmunoterapia son extractos alérgicos (33), se espera que el DBC ayude a definir cuántos y cuáles son los alérgenos que deben usarse para hacer IEA cuando se detecta polisensibilización. La máxima utilidad del DBC se espera que se presente cuando vaya seguido de IEA basada en los componentes hacia los cuales se detectó la sensibilización y que realmente tienen actividad alérgica e importancia clínica. Además, de esta manera se disminuiría el riesgo de desarrollar nuevas sensibilizaciones que se presenta con la inmunoterapia con extractos (34).

El éxito del DBC depende de una buena selección de alérgenos (35). Se debe tener en cuenta que, al contener cada fuente varios alérgenos, la complejidad diagnóstica aumenta, así como sus costos. Por lo tanto, los alérgenos incluidos en una batería de DBC deben ser el menor número posible, pero que estos sean los clínicamente relevantes y representativos de la fuente completa. El primer paso para lograr este propósito es identificar los alérgenos individuales relevantes en una población, pues existen alérgenos con diferencias importantes en cuanto a las cifras de sensibilización en comunidades distintas (36, 37). Una vez consideradas estas variaciones geográficas, se pueden lograr combinaciones de pocos alérgenos que representen muy bien a la fuente, por ejemplo, 3 alérgenos de *Phleum pratense* permiten diagnosticar al 95% de los pacientes alérgicos a este polen (38), o la mezcla Der p 1, Der p 2, Der p 5 y Der p 10 se ha detectado hasta el 93% de los alérgicos a *D. pteronyssinus* (39). Por último, otro aspecto por resolver y tal vez el menos explorado es si los componentes que se quieren usar para el DBC realmente tienen relevancia clínica.



**Figura 3.** Los alérgenos individuales pueden usarse como reactivo para la determinación de IgE específica. Tomado de referencia (25). En este ejemplo se muestran diferentes opciones de cómo los alérgenos individuales y extractos se pueden arreglar para generar plataformas diagnósticas.

### **3.3. La Medicina Personalizada en alergología clínica**

El enfoque tradicional para resolver problemas de salud que se conoce como “one size fits all” o “talla única”, implica que todos los pacientes de una misma enfermedad sean manejados con un esquema similar. En enfermedades alérgicas, la farmacoterapia ha sido así; por ejemplo, la terapia tradicional contra el asma se basa en medicamentos para aliviar el broncoespasmo (agonistas beta-2) y antiinflamatorios (corticosteroides) para controlar los síntomas y reducir la inflamación, aunque la introducción de la terapia biológica avanza en resolver esta limitación, ya que el mismo esquema de manejo no sirve para todos los pacientes de una enfermedad tan heterogénea como el asma (40). El diagnóstico y tratamiento del asma y otras enfermedades alérgicas ha cambiado en los últimos años, aunque el enfoque personalizado ha estado presente desde el principio, especialmente en el diagnóstico y la inmunoterapia. El progreso científico derivado de la Genómica y la Proteómica ha impulsado la idea de la aplicación masiva de un verdadero modelo de Medicina Personalizada (o Medicina de Precisión), que tenga en cuenta la variabilidad individual en los genes, el medio ambiente y el estilo de vida de cada persona en la escogencia y respuesta al tratamiento (41, 42). Debido al impacto socioeconómico que tiene el asma, se hace necesario un diagnóstico preciso que sea capaz de clasificar a los pacientes de tal forma que se prescriba el tratamiento óptimo al paciente correcto (40). Sin embargo, la aplicación de la medicina de precisión en los países subdesarrollados tiene diversas limitaciones (43)

Actualmente se utilizan extractos completos de las fuentes alérgicas, que contiene alérgenos y otro tipo de partículas, tanto para diagnosticar sensibilización IgE como para hacer la inmunoterapia. Sin embargo, esto tiene varios inconvenientes (44). Primero, el contenido de cada alérgeno varía entre lotes ya que la representatividad de una proteína cambia según el proceso técnico de preparación del extracto, el origen del material fuente, así como de las características fisicoquímicas de la proteína. Cuando en el extracto no está bien

representado el alérgeno relevante para el paciente se generan problemas en el diagnóstico y falta de respuesta a la terapia. Además, al contener una cantidad considerable de otras proteínas con capacidad alérgica, el extracto puede inducir nuevas sensibilizaciones (45). Por lo anterior se requiere reemplazar los extractos por los componentes verdaderamente relacionados con la patogénesis de la enfermedad, de esta forma se puede realizar un diagnóstico basado en componentes y una inmunoterapia específica con alérgenos, lo cual representaría un modelo óptimo de medicina de precisión, siendo un real avance en el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades alérgicas (46).

El diagnóstico basado en componentes poco a poco se ha venido integrando a la práctica clínica, solucionando los problemas que conlleva la utilización de los extractos (47), aunque todavía en muchos países, incluyendo Colombia, no es un procedimiento de rutina. Actualmente se emplean ensayos multiplex como una opción costo-efectiva, pues en una sola prueba se evalúan una cantidad considerable de alérgenos usando una mínima cantidad de muestras de sangre. Por el momento se encuentran disponible comercialmente la plataforma ISAC que cuenta con 112 componentes moleculares (48), siendo el más usado en clínica, también encontramos a FABER que es un test para la detección específica de anticuerpos IgE utilizando 122 alérgenos moleculares y 122 extractos alérgicos (49) y por último el sistema ALEX que contiene más de 280 pruebas (incluyendo extractos y componentes purificados) (50). La selección de los alérgenos para la conformación de 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, sea por acción directa en el sistema inmune innato, mediada por IgE, o por ambas. Si bien el DBC se perfila en el inmediato futuro como una de las aplicaciones de la medicina personalizada en alergología, existe todavía un problema importante y es que desconocemos la relevancia clínica de cada alérgeno individual. Esto obstaculiza el diagnóstico y por supuesto el tratamiento mediante inmunoterapia; en consecuencia, la investigación

de la actividad alérgica real de cada componente que une IgE es un paso esencial para que el DBC continúe su desarrollo.

### **3.4. Evaluación de la actividad alérgica.**

Aunque hay poca información disponible sobre los alérgenos de los ácaros del polvo, 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 (51). Por lo tanto, se espera que la respuesta alérgica contra los ácaros del polvo doméstico sea heterogénea, siendo la capacidad de 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 para esto deben tener actividad alérgica e inducir síntomas de alergia (52, 53); aspecto que ha sido documentado consistentemente para los extractos pero no para todas las moléculas individuales (54).

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 como la evaluación de la frecuencia e intensidad de unión a la IgE mediante técnicas de inmunoensayo como el ELISA (55). También se han usado pruebas de provocación *in vivo* como retos orales (56) o las pruebas cutáneas (9, 57) y test de provocación *in vitro* como la prueba de activación de basófilos (58) o de liberación de histamina (59). Por otro lado, se ha evaluado la capacidad inducir inflamación a través de modelos animales (60) o mediante ensayos de anafilaxia cutánea pasiva (52, 61). Además, con algunos alérgenos se han realizado ensayos *in vitro*, como cultivos de células epiteliales bronquiales, para evaluar su capacidad

de inducir vías inflamatorias independientes de la IgE, al activar componentes de la inmunidad innata (11).

Estos estudios, se han realizado con alérgenos alimentarios, del polen o con extractos de ácaros, principalmente del *Dermatophagoides pteronyssinus*. Las pruebas de actividad alérgica solo se han hecho a unas pocas moléculas de *B. tropicalis*, a Blo t 2 solo se le han hecho pruebas de provocación *in vitro*, como la prueba de liberación de histaminas y un ensayo de liberación de mediadores inflamatorios utilizando basófilos de ratón humanizados (huRBL) (Tabla 1). 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 (54).

**Tabla 1.** Ensayos de actividad alérgica realizados en alérgenos del ácaro del polvo doméstico.

<i>D. pteronyssinus</i>	Provocation test <i>in vivo</i>	Provocation test <i>in vitro</i>	Non-IgE induced inflammation	Case-control study	Respiratory Animal model	PCA animal model	Avoidance	AIT trials
Der p 1	ST, B	BAT, HR	Yes	Asthma	Asthma	Yes	Yes	Yes
Der p 2	ST, B	BAT, HR	Yes	Asthma	Asthma		Yes	Yes
Der p 5	ST	HR	Yes	Asthma	Asthma			
Der p 3		BAT, RBL	Yes		Asthma			
Der p 10	ST			Asthma		Yes		
Der p 21	ST	BAT		Asthma				
Der p 13		BAT, HR	Yes					
Der p 23		BAT		Asthma				
Der p 18		BAT						
Der p 24		HR						
<b><i>B. tropicalis</i></b>								
Blo t 5	ST	BAT, HR	Yes	Asthma	Asthma	Yes		
Blo t 8	ST				Asthma	Yes		
Blo t 10	ST			Asthma				
Blo t 12	ST				Asthma			
Blo t 13	ST	HR						
Blo t 2		RBL, HR						
Blo t 7			Yes					
Blo t 11	ST							

. Tomado de referencia (52)

### 3.5. Alergenos de importancia epidemiológica en el trópico

Las fuentes más importantes de sensibilización alérgica en el trópico, y específicamente en nuestro medio, son los ácaros *D. pteronyssinus* y *B. tropicalis* (**Figura 4**). La investigación sobre alergenios de *B. tropicalis* es menor que para los de *D. pteronyssinus* (62, 63), lo cual se explica por su distribución casi exclusiva en ambientes tropicales y subtropicales, a diferencia del otro ácaro presente en latitudes templadas donde se ubican países industrializados de mayor actividad científica. *B. tropicalis* es una causa de sensibilización en acerca 70% de los asmáticos del trópico (64) y la inclusión de sus alergenios en baterías diagnósticas de alergia es indispensable en nuestro medio (65). Aunque varios de sus alergenios se han producido en forma recombinante (37, 66-71) se ha estudiado poco su actividad alérgica y relevancia clínica, de manera que todavía no es posible escoger los que deberían incluirse en una batería para DBC.

Los alergenios de *Blomia tropicalis* son los más importantes alergenios de ácaros en las regiones tropicales y subtropicales. La mayoría de ellos solo tienen un 30-40% de identidad de secuencias con su contraparte en el *Dermatophagoides*, compartiendo bajos niveles de reactividad cruzada. A diferencia de su contraparte *Pyroglyphidae*, Blo t 5 y Blo t 21 tienen la mayor frecuencia de unión a IgE, hasta del 91% (72, 73) y 93% (74) respectivamente, especialmente en áreas tropicales (75). Por su parte, Blo t 1 tiene una frecuencia entre 62% a 90% (67, 76, 77) de reactividad IgE en pacientes sensibilizados. Otros alergenios de este ácaro también tienen alta frecuencia de reactividad IgE, dependiendo de la población, entre estos Blo t 4 (27, 37, 78).

### 3.6. Blo t 2

Aunque se han publicado 3 isoalergenios de Blo t 2 en la base de datos del comité de nomenclatura de alergenios OMS/IUIS, se dispone de datos inmunológicos muy limitados de estas. Se predice que el MW teórico de la proteína madura es de 13.5 kDa para las 3 isoformas, mientras que el punto isoeléctrico teórico varía de 5.9 a

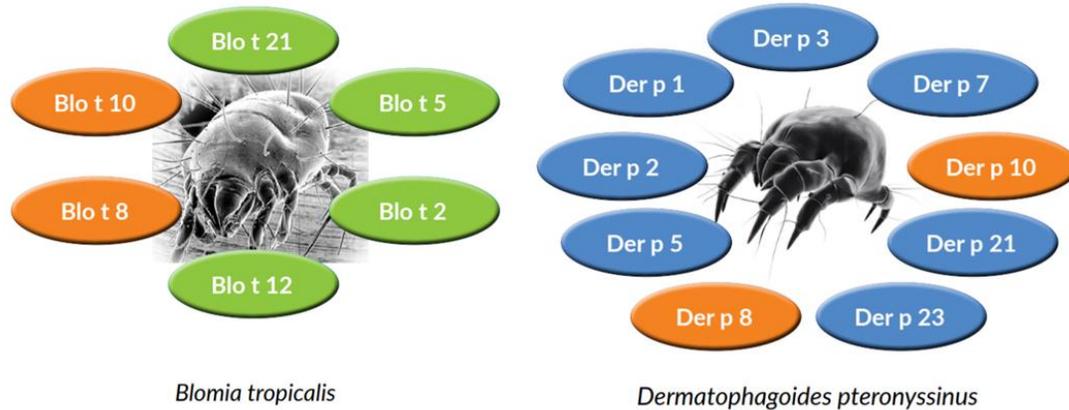
6.5 (10, 79). Reginald et al. (13) describieron a Blo t 2 como una proteína de 126 aminoácidos de longitud con una identidad de secuencia de 52% con Der p 2. También demostraron mediante dicroísmo circular que Blo t 2 es principalmente una proteína con láminas beta, la cual contiene tres enlaces disulfuro que favorecen la formación de un bolsillo hidrofóbico en su estructura terciaria. Además, en este estudio se encontraron 9 isoformas naturales, algunas de las cuales presentaban mutaciones en regiones homólogas a epítopes de unión IgE en Der p2, lo que podría representar la existencia de epítopes únicos para cada molécula.

De un análisis *in silico* de Blo t 2 se obtuvo que esta pertenece a la familia de proteínas que contienen un dominio de reconocimiento de lípidos (ML) relacionado con MD-2 y otros alérgenos del grupo 2 como Der p 2. Mediante el uso de servidores inmunoinformáticos también se obtuvieron 6 epítopes lineales y 4 epítopes conformacionales. Siendo estos epítopes potencialmente aptos como sitios de unión a la IgE (80). A través de un análisis proteómico de los alérgenos de *B. tropicalis* utilizando 11 diferentes extractos, se encontró que la isoforma número 1 de Blo t 2 fue la más abundante en la mayoría de estos extractos con porcentajes que van del 18,9% al 38,5% del total de alérgenos (81).

La evaluación de la prevalencia de sensibilización IgE mediante ELISA mostró que rBlo t 2 es reconocido por el 54% de los pacientes brasileños sensibilizados a *B. tropicalis*, mientras que en otro estudio fue de solo el 36% en un grupo de pacientes brasileños y puertorriqueños (82, 83). Por Western Blotting el 80% de un grupo de pacientes cubanos con prueba cutánea positiva para el extracto de *B. tropicalis* tuvo reacción IgE contra Blo t 2 mientras que solo el 34% de pacientes de Singapur alérgicos al HDM mostraron reactividad IgE contra Blo t 2 (13, 84). En una población infantil de Singapur se encontró una prevalencia de sensibilización a Blo t 2 menor al 20%, siendo más alta entre niños de 7 a 10 años.

El ensayo de inhibición reveló que Blo t 2 inhibía menos del 40% de la unión de IgE a Der p 2 (82). En cuanto a la evaluación de la actividad alérgica de Blo t 2, se

observó que es capaz de generar una liberación dosis dependiente de histamina cuando se incubó rBlo t 2 con sangre completa de individuos sensibilizados con esta proteína, lo que sugiere que es un alérgeno capaz de inducir inflamación (13). También se demostró que puede inducir la liberación de beta-hexosaminidasa en células RBL humanizadas (85). La actividad alérgica e importancia clínica de Blo t 2 aún está poco caracterizada, de igual forma, su función bioquímica y fisiológica es todavía poco clara. Se deben realizar mayores esfuerzos que logren caracterizar esta molécula y dar luces si debe incluirse en pruebas de diagnóstico basadas en moléculas y vacunas contra la alergia a *Blomia*.



**Figura 4.** Alérgenos de ácaros del polvo de relevancia epidemiológica. Tomado de referencia (63). Se muestran de color naranja los alérgenos que presentan mayor reactividad cruzada entre estas dos especies, en azul y verde aquellos considerados específicos de especie para cada uno de estos ácaros del polvo doméstico.

#### **4. Hipótesis**

El alérgeno Blo t 2, además de unir IgE, tiene actividad alérgica.

#### **5. Objetivo general**

Determinar la actividad alérgica mediada por IgE y el impacto clínico del recombinante Blo t 2.

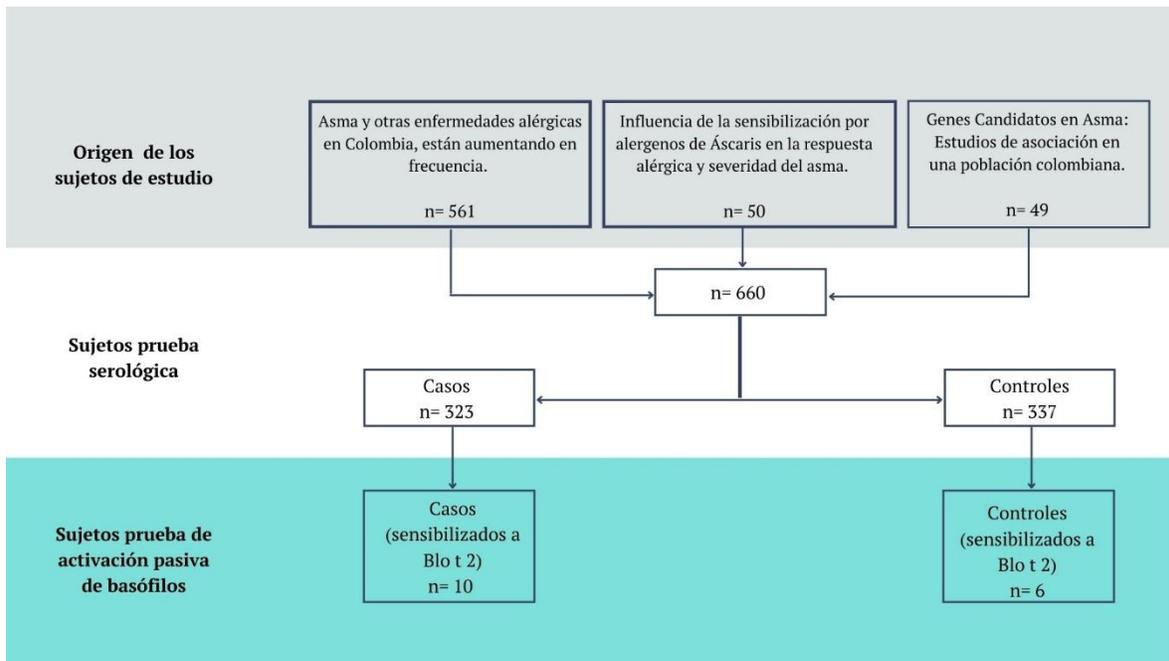
#### **6. Objetivos específicos**

1. Obtener el recombinante Blo t 2 con un alto nivel de pureza y bajos niveles de endotoxina.
2. Estimar la asociación estadística entre los niveles de IgE inducidos por Blo t 2 y el asma en un estudio de casos y controles.
3. Evaluar la activación de basófilos sensibilizados con sueros de asmáticos y controles utilizando Blo t 2
4. Evaluar la capacidad de Blo t 2 de generar inflamación y síntomas mediados por IgE en un modelo murino de asma alérgica.
5. Evaluar la capacidad de Blo t 2 de generar inflamación mediada por IgE con una prueba de anafilaxia cutánea pasiva.

#### **7. Metodología general del estudio**

Este proyecto hace parte de uno 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 Colciencias y cuyo investigador principal es el Dr. Luis Caraballo. Contempló diferentes estrategias; se realizaron dos estudios experimentales controlados, un modelo de anafilaxia cutánea pasiva y un modelo de alergia respiratoria, donde la unidad experimental fueron ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas. Además, se realizaron ensayos de ELISA en un estudio de casos y controles con pacientes asmáticos de diferentes

ciudades de Colombia, el cálculo del tamaño de muestra realizado en el software Epidat 3.1 (Xunta de Galicia, OPS/OMS) sugirió que para un poder del 80% se incluyeran 152 casos y 152 controles, sin embargo en este proyecto se tomó una muestra mayor, de 323 casos y 337 controles; para la prueba de activación de basófilos se tomaron 10 casos y 6 controles, el tamaño de la muestra se determinó a conveniencia debido a las limitaciones en la búsqueda de pacientes (**Figura 5**).



**Figura 5.** Diagrama de flujo de las muestras utilizadas para el estudio de casos y controles en pacientes asmáticos y la prueba de activación pasiva de basófilos. Se muestran el nombre de los proyectos de origen de estas muestras. Luego de la prueba serológica se tomó a un grupo pequeño de muestras de pacientes y sujetos sanos dentro de los sensibilizados para realizar la prueba de activación pasiva de basófilos.

## **8. Metodología específica del estudio**

### **8.1. Preparación del rBlo t 2**

#### **8.1.1. Purificación final de rBlo t 2**

Actualmente el Instituto de Investigaciones Inmunológicas cuenta con un banco de alergen recombinantes, actualmente denominado Banco de Alergenos Silvia Jiménez, entre los que se encuentra el rBlo t 2.0101 purificado por cromatografía de afinidad con una columna de Ni-NTA y liofilizado en TBS 1X. Se utilizaron 31,5 mg de esta proteína, los cuales se reconstituyeron en agua Milli Q y se dispusieron para las adecuaciones finales necesarias para su utilización. Este lote de proteína fue usado en la evaluación de la asociación estadística de Blo t 2 con asma mediante ELISAs y para el modelo murino de asma alérgica.

El nivel de pureza de la proteína recibida, alcanzado mediante la purificación por cromatografía de afinidad, no era adecuado para la inmunización de los ratones, por lo que se utilizó la cromatografía de intercambio iónico como un segundo método de purificación. Para esto, en primer lugar se dializó la proteína contra buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,6 y se pasó por filtro de 0.2  $\mu$ m. El proceso de cromatografía se llevó a cabo usando la columna UNO Q1 (Cat. 720-0001, Bio-Rad) adaptada a un sistema de cromatografía líquida de rendimiento rápido, FPLC (BiologicDuoFlow™, Bio-Rad Laboratories Inc., Estados Unidos). La columna se equilibró con Tris-HCl 20 mM pH 7.6 y se procedió a la purificación de rBlo t 2 en un gradiente escalonado de Tris HCl 20 mM pH 7.6 y NaCl 1M (70%-30%, 60%-40%, 50%-50%, 40%-60%, 0%-100%). La elución se controló a 280 nm. Por último, la proteína purificada se dializó contra PBS pH de 7,3. La pureza de la proteína se verificó mediante una SDS-PAGE con tinción de plata. La concentración de rBlo t 2 fue determinada mediante densitometría, utilizando como estándar albúmina de suero bovino (BSA).

#### **8.1.2. Remoción de endotoxina**

Se tomaron las muestras de rBlo t 2 con una concentración y pureza suficiente para realizar el proceso de remoción de endotoxina. La proteína ya dializada en PBS pH

7,3 se mezcló con Tritón X-114 a una concentración final del 1%. Esta solución se mezcló con vórtex y se incubó en rotor a 4 °C por 40 min, dando vórtex cada 10 minutos. Seguido se incubó por 10 minutos más a 37 °C en el ThermoMixer (Eppendorf ThermoMixer 5350 Mixer) y al final se centrifugó durante 10 minutos a 20000 gravedades a 25 °C. De esto se recuperó el sobrenadante y se descartó el pellet donde se encuentra el Tritón X-114 junto a la endotoxina. Este mismo proceso se realizó 2 veces más para asegurar menores niveles de endotoxina. Al final se realizó densitometría para calcular la concentración de la proteína utilizando BSA como estándar.

### **8.1.3. Cuantificación de endotoxina**

La medición de la endotoxina se determinó mediante un ensayo colorimétrico cuantitativo basado en la reacción del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), usando el kit ToxinSensor™ Chromogenic LAL (Genscript) de acuerdo con las directrices del fabricante. Brevemente, se usaron estándares de endotoxina de *E. coli* en un rango de 1 – 0.1 EU/mL pues la concentración de la endotoxina en la muestra se espera que este en este rango. Cada uno de los reactivos del kit se preparó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El procedimiento se realizó de la siguiente manera: se colocó 100 µL de estándar, proteína o blanco (agua libre de endotoxina) en viales libres de endotoxinas, se realizó una dilución de 1:50 de la proteína en agua estéril para asegurar que entrara en la curva de estándares. Se agregó 100 µL del lisado de amebocitos de *Limulus* reconstituido a cada vial, las muestras se incubaron por 10 minutos a 37 °C ± 1 °C. Después se agregó 100 µL del sustrato cromogénico a cada vial y se incubaron a 37 °C ± 1 °C durante 6 minutos. Por último, se agregaron 500 µL de cada estabilizador de color y se mezcló con vórtex. Para la medición de la endotoxina, se colocaron 200 µL de cada muestra por duplicado en una placa enzimática de 96 pozos y se midió la densidad óptica a 545 nm en el espectrofotómetro Multiskan™ (Thermo Fisher Scientific).

#### **8.1.4. Expresión y purificación del Blo t 2**

Las muestras obtenidas a una concentración y pureza adecuada no fueron suficientes para la culminación de los experimentos comprendidos en este proyecto, por lo que se hizo necesaria la producción de un nuevo lote de rBlo t 2. La expresión de rBlo t 2 fusionada a una 6X His-tag se realizó en la cepa de *E. coli* Origami (DE3) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) a la que se le transfectó mediante electroporación el vector pET-45b (+) con la isoforma Blo t 2.0101. Esta cepa bacteriana se cultivó 16 horas durante la noche en medio Luria Bertani modificado con ampicilina (LBA) 100 µg/mL a 37 °C y en agitación a 250 rpm para ser usada como inóculo en un cultivo de mayor volumen. Al día siguiente se realizó una dilución 1:20 del cultivo en medio LBA y se incubó nuevamente a 37 °C y en agitación a 250 rpm un promedio de 3 horas hasta alcanzar una OD600 entre 0.5 y 0.8. La expresión de la proteína se indujo luego con 0.1 mM de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) durante 5 horas a 37 °C y a 250 rpm. Cumplido este tiempo, se recolectaron las bacterias por centrifugación para formar un pellet compacto y se almacenaron a -20 °C hasta su utilización. Este pellet se reconstituyó en buffer de lisis y se le realizaron dos ciclos de congelamiento y descongelamiento. Luego se realizaron 5 ciclos de sonicación de 20 segundos cada uno con una amplitud de 50 en intervalos de un minuto. Posteriormente se centrifugó la muestra a 4500 rpm a 4 °C por 30 minutos, se resuspendió nuevamente el pellet en buffer de solubilización con TrisHCL 40mM y N-laurilsarcosina (NLS) al 0,2%. Se realizaron otros 5 ciclos de sonicación de 20 segundos con amplitud de 50 en intervalos de un minuto y se dejó la muestra en agitación en rotor durante 24 horas a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 4500 rpm, 4 °C por 30 minutos y se recolectó el sobrenadante.

La proteína rBlo t 2 se purificó usando cromatografía de afinidad Ni-NTA e (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), para esto se realizaron varios lavados usando Tritón X-100 al 0.5%, y luego se hizo la elución de la proteína con un

gradiente creciente de imidazol desde 50 hasta 500 mM. La concentración de Blo t 2 se determinó mediante densitometría, utilizando BSA como estándar.

Esta se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso en la evaluación de la actividad alérgica con el test de activación de basófilos y la prueba de anafilaxia cutánea pasiva. A las muestras usadas en esta última prueba se le realizó la remoción de endotoxina usando Tritón X-114 como se describió anteriormente.

## **8.2. Evaluación de la asociación de Blo t 2 con asma**

### **8.2.1. Escogencia de casos y controles**

Se evaluó la importancia clínica de Blo t 2 teniendo en cuenta como criterio su asociación estadística con la presentación de asma en un estudio de casos y controles. Se evaluaron las muestras de 323 asmáticos y 337 controles. Las muestras de los sujetos hacen parte de proyectos previamente aprobados por el Ministerio de Ciencias de Colombia: “Asma y otras enfermedades alérgicas en Colombia, están aumentando en frecuencia.” Código: 223945921557. Rodolfo Dennis (IP), “Influencia de la sensibilización por alergenos de *Áscaris* en la respuesta alérgica y severidad del asma.” Código: 110749326193. L. Caraballo (IP), y “Genes Candidatos en Asma: Estudios de asociación en una población colombiana.” Código 8286-04-11780. L. Caraballo (IP).

Del primero de estos tres proyectos se obtuvieron muestras de 561 personas, entre casos y controles de 5 ciudades de Colombia. Basándose en un cuestionario desarrollado y validado originalmente por la iniciativa International Study of Asthma and Allergy in Children (ISAAC), se desarrollaron una serie de preguntas que permitieron determinar los casos y los controles. En este 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 un control como cualquier sujeto que ni tuviera síntomas de asma ni un diagnóstico médico previo de asma (86). Del segundo y tercer proyecto se obtuvieron respectivamente

50 casos y 49 controles, únicamente de la ciudad de Cartagena. Aquí los casos correspondieron a personas entre 8 a 70 años que respondieron afirmativamente a la pregunta: ¿Alguna vez le diagnosticaron asma? y a quienes este diagnóstico se le confirmó clínicamente por un médico (31), mientras que los controles fueron individuos sin antecedentes familiares o personales de asma y alergias (87).

### **8.2.2. Medición de IgE específica contra rBlo t 2 mediante prueba de ELISA**

Actualmente se cuenta en el Instituto de Investigaciones Inmunológicas con un protocolo estandarizado para la medición, mediante ELISA indirecto, la IgE específica humana contra alérgenos recombinantes (88), este fue usado en este ensayo y consistió en la inmovilización rBlo t 2 en una microplaca de 96 pozos a una concentración de 5 µg/mL en buffer carbonato/bicarbonato pH 9.6 mediante incubación ON a 4 °C. Los pozos luego se bloquearon con PBS-BSA 1% por un tiempo de 3 horas a temperatura ambiente. Se agregaron, posterior a 4 lavados con PBS-Tween 20 0,1% (PBST), los sueros humanos diluidos 1:5 en buffer de bloqueo y se dejaron incubando ON a temperatura ambiente. Después de 5 lavados con PBST, se incubaron con un monoclonal anti-IgE humana unida a fosfatasa alcalina durante 2 horas a temperatura ambiente. El desarrollo de la reacción se hizo con p-nitrofenil fosfato diluido en dietanolamina al 10% pH 9.8, luego de 60 minutos la reacción se detuvo con NaOH 3N. La lectura de la OD se realizó en un espectrofotómetro a 405 nm (Multiskan™ Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). El volumen de todas las reacciones fue de 50 µL por pozos, a excepción del bloqueo con BSA que fue 100 µL. El punto de corte para la sensibilización al alérgeno recombinante utilizado, fue de 0,09 OD, este ya se calculó en un trabajo anterior (88) como la suma del promedio de la OD de la IgE específica sujetos no asmáticos y no sensibilizados a ácaros más dos desviaciones estándares. Para esta prueba se utilizó como controles de placa un suero negativo y uno positivo al

extracto de *B. tropicalis* este último analizado con una curva de concentraciones del extracto.

### **8.3. Evaluación de la actividad alérgica de rBlo t 2**

#### **8.3.1. Prueba de activación pasiva de basófilos (PAB)**

Para la realización de la PAB se aislaron, por gradiente de Ficoll, células mononucleares de sangre periférica de un donante sano, las cuales se pasaron por un filtro de células de 70 µm y se lavaron tres veces con una solución de PBS/EDTA 2mM. Para separar la IgE unida al receptor de los basófilos se lavaron las células con un buffer basado en ácido láctico (pH 3.9) durante 1 minuto a 4 °C. El pH se neutralizó rápidamente el con RPMI-BSA 0.5% y Tris 12% (pH: 8.0). Estando las células libres de anticuerpos, se incubaron por 1 h a 37 °C con los sueros de los sujetos en estudio. Se realizó un lavado con PBS estéril y se incubaron con rBlo t 2 a concentraciones de 0.1, 1 y 10 µg/mL, PBS como control negativo, extracto de *Blomia tropicalis* 1 µg/mL y Anti-IgE (1:20) como control positivo. La activación de basófilos se cuantificó por citometría de flujo utilizando el sistema FACS-ARIA III (BD, Estados Unidos), identificando las células mediante la estrategia CRTH2pos CD203cposCD3neg usando el estuche Allergenicity Kit (Beckman coulter). Los resultados se expresaron como la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) de cada muestra, por recomendación del fabricante. De igual forma se utilizó el índice de estimulación (SI) que se calcula mediante la fórmula: MFI activación frente al alérgeno/activación basal, el punto de corte para el SI se halló como la suma del promedio del SI de 3 sujetos no asmáticos no sensibilizados al alérgeno ni al extracto más dos desviaciones estándares, el valor resultante fue de 1.5 (89).

#### **8.3.2. Modelo murino de asma alérgica**

##### **8.3.2.1. Inmunización y reto nasal de ratones**

Se obtuvieron ratones hembra BALB/c de seis semanas de edad del Instituto Nacional de Salud, (INS, Bogotá, Colombia). Todos los experimentos se realizaron

de acuerdo con las normativas científicas nacionales e internacionales, y fueron aprobados por el comité de ética local de la Universidad de Cartagena. Los protocolos usados se basan en trabajos previos del Instituto de Investigaciones Inmunológicas (90).

Los ratones se dividieron en tres grupos y fueron inmunizados por vía intraperitoneal (i.p.) una vez cada semana por tres semanas con PBS (control negativo), 20 µg de extracto de *Blomia tropicalis* (control positivo) o 20 µg de rBlo t 2, emulsionado cada uno en alumbre (Imject Alum, ThermoFisher Scientific, EE. UU.). Siete días después de la última inmunización, los ratones fueron retados intranasalmente una vez al día por tres días con solución salina, 40 µg de extracto de *Blomia tropicalis* o 20 µg de rBlo t 2 al grupo correspondiente.

#### **8.3.2.2. 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 entero (Buxco Electronics, EE. UU.). La metacolina se diluyó en agua a diferentes concentraciones (25, 12.5, 6.13 y 3.1 mg/mL) y se administraron en aerosol (50 µL en 90 segundos por cámara) las dosis en concentraciones crecientes. La hiperreactividad bronquial se evaluó mediante la medición de los valores de pausa mejorada (Penh), una determinación indirecta de este parámetro que se puede obtener en animales conscientes.

#### **8.3.2.3. Eutanasia**

Los ratones fueron sacrificados 24 horas después de la realización de la pletismografía. Se recolectaron muestras de sangre, se realizó un lavado broncoalveolar y el pulmón izquierdo se sumergió en formalina tamponada neutra al 10%.

#### **8.3.2.4. Histología pulmonar**

El tejido pulmonar se cortó en secciones de 4 µm de espesor y se tiñó con hematoxilina eosina (HE) y ácido Peryódico de Schiff (PAS). Las placas 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 y perivasculares, basados en una modificación del sistema de puntuación de 5 puntos descrito por Myou et al (91).

#### **8.3.2.5. Análisis del lavado broncoalveolar**

El BAL se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 min para separar el pellet celular del sobrenadante. El pellet se resuspendió en 1 mL de PBS y se le agregó 1 mL de Buffer de lisis 1x y se incubó por 5 minutos en hielo luego se centrifugó nuevamente a 1.500 rpm durante 5 min. El pellet celular se resuspendió en 120 µl de Stain buffer y se tomaron 40 µl a los que se le agrega 10 µl del mix de anticuerpos (V450-CD45, PECy7-CD3e, FITC-F4/80, PE-CD11b, PerCPefluor-CD170 (SiglecF), APC-Ly6G) (**Tabla S1**) o 10 µl del control de isotipos para definir las diferentes poblaciones celulares. Se incubaron las muestras por 10 min a 4 °C y se centrifugaron con 500 µl de Stain buffer por 7 min a 300 G y se descartó el sobrenadante. Finalmente, se resuspendió en buffer de fijación y se cuantificaron las diferentes poblaciones celulares mediante citometría de flujo utilizando el sistema FACS-ARIA III (BD, Estados Unidos).

#### **8.3.2.6. ELISA de inmunoglobulinas de ratones contra Blo t 2**

Para la determinación de los niveles de, IgE IgG1 e IgG2a de ratón específicos para rBlo t 2, se inmovilizaron en las placas de microtitulación los alérgenos a 5 µg/mL diluidos en PBS y se incubaron durante la noche a 4 °C. A continuación, los pocillos se bloquearon con PBS-BSA 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras del plasma se incubaron a 37 °C por 2 horas. Se realizaron 5 lavados con PBST, los pocillos se incubaron con monoclonales anti-IgG1, anti-IgG2a o anti-IgE de ratón marcadas con biotina (diluidas 1: 1.000 en tampón de bloqueo) durante 1 hora a 37 °C. Después de 5 lavados, se añadió a los pocillos estreptavidina fosfatasa alcalina (diluida 1: 2.000 en Tris 50 mM, BSA al 1%, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 8,0). Se utilizó pNPP, disuelto en dietanolamina al 10%, MgCl<sub>2</sub> 0,05 mM a 1 mg / ml, como solución de sustrato. A los 60 minutos de incubación se detuvo la reacción

con NaOH 3N. La densidad óptica se obtuvo leyendo las placas en un espectrofotómetro a 405 nm (Multiskan™ Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

Para aumentar la sensibilidad del ELISA para la detección de la IgE, se debió depletar la IgG de los sueros de los ratones para evitar la competencia de esta por la unión al antígeno. Para este procedimiento se utilizó una proteína G recombinante unida a sefarosa (Thermo Fisher Scientific) la cual, luego de ser lavada y equilibrada con PBS pH 7.4, se incubó por tres ciclos de 30 minutos con los sueros de los ratones diluidos 1:6, lavando la resina con buffer de glicina 100 mM HCL pH 2.7 entre cada ciclo para retirar la IgG unida.

### **8.3.3. Prueba de anafilaxia cutánea pasiva**

Esta prueba se realizó siguiendo un protocolo descrito anteriormente (92). Brevemente, los sueros de los ratones recolectados en el modelo de asma respiratoria sirvieron como insumo para la realización de este experimento. Se dividieron ratones BALB/c no inmunes en tres grupos: rBlo t 2, *Blomia tropicalis* como control positivo y PBS como control negativo, se inyectaron 10 µL en la oreja y 50 µL abdomen del antisuero de su grupo correspondiente de los ratones inmunizados. Después de un período latente (24 horas), se inyectó por vía intravenosa el colorante azul de Evans mezclado con el antígeno (rBlo t 2 o extracto de *Blomia tropicalis*) o PBS. Pasadas dos horas y observándose signos de circulación completa del azul de Evans, se sacrificaron los ratones, se recolectaron las orejas y el segmento del pelaje del abdomen teñido y se incubaron en 700 µL de formamida a 37 °C durante 72 h. Posteriormente se cuantificó el colorante extravasado usando una curva de concentraciones de azul de Evans y midiéndolo a 620 nm en espectrofotómetro.

### **8.4. Análisis estadístico**

Los análisis se llevaron a cabo utilizando el programa SPSS versión 17.0 (SPSS Chicago, IL, EE. UU.) Y GraphPad Prism versión 5.01 para Windows (GraphPad

Software, San Diego, CA, EE. UU.). Para los análisis epidemiológicos de la serología IgE se describen 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 hizo la prueba de chi-cuadrado. Se realizaron análisis de regresión logística binaria multivariada para evaluar la asociación entre asma y sensibilización, para evaluar variables de confusión como edad, sexo o ciudad de origen del sujeto. Se calcularon las razones de probabilidad brutas (OR) y ajustadas (aOR), su intervalo de confianza del 95% y los valores de *P*.

Para analizar las diferencias entre los tres grupos de ratones en los modelos murinos, los resultados se analizaron utilizando la prueba ANOVA de una vía y la prueba post test de Dunnet. Para la prueba de activación de basófilos se utilizó una prueba t pareada para determinar la diferencia de la MFI en células estimuladas con PBS Vs. Estimuladas con rBlo t 2, tanto en los grupos sensibilizados con sueros de pacientes, como sensibilizados con sueros de controles.

La significancia estadística fue *P* con valores de:  $P < 0,05 = *$ ;  $P < 0,005 = **$ ;  $P < 0,001 = ***$ ;  $P > 0,05 =$  no significativo (ns).

### **8.5. Consideraciones éticas**

Se consideró la normatividad nacional vigente en materia de investigación en salud para el diseño del presente proyecto. 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 consiste en la extracción de sangre

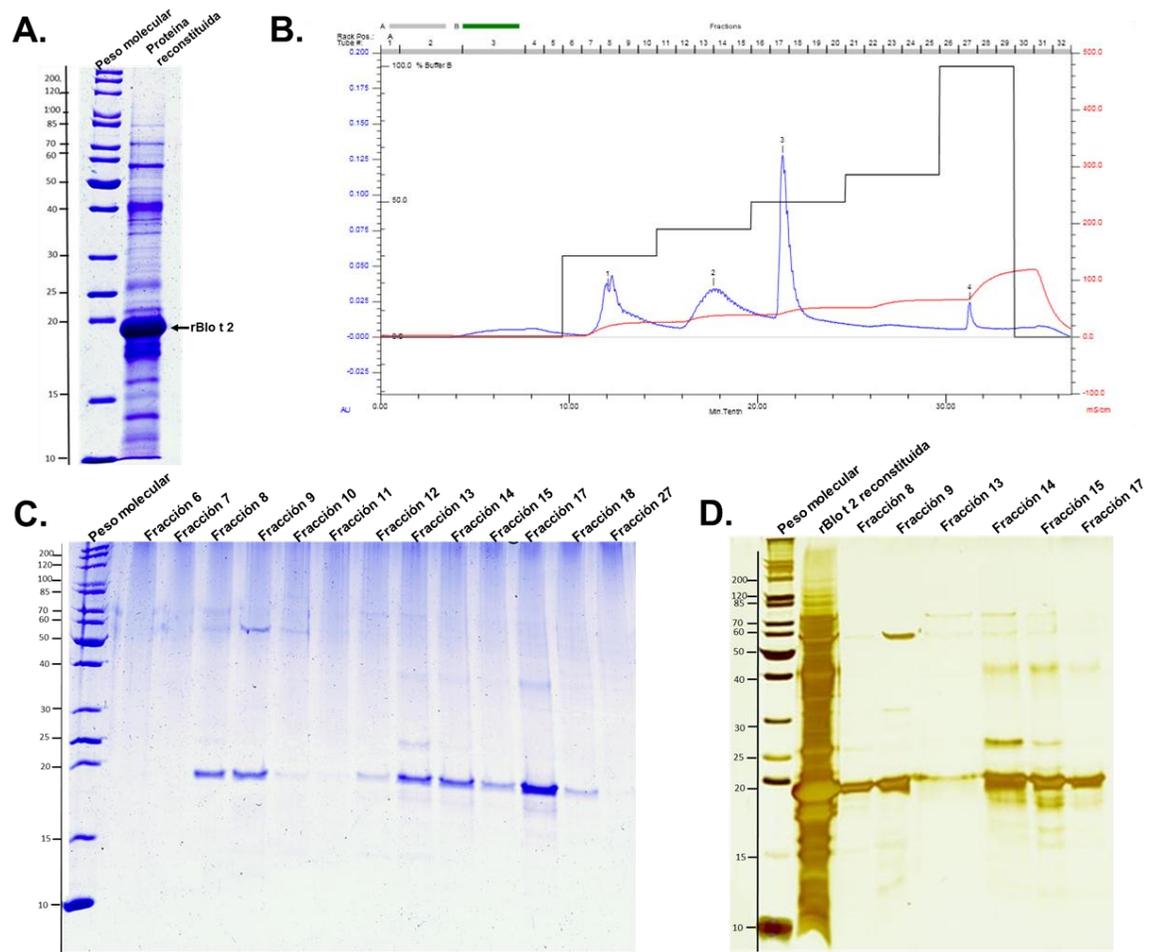
por punción venosa en adultos en buen estado de salud. Esto fue realizado por personas entrenadas especialmente para llevar a cabo este proceso. Todos los datos de los pacientes recolectados fueron tratados de forma anónima, sólo utilizada con fines académicos y fueron revisados solo por el equipo de investigación como datos grupales, sin entrar a identificar sujetos puntuales. Además, se adhirió a las normas científicas internacionales, protocolo de Helsinki y principios de Belmont. Este proyecto fue avalado por el Comité de Ética en Investigaciones de la Universidad de Cartagena (**Anexo 1**). A los pacientes donadores que se les tomó muestra de sangre se les solicitó un consentimiento informado (**Anexo 2**).

Todos los procedimientos incluidos fueron diseñados y ejecutados de acuerdo con las pautas éticas nacionales y globales que protegen el medio ambiente, el bienestar de los animales de experimentación y la salud humana. Los modelos experimentales que contemplan el uso de ratones de laboratorio se rigen por la normativa vigente establecida en la ley 84 de 1989 de la República de Colombia, Capítulo VI, referente al uso de animales vivos en experimentos e investigaciones y de acuerdo con la resolución 594 de 11 de julio de 1996.

## 9. Resultados

### 9.1. Producción del rBlo t 2

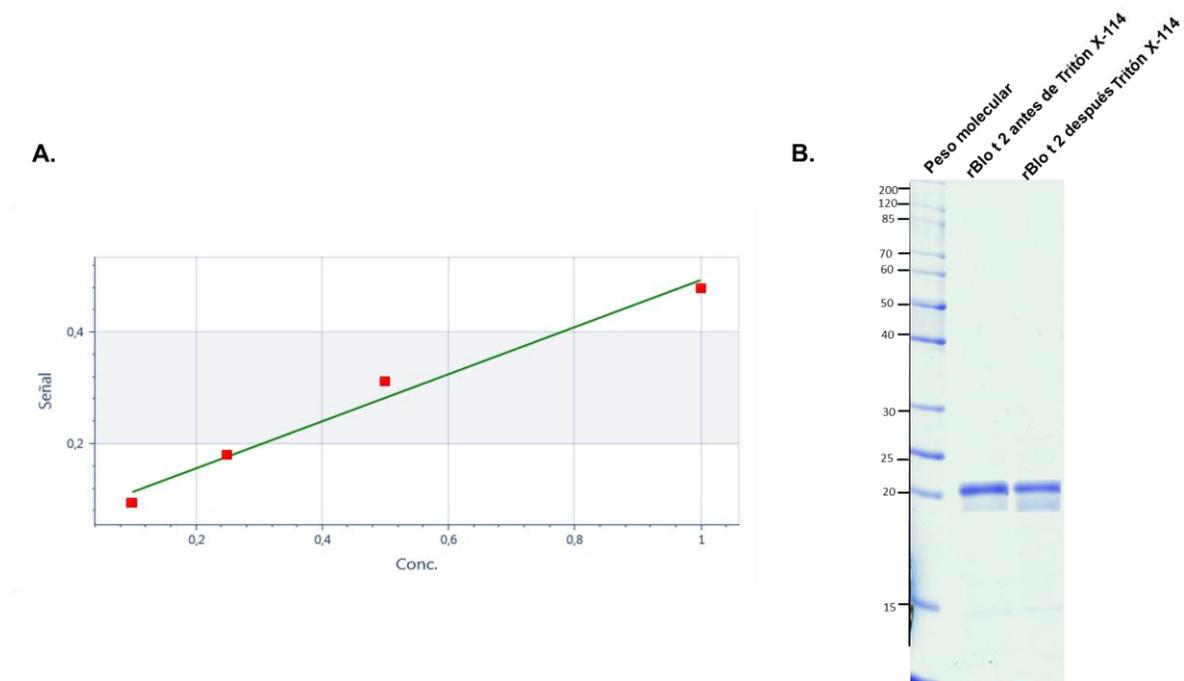
Con los 31,5 mg de rBlo t 2 recibidos del Banco de Alergenos Silvia Jiménez, se realizaron un total de 15 corridas de FPLC. Se observó que la alta afinidad de la proteína por la columna aniónica impidió que la proteína se liberara fácilmente durante el paso de elución, obteniendo así múltiples fracciones con concentraciones bajas de la proteína, mientras que aquellas que tenían mayor concentración aún presentaban bandas de proteínas adicionales (**Figura 6**). De la cantidad inicial se logró recolectar un total 22,8 mg de rBlo t 2, distribuidos en diferentes alícuotas de volúmenes, concentraciones y niveles de pureza variables.



**Figura 6. Purificación final del recombinante Blo t 2.** A. SDS-PAGE 15% del rBlo t 2 recibido del banco de alérgenos luego de ser reconstituido en agua Milli Q; B. Cromatograma de la purificación de rBlo t 2 mediante intercambio aniónico; C. SDS-PAGE 15% luego de la purificación por FPLC de rBlo t 2; D. Tinción de plata de la rBlo t 2 purificada.

A algunas fracciones de proteína con una concentración adecuada para el uso en las inmunizaciones y retos del modelo murino de asma, de por lo menos 200 µg/mL, y además suficientemente puras, se les realizó la remoción de endotoxina usando el Tritón X-114. Utilizando el método LAL para su cuantificación, se encontró que la concentración de endotoxina, luego de multiplicar el resultado encontrado por el factor de dilución (1:50) fue de 6.4 EU/mL, lo que representa una disminución

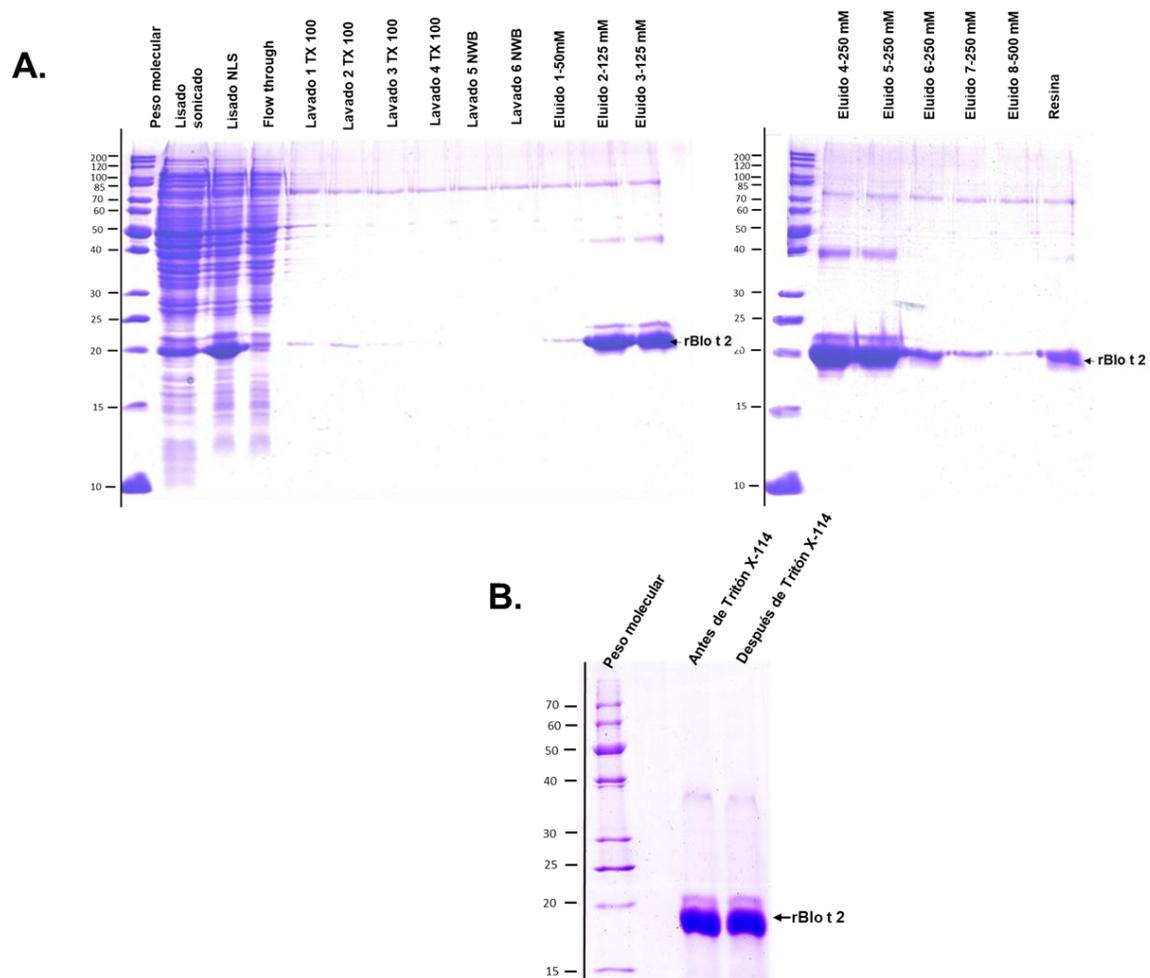
importante de este componente bacteriano ya que los niveles de endotoxina de la muestra previa a su remoción, sobrepasaron el estándar superior de la curva, incluso a una dilución de 1:50. Adicionalmente durante este proceso no se observó una disminución importante de la concentración de la proteína en las muestras (Figura 7).



**Figura 7. Remoción de endotoxina con Tritón X-114.** A. Curva estándar de *E. coli* a diluciones de 0.1 a 1 EU/mL; B. SDS-PAGE 15% de rBlo t 2 antes y después de la remoción de la endotoxina con concentraciones de aproximadamente 219  $\mu\text{g/mL}$  y de 214  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.

La dilución de la proteína durante los ensayos de FPLC hizo necesario que se produjera un nuevo lote de rBlo t 2 que se utilizaría en las pruebas de activación pasiva de basófilos y en la prueba de anafilaxia cutánea pasiva. La isoforma recombinante número 1 de Blo t 2 se expresó usando la *E. coli* Origami (DE3) como sistema y el pET-45 b (+) como vector. Se obtuvo una proteína con un peso teórico de 16.9 KDa y un punto isoelectrico de 5.91. Para mejorar el rendimiento de la producción se utilizó un buffer de solubilización con NLS al 0.2% durante el paso de lisis del cultivo. Para reducir la unión de proteínas contaminantes debido a

interacciones hidrófobas o iónicas inespecíficas se usó el detergente Tritón X-100. Debido a su gran afinidad por la resina de níquel, fue necesario usar un gradiente de imidazol desde los 50 a los 500 mM. El rendimiento del cultivo de rBlo t 2 usando este método fue de aproximadamente 25 mg por litro de cultivo. Se observó que los eluidos 2 al 6, en los que se usó imidazol entre 125 a 250 mM, contenían la concentración más alta de proteína. Además, se observa que estas modificaciones al protocolo de lisado y purificación mejoraron la pureza de la proteína comparada con el lote recibido del banco de alérgenos (**Figura 8**).



**Figura 8. Producción del segundo lote de rBlo t 2.** A. SDS-PAGE 15% de rBlo t 2 que muestra la presencia de la proteína en los diferentes pasos de lisado usando sonicación y NLS, los lavados con Tritón X-100 y la elución con un gradiente

creciente de imidazol. A. SDS-PAGE 15% de rBlo t 2 antes y después de realizar el proceso de remoción de endotoxina usando Tritón X-114.

## 9.2. Características demográficas de la población estudiada

Se obtuvo información de 660 sujetos entre 1 y 74 años. El valor de la mediana de la edad de los casos (24,5 años) y de los controles (25 años) fue similar ( $p= 0,33$ ). El porcentaje de mujeres en el estudio fue superior al porcentaje de hombres, especialmente en el grupo de casos donde el 64,4% fue mujer. Se analizaron muestras de pacientes asmáticos y sujetos sanos de seis de las principales ciudades de Colombia, la mayoría de estos provenientes de Bogotá, que aportó el 47,7% de los sujetos estudiados (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Estadísticas descriptivas de la población de estudio (n=660).

		Controles 337		Casos 323		<i>p-valor</i>
		n	%	n	%	
<b>Sexo</b>	F	184	54,6%	208	64,4%	0,01#
	M	153	45,4%	115	35,6%	
<b>Grupo de edad</b>	Mediana (RI)	25 (15-45)		24,5 (14-44)		0,331##
	1-4	7	2,1%	21	6,50%	
	5-11	47	13,9%	38	11,80%	
	12-18	61	18,1%	61	18,90%	
	19-74	222	65,9%	202	62,70%	
<b>Ciudad</b>	Barranquilla	30	8,9%	30	9,3%	
	Bogotá	164	48,7%	149	46,1%	
	Cali	47	13,9%	47	14,6%	
	Cartagena	49	14,5%	50	15,5%	
	Medellín	27	8,0%	27	8,4%	
	San Andrés	20	5,9%	20	6,2%	

# Chi cuadrado

##Prueba U de Mann-Whitney

### 9.3. Sensibilización a Blo t 2 en pacientes asmáticos

Se realizaron pruebas serológicas para evaluar la reactividad IgE contra Blo t 2 a los 660 sujetos de estudio, 323 casos y 337 controles. Se obtuvieron datos de la reactividad IgE contra el extracto de *Blomia tropicalis* evaluada mediante ImmunoCAP para 657 de estos sujetos evaluados en un estudio pasado, 322 casos y 337 controles (86). El porcentaje de sujetos sensibilizados al extracto de *B. tropicalis* en los casos (42,5%) fue superior cuando se comparó con el porcentaje de sensibilizados en el grupo control (16,6%). De manera similar los casos estuvieron más sensibilizados al recombinante Blo t 2 frente a los controles (30,7% Vs 23,4%  $P=0,037$ ) (**Tabla 3**). La mediana de los niveles séricos de IgE específica contra el extracto de *B. tropicalis* fue mayor en los casos que en los controles (0,12 frente a 0.03 kU/L,  $P < 0,001$ ); Asimismo, la mediana de la OD medida por ELISA de la IgE específica contra Blo t 2 fue mayor en los asmáticos comparado con los controles (0,078 frente 0.075  $p=0,005$ ) (**Tabla 4**).

Se realizaron análisis de regresión logística multivariada ajustados por variables de confusión como edad, sexo o ciudad de origen del sujeto para valorar de mejor manera la asociación entre asma y sensibilización a rBlo t 2. Se calcularon las razones de probabilidad crudas (OR) y ajustadas (aOR), su intervalo de confianza del 95% y los valores de  $P$ , se encontró que a pesar de que el OR crudo muestra una asociación de rBlo t 2 con asma, cuando se ajusta por las variables de confusión esta asociación desaparece (**Tabla 5**). Por último, de los 137 pacientes y 56 controles que se encontraron sensibilizados al extracto de *Blomia*, encontramos que para ambos grupos el porcentaje de sensibilización contra rBlo t 2 fue de aproximadamente de un 40% (**Tabla 6**).

**Tabla 3.** Porcentaje de pacientes sensibilizados a *B. tropicalis* medido por ImmunoCAP y a rBlo t 2 medido mediante ELISA.

Alergeno	Casos			Controles			p-valor
	Casos +	n muestras	% de sensibilización	Controles +	n muestras	% de sensibilización	
Extracto de <i>B. tropicalis</i>	135	320	42,10%	56	337	16,6%	0,001#
Blo t 2	99	323	30,7%	79	337	23,4%	0,037#

#Prueba de Chi-cuadrado

**Tabla 4.** Mediana de los niveles de IgE específicas contra el extracto de *B. tropicalis* expresada en kU/L, medidos por ImmunoCAP y mediana de la OD de rBlo t 2 medida mediante ELISA.

Alergeno	Casos		Controles		p-valor
	Mediana (rango intercuartílico)	n muestras	Mediana (rango intercuartílico)	n muestras	
Extracto de <i>B. tropicalis</i>	0,12 (0,00-3,78)	320	0,03 (0,00-0,10)	337	0,001##
Blo t 2	0,078 (0,070-0,099)	323	0,075 (0,069-0,089)	337	0,005##

##Prueba U de Mann-Whitney

**Tabla 5.** Análisis univariado y multivariado mediante regresión logística binaria.

Sensibilización IgE a rBlo t 2	OR crudo	1,443	IC	P-valor
			1,02-2,03	0,037
	OR ajustado	1,357	0,95-1,93	0,092

Se muestran las razones de probabilidad (OR) crudas y ajustadas, su intervalo de confianza del 95% y los valores de P.

**Tabla 6.** Porcentaje de pacientes y controles sensibilizados rBlo t 2 dentro del grupo de pacientes que presentaban sensibilización IgE al extracto de *B. tropicalis*.

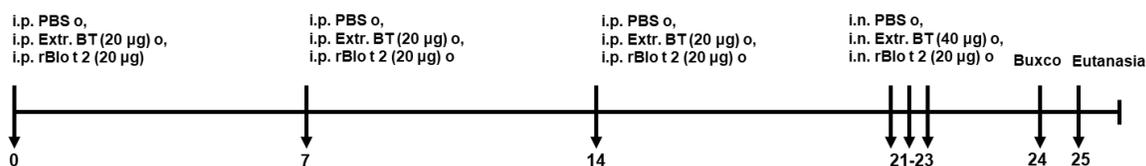
Alergeno	Casos			Controles			p-valor
	n sensibilizados	n muestras	% de sensibilización	n sensibilizados	n muestras	% de sensibilización	
Blo t 2	56	137	40,0%	22	56	39,3%	0,942#

#Prueba de Chi-cuadrado.

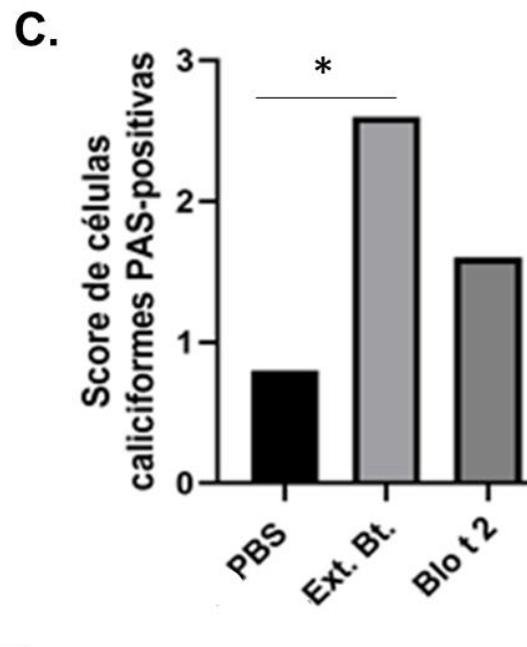
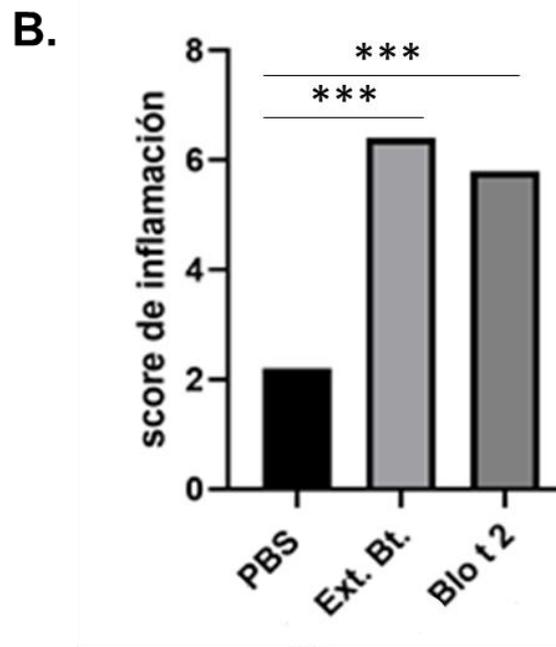
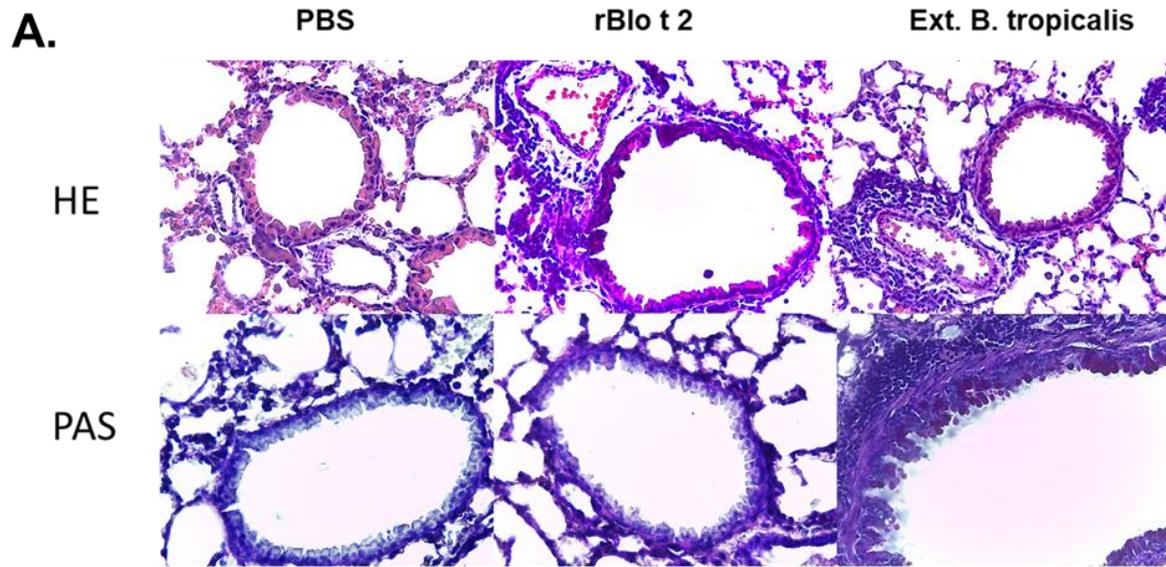
#### 9.4. rBlo t 2 induce inflamación en un modelo murino de asma alérgica

Se sensibilizaron tres grupos de ratones BALB/c por vía intraperitoneal con rBlo t 2, extracto de *B. tropicalis* o PBS adsorbidos 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 (**Figura 9**). Los resultados muestran que el nivel del infiltrado inflamatorio alrededor de la tráquea en los grupos *B. tropicalis* y rBlo t 2 fue mayor con respecto al grupo control. En nuestro estudio no encontramos un aumento significativo del número de células caliciformes de los ratones estimulados con rBlo t 2, aunque este sí estuvo presente en el grupo estimulado con el extracto (**Figura 10**). También se encontró que Blo t 2 es capaz de inducir hiperreactividad de las vías respiratorias ante el estímulo con metacolina a partir de una dosis de 12.5 mg/mL (**Figura 11**). Análisis de citometría de flujo indican que el grupo Blo t 2 es capaz de inducir un aumento del número de eosinófilos frente al grupo PBS, mientras que el número de neutrófilos y macrófagos alveolares es igual entre estos grupos (**Figura 12**), la estrategia de gating usada en este experimento se muestra en la **Figura S1**.

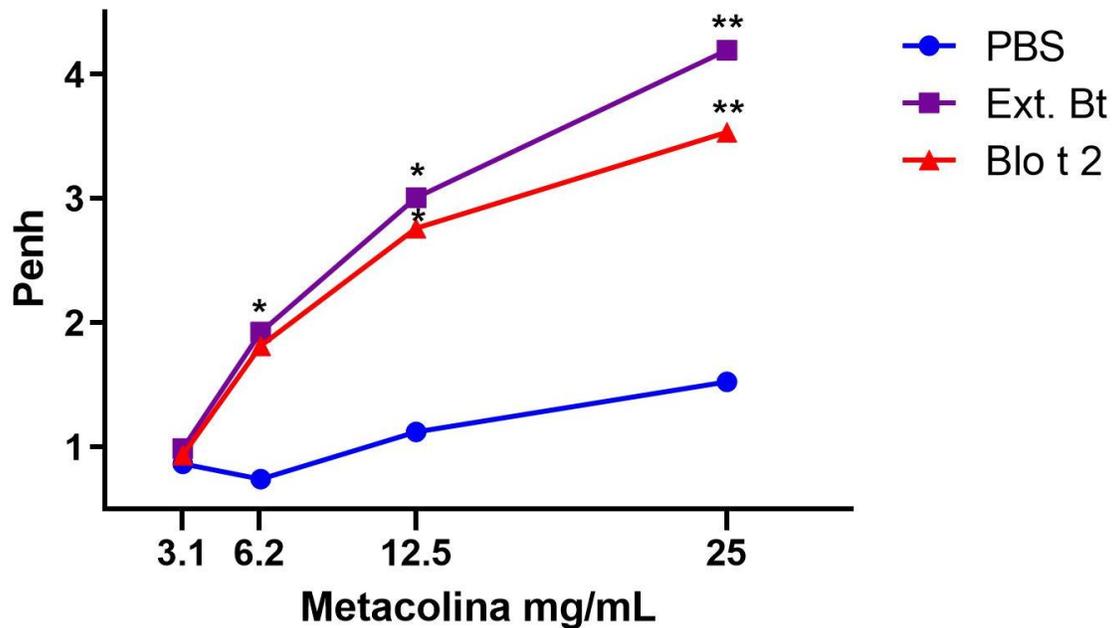
Se midió la reactividad de las inmunoglobulinas IgE, IgG1 e IgG2a de ratón contra el recombinante Blo t 2 mediante ELISA, se encontró que este alérgeno induce un aumento significativo de estas inmunoglobulinas cuando se compara con el grupo PBS y además el aumento es mayor que el inducido por el extracto de la *Blomia tropicalis* (**Figura 13**).



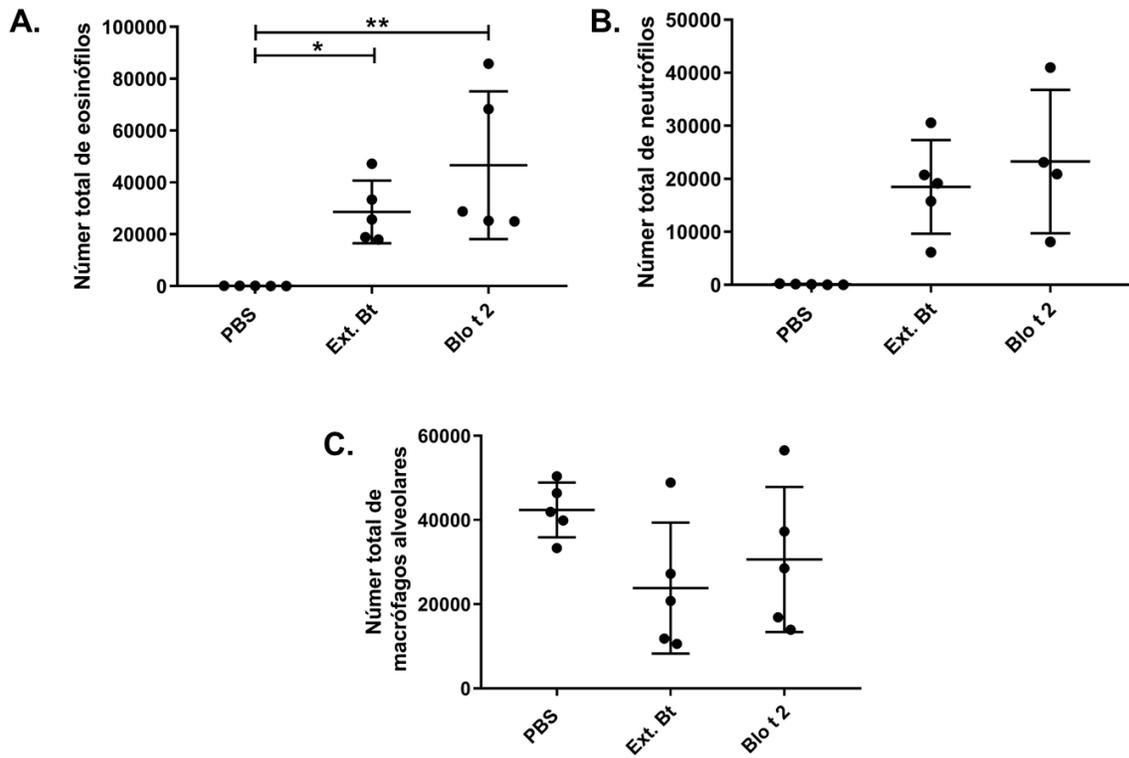
**Figura 9. Protocolo de inmunización y retos usados en el modelo murino de asma alérgica.**



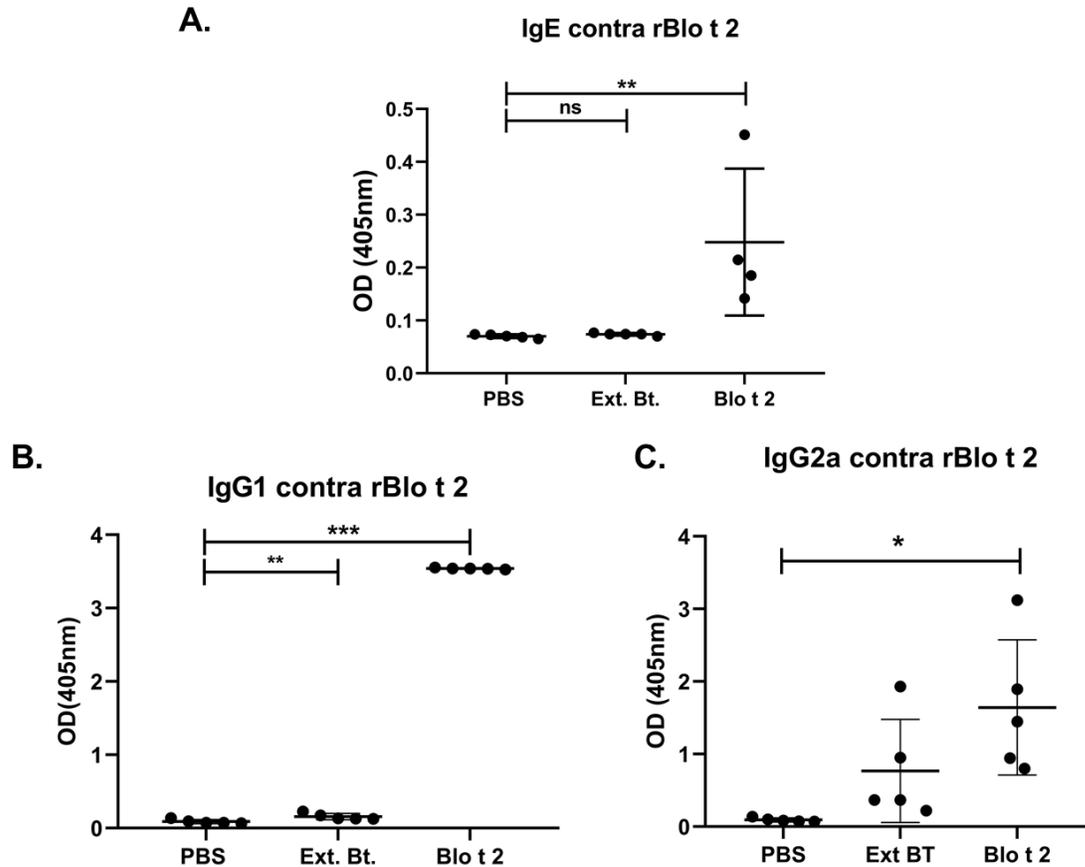
**Figura 10. Análisis histológicos de cortes del tejido pulmonar.** A. Se observan los cortes del tejido pulmonar de los ratones teñidos con hematoxilina-eosina (HE) y con ácido Peryódico de Schiff (PAS). B. Se grafica el score de inflamación y B. de células caliciformes. Análisis realizados con la prueba de One-way ANOVA. \*  $P < 0,05$  \*\*  $P < 0,01$  \*\*\*  $P < 0,001$ .



**Figura 11. Pletismografía de cuerpo completo de ratones sensibilizados con rBlo t 2.** La medición del Penh obtenida al evaluar la hiperreactividad de las vías respiratorias mediante pletismografía de cuerpo completo a dosis crecientes de metacolina. Tanto Blo t 2 como el extracto de Blomia, son capaces de aumentar de manera significativa el valor del Penh. Análisis realizados con la prueba de One-way ANOVA. \*  $P < 0,05$  \*\*  $P < 0,01$  \*\*\*  $P < 0,001$ .



**Figura 12. Conteo de células en el lavado broncoalveolar.** Se observa un aumento significativo del número de eosinófilos, sin que esto suceda con los neutrófilos ni los macrófagos alveolares. Análisis realizados con la prueba de One-way ANOVA. \*  $P < 0,05$  \*\*  $P < 0,01$  \*\*\*  $P < 0,001$ .

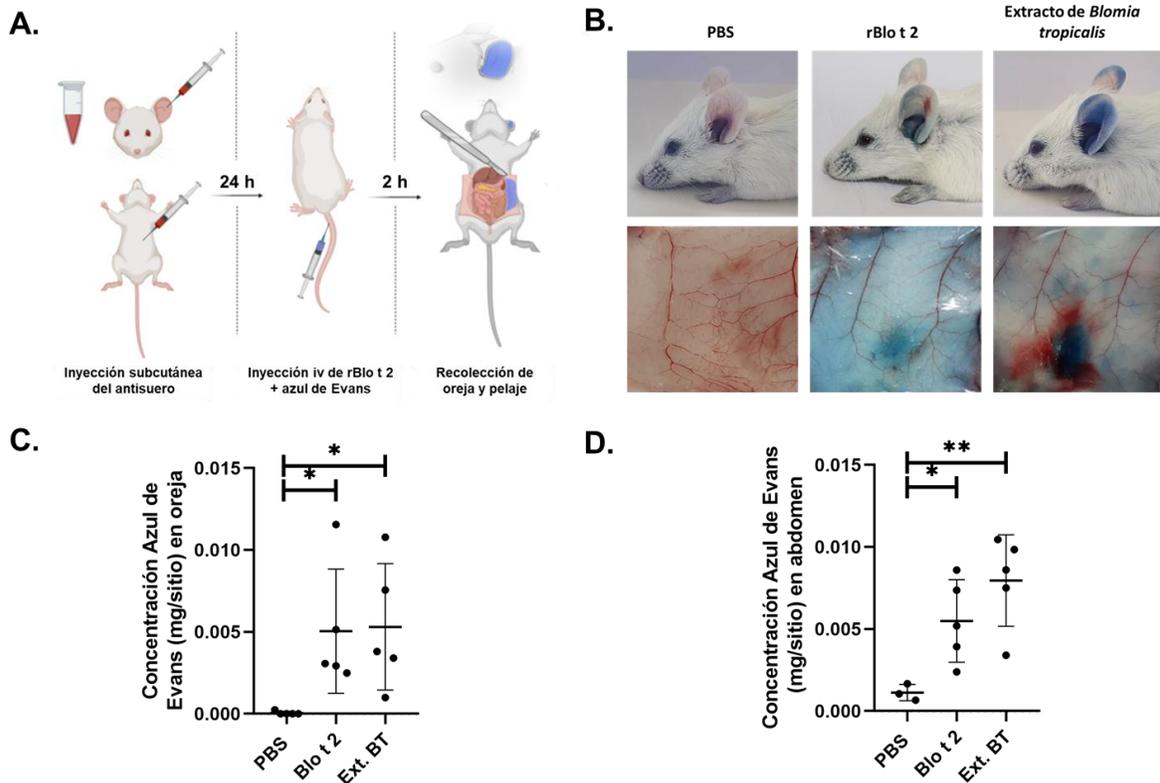


**Figura 13. Niveles de inmunoglobulinas en suero de ratón.** A. OD obtenida mediante Elisa de IgG1 y B. IgG2 a contra Blo t 2. En todos los casos el grupo inmunizado con rBlo t 2 presenta niveles elevados de cada una de estas clases de anticuerpos. \*  $P < 0,05$  \*\*  $P < 0,01$  \*\*\*  $P < 0,001$ .

### 9.5 rBlo t 2 induce anafilaxia cutánea pasiva

Para evaluar la actividad alérgica de rBlo t 2 mediada por IgE se inyectó por vía intradérmica el antisuero de ratones BALB/c previamente inmunizados con rBlo t 2, PBS o extracto de *Blomia tropicalis* en la oreja y la piel del abdomen de tres grupos independiente de ratones BALB/c. Después se administró PBS, rBlo t 2 o extracto junto al azul de Evans y luego se determinó la cantidad del colorante extravasado (**Figura 14 A**). Se observó que luego de 2 horas con el antígeno, los grupos *Blomia*

*tropicalis* y rBlo t 2 presentaron extravasación del azul de Evans en la oreja y el abdomen (**Figura 14 B**). Al comparar azul de Evans extravasado tanto en el abdomen como en la oreja, se encontró que rBlo t 2 provocó un aumento significativo de las medias de las concentraciones de este colorante comparado con el grupo PBS (**Figura 14 C y D**).



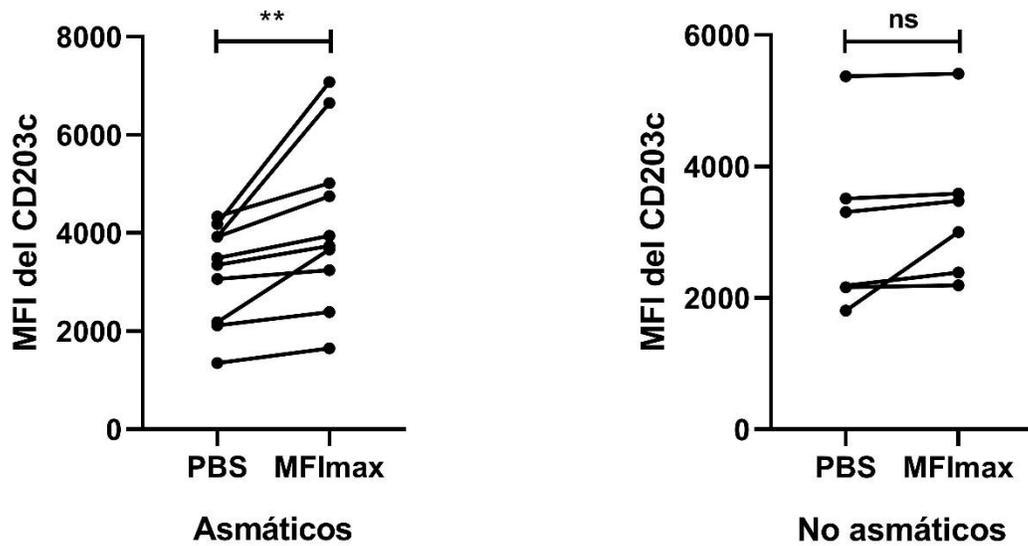
**Figura 14. Evaluación de la actividad alérgica de rBlo t 2 en un modelo de anafilaxia cutánea pasiva (ACP).** A. Protocolo de la ACP realizada en grupos de 3-5 ratones BALB/c donde se evaluó rBlo t 2 y se usó PBS como control negativo y extracto de *Blomia tropicalis* como control positivo. B. Fotografías representativas después del ensayo de ACP donde se muestra el azul de Evans extravasado en la oreja y pelaje abdominal. C y D. Azul de Evans extraído después de la reacción de ACP detectada a 620 nm expresado como media  $\pm$  error estándar de la media de los valores expresados en mg/sitio extrapolados de una curva de concentración. La comparación entre los grupos se realizó mediante un análisis de varianza de una

vía (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de Dunnett: \* $P < 0.05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , no significativo:  $P > 0.05$ .

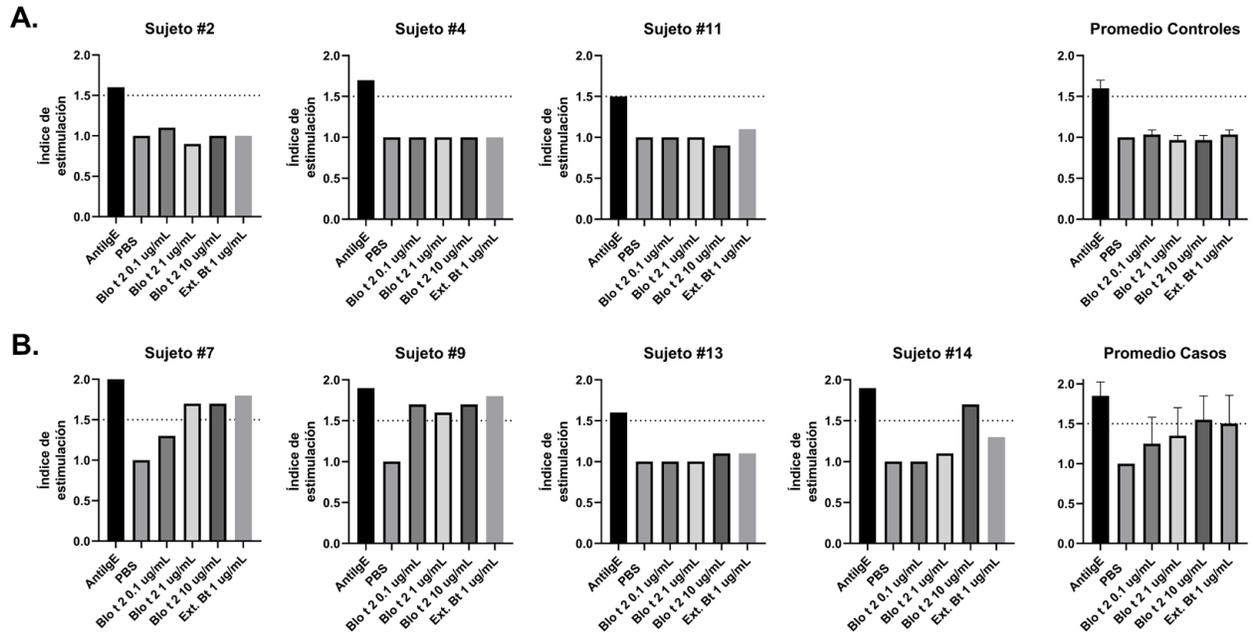
### **9.6 rBlo t 2 produce la activación de basófilos**

Con el fin de determinar si rBlo t 2 es capaz de generar inflamación en humanos, se realizó un ensayo de activación pasiva de basófilos el cuál evalúa la sobre regulación del marcador de superficie CD203c, mediada por la IgE, luego de la incubación con el alérgeno de células sensibilizadas con sueros de pacientes asmáticos (n=10) o de controles (n=6) (**Tabla S2**). Partiendo de los leucocitos se analizaron los basófilos usando la estrategia de gating que se observa en la figura suplementaria 1 (**Figura S2**). Se encontró que rBlo t 2 era capaz de regular a la alta la expresión del CD203c en basófilos con IgE de pacientes asmáticos cuando se comparó con estas mismas células estimuladas con PBS. Por el contrario, cuando se estimularon los basófilos incubados con sueros de controles no hubo un aumento de este receptor con respecto a las células estimuladas con PBS. Para este ensayo se estimularon las células con tres concentraciones del alérgeno y se tomó el valor de la mediana de la intensidad de fluorescencia de la concentración que generó mayor regulación positiva del receptor (MFI<sub>max</sub>) para cada paciente en particular (**Figura 15**).

Al analizar los SI de los basófilos sensibilizados con sueros de los 16 sujetos encontramos que 7 de estos (4 casos y 3 controles) presentaron un SI de por lo menos 1.5 al ser estimulados con Anti-IgE como control positivo. Por su parte, de estos 4 asmáticos, 3 alcanzaron SI mayores de 1.5 con al menos una de las tres concentraciones de rBlo t 2, mientras que ninguno de los 3 controles alcanzó un IS de 1.5 con ninguna concentración del alérgeno. Al promediar los SI de los 4 asmáticos se observa un aumento de este valor de manera dosis dependiente, superando el punto de corte en la dosis mayor de 10  $\mu\text{g/mL}$ . El promedio de los 3 controles no mostró aumento del IS (**Figura 16**).



**Figura 15. MFI de la medición del CD203c en basófilos.** Medición mediante citometría de flujo de la expresión del receptor de membrana CD203c en la superficie de basófilos. A. Comparación pareada de la MFI de los basófilos estimulados con PBS Vs. La MFI más alta a cualquiera de las tres concentraciones (MFImax) de rBlo t 2 y sensibilizados con sueros de pacientes asmáticos o B. de controles. Se realizó una comparación de muestras pareadas para cada grupo usando la prueba de t pareada. Los resultados se expresan así: \* $P < 0.05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , no significativo:  $P > 0.05$ .



**Figura 16. Índice de estimulación de la prueba de activación de basófilos basada en CD203c. A.** Se presentan los IS de las muestras estimuladas con Anti-IgE, Extracto de *B. tropicalis* y rBlo t 2 (0.1, 1 o 10 µg/mL) de 3 controles y de **B.** 4 asmáticos, además se grafican los promedios de los SI para cada condición en ambos grupos. De los 16 sujetos a los que se le realizó la prueba solo se muestran aquellos que superaron el punto de corte de 1.5 al estimularse con la Anti-IgE.

## 10. Discusión

La primera etapa de este trabajo estuvo enfocada en obtener el recombinante de Blo t 2 en una concentración y pureza adecuada para los experimentos subsiguientes. En primer lugar se tomó un lote de rBlo t 2 previamente purificado por cromatografía de afinidad con resina de Ni-NTA, y se le hizo un segundo proceso de purificación mediante una técnica de intercambio aniónico, obteniendo un alto nivel de pureza, lo que se evidencia en geles de poliacrilamida con tinción de plata. A pesar de la eficacia de esta técnica, la alta afinidad rBlo t 2 por la columna, ocasionó que se liberara lentamente, recolectándola en muchas fracciones con concentraciones bajas. Por tal motivo se hizo necesario el uso de un nuevo lote del rBlo t 2, la producción de este nos dio la oportunidad de optimizar los protocolos de lisis y purificación para obtener una proteína con un alto grado de pureza y con concentraciones suficiente para su uso en la prueba de anafilaxia cutánea pasiva y de activación de basófilos.

La proteína que se recibió del Banco de Alergenos Silvia Jiménez fue purificada usando condiciones no desnaturizantes, sin embargo, muchas proteínas recombinantes, especialmente las de origen eucariota, suelen agregarse en cuerpos de inclusión (93). De hecho rBlo t 2 ya ha sido purificada por otros grupos de los cuerpos de inclusión (94). Los detergentes iónicos desnaturizantes son reactivos útiles en la solubilización y purificación de proteínas a partir de cuerpos de inclusión (95). En este sentido modificamos el protocolo de lisado usando la N-laurilsarcosina, que ha demostrado su potencial en la solubilización de proteínas a la vez que realiza una actividad desnaturizante leve, comparada con otros detergentes. El Tritón X-100, un tensioactivo no-iónico, fue usado en los lavados de la proteína unida a la columna de níquel con el fin de solubilizar y separar aquellas proteínas que no tuvieran la etiqueta de histidina. Además, se usó un gradiente de concentraciones de imidazol en la elución, lo cual permitió eliminar algunas proteínas contaminantes a bajas concentraciones de imidazol y luego separar la proteína de la columna, recolectando fracciones con altas concentraciones.

En este trabajo se utilizó el Tritón X-114 como reactivo en la remoción de la endotoxina. Se ha sugerido que este método presenta mejores resultados en la remoción de endotoxinas de proteínas de unión a lípidos, entre las que está rBlo t 2, pues permite que la endotoxina se disocie de las proteínas, en comparación a otros métodos como la utilización de columnas de polimixina B (96). A pesar de esto, luego de tres ciclos de remoción, nuestras muestras continuaban presentando bajas concentraciones de endotoxina (6.4 UE/mL) que no llegaron a niveles inferiores a 1.5 UE/mL, el cual se considera en promedio el límite para la administración de drogas en modelos murinos de investigaciones preclínicas (97).

Anteriormente se había estudiado el estado de sensibilización IgE contra el extracto de ácaros como *D. pteronyssinus* y *B. tropicalis* en asmáticos de diferentes poblaciones de Colombia (86, 98). Una de las características más importantes de este trabajo es que se analizó el estado de sensibilización a un alérgeno individual del ácaro *B. tropicalis* en un grupo de asmáticos y se comparó con sujetos sanos de diferentes regiones de Colombia logrando mostrar un panorama más amplio de este fenómeno en nuestro país. Aquí se encontró en primer lugar que los asmáticos presentaban un mayor porcentaje de sensibilización contra el extracto de *B. tropicalis* frente a los controles, lo cual confirma una vez más que este es una causa importante de sensibilización IgE en esta enfermedad en nuestro país y en general en países del trópico (99). Por otro lado, el porcentaje de asmáticos con reactividad IgE contra Blo t 2 fue superior comparado con los sujetos sanos con una diferencia significativa, sin embargo, cuando se evaluaron factores de confusión como edad, sexo y ciudad de origen, esta significancia desapareció, lo cual sugiere que la sensibilización a este alérgeno de manera individual no está asociado a la presentación de asma, contrario a lo que se ha visto con otros alérgenos individuales de ácaros (55, 100). Sin embargo al comparar los niveles de IgE específica tanto para el extracto de *B. tropicalis*, como para Blo t 2, estos sí están aumentados significativamente en asmáticos frente a los controles.

Al analizar solamente los pacientes y controles sensibilizados al extracto de *B. tropicalis*, fue interesante encontrar que ambos grupos presentaban un porcentaje de sensibilización a Blo t 2 alrededor del 39%, similar a la que se ha encontrado en otras poblaciones del trópico (13, 83), aunque con menor frecuencia que en otras poblaciones latinoamericanas (84).

La comprobación experimental de la capacidad de activar vías inflamatorias y generar síntomas es un paso fundamental para definir la importancia clínica de los alérgenos. Para algunos de los ácaros del polvo se ha definido su actividad alérgica, sobre todo aquellos provenientes del *D. pteronyssinus* (101-105). En el caso de *B. tropicalis* la cantidad de estudios es mucho menor, siendo Blo t 5 el alérgeno mejor definido en este sentido (59, 106, 107). Por su parte, a Blo t 2 tan solo se le ha realizado una prueba de provocación *in vitro*, donde demostró que es capaz de generar la liberación de histamina al ser incubado con sangre completa de individuos sensibilizados a este alérgeno (13). Un aporte valioso que hace esta tesis es la definición de algunas propiedades que indican la actividad alérgica de Blo t 2, al realizar varias pruebas. Entre estas, un modelo murino de asma alérgica demuestra por primera vez que rBlo t 2 genera los signos cardinales de asma alérgica al aumentar el infiltrado inflamatorio pulmonar, la hiperreactividad de las vías respiratorias y el aumento de los niveles de IgE específica. Una respuesta similar se ha observado en ratones expuestos a Der p 2, el alérgeno del grupo dos del ácaro *D. pteronyssinus*, el cual ha demostrado que es capaz de generar infiltrado inflamatorio especialmente de eosinófilos, además de un aumento de la IgE sérica (108-111). En nuestro estudio, a diferencia de otros alérgenos, rBlo t 2 no fue capaz de aumentar la producción de moco pulmonar demostrado por el aumento del número de células caliciformes en los cortes histológicos pulmonares, característica que sí han provocado otros alérgenos de *B. tropicalis* (90, 106). No es posible descartar que esto se deba a inconvenientes técnicos durante la realización de los retos intranasales, por lo que es necesario confirmar estos resultados en un futuro.

El patrón de las poblaciones celulares encontradas en el lavado broncoalveolar, donde hubo un aumento de los eosinófilos, pero no de los macrófagos alveolares ni de los neutrófilos, dan cuenta un infiltrado inflamatorio de tipo de Th2, lo cual es consistente con los datos que se tienen de Blo t 5, otro alergeno de *B. tropicalis*, el cual indujo asma alérgica severa en ratones transfectados con células Th2 específicas de Blo t 5, caracterizado por un aumento del número de eosinófilos en el BAL sin un aumento significativo de neutrófilos (106).

La respuesta inmune típica, polarizada a una vía Th2, producida cuando ratones son sensibilizados con alergenos de ácaros se caracteriza por títulos altos de IgG1 e IgE específicas y la ausencia de producción de IgG2a (104). Sin embargo, si observamos la respuesta de anticuerpos contra rBlo t 2 encontrada aquí, podremos ver que tanto los niveles de IgE e IgG1 que están asociados más con una respuesta de tipo Th2, como los niveles de IgG2a que se asocia con una respuesta de tipo Th1, estuvieron aumentados. Es posible que los niveles de endotoxina de la muestra con la que se realizó la inmunización pudieron influir en este resultado.

De los alergenos de *Blomia*, Blo t 8 es el único alergeno al que se le ha realizado un ensayo de anafilaxia cutánea pasiva, el cual reporta una respuesta intermedia (61). En línea con nuestra hipótesis de que rBlo t 2 tiene actividad alérgica, en este estudio también se encontró que este alergeno tiene la capacidad de activar la inflamación alérgica mediada por la IgE en el ensayo de anafilaxia cutánea pasiva, donde la IgE anti rBlo t 2 presente en sueros de ratones inmunizados fue capaz de desencadenar la extravasación de plasma en la piel de ratones no inmunes.

Otros estudios han mostrado que alergenos de los ácaros de polvo pueden activar basófilos, determinado por la regulación positiva del marcador de activación CD203c en estas células (104, 107, 112). En nuestro estudio encontramos también que rBlo t 2 puede aumentar este marcador de manera significativa en basófilos sensibilizados de manera pasiva con sueros de pacientes asmáticos con reactividad IgE a este alergeno. Esto nos indica que Blo t 2 puede participar en la patogénesis

de la esta enfermedad al activar vías inflamatorias dependientes de la IgE y que a la vez involucren estas células.

El ensayo de activación pasiva de basófilos es una prueba poco estandarizada (113), para la cual aún no existe un consenso sobre la forma más apropiada para su análisis. Para la prueba de activación de basófilos donde se mide la sobrerregulación del CD203c, se emplea la comparación del porcentaje de activación (114) o más usualmente el índice de estimulación, siendo utilizado generalmente un punto de corte de 2 para indicar activación, sobre todo en el diagnóstico de enfermedades alérgicas (115, 116). En otros trabajos se han empleado puntos de corte más bajos hallados de manera similar a la fórmula utilizada en nuestros análisis (89). Con un punto de corte de 1.5, encontramos que rBlo t 2 activa basófilos sensibilizados con sueros de 3 de 4 pacientes asmáticos, pero no lo hace con el suero de sujetos sanos aun estando sensibilizados al alergeno. Esto nuevamente sugiere la capacidad de Blo t 2 de generar inflamación en el contexto de enfermedades alérgicas como el asma.

La ausencia de una relación entre la sensibilización IgE contra rBlo t 2 y la presentación de asma podría deberse a problemas técnicos al recolectar los pacientes y controles participantes en el estudio. Por otro lado, puede sugerir que en realidad la sensibilización IgE, a este alergeno en específico, no determina la presentación de la enfermedad. En este sentido se conoce que en algunos casos la exposición al alergeno y su posterior activación de vías de la inmunidad innata es un mecanismo que produce inflamación sin la necesidad de la IgE, como ya se ha observado con la molécula Der p 2 (11, 117, 118). Sin embargo, la comprobación experimental en nuestro trabajo de la capacidad de generar activación celular e inflamación mediante la IgE, apoya la importancia clínica potencial del Blo t 2, por lo que se podría recomendar su uso en paneles de diagnóstico, para ayudarnos a identificar con gran sensibilidad la alergia a *B. tropicalis*, cuando se combina con otros alergenos de este ácaro (119).

## 11. Conclusiones y recomendaciones

- Los objetivos específicos de este trabajo se cumplieron casi en su totalidad; quedan pendientes algunos ensayos con muestras ya tomadas que por varios motivos, principalmente las limitaciones impuestas por la pandemia de Covid19, no pudieron ser completadas.
- Se hicieron mejoras en diferentes procedimientos, los cuales podrían ser de utilidad en futuras investigaciones.
- Los resultados, en términos generales indican que Blo t 2 es una molécula de unión IgE con actividad alergénica.
- Los estudios de actividad alergénica de Blo t 2 están en su fase inicial y se requieren más investigaciones para evaluar su impacto clínico, entre ellas pruebas de provocación en humanos y mecanismos de acción.

## 12. Referencias

1. Eder W, Ege MJ, von Mutius E. The asthma epidemic. *N Engl J Med*. 2006;355(21):2226-35.
2. The Global Asthma Report 2014. In: Network GA, editor. Auckland, New Zealand 2014.
3. Nunes C, Pereira AM, Morais-Almeida M. Asthma costs and social impact. *Asthma Res Pract*. 2017;3:1.
4. Chung KF. Precision medicine in asthma: linking phenotypes to targeted treatments. *Curr Opin Pulm Med*. 2018;24(1):4-10.
5. Marks GB. House dust mite exposure as a risk factor for asthma: benefits of avoidance. *Allergy*. 1998;53(48 Suppl):108-14.
6. Sanchez-Borges M, Capriles-Hulett A, Torres J, Ansotegui-Zubeldia IJ, Castillo A, Dhersy A, et al. Diagnosis of allergic sensitization in patients with allergic rhinitis and asthma in a tropical environment. *Rev Alerg Mex*. 2019;66(1):44-54.
7. Caraballo L, Puerta L, Martinez B, Moreno L. Identification of allergens from the mite *Blomia tropicalis*. *Clin Exp Allergy*. 1994;24(11):1056-60.
8. Satitsuksanoa P, Kennedy M, Gilis D, Le Mignon M, Suratannon N, Soh WT, 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):1425-34.
9. Westritschnig K, Horak F, Swoboda I, Balic N, Spitzauer S, Kundi M, et al. Different allergenic activity of grass pollen allergens revealed by skin testing. *Eur J Clin Invest*. 2008;38(4):260-7.
10. Santos da Silva E, Asam C, Lackner P, Hofer H, Wallner M, Silva Pinheiro C, et al. Allergens of *Blomia tropicalis*: An Overview of Recombinant Molecules. *Int Arch Allergy Immunol*. 2017;172(4):203-14.
11. Yin SC, Liao EC, Chiu CL, Chang CY, Tsai JJ. Der p2 Internalization by Epithelium Synergistically Augments Toll-like Receptor-Mediated Proinflammatory Signaling. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2015;7(4):393-403.
12. Tsai JJ, Liu SH, Yin SC, Yang CN, Hsu HS, Chen WB, et al. Mite allergen Der-p2 triggers human B lymphocyte activation and Toll-like receptor-4 induction. *PLoS One*. 2011;6(9):e23249.
13. Reginald K, Pang SL, Chew FT. Blo t 2: Group 2 allergen from the dust mite *Blomia tropicalis*. *Sci Rep*. 2019;9(1):12239.
14. Kuruvilla ME, Lee FE, Lee GB. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2019;56(2):219-33.
15. Ricciardolo FL, Sorbello V, Ciprandi G. A pathophysiological approach for FeNO: A biomarker for asthma. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2015;43(6):609-16.
16. Moustaki M, Loukou I, Tsaouri S, Douros K. The Role of Sensitization to Allergen in Asthma Prediction and Prevention. *Front Pediatr*. 2017;5:166.
17. Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S, et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature*. 2007;448(7152):470-3.
18. Gudbjartsson DF, Bjornsdottir US, Halapi E, Helgadóttir A, Sulem P, Jonsdóttir GM, et al. Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction. *Nat Genet*. 2009;41(3):342-7.

19. Torgerson DG, Ampleford EJ, Chiu GY, Gauderman WJ, Gignoux CR, Graves PE, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations. *Nat Genet.* 2011;43(9):887-92.
20. Platts-Mills TA. The role of immunoglobulin E in allergy and asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(8 Pt 2):S1-5.
21. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S73-80.
22. Chevigne A, Jacquet A. Emerging roles of the protease allergen Der p 1 in house dust mite-induced airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;142(2):398-400.
23. Zhang J, Chen J, Robinson C. Cellular and Molecular Events in the Airway Epithelium Defining the Interaction Between House Dust Mite Group 1 Allergens and Innate Defences. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11).
24. Treudler R, Simon JC. Overview of component resolved diagnostics. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2013;13(1):110-7.
25. Kleine-Tebbe J, Jappe U. Molecular allergy diagnostic tests: development and relevance in clinical practice. *Allergol Select.* 2017;1(2):169-89.
26. Bublin M, Pfister M, Radauer C, Oberhuber C, Bulley S, Dewitt AM, et al. Component-resolved diagnosis of kiwifruit allergy with purified natural and recombinant kiwifruit allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(3):687-94, 94 e1.
27. Shek LP, Chong AR, Soh SE, Cheong N, Teo AS, Yi FC, et al. Specific profiles of house dust mite sensitization in children with asthma and in children with eczema. *Pediatr Allergy Immunol.* 2010;21(4 Pt 2):e718-22.
28. Huang Z, Zou X, Chen H, Liao C, Hu H, Luo W, et al. Identifying Potential Co-Sensitization and Cross-Reactivity Patterns Based on Component-Resolved Diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2020;181(2):81-93.
29. Nicolaou N, Poorafshar M, Murray C, Simpson A, Winell H, Kerry G, et al. Allergy or tolerance in children sensitized to peanut: prevalence and differentiation using component-resolved diagnostics. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(1):191-7 e1-13.
30. Lynch NR, Puccio FS, Di Prisco MC, Escudero JE, Nozzolino M, Hazel LA, et al. Association between allergic disease and reactivity to recombinant Der p 2 allergen of house dust mites in a tropical situation. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;101(4 Pt 1):562-4.
31. Buendía E, Zakzuk J, Mercado D, Alvarez A, Caraballo LJWAOJ. The IgE response to *Ascaris* molecular components is associated with clinical indicators of asthma severity. 2015;8(1):1.
32. Depreux N, Quilez E, Roger A, Basagana M. Component-Resolved Diagnosis: Impact on Indications for Therapy in Patients With Respiratory Allergy and Sensitization to Multiple Pollens in Catalonia, Spain. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2016;26(6):396-8.
33. Nelson HS. The use of standardized extracts in allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(1 Pt 1):41-5.
34. Inal A, Altintas DU, Yilmaz M, Karakoc GB, Kendirli SG, Sertdemir Y. Prevention of new sensitizations by specific immunotherapy in children with rhinitis and/or asthma monosensitized to house dust mite. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2007;17(2):85-91.
35. Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Gronlund H. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy.* 1999;29(7):896-904.

36. Hales BJ, Laing IA, Pearce LJ, Hazell LA, Mills KL, Chua KY, et al. Distinctive immunoglobulin E anti-house dust allergen-binding specificities in a tropical Australian Aboriginal community. *Clin Exp Allergy*. 2007;37(9):1357-63.
37. Cheong N, Ramos JD, Tang CY, Chng HH, Yao R, Liang Z, et al. Mite amylase from *Blomia tropicalis* (Blo t 4): differential allergenicity linked to geographical regions. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009;149(1):25-32.
38. Laffer S, Spitzauer S, Susani M, Pairleitner H, Schweiger C, Gronlund H, et al. Comparison of recombinant timothy grass pollen allergens with natural extract for diagnosis of grass pollen allergy in different populations. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;98(3):652-8.
39. Jimenez S, Puerta L, Mendoza D, Caraballo L, Chua KJA, International CI. IgE antibody responses to recombinant allergens of *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus* in a tropical environment. 2007;19(6):233-8.
40. Ferrando M, Bagnasco D, Varricchi G, Bernardi S, Bragantini A, Passalacqua G, et al. Personalized Medicine in Allergy. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2017;9(1):15-24.
41. Collins FS, Varmus H. A new initiative on precision medicine. *N Engl J Med*. 2015;372(9):793-5.
42. Yu X, Schneiderhan-Marra N, Joos TO. [Protein microarrays and personalized medicine]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2011;69(1):17-29.
43. Caraballo L, Acevedo N, Zakzuk J. Personalized medicine for asthma in tropical regions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2020;20(3):268-73.
44. Passalacqua G, Compalati E, Canonica GW. Advances in allergen-specific immunotherapy. *Curr Drug Targets*. 2009;10(12):1255-62.
45. Van Ree R, Van Leeuwen WA, Dieges PH, Van Wijk RG, De Jong N, Brewczynski PZ, et al. Measurement of IgE antibodies against purified grass pollen allergens (Lol p 1, 2, 3 and 5) during immunotherapy. *Clin Exp Allergy*. 1997;27(1):68-74.
46. Boyd SD, Hoh RA, Nadeau KC, Galli SJ. Immune monitoring for precision medicine in allergy and asthma. *Curr Opin Immunol*. 2017;48:82-91.
47. Calamelli E, Liotti L, Beghetti I, Piccinno V, Serra L, Bottau P. Component-Resolved Diagnosis in Food Allergies. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(8).
48. Melioli G, Bonifazi F, Bonini S, Maggi E, Mussap M, Passalacqua G, et al. The ImmunoCAP ISAC molecular allergology approach in adult multi-sensitized Italian patients with respiratory symptoms. *Clin Biochem*. 2011;44(12):1005-11.
49. Alessandri C, Ferrara R, Bernardi ML, Zennaro D, Tuppo L, Giangrieco I, et al. Diagnosing allergic sensitizations in the third millennium: why clinicians should know allergen molecule structures. *Clin Transl Allergy*. 2017;7:21.
50. Popescu FD, Vieru M. Precision medicine allergy immunoassay methods for assessing immunoglobulin E sensitization to aeroallergen molecules. *World J Methodol*. 2018;8(3):17-36.
51. Thomas WR, Heinrich TK, Smith WA, Hales BJ. Pyroglyphid house dust mite allergens. *Protein Pept Lett*. 2007;14(10):943-53.
52. Caraballo L, Valenta R, Puerta L, Pomes A, Zakzuk J, Fernandez-Caldas E, et al. The allergenic activity and clinical impact of individual IgE-antibody binding molecules from indoor allergen sources. *World Allergy Organ J*. 2020;13(5):100118.
53. Caraballo L, Valenta R, Acevedo N, Zakzuk J. Are the Terms Major and Minor Allergens Useful for Precision Allergology? *Front Immunol*. 2021;12:651500.
54. Caraballo L. Mite allergens. *Expert Rev Clin Immunol*. 2017;13(4):297-9.

55. Resch Y, Michel S, Kabesch M, Lupinek C, Valenta R, Vrtala S. Different IgE recognition of mite allergen components in asthmatic and nonasthmatic children. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(4):1083-91.
56. Urisu A, Ando H, Morita Y, Wada E, Yasaki T, Yamada K, et al. Allergenic activity of heated and ovomucoid-depleted egg white. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;100(2):171-6.
57. Gonzalez-Perez R, Poza-Guedes P, Barrios Del Pino Y, Matheu V, Sanchez-Machin I. Evaluation of major mite allergens from European standardized commercial extracts for in vivo diagnosis: addressing the need for precision medicine. *Clin Transl Allergy*. 2019;9:14.
58. de Halleux S, Stura E, VanderElst L, Carlier V, Jacquemin M, Saint-Remy JM. Three-dimensional structure and IgE-binding properties of mature fully active Der p 1, a clinically relevant major allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(3):571-6.
59. Yi FC, Chua KY, Cheong N, Shek LP, Lee BW. Immunoglobulin E reactivity of native Blo t 5, a major allergen of *Blomia tropicalis*. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(11):1762-7.
60. Szalai K, Kopp T, Lukschal A, Stremnitzer C, Wallmann J, Starkl P, et al. Establishing an allergic eczema model employing recombinant house dust mite allergens Der p 1 and Der p 2 in BALB/c mice. *Exp Dermatol*. 2012;21(11):842-6.
61. Bustillo J, Regino R, Coronado SM, Benedetti I, Pedersen L, Mueller GA, et al. Evaluation of the allergenic activity of the Glutathione Transferase from *Blomia tropicalis* (Blo t 8) in a mouse model of airway inflammation. 2019;143(2):AB187.
62. Caraballo L, Zakzuk J, Lee BW, Acevedo N, Soh JY, Sanchez-Borges M, et al. Particularities of allergy in the Tropics. *World Allergy Organ J*. 2016;9:20.
63. Matricardi PM, Kleine-Tebbe J, Hoffmann HJ, Valenta R, Hilger C, Hofmaier S, et al. EAACI Molecular Allergology User's Guide. *Pediatr Allergy Immunol*. 2016;27 Suppl 23:1-250.
64. Caraballo L, Puerta L, Fernandez-Caldas E, Lockey RF, Martinez B. Sensitization to mite allergens and acute asthma in a tropical environment. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 1998;8(5):281-4.
65. Puccio FA, Lynch NR, Noya O, Noda A, Hagel I, Lopez E, et al. Importance of including *Blomia tropicalis* in the routine diagnosis of Venezuelan patients with persistent allergic symptoms. *Allergy*. 2004;59(7):753-7.
66. Ramos JD, Cheong N, Lee BW, Chua KY. cDNA cloning and expression of Blo t 11, the *Blomia tropicalis* allergen homologous to paramyosin. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;126(4):286-93.
67. Mora C, Flores I, Montealegre F, Diaz A. Cloning and expression of Blo t 1, a novel allergen from the dust mite *Blomia tropicalis*, homologous to cysteine proteases. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(1):28-34.
68. Puerta L, Caraballo L, Fernández-Caldas E, Avjioglu A, Marsh DG, Lockey RF, et al. Nucleotide sequence analysis of a complementary DNA coding for a *Blomia tropicalis* allergen. 1996;98(5):932-7.
69. Caraballo L, Avjioglu A, Marrugo J, Puerta L, Marsh D. Cloning and expression of complementary DNA coding for an allergen with common antibody-binding specificities with three allergens of the house dust mite *Blomia tropicalis*. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;98(3):573-9.
70. Caraballo L, Puerta L, Jimenez S, Martinez B, Mercado D, Avjiouglu A, et al. Cloning and IgE binding of a recombinant allergen from the mite *Blomia tropicalis*, homologous with fatty acid-binding proteins. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997;112(4):341-7.

71. Yi FC, Cheong N, Shek LP, Wang DY, Chua KY, Lee BW. Identification of shared and unique immunoglobulin E epitopes of the highly conserved tropomyosins in *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy*. 2002;32(8):1203-10.
72. Arruda LK, Fernandez-Caldas E, Naspitz CK, Montealegre F, Vailes LD, Chapman MD. Identification of *Blomia tropicalis* allergen Blo t 5 by cDNA cloning. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995;107(1-3):456-7.
73. Kuo IC, Cheong N, Trakultivakorn M, Lee BW, Chua KY. An extensive study of human IgE cross-reactivity of Blo t 5 and Der p 5. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(3):603-9.
74. Gao YF, Wang de Y, Ong TC, Tay SL, Yap KH, Chew FT. Identification and characterization of a novel allergen from *Blomia tropicalis*: Blo t 21. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(1):105-12.
75. Carvalho Kdos A, de Melo-Neto OP, Magalhaes FB, Ponte JC, Felipe FA, dos Santos MC, 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 Immunol*. 2013;14:11.
76. Mary CL, Lopez-Malpica F, Diaz AM. Analysis of cross-reactivity between group 1 allergens from mites. *P R Health Sci J*. 2008;27(2):163-70.
77. Cheong N, Soon SC, Ramos JD, Kuo IC, Kolatkar PR, Lee BW, et al. Lack of human IgE cross-reactivity between mite allergens Blo t 1 and Der p 1. *Allergy*. 2003;58(9):912-20.
78. Chua KY, Cheong N, Kuo IC, Lee BW, Yi FC, Huang CH, et al. The *Blomia tropicalis* allergens. *Protein Pept Lett*. 2007;14(4):325-33.
79. Kidon MI, Chiang WC, Liew WK, Ong TC, Tiong YS, Wong KN, et al. Mite component-specific IgE repertoire and phenotypes of allergic disease in childhood: the tropical perspective. *Pediatr Allergy Immunol*. 2011;22(2):202-10.
80. Bertel Pérez S. Análisis In Silico de los Epítopes de la proteína Blo t 2 del Ácaro *Blomia tropicalis*. Cartagena-Colombia: Universidad de Cartagena; 2019.
81. Santos da Silva E, Marques Ponte JC, Barbosa da Silva M, Silva Pinheiro C, Carvalho Pacheco LG, Ferreira F, et al. Proteomic Analysis Reveals Allergen Variability among Breeds of the Dust Mite *Blomia tropicalis*. *Int Arch Allergy Immunol*. 2019;180(3):159-72.
82. Urreg J. Obtenção, caracterização físico-química, imunológica e hipoalergização do alérgeno recombinante Blo t 2 visando o desenvolvimento de imunoterapia para alergia ao ácaro *Blomia tropicalis*: UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA; 2017.
83. Christophel JJ. Expression of the recombinant group 2 allergen from *Blomia tropicalis*: Comparison of the immunoreactivity of Blo t 2 and Blo t 5. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2002;109:135.
84. Mateo Morejón M, Perez Llano Y, Capote Tabares M, Garcia Lerena J, Cruz Jimenez R, Luzardo Lorenzo M, et al., editors. Allergenic activity of the native Blo t 2 purified from *Blomia tropicalis* culture. *Front Immunol Conference Abstract: IMMUNOCOLOMBIA2015-11th Congress of the Latin American Association of Immunology-10o Congreso de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología* doi: 103389/conf fimmu; 2015.
85. Urrego J, Hofer H, Aglas L, Pinheiro C, Briza P, Wallner M, et al., editors. Physico-chemical and immunological characterization of the recombinant *blomia tropicalis* allergen blo t 2. *Allergy*; 2016: WILEY-BLACKWELL 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA.
86. Dennis RJ, Caraballo L, Garcia E, Rojas MX, Rondon MA, Perez A, et al. Prevalence of asthma and other allergic conditions in Colombia 2009-2010: a cross-sectional study. *BMC Pulm Med*. 2012;12:17.

87. Vergara CI, Acevedo N, Jimenez S, Martinez B, Mercado D, Gusmao L, et al. A Six-SNP haplotype of ADAM33 is associated with asthma in a population of Cartagena, Colombia. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010;152(1):32-40.
88. Lopez J, Regino R, Guerrero L, Gracia M, Marrugo V, Zakzuk J, et al., editors. Sensitization to *Blomia tropicalis* and *Ascaris* spp. components in recurrent wheezing children living in a tropical city. *ALLERGY*; 2019: WILEY 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA.
89. Ocmant A, Peignois Y, Mulier S, Hanssens L, Michils A, Schandene L. Flow cytometry for basophil activation markers: the measurement of CD203c up-regulation is as reliable as CD63 expression in the diagnosis of cat allergy. *J Immunol Methods.* 2007;320(1-2):40-8.
90. Zakzuk J, Benedetti I, Fernandez-Caldas E, Caraballo L. The influence of chitin on the immune response to the house dust mite allergen Blo T 12. *Int Arch Allergy Immunol.* 2014;163(2):119-29.
91. Myou S, Leff AR, Myo S, Boetticher E, Tong J, Meliton AY, et al. Blockade of inflammation and airway hyperresponsiveness in immune-sensitized mice by dominant-negative phosphoinositide 3-kinase-TAT. *J Exp Med.* 2003;198(10):1573-82.
92. Ahumada V, Manotas M, Zakzuk J, Aglas L, Coronado S, Briza P, et al. Identification and Physicochemical Characterization of a New Allergen from *Ascaris lumbricoides*. *Int J Mol Sci.* 2020;21(24).
93. Tao H, Liu W, Simmons BN, Harris HK, Cox TC, Massiah MA. Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS. *Biotechniques.* 2010;48(1):61-4.
94. Christophel JJ, Hozic N, Arruda LK, Chew FT, Platts-Mills TAE, Wang WL, et al. Expression of the recombinant group 2 allergen from *Blomia tropicalis*: Comparison of the immunoreactivity of Blo t 2 and Blo t 5. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2002;109(1, Supplement 1):S135.
95. Schlager B, Straessle A, Hafen E. Use of anionic denaturing detergents to purify insoluble proteins after overexpression. *BMC Biotechnol.* 2012;12:95.
96. Aida Y, Pabst MJ. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *J Immunol Methods.* 1990;132(2):191-5.
97. Malyala P, Singh M. Endotoxin limits in formulations for preclinical research. *J Pharm Sci.* 2008;97(6):2041-4.
98. Dennis R, Caraballo L, Garcia E, Caballero A, Aristizabal G, Cordoba H, et al. Asthma and other allergic conditions in Colombia: a study in 6 cities. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2004;93(6):568-74.
99. Arruda LK, Vailes LD, Platts-Mills TA, Fernandez-Caldas E, Montealegre F, Lin KL, et al. Sensitization to *Blomia tropicalis* in patients with asthma and identification of allergen Blo t 5. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155(1):343-50.
100. Ahumada V, Garcia E, Dennis R, Rojas MX, Rondon MA, Perez A, et al. IgE responses to *Ascaris* and mite tropomyosins are risk factors for asthma. *Clin Exp Allergy.* 2015;45(7):1189-200.
101. van der Zee JS, van Swieten P, Jansen HM, Aalberse RC. Skin tests and histamine release with P1-depleted *Dermatophagoides pteronyssinus* body extracts and purified P1. *J Allergy Clin Immunol.* 1988;81(5 Pt 1):884-96.
102. Takai T, Kato T, Yasueda H, Okumura K, Ogawa H. Analysis of the structure and allergenicity of recombinant pro- and mature Der p 1 and Der f 1: major conformational IgE epitopes blocked by prodomains. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(3):555-63.

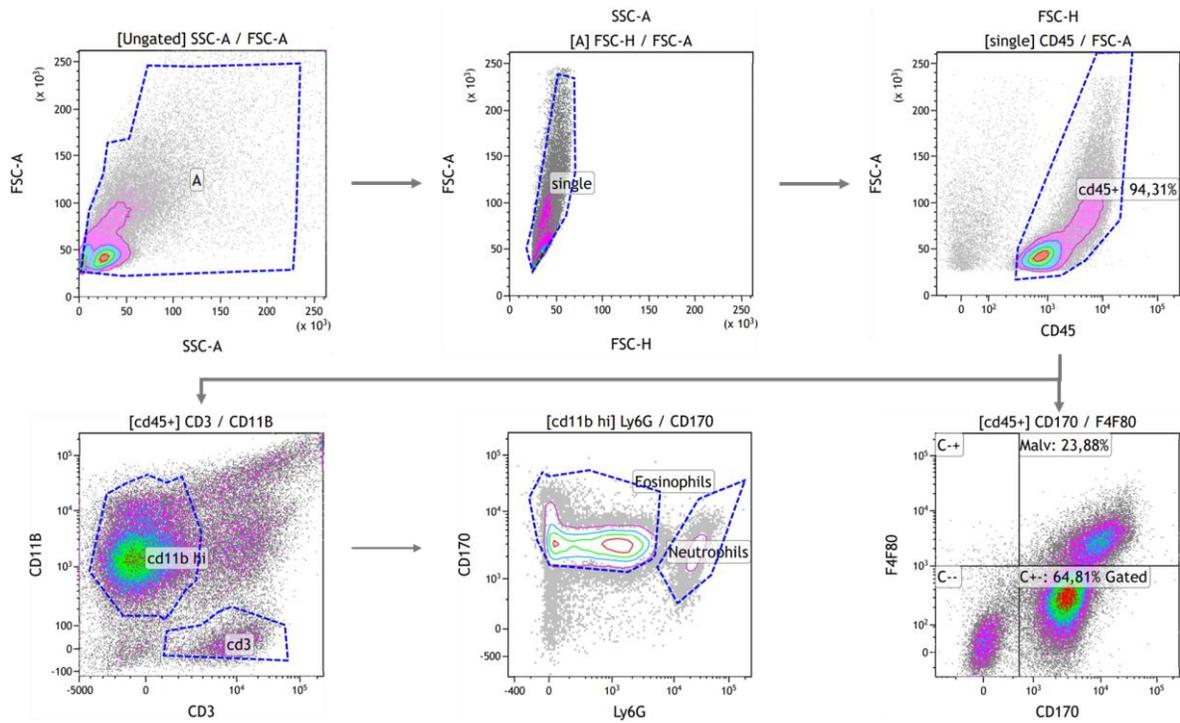
103. Takai T, Takaoka M, Yasueda H, Okumura K, Ogawa H. Dilution method to refold bacterially expressed recombinant Der f 2 and Der p 2 to exhibit the secondary structure and histamine-releasing activity of natural allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005;137(1):1-8.
104. Bouaziz A, Walgraffe D, Bouillot C, Herman J, Foguene J, Gothot A, et al. Development of recombinant stable house dust mite allergen Der p 3 molecules for component-resolved diagnosis and specific immunotherapy. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(4):823-34.
105. Lynch NR, Thomas WR, Chua Y, Garcia N, Di Prisco MC, Lopez R. In vivo biological activity of recombinant Der p II allergen of house-dust mite. *Int Arch Allergy Immunol*. 1994;105(1):70-4.
106. Chua YL, Liong KH, Huang CH, Wong HS, Zhou Q, Ler SS, 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. *J Immunol*. 2016;197(10):3771-81.
107. Martinez D, Cantillo JF, Herazo H, Wortmann J, Keller W, Caraballo L, et al. Characterization of a hybrid protein designed with segments of allergens from *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Immunol Lett*. 2018;196:103-12.
108. Johansson L, Svensson L, Bergstrom U, Jacobsson-Ekman G, Arner ES, van Hage M, et al. A mouse model for in vivo tracking of the major dust mite allergen Der p 2 after inhalation. *FEBS J*. 2005;272(13):3449-60.
109. Tsai JJ, Liu YH, Shen HD, Huang SH, Han SH. Prevention of Der p2-induced allergic airway inflammation by *Mycobacterium-bacillus Calmette Guerin*. *J Microbiol Immunol Infect*. 2002;35(3):152-8.
110. Ou-Yang HF, Hu XB, Ti XY, Shi JR, Li SJ, Qi HW, et al. Suppression of allergic airway inflammation in a mouse model by Der p2 recombined BCG. *Immunology*. 2009;128(1 Suppl):e343-52.
111. Ye YL, Wu HT, Lin CF, Hsieh CY, Wang JY, Liu FH, et al. *Dermatophagoides pteronyssinus* 2 regulates nerve growth factor release to induce airway inflammation via a reactive oxygen species-dependent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011;300(2):L216-24.
112. Weghofer M, Dall'Antonia Y, Grote M, Stocklinger A, Kneidinger M, Balic N, et al. Characterization of Der p 21, a new important allergen derived from the gut of house dust mites. *Allergy*. 2008;63(6):758-67.
113. Gunasekara P, Handunnetti SM, Premawansa S, Kaluarachchi P, Karunatilake C, Ratnayake IP, et al. Diagnosis of *Vespa affinis* venom allergy: use of immunochemical methods and a passive basophil activation test. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2019;15:80.
114. Sturm EM, Kranzelbinder B, Heinemann A, Groselj-Strele A, Aberer W, Sturm GJ. CD203c-based basophil activation test in allergy diagnosis: characteristics and differences to CD63 upregulation. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;78(5):308-18.
115. Hauswirth AW, Natter S, Ghannadan M, Majlesi Y, Scherthaner GH, Sperr WR, et al. Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophils in sensitized individuals. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110(1):102-9.
116. Sato S, Tachimoto H, Shukuya A, Kurosaka N, Yanagida N, Utsunomiya T, et al. Basophil activation marker CD203c is useful in the diagnosis of hen's egg and cow's milk allergies in children. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;152 Suppl 1:54-61.
117. Osterlund C, Gronlund H, Polovic N, Sundstrom S, Gafvelin G, Bucht A. The non-proteolytic house dust mite allergen Der p 2 induce NF-kappaB and MAPK dependent activation of bronchial epithelial cells. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(8):1199-208.

118. Serhan N, Basso L, Sibilano R, Petitfils C, Meixiong J, Bonnart C, et al. House dust mites activate nociceptor-mast cell clusters to drive type 2 skin inflammation. *Nat Immunol*. 2019;20(11):1435-43.
119. Pinheiro CS, Silva ES, de Andrade Belitardo EMM, Pacheco LGC, Aguiar E, Alcantara-Neves NM, et al. En route to personalized medicine: uncovering distinct IgE reactivity pattern to house dust mite components in Brazilian and Austrian allergic patients. *Clin Transl Allergy*. 2021;11(1):e12004.

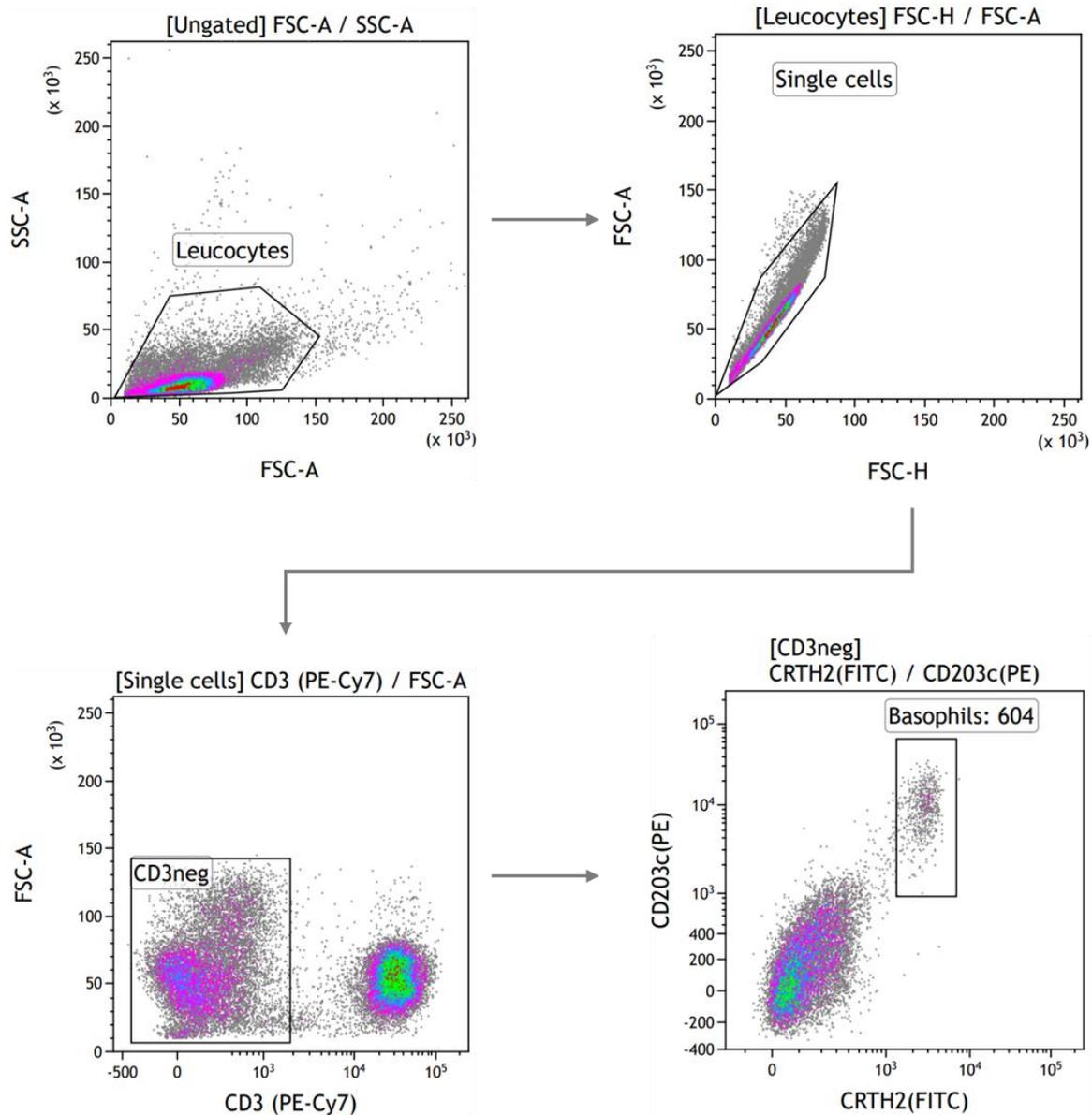
### 13. Material suplementarias

MARCADOR	FLUOROCROMO	EMPRESA	REFERENCIA	Eosinófilos	Neutrófilos	Macrófagos alveolares
CD45	V450	BD	560697	+	+	+
CD3e	PECy7	eBioscience	25-0031-82	-	-	-
CD11b	PE	eBioscience	12-0112-81	+	+	-
CD170 (Siglec-F)	PerCP	eBioscience	46-1702-82	+	-	+
F4/80	FITC	eBioscience	11-4801-81	-	-	+
Ly6G	APC	eBioscience	17-5931-81	-	+	-

**Tabla S1.** Panel de los marcadores de superficie evaluados por citometría de flujo en las células del lavado broncoalveolar de ratón. Las células se analizaron en un citómetro BD FACS ARIA®.



**Figura S2. Estrategia de gating para identificación de células inflamatorias en el lavado broncoalveolar de ratón.** Luego de seleccionar el total de poblaciones en el BAL se eliminaron las dupletas. Luego se seleccionaron las células CD45+ y a partir de estas se identificaron las células inflamatorias de la siguiente manera: macrófagos alveolares (Siglec-F+ F4/80+), eosinófilos (SiglecF + Ly6G-) y neutrófilos (CD11b + Ly6G+).



**Figura S2. Estrategia de gating para identificación de basófilos a partir de células polimorfonucleares de sangre periférica.** 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 CD3neg se identificaron como basófilos a las células que expresaban los marcadores de superficie CD203c y CRTH2.

Sujeto	Sexo	Edad	Condición	OD Blo t 2	IgE Ext. Bt
Sujeto #1	F	25	No asmático	0,13	15,7
Sujeto #2	F	8	No asmático	0,13	0
Sujeto #3	F	52	Asmático	0,13	0,08
Sujeto #4	F	9	No asmático	0,13	2,21
Sujeto #5	F	49	Asmático	0,12	12,74
Sujeto #6	M	8	Asmático	0,12	0,39
Sujeto #7	F	50	Asmático	0,20	20,41
Sujeto #8	F	50	Asmático	0,16	76,49
Sujeto #9	F	20	Asmático	0,46	75,5
Sujeto #10	M	9	No asmático	0,20	0,58
Sujeto #11	M	13	No asmático	0,21	4,38
Sujeto #12	M	20	No asmático	0,21	0,49
Sujeto #13	M	19	Asmático	0,65	355
Sujeto #14	F	10	Asmático	0,21	87,29
Sujeto #15	F	21	Asmático	0,18	30,4
Sujeto #16	F	11	Asmático	0,09	69,5
Control Exp. #1	F	64	No asmático	0,08	0,03
Control Exp. #2	F	33	No asmático	0,08	0,02
Control Exp. #3	F	25	No asmático	0,07	0,04

**Tabla S2.** Características de sujetos evaluados en la prueba de activación pasiva de basófilos. Se muestran al final tres sujetos no asmáticos no sensibilizados a Blo t 2 ni al extracto utilizados para la estandarización de la prueba.

## 14. Anexos

### Anexo 1. Carta comité de ética



Universidad  
de Cartagena  
Fundada en 1827



Accreditación Institucional de Alta Calidad  
Resolución 2183 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 OLIVERA DIAZ, MD.**  
**PRESIDENTE**



Vicerrectoría de Investigaciones  
Centro - Cra. 4 No. 38-40, Claustro de la Merced Teléfax 6642663  
E-mail: [comitedeetica@unicartagena.edu.co](mailto:comitedeetica@unicartagena.edu.co)  
web: [www.unicartagena.edu.co](http://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 alérgica 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 alérgicas 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 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 310 352 7373 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 tome una muestra de 20 cc de sangre venosa con la cual se realizará una prueba de activación de basófilos con alérgenos de *Blomia tropicalis*, esto con el fin de saber si estos 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: \_\_\_\_\_

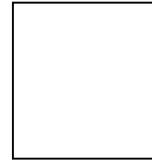
Firma: \_\_\_\_\_

Firma del Testigo # 1: \_\_\_\_\_ Parentesco: \_\_\_\_\_

Nombre del Testigo # 2: \_\_\_\_\_ CC: \_\_\_\_\_

Firma del Testigo # 2: \_\_\_\_\_ Parentesco: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_ Parentesco: \_\_\_\_\_



**Índice derecho**

Nombre del investigador o delegado: \_\_\_\_\_

CC: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Firmado en Cartagena de Indias, el día \_\_\_\_ del mes \_\_\_\_ del año 200 \_\_\_\_