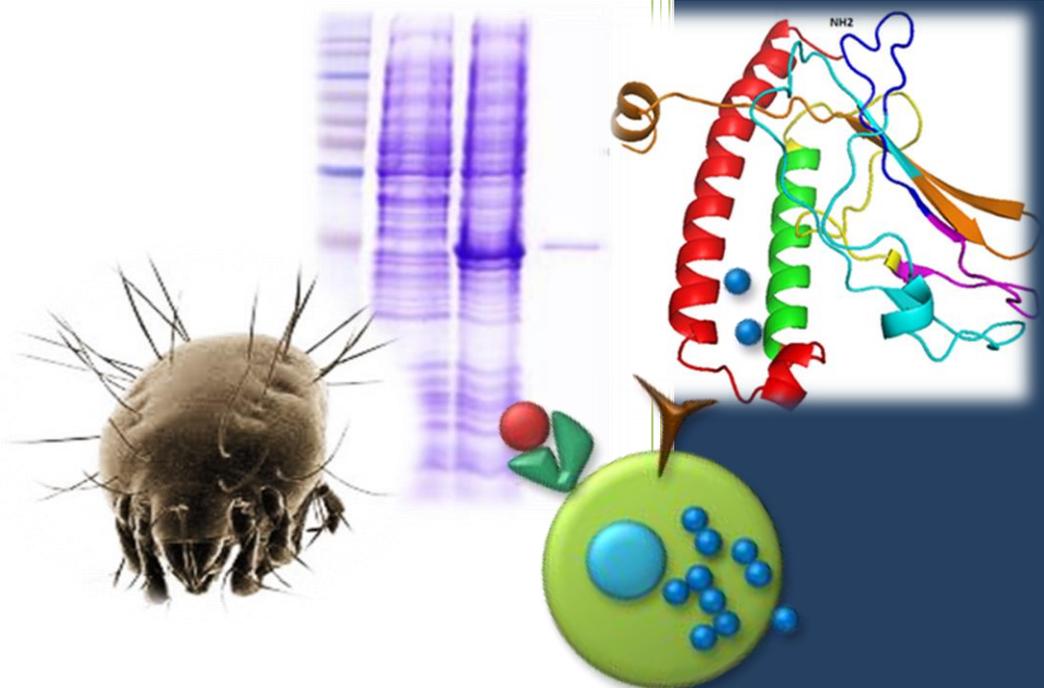


Requisito parcial para el título de Doctor en
Ciencias Biomédicas

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR E INMUNOLÓGICA DE DOS PROTEÍNAS HÍBRIDAS DERIVADAS DE ALERGENOS DE ÁCAROS DOMÉSTICOS



Dalgys Martínez De la Ossa

Doctorado en Ciencias Biomédicas
Instituto de Investigaciones Inmunológicas

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

Cartagena, Colombia

2019



**Universidad
de Cartagena**
Fundada en 1827

iii Instituto de
Investigaciones
Inmunológicas

Leonardo Puerta, PhD
Director



***CARACTERIZACIÓN MOLECULAR E INMUNOLÓGICA DE DOS
PROTEÍNAS HÍBRIDAS DERIVADAS DE ALERGENOS DE
ÁCAROS DOMÉSTICOS***

Tesis doctoral para optar al grado de Doctor en Ciencias Biomédicas

DALGYS MARTINEZ DE LA OSSA, MSc.

DIRECTOR DE TESIS

Leonardo Puerta, PhD.

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

*Doctorado en Ciencias Biomédicas
Instituto de Investigaciones Inmunológicas*

Cartagena, Colombia

30-10-2019



**Universidad
de Cartagena**
Fundada en 1827

iii Instituto de
Investigaciones
Inmunológicas

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR E INMUNOLÓGICA DE DOS PROTEÍNAS HÍBRIDAS DERIVADAS DE ALERGENOS DE ÁCAROS DOMÉSTICOS

Tesis para el grado de doctor (PhD)

por

Dalgys Martínez de la Ossa, MSc

Director de Tesis

Leonardo Puerta, MSc, PhD.

Profesor titular

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Instituto de Investigaciones Inmunológicas

Universidad de Cartagena

Comité Tutorial

Luis Caraballo, MD, PhD.

Director

Instituto de Investigaciones Inmunológicas

Universidad de Cartagena

Niradiz Reyes, MS, PhD.

Profesor titular

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Universidad de Cartagena

Doctorado en Ciencias Biomédicas
Instituto de Investigaciones Inmunológicas
Universidad de Cartagena
Cartagena, Colombia 2019

Tabla de contenido

1	INTRODUCCION GENERAL	XVii
1.1	Alergia a los ácaros del polvo doméstico	1
1.2	Respuesta alérgica.....	1
1.3	Sensibilización a los ácaros domésticos.....	5
1.3.1	Alergenos de <i>D. pteronyssinus</i> y <i>B. tropicalis</i>	6
1.4	Inmunoterapia específica con alergenos	10
1.4.1	Mecanismos moleculares y celulares que participan en la eficacia de la IEA 11	
1.4.2	Nuevas estrategias para el desarrollo de vacunas para las alergias	15
2	HIPOTESIS	21
3	OBJETIVOS	22
	Objetivo general.....	22
	Objetivos específicos	23
1.	Purificar y caracterizar molecularmente las proteínas híbridas MAVAC-BD-2 y DPx4. 23	
2.	Analizar la reactividad IgE e IgG de las proteínas híbridas en muestras serológicas de personas alérgicas a los ácaros domésticos y en individuos no alérgicos.	23
3.	Explorar la presencia de epítopes compartidos entre las proteínas híbridas, los extractos alergénicos y los alergenos purificados Blo t 5, Der p 1 y Der p 2 usando anticuerpos monoclonales y en sueros de alérgicos a los ácaros.	23
4.	Analizar el grado de activación de basófilos de alérgicos a los ácaros inducida por las proteínas híbridas.....	23
5.	Determinar citoquinas en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes alérgicos estimuladas por las proteínas híbridas.	23
6.	Evaluar el efecto de la administración de las proteínas híbridas sobre la respuesta humoral y sobre la hiperreactividad de las vías áreas al reto con metacolina en ratones BALB/c.	23
7.	Evaluar sí los anticuerpos IgG inducidos en los ratones inmunizados con las proteínas híbridas pueden bloquear la unión de la IgE de sueros alérgicos hacia extractos de ácaros y alergenos purificados.	23
8.	Analizar la capacidad alergénica <i>in-vivo</i> de las proteínas híbridas mediante prueba de anafilaxia cutánea pasiva en ratones.....	23
4	MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1	Procedencia de muestras para estudios serológicos	26
4.2	Preparación de extractos alergénicos de los ácaros	26
4.3	Procedencia de alergenos y otras proteínas usadas en este estudio.....	27

4.4	Diseño de las proteínas híbridas.....	27
4.4.1	Diseño de la proteína híbrida compuesta por segmentos de alérgenos de los ácaros <i>D. pteronyssinus</i> y <i>Blomia tropicalis</i> (MAVAC-BD-2)	28
4.4.2	Diseño de la proteína híbrida compuesta por segmentos de alérgenos del ácaro <i>D. pteronyssinus</i> (DPx4)	29
4.5	Expresión y purificación de MAVAC-BD-2 y de DPx4.....	31
4.6	Caracterización molecular de las proteínas híbridas	32
4.6.1	Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	32
4.6.2	Análisis estructural mediante dicroísmo circular	32
4.6.3	Determinación de actividad de cisteína proteasa en la proteína DPx4.	33
4.6.4	Análisis de estabilidad	33
4.6.5	Dispersión de la Luz dinámica (DLS)	34
4.7	Caracterización Inmunológica de las proteínas híbridas	34
4.7.1	Reactividad con anticuerpos IgE e IgG en sueros de alérgicos a los ácaros.....	34
4.7.2	Ensayos de Inhibición de la reactividad IgE.....	36
4.7.3	Ensayo de Dot- blot con anticuerpos monoclonales.....	38
4.7.4	Ensayo de activación de basófilos.....	39
4.8	Determinación de endotoxinas en las proteínas recombinantes purificadas para los estudios <i>in vivo</i>	40
4.9	Evaluación de los niveles de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) estimuladas con las proteínas híbridas	41
4.10	Evaluación de la respuesta humoral e inflamatoria inducida en ratones BALB/c por la administración de las proteínas híbridas	43
4.10.1	Modelo de ratón con inflamación alérgica	43
4.10.2	Evaluación de la respuesta inmune humoral	45
4.10.3	Análisis de la función respiratoria al reto con metacolina en ratones inmunizados con las proteínas híbridas.....	47
4.10.4	Inhibición de la unión de IgE humana a extractos alérgicos por la IgG de ratones inmunizados con las proteínas híbridas	48
4.10.5	Anafilaxia cutánea Pasiva (PCA)	49
4.11	Análisis de datos.	50
5	RESULTADOS.....	51
5.1	Purificación y Caracterización Molecular e Inmunológica de la proteína híbrida MAVAC-BD-2	53
5.1.1	Diseño de la proteína MAVAC-BD-2	55
5.1.2	La proteína MAVAC-BD-2 se obtuvo en forma parcialmente plegada	56

5.1.3	MAVAC-BD-2 muestra una baja capacidad de unión a IgE en sueros de alérgicos a los ácaros	57
5.1.4	MAVAC-BD-2 contiene epítopes B de los alergenos de ácaros <i>B. tropicalis</i> y <i>D. pteronyssinus</i>	59
5.1.5	MAVAC-BD-2 induce una menor activación de basófilos en comparación con los alergenos recombinantes y extractos de ácaros.....	60
5.1.6	MAVAC-BD-2 induce mayores niveles de IL-10 y menores de IL-5 que el extracto <i>B. tropicalis</i> en PBMC de alérgicos a los ácaros	61
5.1.7	MAVAC-BD-2 no mostró degradación a condiciones de almacenamiento a 4°C durante 3 semanas.....	62
5.1.8	MAVAC-BD-2 forma agregados de alto peso molecular.....	63
5.1.9	La inmunización con MAVAC-BD-2 induce anticuerpos IgG que reaccionan con el extracto de <i>B. tropicalis</i> y con los alergenos purificados.....	64
5.1.10	Los anticuerpos IgG específicos a MAVAC-BD-2 inhiben la unión de la IgE humana hacia los extractos de ácaros y alergenos purificados.....	66
5.1.11	MAVAC-BD-2 no induce hiperreactividad de las vías aéreas al reto con metacolina en ratones BALB/c.....	67
5.1.12	Disminución de la respuesta inflamatoria <i>in vivo</i> en ratones inmunizados con MAVAC-BD-2	68
5.2	Purificación y Caracterización Molecular e Inmunológica de la proteína híbrida DPx4	71
5.2.1	Diseño de la proteína DPx4	73
5.2.2	La proteína DPx4 se obtuvo en forma parcialmente plegada	73
5.2.3	DPx4 muestra baja capacidad de unión a IgE de sueros de alérgicos a los ácaros	74
5.2.4	DPx4 contiene epítopes B de los alergenos del ácaro <i>D. pteronyssinus</i>	77
5.2.5	DPx4 induce menor activación de basófilos que los alergenos recombinantes y el extracto de ácaro.....	78
5.2.6	DPx4 induce mayores niveles de IL-10 y menores de IL-5 que el extracto de <i>D. pteronyssinus</i> en PBMC de pacientes alérgicos a los ácaros.	79
5.2.7	DPx4 no posee actividad de cisteína proteasa.....	80
5.2.8	DPx4 no mostró degradación en almacenamiento a 4°C durante tres semanas.....	80
5.2.9	DPx4 forma agregados de alto peso molecular.....	81
5.2.10	La inmunización con DPx4 induce anticuerpos IgG que reaccionan con el extracto de <i>D. pteronyssinus</i> y con los alergenos purificados	82
5.2.11	Los anticuerpos IgG específicos a DPx4 inhiben la unión de la IgE humana hacia el extracto de ácaros y alergenos purificados.....	84

5.2.12	DPx4 no induce hiperreactividad de las vías respiratorias al reto con metacolina en ratones.....	85
5.2.13	Disminución de la respuesta inflamatoria in vivo en ratones inmunizados con DPx4.	86
6	DISCUSIÓN.....	87
7	CONCLUSIONES.....	99
8	DISCUSIÓN GENERAL	101
9	PERSPECTIVAS	103
10	REFERENCIAS	105

Listado de Figuras

Figura 1. Respuesta Alérgica.	3
Figura 2. Cambios humorales y celulares que tiene lugar durante el curso de IEA.	12
Figura 3. Esquemas de sensibilización con MAVAC-BD-2 en un modelo de inflamación alérgica.....	44
Figura 4. Esquema de sensibilización con DPx4 en un modelo de inflamación alérgica. ..	45
Figura 5. Modelo estructural de la proteína MAVAC-BD-2.	55
Figura 6. Purificación y espectro de dicróismo de la proteína MAVAC-BD-2.....	56
Figura 7. Niveles de IgE a MAVAC-BD-2 por ELISA en sueros de alérgicos a los ácaros.57	
Figura 8. Reactividad de la IgE a MAVAC-BD-2 por ensayo de dot-blot.	58
Figura 9. Reactividad IgG mediante ELISA.	58
Figura 10. Inhibición de ELISA: Inhibición de la unión de IgE a extractos y alergenos recombinantes por MAVAC-BD-2.	59
Figura 11. Ensayo de Dot-blot con anticuerpos monoclonales.....	60
Figura 12. Ensayo de activación de basófilos.	61
Figura 13. Niveles de citoquinas inducidos por MAVAC-BD-2 en cultivos de PBMC de 5 pacientes alérgicos a los ácaros.....	62
Figura 14. Análisis en de la estabilidad de MAVAC-BD-2 después de un periodo de almacenamiento de 21 días a 4°C.	63
Figura 15. Análisis DLS con MAVAC-BD-2.....	63
Figura 16. Niveles de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados con MAVAC-BD-2.64	
Figura 17. Reactividad de anticuerpos IgG inducidos en ratones BALB/c por la inmunización con MAVAC-BD-2.	65
Figura 18. Reactividad de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados con MAVAC-BD-2 y B. tropicalis por ELISA.	66
Figura 19. Evaluación de la hiperreactividad de las vías aéreas al reto con metacolina en ratones BALB/c inmunizados con MAVAC-BD-2.	68
Figura 20. Prueba de anafilaxia cutánea pasiva.	69
Figura 21. Representación de la estructura de la proteína DPx4.....	73
Figura 22. Purificación y espectro de dicróismo de la proteína DPx4.	74
Figura 23. Niveles de IgE a DPx4 por ELISA en sueros de alérgicos a los ácaros.....	75
Figura 24. Reactividad de la IgE a DPx4 por ensayo de dot-blot.....	76
Figura 25. Reactividad IgG mediante ELISA.	76
Figura 26. Inhibición de ELISA de unión de la IgE a extractos y alergenos purificados por DPx4.....	77
Figura 27. Ensayo de Dot-blot con anticuerpos monoclonales.....	78
Figura 28. Ensayo de activación de basófilos.	79
Figura 29. Niveles de citoquinas inducidos por DPx4 en cultivos de PBMC de 6 pacientes alérgicos a los ácaros.	80
Figura 30. Análisis de la estabilidad de DPx4 después de un periodo de almacenamiento de 21 días a 4°C.....	81
Figura 31. Resultados DLS con DPx4.	81
Figura 32. Niveles de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados con DPx4.....	82
Figura 33. Reactividad de anticuerpos IgG inducidos en ratones BALB/c inmunizados con DPx4.....	83
Figura 34. Reactividad de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados con DPx4 y D. pteronyssinus por ELISA.....	83

Figura 35. Evaluación de la hiperreactividad de las vías respiratorias al reto con metacolina en ratones inmunizados con DPx4.	85
Figura 36. Prueba de anafilaxia cutánea pasiva.	86

Listado de Tablas

Tabla 1. Alergenos de ácaros seleccionados para el diseño de las proteínas recombinantes MAVAC-BD-2 y DPx4.....	7
Tabla 2. Nuevos esquemas de Inmunoterapia específica de alergen.....	17
Tabla 3. Características de los segmentos de alergen que conforman la proteína MAVAC-BD-2*.....	29
Tabla 4. Características de los segmentos de alergen que conforman la proteína DPx430	
Tabla 5. Pool de sueros usados para la inhibición IgE por la proteína MAVAC-BD-2	37
Tabla 6. Pool de sueros usados para la inhibición IgE por la proteína DPx4.....	38
Tabla 7. Características de los sueros usados en la activación de basófilos con MAVAC-BD-2.....	40
Tabla 8. Características de los sueros usados en la activación de basófilos con DPx4	40
Tabla 9. Inhibición de la reactividad IgE a B. tropicalis y D. pteronyssinus, en sueros de alérgicos, por anticuerpos IgG de ratón inmunizados con MAVAC-BD- 2.....	67
Tabla 10. Inhibición de la reactividad IgE hacia Blot 5 y Der p 2 en sueros de alérgicos, por anticuerpos IgG de ratón inmunizados con MAVAC-BD- 2.....	67
Tabla 11. Inhibición de la reactividad IgE hacia D. pteronyssinus en suero de alérgicos, por anticuerpos IgG de ratón inmunizado con DPx4	84
Tabla 12. Inhibición de la reactividad IgE a Der p 1 y Der p 2 en sueros de alérgicos por anticuerpos IgG de ratón inmunizados con DPx4	85

ABREVIATURAS

6xHis-tag: Etiqueta de hexa-histidina
ADN: Ácido Desoxirribonucleico
pb: Pares de bases
BSA: Albúmina Sérica Bovina
CD: Células dendríticas
DC: Dicroísmo circular
DLS: Dispersión de la Luz dinámica
DO: Densidad óptica
DTT: Ditiotreitól
ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
E.coli: *Escherichia coli*
FcγRIIb: Receptor de baja afinidad de la IgG
FcεRI: Receptor de alta afinidad de la IgE
HCl: Ácido clorhídrico
HisTag: secuencia "Tag" de histidinas
IgE: Inmunoglobulina E
IgG: Inmunoglobulina G
IL: Interleuquina
ILC: Células linfoides innatas
IEA: Inmunoterapia específica con alérgeno
IPTG: isopropiltiogalactósido
ITAMs: Motivos de activación en inmunoreceptores basados en tirosina
ITIMs: Motivos de Inhibición en inmunoreceptores basados en tirosina
i.p: intraperitoneal
i.n: intranasal
kDa: Kilodaltons
LB: Luria-Bertani
LBA: Luria-Bertani con ampicilina
LPS: Lipopolisacarido
M: Molar
mAb: Anticuerpo monoclonal
MgCL₂: Cloruro de Magnesio
NaCl: Cloruro de Sodio
NaH₂PO₄: Fosfato de sodio di-hidrogenado
PBS: Buffer de fosfato salino
PFLNA: pGlu-Phe-Leup-nitroanilide
PHA: Fitohemaglutinina
PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
r.p.m.: Revoluciones por minuto
SDS-PAGE: Electroforesis en Gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio
TA: Temperatura ambiente
Th: Células T colaboradoras
Treg: Células T reguladoras
TSLP: Linfopoyetina estromal tímica

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha significado un gran crecimiento en lo profesional como en lo personal. Deseo expresar mi profundo agradecimiento en primer lugar a mi tutor y director de esta tesis: gracias Leonardo Puerta, por confiar en mí para la ejecución de este trabajo, por tu paciencia con la mirada positiva que ha demostrado durante el transcurso de esta tesis. Por tu preocupación incesante de enseñarme a pensar con mentalidad científica. Por tus críticas y comentarios que han forjado mi carácter científico y personal. Gracias por tu amistad y por escucharme.

Gracias al Doctor Luis Caraballo, por abrirme las puertas de este centro, por su disponibilidad y asesoramiento, aportando valiosas correcciones y por ser un motor incansable de esta cuna de científicos.

A todos mis compañeros y docentes, que hacen parte de la gran familia del Instituto de Investigaciones Inmunológicas, gracias por cada colaboración recibida y por hacer mejor mi estadía en el laboratorio. Gracias a la Dra, Ines Benedetti y a mis amigas Titi y Sandri, por las tertulias científicas y no tan científicas y por estar siempre en los momentos buenos y no tan buenos.

A mi compañero de equipo, Marlon con quien compartimos largas horas de estudio, de trabajo científico y camaradería.

Gracias a Colciencias (Proyecto N° 385-2009 y 588-2013) y a la Universidad de Cartagena por el financiamiento de este trabajo.

Flo, gracias por tu amor, apoyo y haber llegado en el mejor momento.

Finalmente quiero agradecer a mi madre María Concepción, mi tía Amparo y mis hermanos y familia por todo el apoyo y el esfuerzo que me han dado en mi formación académica, personal y por su amor incondicional.

RESUMEN

La inmunoterapia específica con extractos alérgicos, es actualmente la única terapia capaz de modular las bases inmunológicas de las enfermedades alérgicas y brindar mejoría a largo plazo. A pesar de los beneficios que se le atribuyen, el uso de extractos alérgicos presenta inconvenientes principalmente relacionados con la compleja composición y la dificultad para una buena estandarización, lo que disminuye su eficacia y seguridad. Una alternativa para solucionar estos problemas está enfocada en administrar al paciente alérgico solo los alérgenos comprometidos en la respuesta inmune alérgica o derivados de éstos, en una forma altamente purificada y estandarizada, que garanticen un manejo más seguro y reproducible de las dosis administradas.

En este trabajo se expresaron, purificaron y se evaluaron las características moleculares e inmunológicas y la respuesta inmune inducida en un modelo murino de inflamación alérgica, de dos proteínas recombinantes híbridas llamadas MAVAC-BD-2 y DPx4 diseñadas con segmentos de varios alérgenos de los ácaros *Blomia tropicalis* y *Dermatophagoides pteronyssinus*, respondiendo a la necesidad de buscar moléculas para el diagnóstico y la terapia de las alergias provocadas por los ácaros domésticos. MAVAC-BD-2 y DPx4, se expresaron y se purificaron como proteínas con alto grado de pureza y con pesos moleculares de 22.8 kDa y 27.2 kDa respectivamente. Los espectros de dicroísmo circular muestran que MAVAC-BD-2 tiene estructura de proteína α -helicoidal y DPx4 tiene una estructura con un mayor contenido de cintas β . En pruebas de ELISA con sueros de alérgicos, estas dos proteínas mostraron niveles de IgE significativamente menores que los obtenidos con los alérgenos recombinantes y los extractos de ácaros. Ambas proteínas híbridas inhibieron la reactividad de la IgE hacia Der p 1 y Der p 2, MAVAC-BD-2 además, inhibió la reactividad IgE hacia Blo t 5. Los anticuerpos monoclonales anti-Der p 1 y anti-Der p 2 mostraron reactividad hacia las proteínas híbridas. Los ensayos *in vitro* con basófilos de pacientes alérgicos junto con los estudios *in vivo* de prueba de anafilaxia cutánea pasiva revelan que estas proteínas carecen de

actividad alérgica relevante. La estimulación de PBMC de pacientes alérgicos con las proteínas híbridas indujo la producción significativa de IL-10, acompañada con una baja producción de IL-5.

Los estudios en ratones BALB/c, revelaron que la inmunización con las dos proteínas indujo niveles significativamente menores de IgE específicos y mayores de IgG comparados a los inducidos con los extractos alérgicos de ácaros. La relación IgG1/IgG2 sérica en los ratones mostró un mayor peso de la IgG2. Estos anticuerpos reaccionaron con los extractos de ácaros, los alérgenos purificados y bloquearon la unión de los anticuerpos IgE de alérgicos a los ácaros hacia los extractos de ácaros y alérgenos purificados. Lo anterior estuvo acompañado de una disminución significativa en los signos de inflamación de las vías respiratorias en los ratones inmunizados con MAVAC-BD-2 y DPx4. Todos los resultados anteriores sustentan que es posible obtener proteínas con representación de regiones antigénicas de los principales alérgenos de ácaros con propiedades antigénicas e inmunológicas apropiadas para el desarrollo de vacunas para tratar las alergias por ácaros domésticos.

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Alergia a los ácaros del polvo doméstico

1.2 Respuesta alérgica

El asma y la rinitis alérgica constituyen un problema de salud a nivel mundial por su alta tasa de prevalencia asociada con mayor número de consultas y urgencias hospitalarias, afectando la calidad de vida de quienes la padecen con pérdida de días en el trabajo, las escuelas y alto costo en su diagnóstico y tratamiento. En Colombia, las encuestas epidemiológicas sugieren que la prevalencia de enfermedades atópicas ha aumentado en la última década (1). En 2010, las tasas de enfermedad alérgicas fueron del 12% para el asma y del 32% para la rinitis alérgica (2).

Estas enfermedades se caracterizan por una respuesta inmunológica inflamatoria de tipo Th2, la cual se desencadena por la exposición a los alérgenos ambientales contra los cuales una minoría de la población, llamada atópica, reacciona (3). En el desarrollo y manifestación clínica de estas enfermedades se asocian principalmente con la exposición hacia alérgenos de ácaros domésticos y la susceptibilidad genética del individuo al padecer estas enfermedades (4) .

La respuesta alérgica es una respuesta exagerada y alterada del sistema inmune frente a determinados antígenos, por lo general inocuos, llamados alérgenos. En el desarrollo de una reacción alérgica, ocurren varios acontecimientos que se dividen en dos fases (5), (Fig. 1). La primera, conocida como sensibilización alérgica, la cual se inicia cuando el individuo genéticamente predispuesto se expone al alérgeno. Después de la entrada del alérgeno al organismo a través de las vías aéreas o el tracto gastrointestinal, las células presentadoras de antígenos (CPA) internalizan y procesan el alérgeno. Luego las CPA activadas migran hacia los ganglios linfáticos y los péptidos generados por el procesamiento son expuestos en la superficie celular de las CPA por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHCII) y lo presentan a un linfocito T (LT) CD4+ indiferenciado (“naive”), el cual en presencia de las citoquinas IL-4, IL-13, IL-5

secretadas por una variedad de fuentes celulares, moléculas coestimuladoras (CD80/CD86, CD40-CD40L, OX40-OX40L e ICOS-ICOSL) experimentan diferenciación, polarización y expansión clonal de linfocitos tipo Th2 específicos para el alérgeno. La interacción de los linfocitos Th2 con los linfocitos B junto con el ambiente pro-Th2 promueve en estos la activación de genes de recombinación de la cadena pesada ϵ de la inmunoglobulina para producir IgE antígenos específicos (6). La IgE secretada por los linfocitos B de memoria permanecerá, por un lado, libre circulante en el organismo y por otro lado unida a la superficie de células efectoras a través de sus receptores de alta afinidad ($Fc\epsilon RI$) presentes en los mastocitos, eosinófilos y basófilos, así como también en los receptores de baja afinidad ($Fc\epsilon RII$ -CD23), principalmente en los linfocitos B, células dendríticas y macrófagos, generando lo que se denomina células sensibilizadas.

La segunda, comprende la fase llamada efectora, que tiene lugar después de sucesivas exposiciones al mismo alérgeno (re-exposición), la que desencadenará una respuesta inflamatoria alérgica, con liberación de mediadores preformados como la histamina y triptasa, además de mediadores sintetizados a partir del ácido araquidónico (prostaglandinas y leucotrienos) como producto del entrecruzamiento del complejo alérgeno/IgE unido a los receptores $Fc\epsilon RI$. Este ambiente inflamatorio induce una mayor activación de citoquinas y las células Th2 específicas a los alérgenos, responsables de la sintomatología alérgica.

respuesta a quimioquinas e interacción con otros tipos células (9, 10). Las células T reg también parece tener un papel clave en las manifestaciones de las enfermedades alérgicas ya que se ha demostrado que los pacientes alérgicos tienen deficiencias en estas células, comparado con lo observado en un individuo no alérgico (11).

Diferentes estudios muestran que la inflamación alérgica resulta no solo de una respuesta exacerbada Th2/IgE de la inmunidad adaptativa, sino que también existe la participación directa de células del llamado sistema inmunitario innato. Las células epiteliales de las vías aéreas (CEA) promueven una respuesta Th2, mediante la activación de los receptores de reconocimientos de patógenos (PPR) presente en ellas, por acción directa de la actividad biológica de los alérgenos o a través de las “señales de peligro” presentes también en las fuentes alérgicas naturales, promoviendo la secreción de mediadores inflamatorios como la IL-25, IL-33 y TSLP. Estas citoquinas pro-Th2 participan en la polarización de los linfocitos hacia el subtipo Th2 mediante la modulación de subpoblaciones de CD específicas de alérgenos, también regulan la activación y proliferación de las células linfoides innatas (ILC). Dentro de esta población celular, la ILC-2 se ha asociado con el desarrollo de asma y la hiperreactividad de las vías aéreas por su alta producción de citoquinas inflamatorias como IL-5 e IL13 (12, 13), por lo que se consideran poblaciones importantes en las etapas iniciales del desarrollo de las enfermedades alérgicas.

Los alérgenos con actividad de proteasas pueden mediar el desarrollo de respuesta alérgica en ausencia de IgE, a través de la activación de los receptores activados por proteasas (PAR) presentes en las células epiteliales de las vías aéreas, mastocitos, eosinófilos, macrófagos y monocitos. Courtney D, colaboradores, usando un modelo murino de inflamación alérgica inducido con el extracto de ácaro, demostraron que la administración de anticuerpo anti-PAR-2 antes de cada inmunización con el extracto, disminuía significativamente la expresión de las citoquinas IL4, IL5, IL-33, así como también la hiperreactividad bronquial, sugiriendo

que la sensibilización hacia alergenos de ácaros pueden estar mediada por la activación de PAR-2 (14).

TLR-2 es un receptor tipo Toll, presente en los monocitos, células dendríticas, macrófagos, polimorfonucleares y células epiteliales, que se une a los peptidoglicanos (PGN), glicolípidos, lipolípidos y polisacáridos en las bacterias, hongos y virus. Este receptor se ha descrito como un factor clave en el desarrollo de las alergias. La administración de ovoalbúmina junto con Pam3CSK4 en ratones, un agonista sintético para TLR2, indujo una mayor secreción de citoquinas pro-inflamatorias y desarrollo de una respuesta inmune tipo Th2 (15).

1.3 Sensibilización a los ácaros domésticos

La sensibilización hacia los alergenos de ácaros es un factor de riesgo importante para el desarrollo de asma y rinitis alérgica en el mundo, especialmente en las regiones tropicales y subtropicales, donde los ácaros crecen y proliferan abundantemente todo el año, ya que estas regiones proporcionan las condiciones ideales de temperatura (aproximadamente 25°C a 30°C) y humedad relativa para su proliferación (entre el 70% y el 90%). Los ácaros domésticos se encuentran en los colchones, almohadas, sofás y alfombras, siendo las camas el hábitat perfecto para su crecimiento.

Se han descrito más de treinta especies de ácaros clínicamente relevantes, constituyendo la principal fuente de alergenos en el interior de las casas (16). Entre las especies de mayor importancia clínica en el desarrollo de asma y rinitis alérgicas en las regiones tropicales y subtropicales, se encuentran *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Blomia tropicalis*, las cuales coexisten en la mayoría de las regiones geográficas (4, 17, 18). En estas especies se han identificado un gran número de alergenos, los cuales presentan una alta tasa de sensibilización entre los alérgicos a los ácaros en comparación con los alergenos de otras especies de ácaros domésticos. En individuos alérgicos de Asia y de América Latina, usando prueba cutánea y ensayos serológicos, se ha observado una frecuencias de sensibilización

entre 60% y 90% a estas especies de ácaros (18-20). En el año 1993, nuestro grupo evaluó la sensibilización IgE a estas especies de ácaros en pacientes alérgicos de Cartagena Colombia, encontrando una sensibilización a *B. tropicalis* del 80.5% y a *D. pteronyssinus* del 75.3% (21). Recientemente en la cohorte FRAAT (Cartagena, Colombia) usando la tecnología de Inmunocap, se encontró que el 33.3% de los sueros de los niños con edad de 3 años tienen anticuerpos IgE hacia el extracto de *B. tropicalis*, demostrando no sólo una sensibilización temprana a los alérgenos de ácaros del polvo doméstico, sino también la importancia de estos ácaros como factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades alérgicas (22).

1.3.1 Alérgenos de *D. pteronyssinus* y *B. tropicalis*

Los alérgenos son proteínas o glicoproteínas con peso molecular que oscila entre los 10 kDa y 90 kDa. En los ácaros están localizados en diferentes partes del cuerpo, siendo las partículas fecales donde se concentran la mayor parte de los alérgenos, constituyendo un vehículo para el transporte fácil de estos alérgenos en el medio ambiente (23).

Los extractos alérgicos de ácaros están compuestos por diversos alérgenos, de los cuales sólo algunos tienen relevancia clínica en las alergias. El subcomité de nomenclatura de alérgenos de la Organización Mundial de la Salud y la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (OMS/IUIS) registran actualmente más de 30 alérgenos de *D. pteronyssinus* y 14 alérgenos de *B. tropicalis*. La mayoría de estos alérgenos se han definido por la unión a IgE en ensayos de ELISA o por pruebas cutáneas positivas. Algunos de estos alérgenos se han aislado y purificado a partir de las heces y/o cuerpo de los ácaros mediante diferentes métodos que combinan la cromatografía, la filtración en gel y la diálisis. Otros se han obtenido mediante técnicas de ingeniería genética y la biología molecular, utilizando habitualmente el sistema de expresión en bacterias, produciendo de esta manera alérgenos recombinantes, con características moleculares e inmunológicas equivalentes a las del alérgeno natural. La estructura tridimensional de varios

alergenos se ha determinado mediante cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN).

Los alergenos de estas dos especies de ácaros presentan una variedad de propiedades bioquímicas de proteínas con actividad hidrolítica, función transportadora, enzimáticas, proteínas de unión a lípidos, proteínas de contracción muscular o que actúan como inhibidores enzimáticos, entre otras. Aquí nos referiremos solo a aquellos alergenos que están presente en las moléculas híbridas estudiadas en esta investigación (Tabla 1).

Tabla 1. Alergenos de ácaros seleccionados para el diseño de las proteínas recombinantes MAVAC-BD-2 y DPx4

Ácaros	Alérgeno	Función Biológica	Reactividad IgE (%)
Blomia tropicalis	Blo t 5	Desconocida	59
	Blo t 8	GST	76
	Blo t 10	Tropomiosina	9-41
Dermatophagoides pteronyssinus	Der p 1	Cisteína proteasa	50-90
	Der p 2	Proteína de unión a lípido como MD-2	50-9
	Der p 7	Desconocida	15
	Der p 8	GST	19-70
	Der p 10	Tropomiosina	9-41

Los alergenos del grupo 1 y 2 de las especies *D. pteronyssinus* son de gran relevancia clínica porque ellos son reconocidos por la gran mayoría de pacientes alérgicos a los ácaros. En el grupo 1 se encuentra el alérgeno Der p 1, con actividad de cisteína proteasa de la misma familia C1 que incluye a la papaína y sus parientes y con peso molecular de 25 kDa. Der p 1 presenta un 34% de similitud con la secuencia de aminoácidos de Blo t 1, con bajos niveles de reactividad cruzada entre ellos (24). Der p 1 es producido como enzima inactiva, que se activa después de la separación del pro-peptido. La estructura 3D de Der p 1 se ha determinado experimentalmente y los residuos catalíticos se han identificado como Cys³⁴, His¹⁷⁰, Asn¹⁹⁰ y Gln²⁸. La alta alergenicidad de Der p 1 se ha asociado a sus propiedades enzimáticas, debido a los hallazgos de que dicha actividad promueve la ruptura de

las uniones estrechas entre células epiteliales, favoreciendo el paso de proteínas para luego ser procesadas y presentadas por las CPA. Además, Der p 1 puede separar al receptor CD23 (receptor de baja afinidad para la IgE) de la membrana de linfocitos B, alterando la síntesis de la IgE y también separar el receptor CD25 (la subunidad del receptor para interleucina-2) de la superficie de células T periféricas humanas y en consecuencia estas células presentan una menor proliferación y secreción de IFN- γ , favoreciendo colectivamente la respuesta tipo Th2 (25). Por otra parte, se ha demostrado que Der p 1 tiene la capacidad de estimular el sistema inmune innato, a través de la activación de PAR-2 presente en las células epiteliales de las vías aéreas, promoviendo la inflamación alérgica a través de la inducción de citoquinas inflamatorias como la IL-25, IL-33 y TSLP (26). Recientemente se demostró que Der p 1 a través de su actividad enzimática puede regular la producción de la IL-33 en las células epiteliales y en las ILC, apoyando el papel crucial de Der p 1 en el desarrollo del asma (27).

El alérgeno Der p 2 tiene un peso molecular de 14 kDa con homología estructural y funcional con el correceptor MD-2 humano (Factor de diferenciación mieloide-2) y capacidad de unión a LPS. Debido a su homología estructural con MD-2, Der p 2 podría actuar como un adyuvante natural pro- Th2 , vía respuesta innata, al propiciar la unión de LPS al receptor TLR-4 e inducir un ambiente proinflamatorio (28). Der p 2 presenta una extensa homología con los alergenos Der f 2 y Tyr p 2 (29). La frecuencia de reactividad IgE a Der p 1 y Der p 2 en pacientes alérgicos a los ácaros es alta, con porcentaje de sensibilización entre el 50% y el 90%, constituyendo los alergenos de ácaros más relevantes alrededor del mundo (30). En Cartagena, Colombia la prevalencia de IgE específica a Der p 1 y Der p 2 en el estudio de Jiménez S y colaboradores, fue reportada entre un 64% y 69% respectivamente (31).

Blo t 5 es una proteína con una estructura monomérica α hélice y actividad biológica desconocida. Presenta un 43% de similitud con la secuencias de aminoácidos de Der p 5, estos dos alergenos son considerados específicos de especie, por carecer de relevante reactividad cruzada entre ellos (32). En áreas del trópico, Blo t 5 es un

alérgeno importante entre los pacientes sensibilizados a *B. tropicalis*, con frecuencia de sensibilización IgE mayor del 50% en pacientes asmáticos de regiones tropicales como Singapur, Taiwan (18, 33), Brasil (34, 35) y Colombia (36).

Der p 7 es una proteína con peso molecular de 22.2 kDa y con un 86% de identidad con la secuencias de aminoácidos de Der f 7 (37). El análisis estructural por NMR y ensayos bioquímicos indican que Der p 7 no se une a LPS sino que presenta una afinidad por el polipéptido polimixina B bacteriano (30, 38). Aunque la frecuencia de sensibilización a Der p 7 en los alérgicos a los ácaros es relativamente baja comparado con los alergenos Der p 1 y Der p 2, algunas poblaciones muestran porcentaje de reactividad IgE entre el 30 y 50% (30, 39). En Colombia, la frecuencia de sensibilización a Der p 7 es del 15.6% en asmáticos alérgicos a los ácaros (31).

Der p 8 y Blo t 8 son alergenos con función glutatión-S-transferasa (GST) con peso molecular de 26 kDa y con reactividad cruzada con sus homólogos en la cucaracha (*Blattella germanica*), los hongos (*Aspergillus fumigatus*) y *Ascaris lumbricoides* (40). Son alergenos clínicamente relevantes en áreas subtropicales y tropicales (41) con distintos porcentaje de sensibilización IgE dependiendo de la región geográfica. Por ejemplo, en Malasia y en Singapur, los pacientes alérgicos muestran porcentaje de frecuencias de sensibilización entre el 19% y 75% respectivamente (42). En Cartagena, Colombia, en una muestra de 24 sueros de alérgicos a *B. tropicalis* se halló una frecuencia de reactividad IgE a Blo t 8 del 76.9% (40).

Blo t 10 y Der p 10 son alergenos homólogos a la tropomiosina, con peso molecular de 37 kDa (43). Aunque Der p 10 y Blo t 10 muestran un alto grado de identidad en las secuencias de amino ácidos y una alta reactividad cruzada, existen epítopes de IgE únicos entre ellos, por lo que ambos alergenos deberían incluirse en las pruebas para el diagnóstico de las enfermedades alérgicas inducidas por ácaros (44). La frecuencia de sensibilización a estos alergenos es generalmente baja y con amplias diferencias en diferentes áreas geográficas, con porcentajes entre el 2% en Singapur y el 29% en países de Europa (45). En Colombia el 34.6% y el 41% de los individuos alérgicos a los ácaros están sensibilizados a Der p 10 y Blo t 10 respectivamente (46). Sin embargo, a pesar de la baja frecuencia de reactividad en

algunas poblaciones, la gran importancia de estos alergenos reside en ser responsables de severa reacción anafiláctica, debido en gran medida a la alta reactividad cruzada que presenta con los homólogos en otras fuentes alérgicas.

1.4 Inmunoterapia específica con alergenos

El tratamiento de las enfermedades alérgicas se apoya en tres ejes fundamentales, el control ambiental, el tratamiento farmacológico y la inmunoterapia específica con alérgeno (IEA). Las medidas de control ambiental de los alergenos de ácaros no son muy eficaces, ya que la eliminación de los ácaros y la disminución de los niveles de alergenos en el ambiente constituyen una tarea difícil. El tratamiento farmacológico, aunque es una terapia eficaz al disminuir los síntomas alérgicos, al bloquear la liberación de mediadores inflamatorios en células implicadas en la inflamación, es una terapia paliativa, ya que disminuye los síntomas asociados con la enfermedad sin modificar el curso natural de la misma. La IEA usando extractos completos, es el único tratamiento actual avalado por la Academia Americana de Alergia, Asma e Inmunología, el Colegio Americano de Asma Alergia e Inmunología y la Organización Mundial de Alergia, que puede cambiar el curso natural de las enfermedades alérgicas proporcionando eficacia a largo plazo, disminuyendo significativamente la severidad de la enfermedad y el consumo de medicamentos, así como mejorando la calidad de vida. Su eficacia ha sido demostrada en múltiples estudios (47, 48).

En el año 1911, Leonard Noon introdujo el uso de la inmunoterapia específica para el tratamiento de la rinitis alérgica. Sus ensayos clínicos indicaron que la administración subcutánea de extractos de polen a pacientes con fiebre del heno era capaz de inducir tolerancia inmunológica, logrando revertir el curso de la enfermedad y proporcionando protección prolongada después de la suspensión del tratamiento (49). A partir de esta fecha, el método usado por Noon fue aceptado por la comunidad científica y ha sido usado como el principal tratamiento para las enfermedades alérgicas. La IEA consiste en la administración gradual de cantidades

crecientes de extracto alérgico por vía subcutánea o sublingual a pacientes con enfermedades alérgicas, hasta alcanzar las dosis máximas toleradas. Los beneficios clínicos se observan transcurridos varios meses desde el inicio de la vacunación y los síntomas de la enfermedad disminuyen progresivamente durante los 3 o 4 años que dura la terapia (50, 51).

1.4.1 Mecanismos moleculares y celulares que participan en la eficacia de la IEA

La inmunoterapia actúa a diversos niveles sobre un paciente alérgico el que ya está instaurada una respuesta tipo Th2 hacia alérgenos, siendo su objetivo inducir tolerancia o anergia de linfocitos T efectores específicos de alérgeno. En la IEA se desarrollan varios eventos celulares y moleculares específicos que podrían explicar su eficacia (Fig 2): Inicialmente, horas después de la primera dosis se observa una disminución en la activación y degranulación de basófilos y mastocitos, evento que se acompaña con la inducción de un estado de tolerancia por el aumento de las subpoblaciones de linfocitos T reguladores (T_{R1}) y B reguladores (B_{R1}) que producen IL-10 y TGF β , citoquinas que a su vez inhiben la activación de linfocitos Th1 y Th2 específicos del alérgeno y la síntesis de IgE. La regulación de isotipo de anticuerpo es otro evento que también ocurre, iniciando con aumento temprano en los niveles séricos de IgE, los cuales disminuyen en el curso de la inmunoterapia, al tiempo que se presenta un incremento continuo en los niveles séricos de IgG4. Después de varios meses y años se observa un descenso significativo en la relación de anticuerpos específicos IgE/IgG4, disminución en el número de eosinófilos, mastocitos y sus mediadores, acompañados con una menor reactividad frente a la prueba cutánea (51, 52).

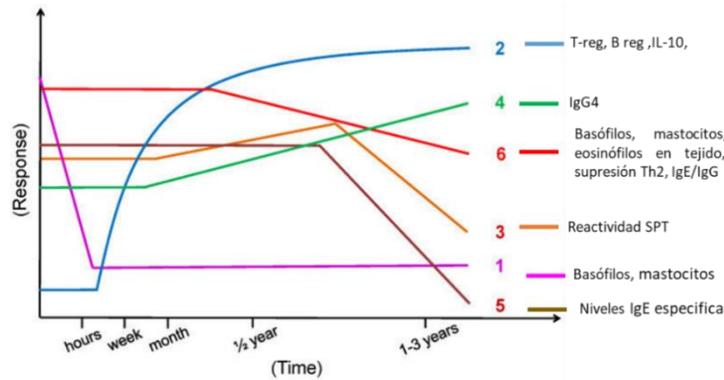


Figura 2. Cambios humorales y celulares que tiene lugar durante el curso de IEA. *World Allergy Organization Journal* (2015) 8:17

Entre los mecanismos que participan en la eficacia de la IEA se han señalado los siguientes:

1.4.1.1 Producción de IgG4

Durante la IEA, a nivel de la respuesta humoral en humanos, se observa un aumento temprano de anticuerpos IgG especialmente de la subclase IgG4. Durante el curso de la inmunoterapia, los anticuerpos IgG se han detectado tanto en el fluido nasal como en el suero y sus altos títulos séricos se han asociado con una mejoría en los síntomas de alergia (53). Varios estudios sustentan que la IgG específica producida durante IEA puede inducir efectos benéficos a través de su actividad bloqueadora (54, 55), mediante los siguientes mecanismos: a) inhibiendo la unión del alérgeno hacia la IgE unida sobre la membrana de los mastocitos, basófilos y linfocitos B, como también en los receptores de baja afinidad (FcεRII) presentes en los linfocitos B. b) bloqueando la presentación del alérgeno facilitada por la IgE (56, 57). c) Inhibiendo la internalización del complejo IgE-alérgeno en células presentadoras de antígeno (58, 59) y d) promoviendo la coagregación del receptor de baja afinidad de la IgG (FcγRIIB- CD32B) con el receptor FcεRI. Este mecanismo induce la regulación negativa de la señalización del receptor FcεRI, a través de la activación de motivos de inhibición del inmunoreceptores basados en tirosina (ITIM), contrarrestando el efecto de los motivos de activación del inmunoreceptor basados en tirosina (ITAM), (60, 61).

El efecto bloqueador de la IgG4 puede persistir incluso durante años, después de la suspensión del tratamiento, sugiriendo que este anticuerpo puede ser importante para la tolerancia clínica a largo plazo (62). Recientemente, en un estudio en humanos se encontró que la eficacia de la inmunoterapia específica observada en pacientes alérgicos al polen, estaba asociada con la capacidad de los anticuerpos IgG4 en el fluido nasal de inhibir la presentación antigénica facilitada por la IgE, demostrando la actividad inhibitoria funcional de la IgG4 (63).

1.4.1.2 Activación y proliferación de linfocitos reguladores

El éxito de la inmunoterapia específica con alérgenos también se sustenta en el desarrollo de tolerancia a través de la activación y proliferación de linfocitos T reguladores (Treg) (52). Estas poblaciones celulares juegan un papel importante en la modulación y el control de la respuesta alérgica. Los subtipos de linfocitos Treg están claramente diferenciados según su origen: las Treg naturales, producidas en el timo son de tipo CD4+CD25+ y expresan el factor nuclear FOXP3 y las Treg inducibles (iTreg) que a diferencia de las Treg naturales aparecen en la periferia, caracterizándose por una elevada secreción de IL-10 y TGF β . Estas dos poblaciones contribuyen al control de la respuesta inmune alérgica específica en varios aspectos: modulación de la activación de las CD que inducen la generación de células T efectoras de tipo Th2 a través de la expresión de moléculas inhibitorias como CTLA-4 (CD152) y LAG-3 (CD223); supresión de las células Th1, Th2, Th17, disminución en la producción de IgE, inducción de la síntesis de IgG4, supresión de la activación de mastocitos y basófilos a través de la inducción de las citoquinas inmunosupresoras IL-10 y TGF β (52, 64).

Ratones C57BL/6J sensibilizados con Der p 1, sometidos a transferencia adoptiva con células Treg (CD4+CD25+Foxp3+) de ratones “naive” antes del reto alérgico, se observó una disminución significativa en el número de eosinófilos y de células caliciformes productoras de moco a nivel pulmonar, seguido con atenuación en la producción de anticuerpos IgE e IgG1 específicos hacia Der p1. Estos hallazgos resaltan el papel central de la Treg en el control de la respuesta alérgica inducida por alérgenos del polvo doméstico (65).

La IL-10 es una citoquina sintetizada por diferentes tipos de células, como los linfocitos B, monocitos, CD, NK y células T. Su efecto regulador está mediado por un receptor de superficie. Para que esta citoquina inhiba la activación y proliferación de linfocitos Th2 y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, se han descrito mecanismos de acción dependientes y no dependientes de la activación de las CD (66, 67). La IL-10 y el TGF- β tienen papel importante en la supresión de la respuesta alérgica y en la eficacia de la inmunoterapia específica. Ambas citoquinas son inhibidoras de los procesos inflamatorios alérgicos (64).

Kearley y colaboradores, observaron que la disminución de la eosinofilia en las vías aéreas y la producción de citoquinas Th2 (IL-5 e IL-13) en el pulmón de ratones sensibilizados a Ovoalbúmina (Ova), después de recibir la transferencia adoptiva de células T-CD4+CD25+ específicas para Ova, fue dependiente de la producción de IL-10 (68). Recientemente, se demostró que ratones deficientes de la subunidad α del receptor de la IL-10 (*Il10ra-deficient*) en los linfocitos T al sensibilizarlos con extractos de *D. pteronyssinus* mostraron un incremento significativo en la infiltración celular y eosinofilia pulmonar en comparación con los ratones silvestres, proporcionando evidencia del papel regulador directo que ejerce la IL-10 sobre los linfocitos Th2, previniendo el desarrollo de inflamación en las vías respiratorias (69). La IL-10 también inhibe la producción de la IgE específica y aumenta la producción de anticuerpos de tipo IgG4. Por lo anterior, se señala que la IL-10 es un potente supresor de la respuesta alérgica y se sugiere que además de generar tolerancia en linfocitos T, también regula la producción de anticuerpos (70).

Otra población celular que parece tener un papel importante en la IEA son los linfocitos B reguladores (B reg), especialmente el subtipo de linfocitos B productores de IL-10 (B_{R1}+IL-10). Esta población celular al igual que los linfocitos T ejercen funciones inmunorreguladoras, promoviendo la tolerancia antígeno específica por múltiples mecanismos tales como la secreción de IL-10 o TGF β , disminución de la inflamación e induciendo el reclutamiento de linfocitos Treg y la producción de anticuerpos IgG4 (71, 72).

1.4.2 Nuevas estrategias para el desarrollo de vacunas para las alergias

La IEA con extractos completos es exitosa en la mayoría de los pacientes que cumplen el esquema de tratamiento. Sin embargo, existen factores que limitan su uso y eficacia. En la IEA se aplican varias dosis en concentraciones cada vez mayores de extractos alergénicos durante un largo tiempo hasta alcanzar una dosis efectiva que se mantiene por un largo período. Este esquema puede representar un riesgo para desarrollar efectos adversos locales y sistémicos durante el tratamiento, poniendo en peligro la vida y el bienestar del paciente (73). Estos inconvenientes están relacionados principalmente con la naturaleza de los extractos, ya que estos son mezclas complejas y variables que contienen endotoxinas, beta-glucanos (74) y otras proteínas de naturaleza desconocida, alterando la estabilidad, la potencia, inmunogenicidad y el contenido alergénico (75, 76). Para superar estos inconvenientes se han desarrollado nuevos esquemas de inmunoterapias para las alergias, dirigidos principalmente a disminuir la alergenicidad del producto administrado y aumentar la eficacia y seguridad de la inmunoterapia. En este ámbito, la producción de proteínas recombinantes y derivados de estas obtenidos a partir de tecnología del ADN recombinante, han adquirido un gran protagonismo en los últimos años.

El uso de alérgenos recombinantes en pruebas de diagnóstico permite la identificación del perfil de sensibilización del paciente hacia alérgenos particulares ofreciendo un diagnóstico más específico, permitiendo de esta forma, una inmunoterapia a la medida del paciente y basada en componentes, en la cual se administran sólo los alérgenos de interés de acuerdo a la historia clínica del paciente evitando la administración de componentes indeseables. Este tipo de terapias se acerca más hacia la tendencia de medicina de precisión la cual persigue proporcionar un tratamiento personalizado.

Las vacunas que contienen cantidades definidas de alérgenos purificados clínicamente relevantes deben ser al menos igual de efectivas que un extracto de alérgeno que contenga los mismos componentes (77). Para aplicar este enfoque se requiere identificar cuáles son los alérgenos que participan en la respuesta alérgica

en la población a tratar, lo cual ya es posible gracias a la obtención de alergenios mediante el clonaje molecular e identificar las frecuencias de sensibilización en poblaciones de diferentes regiones.

Existen varias estrategias de IEA favorecidas por el uso de la tecnología del ADN recombinante. Estas incluyen el uso de alergenios recombinante silvestres, vacunas de ADN que codifica alergenios, péptidos sintéticos derivados de alergenios que contienen epítomos T o B unidos a proteínas transportadoras, fragmentos de alergenios, oligómeros, mosaicos derivados de alergenios y moléculas híbridas o de fusión compuestas por la unión de dos o más moléculas completas o segmentos de alergenios (78, 79) (Tabla 2). Estas preparaciones han mostrado una disminución en la reactividad IgE y menor alergeniosidad comparada con los alergenios naturales, mientras que al mismo tiempo se mantienen los epítomos T y la inmunogenicidad, mostrando su eficacia en modelos murinos y estudios *in-vitro* (79). Algunas moléculas obtenidas por estos métodos se encuentran en fase clínica en humano donde se evalúa su utilidad para el tratamiento de las alergias (80).

Tabla 2. Nuevos esquemas de Inmunoterapia específica de alérgenos

TIPO DE ESTRATEGIA	DESCRIPCIÓN Y MECANISMO	ALERGENOS APLICANDO AL DISEÑO	POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN
Fusión o híbridos de los principales alérgenos	Varios alérgenos o sus fragmentos se expresan como una sola proteína recombinante, alterando la estructura y los epítopes B característicos de los alérgenos nativos	Par j 1 + Par j 2 Api m 1 + Api m 2 + Api m 3 Phl p 2 + Phl p 6 Der p 1 + Der p 2	Disminución de la unión IgE y la reactividad de las células T se conserva. Producción de anticuerpos bloqueadores
Fragmentos, mosaicos y mutantes	Destruir epítopes de IgE conformacional mediante mutagénesis dirigida, fragmentación u oligomerización.	Bet v 1 (Fragmentación) Bet v 1 (mutación Gln45-Ser, Pro108-Gly) Phl p 7 mutación en dos motivos EF-hand Der f 13 (mutación E41A_K63A_K91A)	Activación de células presentadoras de antígeno y células T. Disminución de la IgE y la reactividad de las células T se conserva. No activación de basófilos
Péptidos conteniendo epítopes de linfocitos T	Péptidos obtenidos por síntesis química que incorporan epítopes de Linfocitos T específicos de alérgenos, no reaccionan con anticuerpos	Phl p 1 Der p 2 Fel d 1 PLA2	Activación de células presentadoras de antígeno y células T. Inducción de tolerancia directa de células T, no inducen anticuerpos IgE hacia epítopes conformacionales
Péptidos unidos a proteínas transportadoras	Epítopes de Linfocitos B de alérgenos fusionados a la proteína portadora viral (virus-like particles, VLP) u otro inmunógeno.	PreS-fused Bet v 1 Fel d 1-B PreS BM32 Der p 2 PreS fused Der p 23	Producción de anticuerpos bloqueadores Expansión de T reg No activación de células Th2
Desnaturalización de la estructura terciaria de alérgenos recombinantes	Alterando la estructura, eliminación de puentes de disulfuro y pérdida de epítopes B característicos de los alérgenos nativos	Bet v 1	Proliferación de linfocitos T e inducción de tolerancia directa de células T
Agregación de proteínas recombinantes	Varios alérgenos o sus fragmentos se expresan en un sola molécula	Bet v 1d Bet v 1 trimer Feld 1 Bet v 1 y Phl p 5	Disminución de la unión IgE No- activación de basófilos Producción de anticuerpos IgG bloqueadores Inmunogenicidad de linfocitos T

Las proteínas híbridas o de fusión en la modalidad de combinación de varios alérgenos o porciones de estos en una sola molécula, se han diseñado y analizado para el tratamiento de alergia a diferentes fuentes alérgicas incluyendo los ácaros. En un estudio realizado con una molécula híbrida compuesta por dos alérgenos de polen de *periataria judaica*, Par j 1 y Par j 2, se observó que el hipoalérgeno posee una menor reactividad IgE con sueros de pacientes alérgicos, menor capacidad de activar basófilos de alérgicos al polen e indujo una respuesta protectora mediada por anticuerpos de clase IgG2a en ratones inmunizados con el híbrido (81).

Resultados similares se hallaron en un modelo murino al administrar una proteína hipoalérgica compuesta por 4 alérgenos del polen de la grama timotea (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 y Phl p 6 la cual indujo la producción de anticuerpos bloqueadores y una disminución significativa en la síntesis de IgE (82).

Api m 1/ Api m 2 es una proteína de fusión construida a partir de los alérgenos principales inductores de alergia al veneno de avispa. Esta proteína mostró una baja capacidad alérgica *in- vivo*, como también una baja reactividad de la IgE en sueros de alérgicos al veneno de la avispa preservando su capacidad de inducir tolerancia (83).

Para el caso de alergias inducidas por los ácaros del polvo doméstico se han desarrollado varias moléculas hipoalérgicas principalmente con los alérgenos del grupo 1 y 2 acoplados molecularmente, que muestran menor capacidad de unión a IgE y menor actividad alérgica. Asturias y colaboradores construyeron dos moléculas híbridas derivadas de los alérgenos Der p 1 y Der p 2. Las proteínas mostraron una disminución significativa en la unión a IgE y en la liberación de mediadores inflamatorios en células de basófilos de pacientes alérgicos a los ácaros en comparación con lo mostrado por la mezcla de alérgenos silvestres. Estas proteínas indujeron la producción de anticuerpos bloqueadores IgG y proliferación de linfocitos T específicos (84). De forma similar, se diseñaron moléculas hipoalérgicas llamadas rDer p2/1C y Der p 2/1S obtenidas a partir de la combinación de los alérgenos de Der p 1 y Der p 2 con incorporación de residuos

de cisteínas o serinas. Los híbridos, mostraron propiedades inmunológicas y celulares anti-Th2, con una notable disminución de la alergenicidad en ensayos de activación de basófilos comparada a la producida por los alergen silvestres (85).

La obtención y análisis de moléculas híbridas conteniendo segmentos de alergen de *B. tropicalis* puede contribuir a ofrecer mejores productos para el desarrollo de nuevas vacunas anti-alérgicas. Debido a que esta especie de ácaro tiene gran relevancia clínica en regiones tropicales y subtropicales con porcentajes de sensibilización entre 50% y 80%. La ingeniería genética aplicada al diseño de nuevas moléculas derivadas de los alergen permite obtener moléculas que pueden reducir la actividad alérgica y/o aumentar la inmunogenicidad. Esta modalidad de enfoque de tratamiento puede representar una muy buena alternativa para el tratamiento futuro de la alergia.

2 HIPOTESIS

Las moléculas híbridas compuestas por epítopes de varios alergenios de las especies de ácaros *D.pteronyssinus* y *B. tropicalis* son una mejor alternativa que los extractos alérgicos para la inmunoterapia alérgeno-específica.

3 OBJETIVOS

Objetivo general

- Desarrollar proteínas híbridas con representación de diferentes alérgenos de los ácaros domésticos para ofrecer nuevos esquemas de inmunoterapia alérgeno específica para las alergias inducidas por ácaros.

Objetivos específicos

1. Purificar y caracterizar molecularmente las proteínas híbridas MAVAC-BD-2 y DPx4.
2. Analizar la reactividad IgE e IgG de las proteínas híbridas en muestras serológicas de personas alérgicas a los ácaros domésticos y en individuos no alérgicos.
3. Explorar la presencia de epítopes compartidos entre las proteínas híbridas, los extractos alergénicos y los alergenios purificados Blo t 5, Der p 1 y Der p 2 usando anticuerpos monoclonales y en sueros de alérgicos a los ácaros.
4. Analizar el grado de activación de basófilos de alérgicos a los ácaros inducida por las proteínas híbridas.
5. Determinar citoquinas en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes alérgicos estimuladas por las proteínas híbridas.
6. Evaluar el efecto de la administración de las proteínas híbridas sobre la respuesta humoral y sobre la hiperreactividad de las vías aéreas al reto con metacolina en ratones BALB/c.
7. Evaluar si los anticuerpos IgG inducidos en los ratones inmunizados con las proteínas híbridas pueden bloquear la unión de la IgE de sueros alérgicos hacia extractos de ácaros y alergenios purificados.
8. Analizar la capacidad alergénica *in-vivo* de las proteínas híbridas mediante prueba de anafilaxia cutánea pasiva en ratones.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Procedencia de muestras para estudios serológicos

Los sueros usados en este estudio proceden de una seroteca del Instituto de investigaciones inmunológicas obtenidos en el desarrollo de proyectos previos (86). Estos sueros pertenecen a pacientes con asma y sensibilizados a los ácaros domésticos *B. tropicalis* y *D. pteronyssinus*, con prueba cutánea positiva (pápula \geq de 3 mm) y niveles séricos de IgE positivo hacia los extractos de ácaros mediante ELISA. Como control se seleccionaron sueros de personas sin sintomatología ni historial de enfermedades alérgicas, con prueba cutánea y niveles de IgE negativos a los extractos alergénicos de los ácaros domésticos. Los criterios usados para establecer el asma alérgica se describen en la referencia (86). En resumen, el diagnóstico de Asma se definió de acuerdo a los criterios del GINA (Global Initiative for Asthma), empleando un cuestionario previamente aprobado y estandarizado por médicos pertenecientes al personal del Instituto de Investigaciones Inmunológicas.

La obtención de las muestras de suero se realizó con la firma del consentimiento informado de los pacientes y personas sanas, previa aprobación de los proyectos por el comité de ética de la Universidad de Cartagena.

4.2 Preparación de extractos alergénicos de los ácaros

Se prepararon extractos alergénicos de los ácaros *D. pteronyssinus* y *B. tropicalis* a partir del cuerpo de ácaro completos cultivados en la Compañía Immunotek, SL (España), siguiendo el protocolo descrito en la referencia (87). En resumen: se pesaron 5 gramos de ácaros completos. Luego, se desgrasaron con éter mediante uso de equipo Soxhlet por 5 horas. Se dejó secar el éter residual en los ácaros y se procedió a mezclar los ácaros con bicarbonato de amonio 1 M (pH 8.0) en agitación por 16 horas a 4°C. La mezcla se centrifugó a 1.800 r.p.m hasta clarificación y luego se dializo contra agua ON a 4 °C. Procedió a su análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). La concentración de proteínas se determinó usando el método Bradford (Quick Start™ Bradford Protein Assay).

4.3 Procedencia de alérgenos y otras proteínas usadas en este estudio

Los alérgenos naturales purificados Der p 1 (NA-DP1) y Bet v 1 (NA-BV1-1) usados en este estudio se adquirieron de la compañía Indoor Biotechnologies (Charlottesville, VA, USA). La producción de los alérgenos recombinantes rDer p 2, rBlot 5 y rFABP-4 se realizó en nuestro laboratorio. rDer p 2 se produjo en células competentes Origami™ B(DE3) Novagen (Wisconsin, USA) y rBlot 5 en *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). Estas dos proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad usando la resina de Ni-NTA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) como se describe en la referencia (88).

La expresión de la proteína de unión de ácidos grasos humana 4 (FABP4) se realizó en cepa *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) usando el vector de expresión pET45b (+). Las células transformadas se crecieron en medio LB con 100 µg/ml de ampicilina hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.5. El cultivo fue inducido con 1 mM de isopropil-β-D-tio-galacto-piranosido (IPTG) por 4 horas a 37°C. La purificación se realizó usando la resina de Ni-NTA en condiciones desnaturizantes siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). La pureza y la integridad de las proteínas se evaluaron mediante SDS-PAGE y la tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad laboratorios).

4.4 Diseño de las proteínas híbridas

La idea básica en el diseño de estas proteínas fue tener una sola molécula, representando los segmentos antigénicos de varios alérgenos de interés en nuestra región caribe colombiano, caracterizado por un clima tropical. Se eligieron las especies *B. tropicalis* y *D. pteronyssinus* y de estas especies se seleccionaron los alérgenos con mayor importancia clínica (31), de los cuales se seleccionaron regiones antigénicas basado en publicaciones científicas o sugeridas mediante nuestro análisis bioinformático. Las diferentes regiones seleccionadas se unieron para formar una sola estructura primaria de proteína. A partir de la secuencia de

aminoácidos se modeló la probable estructura 3D de la proteína diseñada, la cual se optimizó para obtener la mejor predicción de parámetros estructurales.

4.4.1 Diseño de la proteína híbrida compuesta por segmentos de alérgenos de los ácaros *D. pteronyssinus* y *Blomia tropicalis* (MAVAC-BD-2)

Los diferentes segmentos de aminoácidos que componen la molécula MAVAC-BD-2 se seleccionaron teniendo en cuenta los estudios reportados de mapeo de epítopes B de unión a IgE (28, 44, 89, 90). De la especie *B. tropicalis* se seleccionaron segmentos de los alérgenos Blo t 5, Blo t 8 y Blo t 10 y de la especie *D. pteronyssinus* se seleccionaron segmentos de los alérgenos Der p 1, Der p 2, Der p 7 y Der p 8. Esta proteína está amparada en la patente desarrollada previamente en nuestro Instituto (Puerta L, Caraballo L y Cantillo J) y con registro en Estados Unidos (US 9, 163,069 B2), varios países de Europa (EP2727934B1) y Colombia (SIC Resolución No.28721/ mayo 2015), en las cuales está registrada como PF3a. Los siete segmentos se ensamblaron en una sola estructura molecular en el siguiente orden desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal (Tabla 3): aminoácido de Blo t 5 (a.a 63 – 108), Blo t 10 (a.a 216 – 233), Der p 8 (a.a 158- 177) Blo t 8 (a.a 71 a 83) Der p 1(a.a 141 a 155), Der p 2 (a.a 64 a 108) y Der p 7 (a.a 94 a 124). El número de los aminoácidos corresponde a los de la secuencia en cada alérgeno.

Tabla 3. Características de los segmentos de alergenios que conforman la proteína MAVAC-BD-2*

Alergeno	Posición aa en el alergenio nativo	Secuencia	Nº de a. a
Blo t 5	63-108	NKSKELQEKIIRELDVVCMIEGAQGALERELKRTDLNILERFNVE	46
Blo t 8	71-83	DFNLYEYLCHVKVMVPEVFG	20
Blo t 10	216-223	QREEAYEQQIRMMTGKLK	19
Der p 1	141-155	LDAFRHYDGRTHIQR	15
Der p 2	64-108	DVPGIDPNACHYMKCPLVKGQYDIKYTWNVPKIAPKSENVVVT	44
Der p 7	94-124	SEDGVVKAHLLVGVHDDVVSMEYDLAYKLGD	31
Der p 8	158-177	DFKMTESVAILKR	13

* Orden en que fueron ensamblados los segmentos en MAVAC-BD-2, desde el extremo N terminal al C terminal

4.4.2 Diseño de la proteína híbrida compuesta por segmentos de alergenios del ácaro *D. pteronyssinus* (DPx4)

La proteína DPx4 está constituida por cuatro segmentos de Der p 1, dos segmentos de Der p 2, dos segmentos de Der p 7 y un segmento de Der p 10 (Tabla 4). Para la selección de estos segmentos se tuvo en cuenta la presencia de epítipes B en estos alergenios (28, 89, 91). Los segmentos se ensamblaron en una sola estructura molecular, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, en el siguiente orden: Der p 2 (a.a 42 – 52), Der p 7 (a.a 157 – 165), Der p 1 (a.a 23 – 44), Der p 10 (a.a 93 – 106), Der p 1 (a.a 63 – 112) Der p 2 (a.a 103 – 118), Der p 1 (a.a 125 – 204), Der p 7 (a.a 179 – 187) y Der p 1 (a.a 215 – 223). El número de los aminoácidos corresponde a los de la secuencia en cada alérgeno.

Tabla 4. Características de los segmentos de alérgenos que conforman la proteína DPx4

Alergenos	Posición aa en el alérgeno nativo	Secuencia	N° de a.a
Der p 1	23-44	TPIRMQGGCGSCWAFSGVAATEAYL	25
	63-112	VDCASQHNHGCHGDTIPRGIEYIQHNGVVQESYYRYVAREQQSCRRPNAQRF	51
	125-204	VNKIREALAQTHSAIAVIGIKDLDAFRHYDGRITIIQRDNGYQPNYHAVNIVGYSNAQGGVDYWIVRNSWDTNWGDNGYGY	80
	215-223	AEEYPYVVIL	12
Der p 2	42-52	TEPCIIHRGKPF	12
	103-118	YDIKYTWNVPKIAPKS	16
Der p 7	157-165	EFEVRQFANV	10
	179-187	FAVLSDVLT	9
Der p 10	93-106	QLIEEDLERSEERL	14

La combinación y el orden de los diferentes segmentos de aminoácidos se definieron después de verificar que se produjo modelos 3D estructurales con energía y estereoquímicas apropiadas.

La proteína putativa codificada por cada secuencia se modeló por homología usando Swiss-Model y por modelaje ab initio usando I-TASSER. Las visualizaciones tridimensionales de las proteínas se realizaron con el software de visualización molecular PyMOL (Delano, W. L. The PyMol Molecular Graphics System, www.pymol.org)

Los parámetros estructurales de los modelos se analizaron mediante “Ramachandran plot” (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>) y los posibles errores estructurales con el programa “ProSA-web” (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at>).

La síntesis de la secuencia codificadora de cada proteína se obtuvo por orden a un tercero, a la Compañía GenScript, (Piscataway, NJ, EE. UU.) con optimización de codones para una expresión eficiente en *E. coli*. A esta compañía también se le ordenó la construcción de un vector de expresión de la secuencia pET45b+ (Novagen, catálogo 71327-3) con el inserto codificador flanqueado por los sitios de restricción Kpn I y Pml I, de tal manera que resultara en marco de lectura para la expresión de la proteína codificada por el inserto con una etiqueta de histidina 6X en el extremo N-terminal para facilitar la purificación por cromatografía de afinidad.

4.5 Expresión y purificación de MAVAC-BD-2 y de DPx4

A partir de las colonias transformadas con el vector pET45b+/MAVAC-BD-2, o con el pET45b+/DPx4, se realizó la expresión bajo la inducción con 1 mM de IPTG. A partir de una colonia positiva crecida en plato LBA con 100 µg/mL de ampicilina, se realizó cultivo bacteriano en 10 mL de medio LBA líquido a 37°C en agitación a 250 r.p.m en sheaker (Thermo Scientific, SHKE4000-7) durante toda la noche (ON). Posteriormente el cultivo se diluyó en medio LBA líquido (dilución 1:20) y se incubó en iguales condiciones hasta alcanzar una DO entre 0.5 – 0.8 a 600 nm. Luego se agregó IPTG a una concentración final de 1 mM y se dejó en inducción por 4 horas a 37°C. Se tomaron muestras a 0, 2 y 4 horas para seleccionar el tiempo óptimo de expresión. El tiempo óptimo de expresión fue de 4 horas.

El cultivo se centrifugó a 4.000 g durante 20 min a 4°C, descartando el sobrenadante, luego el cultivo se centrifugó y el botón de células se resuspendió en “buffer” de lisis nativo (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 500 mM, pH 8.0) y las células se lisaron por sonicación en 5 tandas de 15 segundos cada uno y con intervalos de 1 minuto (Sonic Dismembrator, Fisher Scientific, FB-705). La suspensión se centrifugó a 6500 r.p.m. durante 15 minutos y el botón de células como el sobrenadante obtenido se analizaron por SDS-PAGE. Las dos proteínas híbridas se encontraron en el botón de células en cuerpos de inclusión. Para solubilizar los cuerpos de inclusión, el botón de células se trató con “buffer” de lisis (Urea 8 M, NaH₂PO₄100 mM, y Tris 10 mM, pH 8.0) conteniendo el derivado fluoruro de fenil metil sulfónico (PMSF) 0.1 mM, durante 2 horas a RT con agitación constante. Posteriormente se realizó centrifugación a 5.500 rpm x 15 minutos y el sobrenadante se mezcló con la resina Ni-NTA (Agarose, Qiagen, 1018244) durante 1 hora en agitación. La purificación se realizó por cromatografía de afinidad en condiciones desnaturizantes, siguiendo el protocolo de Invitrogen (Catálogo K950-01, Carlsbad, CA, USA.) con elución de las proteínas a pH 4.0, en buffer de Urea 8 M, NaH₂PO₄ 20 mM, y 0.5M NaCl. La presencia de la banda de interés en las fracciones recolectadas se analizó mediante electroforesis en geles de poli-acrilamida al 15% en condiciones de reducción. Las proteínas purificadas se conservaron a -20°C.

Después de desnaturalización con urea se procedió a una renaturalización usando buffer de cisteína/cistina asistida con arginina. Las fracciones obtenidas en la purificación por afinidad se dializaron en buffer de renaturalización (Tris 100 mM, EDTA 10 mM, Cisteína 5 mM, Cistina 1 mM pH 8) en una relación 1:20, bajo agitación suave y constante con tres recambios, usando membranas de diálisis con punto de corte de 8 kDa (Spectra/Por, 132724 Houston, TX, USA). Los productos se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% en condiciones de reducción. Finalmente, las muestras se liofilizaron y almacenaron a 4°C hasta su uso. La concentración de las proteínas se determinó por el método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

4.6 Caracterización molecular de las proteínas híbridas

4.6.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las proteínas expresadas se analizaron mediante SDS-PAGE al 15%, en condiciones de reducción siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli (92). Las muestras se trataron con buffer de corrida (SDS 10%, Tris 0.5 M, β -mercaptoetanol, glicerol 20% y azul de bromofenol 0.5%) en proporción 1:1 y se calentaron a 95°C por 5 min. se sembraron 10 μ L de muestra por cada pozo. La electroforesis se realizó a 200 Voltios por 45 minutos en buffer electrodo (Tris 0.025 M, Glicina 0.192 M, SDS 1%), usando el equipo de Mini-PROTEAN® Electrophoresis System - Bio-Rad. Las proteínas se visualizaron mediante tinción del gel con azul brillante de Coomassie R250.

4.6.2 Análisis estructural mediante dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular (DC) de las proteínas híbridas se midieron en el rango UV de 190-260 nm en el espectrómetro de DC Jasco J-715 (Japan Spectroscopic Co., Tokio, Japón). Las mediciones se realizaron a concentraciones

de 0.3 mg/mL para MAVAC-BD-2 y 0.09 mg/mL para DPx4 en una cubeta cilíndrica de cuarzo con una longitud de recorrido de 0.1 cm. Se realizaron cinco mediciones independientes y se promediaron. Los espectros se corrigieron mediante la sustracción del espectro de buffer tampón y se convirtieron a medias de coeficiente de elipticidad (Θ) en longitudes de onda dadas. El cálculo del contenido de la estructura secundaria se realizó usando el programa Dichroweb (93).

4.6.3 Determinación de actividad de cisteína proteasa en la proteína DPx4.

Teniendo en cuenta que la secuencia de DPx4 tiene un 79% de identidad en la secuencia de a.a con Der p 1, incluyendo los residuos la región de actividad cisteína proteasa, se evaluó, si la proteína híbrida conservaba dicha actividad enzimática. Se determinó la actividad proteasa específica en un ensayo colorimétrico basado en la medida de los productos liberados por la incubación del sustrato pGlu-Phe-Leup-nitroanilida (PFLNA) en presencia de la proteína como describe Katsaros et al (94). Se preparó el buffer de activación enzimático incubando la muestra (50 μ g DPx4) y el control positivo (50 μ g de papaína P4762, Sigma) durante 20 minutos a 40°C con buffer de activación enzimático (cisteína 0,1 mM, EDTA 0,1 M, PBS 0,2 M, pH 7,0). Luego, se agregaron a los pozos de microtitulación 200 μ L del sustrato PFLNA, (Sigma P3169) a concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mM, durante 10 minutos a 40°C. Posteriormente se agregó 50 μ L de la enzima activada a cada pozo. La reacción se determinó a los 5 min a una longitud de onda de 410 nm, usando un espectrofotómetro (Spectra MAX 250, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA.).

4.6.4 Análisis de estabilidad

Se analizó la estabilidad de las proteínas híbridas a condiciones de almacenamiento a 4°C durante 3 semanas. Las proteínas se almacenaron durante 21 días a una temperatura de 4°C, tomando muestras en diferentes tiempos (0 días, 3 días 1, 2 y

3 semanas). Posteriormente, las muestras se analizaron por SDS-PAGE al 12% en condiciones de reducción.

4.6.5 Dispersión de la Luz dinámica (DLS)

El estado de agregación de MAVAC-BD-2 y DPx4, se investigó mediante la técnica de dispersión de la luz dinámica (DLS), con la colaboración de Walter Keller y Judith Wortmann, de la Universidad de Graz, Austria, para lo cual las muestras de proteínas se diluyeron en buffer de Na₂PO₄ 20 mM, pH 8,0 (forma oxidada). Luego, las muestras se centrifugaron a 14000 g durante 30 min y 50 µL de las muestras se transfirieron a una cubeta de cuarzo de 3 mm para su lectura en el Zetasizer nano ZS (Malvern, Worcestershire, Reino Unido), usando como dispersante el buffer usado en la dilución de las muestras. Las mediciones se realizaron a 20 °C con una retrodispersión de 173° y con un rango de tamaño de las partículas entre 0.6 y 6000 nm. Se realizaron tres mediciones para cada muestra con 15 corridas de 30 segundos por corrida. El peso molecular se estimó mediante una curva de calibración de masa frente a tamaño.

4.7 Caracterización Inmunológica de las proteínas híbridas

4.7.1 Reactividad con anticuerpos IgE e IgG en sueros de alérgicos a los ácaros

La capacidad de las proteínas MAVAC-BD-2 y DPx4 de unir anticuerpos de tipo IgE e IgG en sueros humanos se determinó mediante ensayos de ELISA y Dot-Blot.

4.7.1.1 Prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA).

Todos los ensayos se llevaron a cabo en placas de microtitulación (Immulon-4 Dynatech, Chantilly, VA, USA) fondo planos por duplicado. Los recombinantes MAVAC-BD-2, DPx4, nDer p 1, rDer p 2 y rBlo t 5 se prepararon a una concentración de 0.5 µg/100 µL y los extractos de ácaros a 5 µg/100 µL en buffer de

carbonato/bicarbonato 0.2 M a pH 9.2. De esta dilución se agregaron 100 µL a cada pozo de la placa de microtitulación y se incubaron ON a TA. Luego de 4 lavados con PBS-Tween 20 al 0.1% (PBS-T), se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con 200 µL buffer de bloqueo (PBS-T/BSA 1% con azida de sodio 0.02% (NaN₃)) durante 3 horas a TA. Después de 4 lavados con PBS-T, cada pozo se incubó con 100 µL de suero diluido 1:5 para la determinación de la IgE o 1:100 para la determinación de la IgG en PBS/BSA al 1% (Fig S1), ON a TA. Luego de cuatro lavados las placas se incubaron por 2 horas a TA con el segundo anticuerpo anti-IgE (Sigma, A3525) o anti-IgG (Sigma A3187) humana marcada con fosfatasa alcalina diluida 1:500 y 1:20.000 respectivamente en buffer de conjugado (Tris 0.05 M/BSA 1%/ MgCl₂ 1 mM, pH 8). Después del lavado, se procedió al revelado agregando 100 µL de la solución 1 mg/mL de *p*-nitrofenil fosfato (Sigma, 2640) diluida en 10 % de dietanolamina, pH 9.8, durante 30 minutos a TA. La reacción se detuvo con 100 µl de NaOH 3N. Las placas se leyeron a 405 nm en un espectrofotómetro (Spectra MAX 250, Molecular Device Sunnyvale, CA, USA).

Para la expresión de los niveles de IgE en ng/mL se construyó una curva estándar de IgE humana (Merk Millipore, Billerica, MA, USA). La IgE se diluyó en buffer de carbonato 0.2 M usando diluciones seriadas por duplicado en concentraciones desde 125 ng/mL a 0.1 ng/mL y extrapolando los resultados de OD en la curva.

Para establecer el punto de corte (Cut-off) se seleccionaron 31 sueros de individuos sin alergia y con títulos de IgE negativos frente a los extractos de *B. tropicalis* y *D. pteronyssinus*. Se estableció como punto de corte el valor promedio de las lecturas más 2 desviaciones estándar. El punto de corte calculado para MAVAC-BD-2 y DPx4 fue de 3.17 ng/mL.

4.7.1.2 Ensayo de Dot-blot con sueros de pacientes alérgicos a los ácaros

- Para el ensayo con MAVAC-BD-2 se seleccionaron al azar 28 sueros de pacientes alérgicos con niveles positivos a los extractos *D. pteronyssinus* y *B. tropicalis* y 14 sueros de individuos sin alergia y con niveles negativos de IgE a los extractos de *B. tropicalis* y *D. pteronyssinus*.

- Para el ensayo con DPx4 se seleccionaron al azar 26 sueros de pacientes alérgicos a los ácaros con niveles positivos al extracto *D. pteronyssinus* y 4 sueros de individuos sin alergia, con niveles negativos de IgE al extracto de *D. pteronyssinus*

Un microgramo de las proteínas MAVAC-BD-2, DPx4, rBlo t 5, nDer p 1, rDer p 2 y 5 µg de extracto de ácaro (*B. tropicalis* o *D. pteronyssinus*) se aplicaron sobre las membranas de nitrocelulosa de 0.45 µm (Bio-Rad, USA) usando Bio-Dot®SF Microfiltration Apparatus (Biorad) acoplado a una bomba de vacío. Las membranas se incubaron en buffer de bloqueo (PBS-T al 1% y leche descremada al 5%) durante 1 hora a TA. Después de lavar las membranas con PBS -T, estas se incubaron con suero de pacientes alérgicos y sueros de individuos no alérgicos en una dilución final de 1:5 ON a TA. Después de lavar 4 veces con PBS-T, se incubaron con anticuerpo de detección anti-IgE humana conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma A3525) diluida 1:500 en buffer de conjugado, durante 3 horas a TA. La IgE unida se reveló con la mezcla de NBT (p-nitro-blue-tetrazolium) y BCIP (5 bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate) disueltos en “buffer” de fosfatasa alcalina (NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris 100 mM, pH 9.5 durante 5 min.

4.7.2 Ensayos de Inhibición de la reactividad IgE

Para analizar si los epítopes IgE presentes en los extractos alérgicos y en los alérgenos recombinantes purificados (rBlo t 5, nDer p 1 y rDer p 2) están presentes en las proteínas híbridas se realizaron ensayos de inhibición IgE y ensayos de Dot-blot con anticuerpos monoclonales.

Para llevar a cabo los ensayos de inhibición con las proteínas MAVAC-BD-2 y DPx4 se prepararon cuatro mezclas de sueros (pools), (Tabla 5 y Tabla 6). Para la preparación de cada pool se seleccionaron sueros con reactividad IgE a los extractos de *B. tropicalis* y *D. pteronyssinus* y con reactividad IgE a las proteínas híbridas a usar en cada ensayo. Para cada pool se tomaron partes iguales de cada suero y se diluyeron en buffer PBS-BSA al 1%.

4.7.2.1 Inhibición de la reactividad IgE hacia alergenios purificados y extractos de ácaros por MAVAC-BD-2.

Para la inhibición de la reactividad IgE al extracto de *B. tropicalis* por la proteína MAVAC-BD-2 se usó el Pool A y 4 concentraciones del inhibidor (0.1, 1.0, 10 y 100 µg/mL), mientras que para la inhibición de la reactividad IgE a los recombinantes rDer p 2 y rBlo t 5 por MAVAC-BD-2 se usó el pool B y 2 concentraciones del inhibidor (0.1 y 100 µg/mL).

Tabla 5. Pool de sueros usados para la inhibición IgE por la proteína MAVAC-BD-2

Pool de sueros A				Pool de sueros B			
Paciente	Niveles IgE (OD)			Paciente	Niveles IgE (OD)		
	MAVAC-BD-2	Der p 2	Blo t 5		MAVAC-BD-2	<i>B.tropicalis</i>	<i>D. pteronyssinus</i>
A33	2.37	0.17	0.25	A33	2.37	3.32	2.73
A39	2.00	0.29	0.26	A39	2.00	2.26	2.63
A43	2.13	0.21	0.17	A43	2.13	2.31	2.41
A84	2.13	0.76	0.18	A44	2.13	0.50	3.29
A90	0.22	0.36	0.19	A45	2.01	0.69	2.62
A92	0.53	0.35	0.52	A92	0.53	1.02	0.74

4.7.2.2 Inhibición de la reactividad IgE hacia alergenios purificados y *D. pteronyssinus* por DPx4.

Para la inhibición de la reactividad IgE al extracto de *D. pteronyssinus* por DPx4 se usó el Pool C y 5 concentraciones del inhibidor (0.001, 0.01, 0.1, 1 y 5 µg/mL) y para la inhibición IgE a Der p 1 y Der p 2 por la DPx4 se usó el Pool D y dos concentraciones del inhibidor (0.1 y 25 µg/mL).

Tabla 6. Pool de sueros usados para la inhibición IgE por la proteína DPx4

Pool de sueros C			Pool de sueros D			
Paciente	Niveles de IgE (OD)		Paciente	Niveles de IgE (OD)		
	<i>D. pteronyssinus</i>	DPx4		DPx4	Der p 1	Der p 2
A676	0.62	0.77	AC043	0.41	0.60	0.27
A635	0.75	0.30	AF33	0.33	0.43	0.29
AC043	0.31	0.41				

Los pozos de placas de microtitulación (Immulon 4HBX Dynatech, Chantilly, VA, USA) se cubrieron con 5 µg del extracto de *B. tropicalis*, del extracto de *D. pteronyssinus*, o con 0.5 µg de las proteínas híbridas o alergenios purificados en 100 µL de buffer de pegada y se incubaron ON a 4°C en cámara húmeda. Los pozos se lavaron con PBS-T al 0.1% y se bloquearon con 200 µL de buffer de bloqueo por 3 horas. Después de lavar 4 veces, los pozos se incubaron con 100 µL en una dilución 1:5 de la mezcla de pool preincubados con las distintas concentraciones del inhibidor (con la proteína recombinante o con el extracto de ácaros) durante 16 horas en agitación suave a TA. Como control se usó BSA (albumina de suero bovino) a las mismas concentraciones que los antígenos. Los anticuerpos IgE unidos se detectaron con anti-IgE humana conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma A3525) diluida 1:500 en buffer de conjugado. El desarrollo del color y la lectura de la OD se realizó como se describe anteriormente en el ELISA.

Para calcular el porcentaje de inhibición se aplicó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = [(D.O \text{ sin inhibidor} - D.O \text{ con inhibidor}) / D.O \text{ sin inhibidor}] \times 100$$

4.7.3 Ensayo de Dot- blot con anticuerpos monoclonales

Dos microgramos de las proteínas MAVAC-BD-2, DPx4, Der p 1 y Der p 2 se aplicaron sobre la membrana y se incubaron con buffer de bloqueo durante 45 minutos a TA. Después de lavar 4 veces las membranas de nitrocelulosa, se incubaron con anticuerpo monoclonal anti-Der p 1 (clon MA-4C1-1, Indoor Biotechnologies Inc., Charlottesville, VA, U.S.A) o anticuerpo monoclonal anti-Der p

2 (clon Dpx-A9, Indoor Biotechnologies Inc., Charlottesville, VA, USA) ON a TA. Los anticuerpos unidos se detectaron mediante incubación con anti- IgG de ratón (Sigma A1418) diluida 1: 2000 en PBS-T durante 1 hora a TA. Finalmente, las membranas se revelaron usando sustrato BCIP/NBT como se describió en el párrafo 4.1.7.2

4.7.4 Ensayo de activación de basófilos.

Para evaluar la alergenicidad de las proteínas híbridas, se realizó el test de activación de basófilos, usando el estuche Allergenicity Kit (Beckman Coulter, Inc. CA, USA), de la siguiente manera: se tomaron muestras de sangre periférica de alérgicos a los ácaros de polvo doméstico con niveles de IgE positivos a MAVAC-BD-2 (n=5) y DPx4 (n=7) e individuos no alérgicos (n=2) (Tablas 7 y 8). Para definir la concentración más adecuada de antígeno se realizó un ensayo de dosis repuesta con concentraciones de 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig S2). Se eligió la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, porque esta indujo una clara activación de los basófilos con el antígeno de referencia (Der p 2). Cien microlitros de sangre se incubaron con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de las proteínas híbridas, rDer p 2, rBlot 5 o el extracto de ácaros durante 15 minutos a 37°C. Los basófilos se tipificaron en función a la expresión de CD3-PC7, CRTh2-FITC y a la detección del marcador de activación CD203c-PE (CD3^{neg}CRTh2^{pos}CD203c^{pos}), en un citómetro de Dakocytomation (Beckman Coulter, Inc. CA, USA.). Los datos se analizaron usando el software Summit 4.3 (Beckman coulter, Inc CA, USA.). En cada ensayo se contaron al menos 500 basófilos. La activación de basófilos se calculó usando la intensidad de fluorescencia media (MFI) obtenida con los basófilos estimulados (MFI estimulación) y no estimulados (MFI control), expresados en un índice de estimulación (SI), (SI = MFI control / MFI estimulación). Un SI ≥ 2.0 es un indicativo de activación de basófilos. Como control positivo se usó el anticuerpo monoclonal anti-IgE (suministrado por el kit) que reconoce el receptor de alta afinidad (Fc ϵ RI) y como control negativo se usaron basófilos de pacientes estimulados con PBS.

Tabla 7. Características de los sueros usados en la activación de basófilos con MAVAC-BD-2

Paciente	Sexo	Prueba cutánea > 3mm	Niveles de IgE (OD)				
			B. t	D.p	MAVAC-BD-2	Der p 2	Blo t 5
1	M	Bt, Dp	0.92	2.33	0.16	0.25	0.12
2	F	Bt, Dp	1.20	0.58	0.12	3.08	0.12
3	M	Bt,Dp	0.17	0.78	0.12	0.14	0.42
4	M	Bt, Dp	0.70	0.70	3.28	0.14	1.79
6	F	Bt, Dp	0.20	0.37	0.25	0.76	0.18
No-Alergico	F	Neg	0.07	0.07	0.09	0.07	0.08

Tabla 8. Características de los sueros usados en la activación de basófilos con DPx4

Paciente	Sexo	Prueba cutánea > 3mm	Niveles de IgE (OD)		
			<i>D. pteronyssinus</i>	Der p 2	DPx4
1	M	Bt, Dp	0.83	2.38	0.21
2	M	Bt,Dp	0.79	0.55	0.50
3	F	Bt, Dp	0.58	0.82	0.15
4	M	Bt, Dp	2.34	0.63	0.20
5	M	Bt, Dp	0.70	0.14	0.13
6	F	Bt, Dp	0.32	0.30	0.29
7	M	Bt, Dp	0.58	0.13	0.25
No -alérgico	M	Neg	0.09	0.10	0.10

4.8 Determinación de endotoxinas en las proteínas recombinantes purificadas para los estudios *in vivo*

La concentración de endotoxina en las proteínas híbridas, los recombinantes purificados y extractos de ácaros domésticos se determinó mediante ensayo colorimétrico de punto final basado en la reacción del lisado de amebocitos de limulus (ToxinSensor™, GenScript, L00350), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una curva con estándares de endotoxina en el rango de 0.1 – 1 unidades de endotoxina (UE), en resumen: en viales libres de endotoxina (adquiridos con el estuche), se adicionaron 100 µL de estándar o de cada muestra

a ensayar, seguido de la adición de 100 μ L de lisado de amebocitos de limulus (LAL) e incubación por 8 min a 37°C en baño de maría. Luego las muestras se incubaron con 100 μ L de solución de sustrato por 6 min a 37°C y se adicionó a cada vial 500 μ L de la solución stop (estabilizador de color #1), seguido por estabilizador de color #2 y finalmente el estabilizador de color #3. La lectura de absorbancia se realizó a longitud de onda de 545 nm en espectrofotómetro (Spectra MAX 250, Molecular Device Sunnyvale, California), se usó el software SoftmaxPro versión 2.2.1.

4.9 Evaluación de los niveles de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) estimuladas con las proteínas híbridas

Con el fin de analizar si las proteínas híbridas son capaces de inducir la secreción de citoquinas, se evaluaron los niveles de IL-4, IL-5, IL-10 e IFN γ en el sobrenadante de cultivos de PBMC de pacientes alérgicos a los ácaros. Para la separación de las células se extrajeron 10 mL de sangre venosa periférica en tubos con heparina (BD vacutainer REF 367880), de pacientes alérgicos a los ácaros. La sangre se diluyó 1:2 en PBS estéril y se procedió al aislamiento de las PBMC mediante gradiente de densidad con Ficoll-Paque (Histopaque® 1077, Sigma) por centrifugación a 400 g durante 30 minutos a 4°C con la opción de freno en “off”. Se recolectó el anillo de células y se lavaron dos veces con PBS. El sobrenadante se descartó y el botón de células se resuspendió en medio RPMI-1640 suplementado con L-glutamina y NaHCO₃ (Sigma, Aldrich. San Luis, USA), MEM vitamine/L-Glutamine 2 mM, Piruvato de sodio 1 mM /aminoácidos no esenciales 1%, 100 U/mL de la mezcla de antibióticos (Penicilina 100 U/mL, Estreptomicina 100 U/mL, Kanamicina 100 U/mL) y suero fetal bovino (inactivado a 56 °C durante 60 minutos).

La viabilidad y el número de células se evaluó mediante exclusión con el colorante azul de tripan usando el equipo TC20™ Automated Cell Counter (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una dilución 1:2 de las células con azul de tripan (10 μ L de células + 10 μ L de azul de tripan) y se realizó la lectura, seleccionando en el equipo el tamaño celular para linfocitos de 7-9 μ m. Se sembraron 500.000 células en un volumen final de 500 μ L de RPMI por pozo. La

cantidad de antígeno para la estimulación se determinó por titulación usando concentraciones de 1.0, 1.5 y 2.0 μM para las proteínas híbridas y 6.5, 12.5 y 25 $\mu\text{g/mL}$ para los extractos de ácaros *D. pteronyssinus* o de *B. tropicalis*. Se eligió la concentración final de 1.0 μM para las proteínas híbridas y 25 $\mu\text{g/mL}$ para los extractos (Tabla S1). Se usó fitohemaglutinina (PHA) a una concentración final de 5 $\mu\text{g/mL}$ como control positivo. Como control negativo se usaron cultivos sin estimulación, en el cual el volumen de líquido correspondiente al antígeno se reemplazó por RPMI. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 y 95% de humedad relativa durante 3 días en el caso del PHA y 6 días para los antígenos. Finalizado el tiempo de incubación las células se centrifugaron a 12.000 g durante 10 minutos y los sobrenadantes se guardaron a -80°C hasta la cuantificación de las citoquinas. La medición de citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos celulares se realizó por citometría de flujo, utilizando un sistema multiplex denominado BD™ Cytometric Bead Array (CBA Catalogo No. 550749), Human Th1/Th2 Cytokine. Las lecturas de citometría de flujo se realizaron en un sistema FACS-ARIA III (BD).

La medición de citoquinas en el sobrenadante de cultivos se realizó siguiendo las instrucciones del protocolo de BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Kit. Se preparó una curva estándar con rango desde 0 pg/mL hasta - 5000 pg/mL de cada una de las citoquinas a evaluar. Luego, se mezclaron 10 μL de perlas de captura de cada citoquina (IL-4, IL-5, IL-10 e INF- γ) en un tubo de poliestireno (Falcon®) y se incubaron por 30 min a TA. Posteriormente, se tomaron 25 μL de esta mezcla y se incubaron con 25 μL de sobrenadante de cultivo y 25 μL de anticuerpo de detección ficoeritrina (PE) por 3 horas a TA, protegido de la luz. Luego, se agregó 500 μL de buffer de lavado y se centrifugó a 200 g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 300 μL de buffer de fijación a cada tubo y se procedió a la adquisición de las muestras en el citómetro de flujo FACS Aria III (Becton, Dickinson y compañía, Lago Franklin, NJ, USA.). Finalmente, se interpolaron los valores obtenidos en las muestras problema en la curva estándar mediante el programa BD CBA análisis Software.

4.10 Evaluación de la respuesta humoral e inflamatoria inducida en ratones BALB/c por la administración de las proteínas híbridas

Para evaluar *in vivo* el tipo de respuesta inducida por las proteínas híbridas, se analizaron las respuestas, humorales e inflamatorias inducidas por estas proteínas en un modelo murino de inflamación de las vías respiratorias.

4.10.1 Modelo de ratón con inflamación alérgica

Se usaron ratones hembra BALB/c de 5-8 semanas de edad, adquiridos en el Instituto Nacional de Salud (Bogotá), distribuidos de forma homogénea (n= 7/grupo), en los diferentes grupos experimentales. Todos los ratones se mantuvieron en el bioterio de paso del Doctorado de Ciencias biomédicas (Universidad de Cartagena), con foto periodo de 12 horas, en ambiente con temperatura entre 18°C a 24°C y con acceso libre a comida y agua. Los animales fueron tratados siguiendo las normas éticas en investigación con animales (Ley 84, 1989). Todos los procedimientos relacionados con la manipulación de animales se realizaron dentro de la cabina de flujo laminar con las medidas de seguridad (uso de guantes y tapa boca) y aprobados por el Comité Ético para uso de animales de experimentación de la universidad de Cartagena, (No. 42-2012).

4.10.1.1 Esquema de sensibilización con MAVAC-BD-2 en un modelo murino de inflamación de las vías áreas

Los ratones BALB/c se distribuyeron en distintos grupos (7 ratones/grupo): grupo I (inmunizados con MAVAC-BD-2), grupo II (inmunizados con *B. tropicalis*) y grupo III (inmunizados con PBS). La administración de antígenos se realizó siguiendo el protocolo descrito por Zakzuk y colaboradores (95), como se observa en la figura 3. Los ratones se sensibilizaron por vía intraperitoneal (i.p) con 40 µg de MAVAC-BD-2 o 20 µg de *B. tropicalis* en presencia de 2 mg del adyuvante hidróxido de aluminio (Al(OH)₃), (Sigma-Aldrich), los días 0, 7 y 14. Al día 21 se indujo la respuesta

inflamatoria de las vías respiratorias mediante la administración intranasal (in) por tres consecutivos días (21, 22 y 23) con 40 μg de MAVAC-BD-2 o 20 μg de *B. tropicalis* en 50 μL de PBS, bajo anestesia con la mezcla de ketamina (9.2 mg/mL) y xilacina (1.2 mg/mL). Los ratones controles recibieron PBS estéril durante las sensibilizaciones y los retos, siguiendo el mismo protocolo.

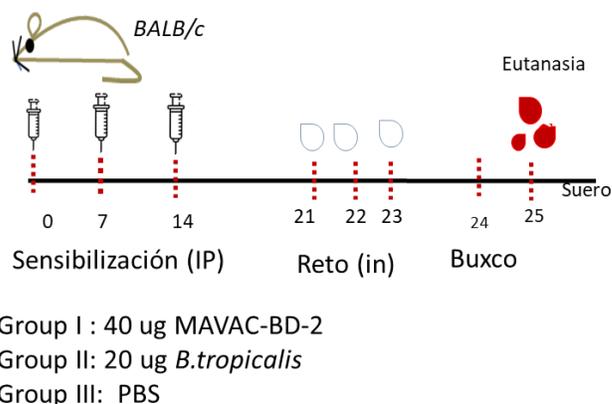


Figura 3. Esquemas de sensibilización con MAVAC-BD-2 en un modelo de inflamación alérgica.

4.10.1.2 Esquema de sensibilización con DPx4 en un modelo de inflamación de las vías áreas

Se organizaron 3 grupos de inmunización (7 ratones/grupo): grupo I (inmunizados con DPx4), grupo II (inmunizados con el extracto de *D. pteronyssinus*) y grupo III (inmunizados con PBS). Los ratones se sensibilizaron por vía i.p. con 20 μg de DPx4 o con 20 ug de extracto *D. pteronyssinus* en presencia de 2 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$, (Sigma-Aldrich), los días 0, 7, 14 y 21. Siete días después de la última sensibilización, se provocó una respuesta inflamatoria en las vías respiratorias mediante la administración intranasal bajo anestesia con 20 μg de DPx4 o 20 μg de extracto de *D. pteronyssinus* en 50 μL de PBS, durante cuatro días consecutivos (29, 30, 31 y 32) (Figura 4).

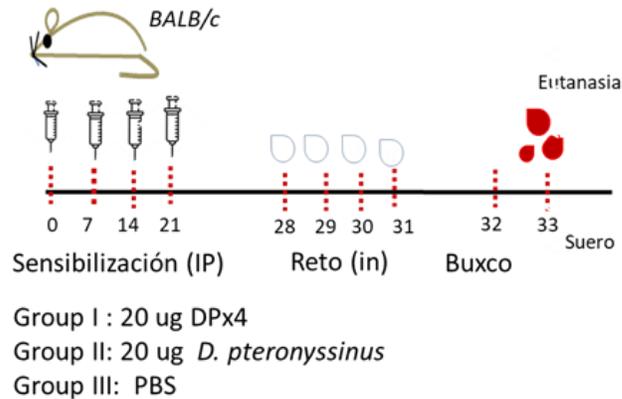


Figura 4. Esquema de sensibilización con DPx4 en un modelo de inflamación alérgica.

Después de 12 horas del último reto antigénico i.n., se realizó el ensayo de hiperreactividad bronquial administrando dosis crecientes de metacolina. Al día siguiente se realizó el sacrificio de los ratones usando pentobarbital sódico al 20% (v/v), administrando un volumen de 100 μ L/ratón. La toma de muestra de sangre se realizó después de sacrificio mediante punción cardíaca.

En el día cero se obtuvieron las muestras de sueros pre-inmunes mediante punción en la vena de la cola de los ratones. Las muestras de suero se almacenaron a -20°C hasta su uso.

4.10.2 Evaluación de la respuesta inmune humoral

Se cuantificaron los niveles séricos de anticuerpos específicos inducidos en el modelo de ratón alérgico por las proteínas híbridas mediante ensayo de ELISA. Se tituló la cantidad del antígeno para la fase sólida, la dilución de suero y del anticuerpo secundario conjugado. Como controles se usaron sueros de ratones sensibilizados con PBS y algunas ocasiones se usó el suero preinmune.

Las muestras de sangre se mezclaron con EDTA y se dejaron sedimentar al menos 1 hora a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a 15.000 g durante 20 min. El sedimento se descartó y los sobrenadantes, se conservaron a -20°C hasta su uso.

4.10.2.1 Determinación de los niveles de IgE e IgG en sueros de ratones inmunizados

Para obtener una dilución apropiada del suero y del conjugado (segundo anticuerpo) para los ensayos de ELISA, se realizaron titulaciones de la siguiente manera (Fig S3 y S4): para el primer anticuerpo IgE se usaron las diluciones 1:5, 1:20, 1:80, 1:320, 1:640 y 1: 1280 y para la IgG1 e IgG2a se usaron 4 diluciones seriadas 1:5.000 - 1:40.000. Para el segundo anticuerpo se usaron las siguientes diluciones 1:2.000, 1:5.000, 1:10.000, 1:14.000, 1:16.000 y 1:18.000.

Para cuantificar los niveles de IgE, IgG1 e IgG2a específicas frente a las proteínas híbridas en sueros de ratones inmunizados: placas de poliestireno (NUNC, Maxisorp™, Corning, Costar) se recubrieron con 1 µg/mL de las proteínas híbridas o 5 µg/mL de extracto de ácaros diluidos en buffer carbonato/bicarbonato 0.2 M a pH 9.6, durante toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron 4 veces con PBS-T al 0.05% y se bloquearon las uniones inespecíficas con 250 µl de buffer de bloqueo durante 3 horas a TA. Luego de 4 lavados, los pozos se incubaron con 100 µL de los sueros de ratón durante toda la noche a TA. Después de 4 lavados con PBS-T, se adicionó 100 µL de los anticuerpos secundarios conjugados con biotina anti-IgE (e-Bioscience 13-5992-82), anti-IgG1 (e-Bioscience 533441) o anti-IgG2a (e-Bioscience -553504) de ratón por 2 horas a TA. Luego de 4 lavados con PBS-T, los pozos se incubaron con 100 µL de estreptavidina conjugada con peroxidasa (Streptavidin-HRP, BD bioscience, 553388) diluida 1:2.000 por 30 minutos a TA y 50 r.p.m. Luego de una etapa final de lavado los pozos se incubaron con 100 µL de sustrato TMB (BD bioscience, 00-5002056) durante 5 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2 N y se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas (Spectra MAX 250, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA.).

4.10.2.2 Ensayo de Dot-blot con sueros de ratones inmunizados

Para evaluar si los anticuerpos IgG inducidos por la inmunización reaccionaban con el extracto de ácaros y los alérgenos purificados se realizó ensayo de Dot-blot, como se describió anteriormente. Dos μg de rDer p 2, rBlo t 5, MAVAC-BD-2, DPx4, Bet v 1 y 5 μg de los extractos de ácaros *B. tropicalis* o *D. pteronyssinus* se aplicaron sobre la membrana de nitrocelulosa y se bloqueó las uniones inespecíficas con PBS-T, leche descremada al 5% durante 1 hora a TA. Luego, las membranas se incubaron con suero de ratones inmunizados con MAVAC-BD-2, DPx4 o suero preinmune ON a TA. La reactividad IgG2a se detectó incubando las membranas con anti-IgG2 de ratón conjugado con biotina (BD553504) diluida 1:1000 en PBS-T por 1 hora a TA. Luego las membranas se lavaron 3 veces con PBS-T y la reacción se visualizó utilizando como sustrato 3,3'diaminobenzidina (DAB).

4.10.3 Análisis de la función respiratoria al reto con metacolina en ratones inmunizados con las proteínas híbridas

La inflamación las vías aéreas inducida en los ratones por las proteínas híbridas se evaluó mediante el reto con dosis creciente de metacolina vía nasal por aerosol usando el pletismógrafo de cuerpo entero (Buxco Electronics, Troy, N.Y., USA.).

Este ensayo se inició con un período de aclimatación de los animales durante 5 minutos en las cámaras. Luego, se registraron medidas de los flujos respiratorios, los cuales se tomaron como medida basal y se procedió a realizar la administración de la metacolina durante 90 segundos en aerosol usando un nebulizador automático. La nebulización se inició con el PBS seguido de la metacolina a concentraciones crecientes de 3.1, 6.25, 12.5 y 25 mg/mL.

Los cambios de presión pulmonar en las vías respiratorias del ratón, que reflejan el grado de inflamación de las mismas, se cuantificaron mediante el parámetro denominado "Penh".

Para valorar el grado de inflamación en las vías respiratorias se usó los cambios en los valores de Penh (pausa aumentada) como una medida indirecta de la hiperreactividad de las vías respiratorias.

4.10.4 Inhibición de la unión de IgE humana a extractos alérgicos por la IgG de ratones inmunizados con las proteínas híbridas

La actividad IgG bloqueadora inducida en los ratones inmunizados con las proteínas híbridas frente a extractos alérgicos de ácaros y alérgenos purificados se evaluó mediante ensayo de inhibición de ELISA de la siguiente manera:

Previo a la realización de este ensayo se procedió a la termo-inactivación de los anticuerpos para evitar la interferencia de la IgE de ratón en los ensayos de inhibición IgG (96, 97). Para lo cual se mezcló un pool de sueros de ratones sensibilizados diluidos 1:10 con PBS/BSA 1% y se calentaron a 56°C en baño de María con agitación suave por 1 hora. Posteriormente se analizó la reactividad IgE, IgG1 e IgG2a de estas muestras antes y después del calentamiento mediante ensayos de ELISA (Tabla S2), como se describió en el párrafo anterior.

Para realizar el ensayo de inhibición, en placas Maxisorp se agregaron 100 µL de una solución 5 µg de extracto de ácaros o 0.5 µg de Der p 1, Der p 2 o Blo t 5 en buffer carbonato/bicarbonato 0.2 M a pH 9.6 y se incubaron ON a 4°C. Las placas se lavaron 4 veces con PBS-T y se adicionó buffer de bloqueo PBS/BSA 1%, durante 2 horas a TA. Luego, los pozos se incubaron con 100 µL de un pool de sueros de ratones se diluyó 1:25 (dilución seleccionada por titulación, Fig S5) por toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron 4 veces con PBS- BSA 1% y se incubaron con 100 µL de suero de pacientes alérgicos o suero de control (suero pre-inmune) diluido 1:5 en PBS/BSA 1% ON a 4°C. Luego de 4 lavados, se adicionó 100 µL de anti-IgE humana marcada con fosfatasa alcalina (Sigma, A3525) diluida 1:500 en buffer de conjugado y se incubó por 2 horas a TA. Para el revelado se adicionaron 100 µL/ pozo del sustrato p-nitrofenil fosfato 1 mg/mL y se incubó durante 30 minutos, la reacción se detuvo con 100 µL de NaOH 3 N y la lectura se

realizó a 405 nm. Para el cálculo del porcentaje de inhibición se aplicó la fórmula $\% \text{ Inhibición} = [100 - (DO_i/DO_p)] \times 100$, donde DO_i : DO suero de ratón inmunizado y DO_p : DO suero de ratón preinmune.

4.10.5 Anafilaxia cutánea Pasiva (PCA)

Para estudiar la actividad alergénica *in vivo* de las proteínas híbridas se realizó la prueba PCA, que permite revelar la capacidad de las proteínas en unirse a la IgE específica unida a los receptores de alta afinidad en la superficie de los mastocitos. La activación de las células sensibilizadas, después de la unión del antígeno, genera la liberación de mediadores proinflamatorios presentes en sus gránulos. Este mecanismo se evidencia mediante la administración intravenosa del reactivo azul de Evans, el cual al llegar a la zona inflamada se extravasa e invade el tejido adyacente coloreando la piel de azul.

En este ensayo se usó un pool de antisueros (sin diluir) procedentes de ratones inmunizados con las proteínas híbridas y como control positivo y negativo se usó antisueros procedentes de ratones inmunizados con el extracto de ácaros y con PBS respectivamente. El ensayo se realizó de la siguiente manera: en el abdomen de ratones BALB/c naive se inyectó vía intradérmica 50 μL de los distintos pools de antisueros. Después de 24 horas, se indujo la reacción anafiláctica mediante la administración intravenosa (iv) de 0.2 mL de una mezcla de 20 $\mu\text{g/mL}$ de DPx4 o 40 $\mu\text{g/mL}$ de MAVAC-BD-2 o 20 $\mu\text{g/mL}$ de extracto de ácaros disueltos en el colorante azul de Evans al 0.5% (Sigma-Aldrich). Después de dos horas, los animales se sacrificaron y se cortaron las porciones de piel que contienen azul de Evans, que luego se incubaron en 2mL de formamida, a 56°C durante 24 horas.

Posteriormente, se recogió la fracción líquida de cada muestra, se filtró a través de filtro de 0.20 μM , se centrifugó a 1000 r.p.m durante 5 minutos para eliminar los restos de piel, pelos etc. Finalmente se midió la densidad óptica del colorante extravasado a una longitud de onda de 620 nm usando un espectrofotómetro (Spectra MAX 250, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA.).

El grado de extravasación inducido por cada proteína se evaluó de manera visual y cuantificando la absorbancia del azul de Evans en el líquido extracelular adyacente al sitio de administración, a partir de una curva estándar para el azul de Evans (1.5-100 $\mu\text{g/mL}$), estos valores se expresaron en microgramos de azul de Evans extravasado /sitio.

4.11 Análisis de datos.

Para el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, Los datos se evaluaron para la normalidad a través de Kolmogorov-Smirnov. Los resultados son expresados como la media aritmética \pm SEM. Se consideraron significativos aquellos valores con $p < 0.05$.

La diferencia entre medias de dos grupos dependientes que cumplieran las condiciones de normalidad se evaluó usando t- student y cuando se trató de más de dos grupos se usó ANOVA. En caso en que no se cumplieran las condiciones de normalidad los análisis se realizaron usando estadística no paramétrica. Para dos grupos independientes se usó la prueba U-Mann Whitney; cuando se trató de más de dos grupos dependientes se usó la prueba de Friedman y para grupos independientes Kruskal-Wallis.

La medida de la hiperreactividad de las vías respiratorias se reflejó como valores de Penh (pausa aumentada). Los datos son expresados como media \pm SEM. La significancia estadística se estimó mediante ANOVA de dos vías.

5 RESULTADOS

5.1 Purificación y Caracterización Molecular e Inmunológica de la proteína híbrida MAVAC-BD-2

5.1.1 Diseño de la proteína MAVAC-BD-2

Para la generación del modelo tridimensional (3D) de la proteína MAVAC-BD-2 se usó como plantilla la estructura 3D de Blo t 5 y Der p 2. Los resultados con ProSA-web mostraron que la estructura MAVAC-BD-2 posee una buena calidad global y local con un valor "Z" -4.52. El análisis Ramachandran para MAVAC-BD-2 mostró las siguientes estadísticas: residuos en regiones favorecidas 147 (79.9%), en regiones permitidas 25 (13.6%), en regiones no permitidas 12 (6.5%). La representación esquemática del orden en que fueron ensamblados los segmentos de alérgenos con una etiqueta histidina en la región amino terminal se observa en la Fig 5A. Las imágenes representan la estructura tridimensional de MAVAC-BD-2 (Fig 5 B y C) generadas por el programa PyMOL.

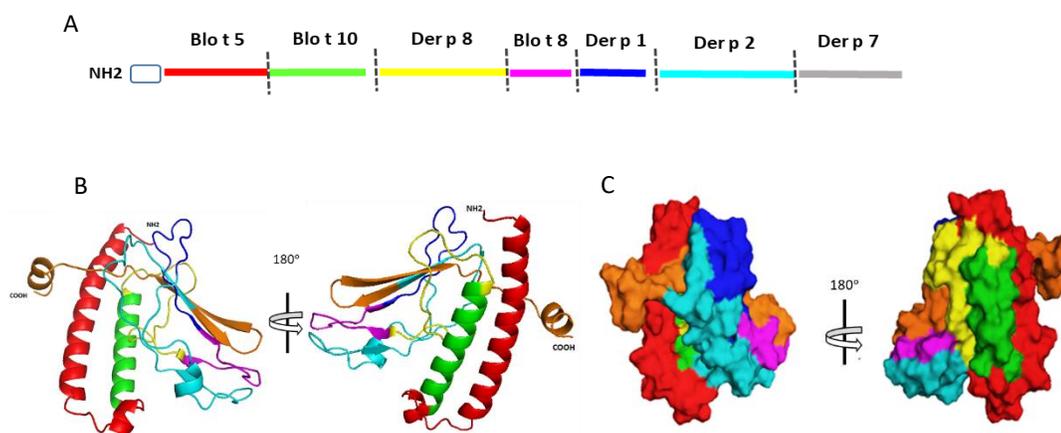


Figura 5. Modelo estructural de la proteína MAVAC-BD-2.

A) Representación del orden en que fueron ensamblados los segmentos de alérgenos. B) Representación en cintas y C) Representación en superficies, del modelo 3D de MAVAC-BD-2. Se muestra la ubicación de cada segmento. Blo t 5 (rojo), Blo t 8 (fucsia), Blo t 10 (verde) Der p 1 (azul), Der p 2 (magenta), Der p 7 (naranja) y Der p 8 (amarillo).

5.1.2 La proteína MAVAC-BD-2 se obtuvo en forma parcialmente plegada

La migración de la proteína en SDS-PAGE mostró que MAVAC-BD-2 se expresó con alto grado de pureza, mostrando una banda única con un peso molecular aproximado de 22.8 kDa, consistente con la masa molecular teórica del diseño de la proteína (Fig. 6). La concentración de LPS obtenida mediante el estuche ToxinSensor™ estuvo por debajo de 0.12 EU/mL

El espectro de DC mostró que MAVAC-BD-2 está parcialmente plegada, con un máximo en 192 nm y un mínimo en 208 nm, indicando un significativo contenido de estructura hélice α (22%) y cintas β (21%). El contenido (%) de estructura secundaria (hélices α , cintas β y otros) de la proteína se determinó mediante el programa de análisis Dichroweb.

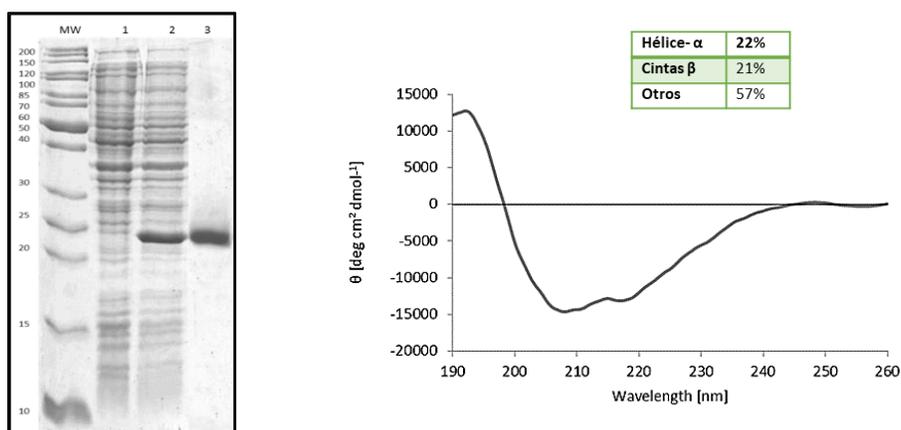


Figura 6. Purificación y espectro de dicroísmo de la proteína MAVAC-BD-2. (A) Electroforesis en SDS-PAGE, con tinción con azul brillante de Comassie. MW: marcador de peso molecular. Carril 1: muestra de cultivo celular sin inducción. Carril 2: muestra de cultivo inducido con IPTG 1mM, Carril 3: muestra purificada con resina Ni-NTA. (B) Espectro de dicroísmo circular (DC) de MAVAC-BD-2. Los valores de DC se expresaron como elipticidad molar por residuo θ .

5.1.3 MAVAC-BD-2 muestra una baja capacidad de unión a IgE en sueros de alérgicos a los ácaros

Al evaluar la frecuencia de reconocimiento de la IgE en sueros de individuos alérgicos hacia la proteína híbrida, se encontró una frecuencia de reactividad IgE del 40% (40/100). Al comparar los niveles de reactividad IgE en sueros de alérgicos se encontró una menor unión IgE hacia la proteína híbrida que hacia los extractos de *B. tropicalis* ($p < 0.001$), de *D. pteronyssinus* ($p < 0.001$) y los recombinantes purificados rBlo t 5, nDer p 1 y rDer p 2 ($p < 0.001$), Fig. 7A y 7B.

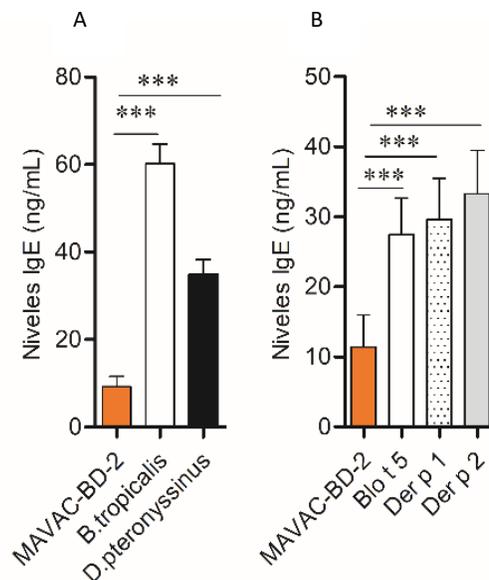


Figura 7. Niveles de IgE a MAVAC-BD-2 por ELISA en sueros de alérgicos a los ácaros. A) Comparación entre MAVAC-BD-2 y los extractos de ácaros. Niveles de IgE obtenidos en 100 sueros de alérgicos. B) Comparación entre MAVAC-BD-2 vs nDer p 1, rDer p 2 y rBlo t 5. Niveles de IgE obtenidos con 47 sueros alérgicos *** $P < 0.001$. Para los análisis se usó el test Kruskal-Wallis.

Los experimentos de dot-blot también mostraron que MAVAC-BD-2 tiene poca capacidad de unir IgE de pacientes alérgicos. De los 28 sueros analizados, 20 no mostraron reactividad IgE hacia MAVAC-BD-2, mientras que solo 8 (sueros # 2, #12, #13, #14, # 16, #17, #18 y #19) mostraron una débil unión a IgE. Es notable que solo el suero #20 presento una reactividad IgE comparable con la obtenida hacia el extracto de ácaro. Por otra parte, como se esperaba cada uno de los sueros de

pacientes alérgicos tienen reactividad IgE hacia los extractos de los ácaros. También se observa que la mayoría de los sueros muestran reactividad IgE hacia rDer p 2 y rBlo t 5, algunos de ellos hacia nDer p 1. Ninguno de los individuos no alérgicos mostró reactividad IgE hacia las proteínas ensayadas (Fig 8). Los datos obtenidos en conjunto sugieren que MAVAC-BD-2 es débilmente reconocida por la IgE de los alérgicos a los ácaros del polvo doméstico.

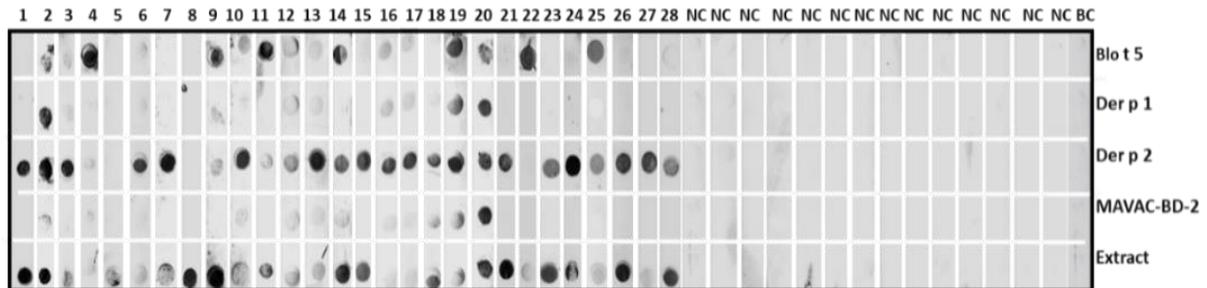


Figura 8. Reactividad de la IgE a MAVAC-BD-2 por ensayo de dot-blot. Blo t 5, Der p 1, Der p 2, MAVAC-BD-2 y *Blomia tropicalis* se pegaron en membranas de nitrocelulosa e incubaron con 28 sueros de pacientes alérgicos a los ácaros (columnas 1–28), 14 sueros de sujetos no alérgico (NC) o buffer sin suero (BC).

El siguiente experimento consistió en evaluar la capacidad de MAVAC-BD-2 de unir anticuerpos de clase IgG. El híbrido mostró la capacidad de unir IgG en sueros de pacientes alérgicos como también en sueros de individuos sin alergia (\bar{x} alérgico = 1.30 vs \bar{x} No-alérgico = 1.05). Los niveles de IgG fueron significativamente mayores en el grupo de los alérgicos, (Fig 9).

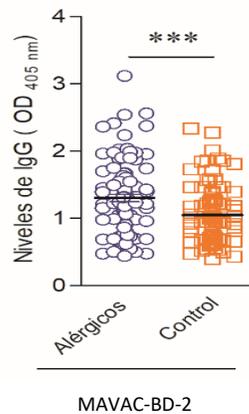


Figura 9. Reactividad IgG mediante ELISA. Reactividad IgG a MAVAC-BD-2 en 100 sueros de alérgicos y no alérgicos a los ácaros. *** $P < 0.001$. Para la comparación entre los grupos se usó el test de U de Mann-Whitney.

5.1.4 MAVAC-BD-2 contiene epítopes B de los alérgenos de ácaros *B. tropicalis* y *D. pteronyssinus*.

Los epítopes B relevantes de Der p 1, Der p 2, Blo t 5 y alérgenos de *B. tropicalis* presentes en MAVAC-BD-2 se analizaron mediante ensayos de inhibición de ELISA y Dot-blot con anticuerpos monoclonales.

A la concentración de 100 µg/mL, MAVAC-BD-2 inhibió la unión de IgE del pool A hacia rDer p 2 y rBlo t 5 en un 26.3% y 26% respectivamente (Fig. 10 A, B). Por otra parte, MAVAC-BD-2 también inhibió la unión de IgE del pool B hacia el extracto de *B. tropicalis* en un 20% (Fig. 10 C).

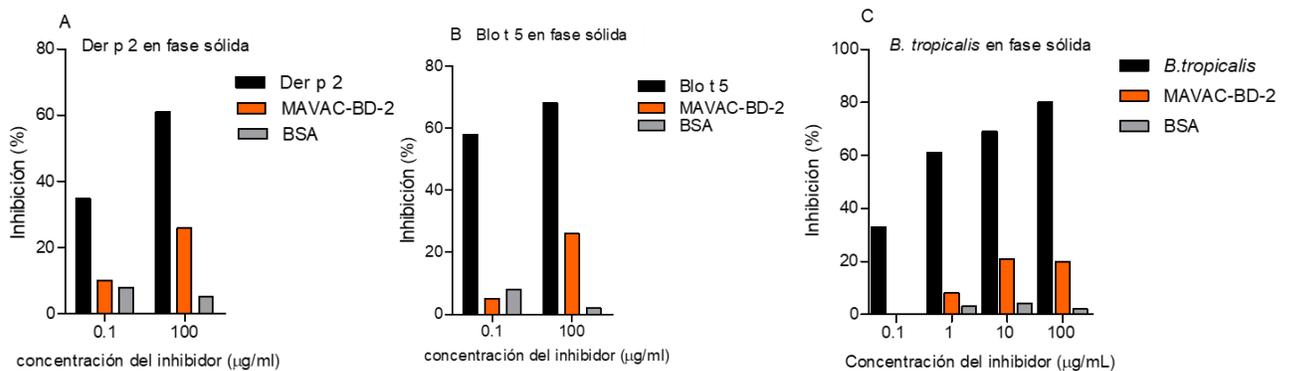


Figura 10. Inhibición de ELISA: Inhibición de la unión de IgE a extractos y alérgenos recombinantes por MAVAC-BD-2.

Los gráficos de barras muestran los porcentajes de inhibición de la reactividad IgE de un pool de sueros por MAVAC-BD-2 a Der p 2 (A), Blo t 5 (B) y *B. tropicalis*(C).

Los ensayos de Dot-blot con los anticuerpos monoclonales anti- Der p 1 (mAb 4C1) y anti-Der p 2 (mAb Dpx-A9), mostraron reactividad hacia MAVAC-BD-2 (Fig 11). Los resultados en conjunto sugieren que MAVAC-BD-2 conserva epítopes B de los principales alérgenos de los ácaros *B. tropicalis* y *D. pteronyssinus*

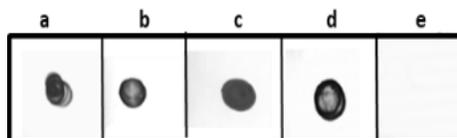


Figura 11. Ensayo de Dot-blot con anticuerpos monoclonales. MAVAC-BD-2, Der p 1, Der p 2 y BSA fueron depositados en la membrana de nitrocelulosa e incubados con los mAb como se indica (Proteína/mAb): a) MAVAC-BD-2/anti Der p 1, b) MAVAC-BD- 2/anti Der p 2, c) Der p 1 /anti-Der p 1, d) Der p 2/anti-Der p 2, e) BSA/anti-Der p 1.

5.1.5 MAVAC-BD-2 induce una menor activación de basófilos en comparación con los alérgenos recombinantes y extractos de ácaros

Al estimular los basófilos de pacientes alérgicos con 10 µg/mL de rDer p 2, rBlo t 5 o de los extractos de ácaros, se observó una sobreexpresión del marcador CD203c en los basófilos de todos los pacientes (\bar{x} SI = 5.0), mientras que MAVAC-BD-2 no indujo activación en las muestras de los pacientes # 1, 2 y 3 (\bar{x} SI = 1.0), (Fig 12). Aunque dos muestras (# 4 y # 6) mostraron activación de basófilos frente a MAVAC-BD-2, el grado de activación fue más bajo comparado con los alérgenos purificados y los extractos de ácaros. Por otro lado, no se observó activación de basófilos en muestras de individuos sin alergia (\bar{x} SI = 0.9). La anti-IgE usada como control positivo indujo una sobreexpresión del marcador CD203c en los basófilos de todos los donantes. No se observó activación de basófilos con PBS (control negativo). Estos resultados indican que MAVAC-BD-2 tiene una menor alergenidad que los alérgenos Der p 2, Blo t 5 y los extractos de *D. pteronyssinus* y *B.tropicalis*

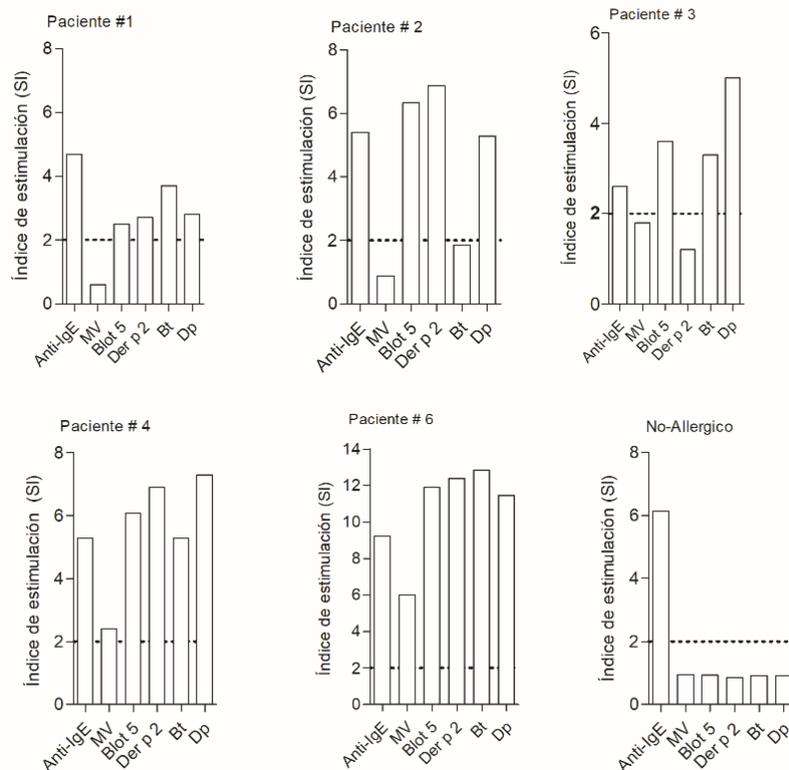


Figura 12. Ensayo de activación de basófilos.

Índice de estimulación (SI) obtenido en 5 muestras de pacientes alérgicos a los ácaros y un sujeto no alérgico, expuestos a 10 $\mu\text{g/mL}$ MAVAC-BD-2, Der p 2, Blo t 5 y Bt, Dp. anti-IgE o PBS (controles). Activación positiva con $\text{SI} \geq 2$ MV (MAVAC-BD-2), Dp: *Dermatophagoides pteronyssinus*, Bt: *Blomia tropicalis*.

5.1.6 MAVAC-BD-2 induce mayores niveles de IL-10 y menores de IL-5 que el extracto *B. tropicalis* en PBMC de alérgicos a los ácaros

En cultivos de PBMC de alérgicos estimulados con MAVAC-BD-D-2 se hallaron niveles de IL-5 significativamente menores ($1.06 \text{ pg/mL} \pm 1.42 \text{ pg/mL}$) que los niveles encontrados en los cultivos estimulados con el extracto de *B. tropicalis* ($29.0 \pm 56.9 \text{ pg/mL}$), $***p < 0.001$ (Fig 13 A).

Los niveles de IL-10, fueron significativamente mayores en las células estimuladas con MAVAC-BD-2 que en las estimuladas con *B. tropicalis*, $p < 0.05$ (Figura 13B). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IFN- γ entre los diferentes estímulos ensayados (Fig 13C). En nuestras condiciones experimentales no se detectaron niveles de IL-4 en ninguno de los cultivos.

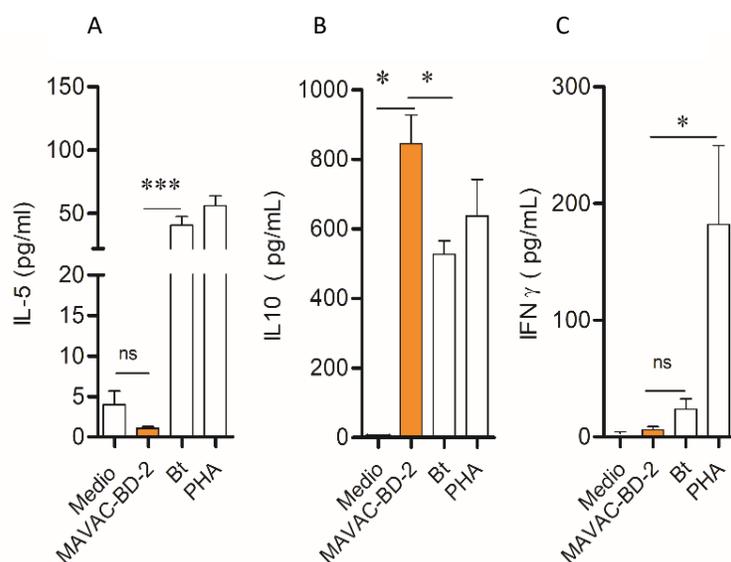


Figura 13. Niveles de citoquinas inducidos por MAVAC-BD-2 en cultivos de PBMC de 5 pacientes alérgicos a los ácaros. Se cuantificaron los niveles de IL-5, IL-10 e IFN γ en sobrenadantes de cultivo mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan como la media \pm SEM *p <0.05, ***p <0.001. (Prueba de Anova para múltiples comparaciones de medidas repetidas).

5.1.7 MAVAC-BD-2 no mostró degradación a condiciones de almacenamiento a 4°C durante 3 semanas

Al analizar la estabilidad de la proteína después de 3 semanas de almacenamiento a 4°C, no se observó ningún tipo de degradación visual de la proteína en los diferentes tiempos analizados (0 días, 1 días, 3 días, 14 días y 21 días) (Fig. 14).

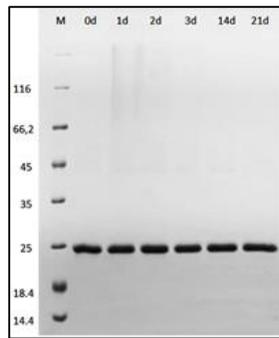


Figura 14. Análisis en de la estabilidad de MAVAC-BD-2 después de un periodo de almacenamiento de 21 días a 4°C.

SDS-PAGE al 12 % M: Marcador de peso molecular. Carril 1-4: Muestra almacenada durante 0, 1, 2 y 3 días. Carril 5 y 6 Muestra almacenada durante 2 y 3 semanas.

5.1.8 MAVAC-BD-2 forma agregados de alto peso molecular

El ensayo de DLS mostró que MAVAC-BD-2 forma agregados moleculares de alto peso molecular con una amplia distribución de tamaños. A partir de los datos de DLS se puede estimar que los agregados consisten en aproximadamente 5500 moléculas de MAVAC-BD-2 en su estado oxidativo (Fig 15).

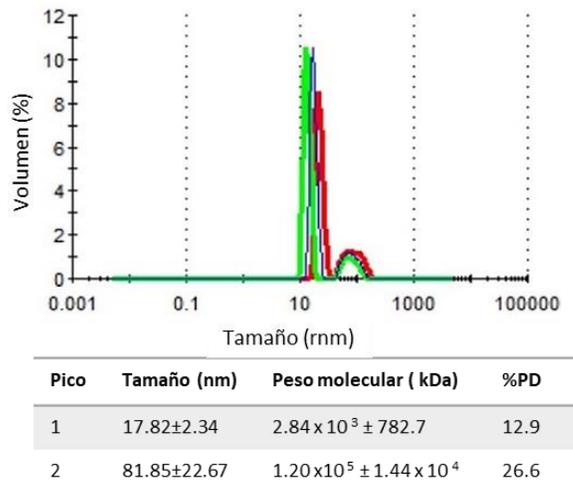


Figura 15. Análisis DLS con MAVAC-BD-2.

Se muestra la distribución del tamaño en r.nm por masa de MAVAC-BD-2 con tres mediciones repetidas cada una. El tamaño en r.nm, el MW estimado en kDa y la polidispersidad (Pd) en porcentajes de los picos individuales se enumeran debajo de la figura.

5.1.9 La inmunización con MAVAC-BD-2 induce anticuerpos IgG que reaccionan con el extracto de *B. tropicalis* y con los alérgenos purificados

Para evaluar la especificidad e inmunogenicidad de los anticuerpos IgG inducidos en ratones BALB/c por la inmunización con MAVAC-BD-2 se realizaron ensayos de dot-blot y ELISA.

La administración de MAVAC-BD-2 originó un aumento significativo en la producción de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a (Fig 16A) con respecto al grupo control. Interesantemente, MAVAC-BD-2 indujo mayores niveles de anticuerpos IgG2a que anticuerpos IgG1 (Fig 16B). La relación IgG1/IgG2a en el suero de ratones inmunizados con el híbrido fue de 0.46, mientras que en el suero de los ratones inmunizados con el extracto fue de 9.01 (Fig 16C), indicando que la inmunización con MAVAC-BD-2 indujo una respuesta humoral con mayor peso de hacia el perfil Th1.

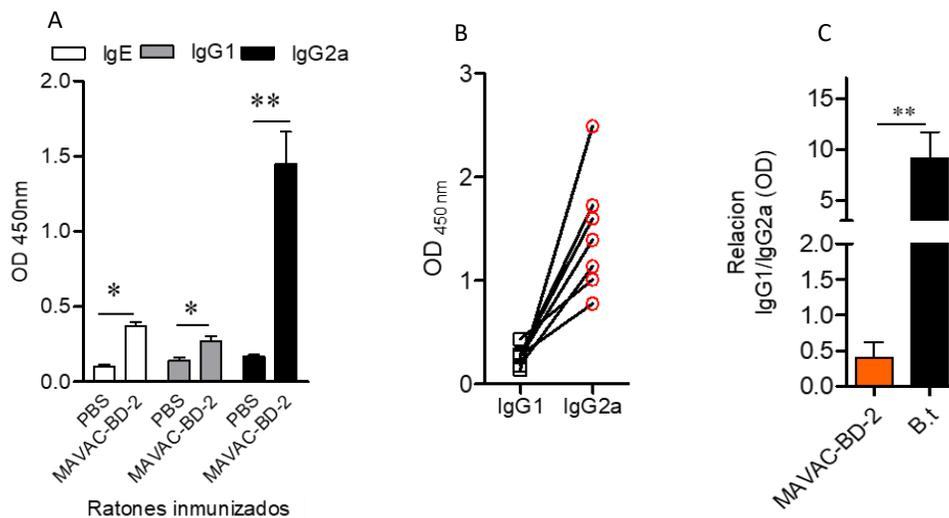


Figura 16. Niveles de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados con MAVAC-BD-2. Los niveles de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos fueron determinados por ELISA. A) Reactividad IgE, IgG1 e IgG2a específicos a MAVAC-BD-2 en suero de ratones inmunizados con MAVAC-BD-2 y PBS. B) Relación IgG1 e IgG2a a MAVAC-BD-2 en suero de ratones inmunizados con MAVAC-BD-2. C) Relación IgG1 e IgG2a a MAVAC-BD-2 (barra naranja) y el extracto (barra negra). Los datos corresponden a la media \pm SEM (n=7/grupo), **p<0.01.

Los resultados del ensayo de Dot Blot señalan que la IgG inducida en ratones por la inmunización con MAVAC-BD-2 tienen reactividad frente a MAVAC-BD-2, Der p 2, Blo t 5 y el extracto de *B. tropicalis*. No se observó reactividad frente al antígeno no relacionado Bet v 1 y tampoco se observó reactividad con un pool de suero preinmune frente a la proteína (Fig 17).

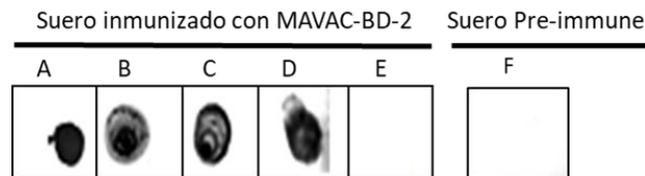


Figura 17. Reactividad de anticuerpos IgG inducidos en ratones BALB/c por la inmunización con MAVAC-BD-2.

Las proteínas se pegaron en la membrana de nitrocelulosa como se indica: A) MAVAC-BD-2, B) *B. tropicalis*, C) Der p 2, D) Blo t 5), E) Bet v 1, F) MAVAC-BD-2. Las membranas se incubaron con un pool de sueros de ratones inmunizados con MAVAC-BD-2 (A- E), y con un pool de sueros pre-inmune (F).

Por otra parte, al comparar los niveles de anticuerpos inducidos en ratones inmunizados con MAVAC-BD-2 y el extracto de *B. tropicalis* (grupo alérgico), se observó un incremento significativo en los niveles de IgG2a (**p<0.01), acompañado con menor producción de IgE e IgG1 (**p<0.001), en el grupo de ratones inmunizado con MAVAC-BD-2, respecto al grupo alérgico, que como se esperaba mostraron elevados niveles séricos de anticuerpos IgE e IgG1 específicos para el extractos de *B. tropicalis* características de un estado alérgico, (Fig 18).

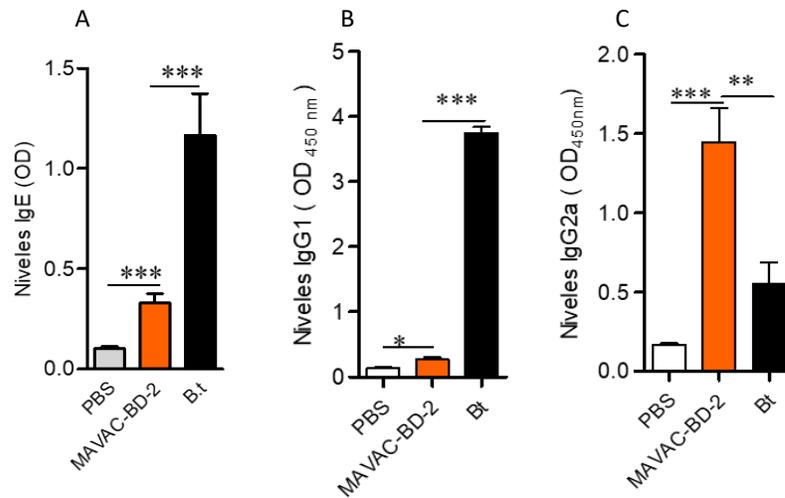


Figura 18. Reactividad de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados con MAVAC-BD-2 y *B. tropicalis* por ELISA.

A) Niveles de IgE. B) Niveles de IgG1. C) Niveles de IgG2a. Los datos corresponden a la media \pm SEM (n=7/grupo MAVAC-BD-2, n= 5/grupo Bt). Los resultados se analizaron mediante el test ANOVA, **p<0.01 y*** p<0.001. ns= No significativo.

5.1.10 Los anticuerpos IgG específicos a MAVAC-BD-2 inhiben la unión de la IgE humana hacia los extractos de ácaros y alérgenos purificados

Los anticuerpos IgG específicos a MAVAC-BD-2 inhibieron la unión de la IgE de pacientes hacia el extracto *D. pteronyssinus* entre un 54% y 96% (\bar{X} inhibición=86%), mientras que la inhibición de la reactividad hacia el extracto de *B. tropicalis* fue entre un 33% y 90% (\bar{X} inhibición = 56%). La inhibición de la unión IgE en sueros de individuos sanos fue del 10% (Tabla 9).

Al evaluar la actividad bloqueadora frente alérgenos purificados, se encontró que la IgG a MAVAC-BD-2 inhibió la reactividad IgE del suero de alérgicos hacia Blo t 5 entre el 12% y 77% (\bar{X} inhibición= 58%) y hacia Der p 2 entre un 35% y 78% (\bar{X} inhibición = 74%), (Tabla 10).

Tabla 9. Inhibición de la reactividad IgE a *B. tropicalis* y *D. pteronyssinus*, en sueros de alérgicos, por anticuerpos IgG de ratón inmunizados con MAVAC-BD- 2

Paciente	<i>D. pteronyssinus</i> en fase sólida			<i>B. tropicalis</i> en fase sólida		
	Niveles de IgE (OD)					
	Pre-incubado con			Pre-incubado con		
	pre-immune	Inmunizado	% de Inhibición	pre-immune	Inmunizado	% de Inhibición
1	2.60	0.30	88	3.32	0.33	90
2	2.71	0.13	95	2.45	0.32	86
3	2.66	0.10	96	0.40	0.15	62
4	2.74	0.35	86	0.72	0.48	33
5	2.52	0.25	89	1.94	0.98	49
6	2.58	0.10	95	0.23	0.15	35
7	1.54	0.69	54	0.29	0.17	41
Promedio	2.48	0.28	86	1.34	0.37	57
No Alérgico	0.075	0.08	10	0.08	0.09	11

Tabla 10. Inhibición de la reactividad IgE hacia Blo t 5 y Der p 2 en sueros de alérgicos, por anticuerpos IgG de ratón inmunizados con MAVAC-BD- 2

Suero de alérgico	Blo t 5 en fase sólida			Der p 2 en fase sólida		
	Niveles de IgE en suero (DO)					
	Pre- incubado con			Pre- incubado con		
	preimmune	Inmunizado	% de inhibición	preimmune	Inmunizado	% de inhibición
1	1.08	0.81	24	0.22	0.05	74
2	1.60	0.64	58	0.63	0.27	58
3	3.45	3.04	12	3.45	2.22	35
4	1.02	0.23	77	1.28	0.27	78
promedio	1.79	1,18	43	2.37	2.21	61
No Alérgico	0.06	0.05	16	0.08	0.08	2

5.1.11 MAVAC-BD-2 no induce hiperreactividad de las vías aéreas al reto con metacolina en ratones BALB/c.

El efecto sobre la función de las vías respiratorias por la administración de MAVAC-BD-2 en un modelo alérgico, se evaluó usando el pletismógrafo de cuerpo entero, Buxco. Los ratones inmunizados con MAVAC-BD-2 presentaron signos de inflamación en respuesta al reto con metacolina similares a lo observado en los ratones que recibieron PBS (controles). Por el contrario, los ratones inmunizados con el extracto de *B. tropicalis*, presentaron mayores signos de inflamación

pulmonar con diferencias estadísticamente significativas a la dosis de metacolina de 6.25, 12.5 y 25 mg/mL que los ratones inmunizado con el híbrido, (Fig 19).

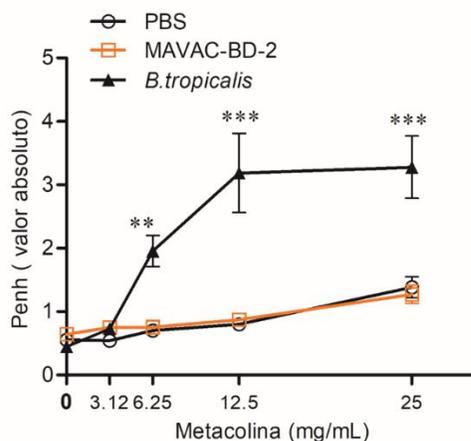


Figura 19. Evaluación de la hiperreactividad de las vías aéreas al reto con metacolina en ratones BALB/c inmunizados con MAVAC-BD-2.

La medición se realizó usando el pletismógrafo de cuerpo entero (Buxco). Los datos se expresan mediante el parámetro Penh. Los datos se presentan como la media \pm SEM. Los resultados se analizaron mediante el test de ANOVA de dos vías. *** $p < 0.001$ grupo inmunizado con MAVAC-BD-2 vs el grupo inmunizado con *B. tropicalis*.

5.1.12 Disminución de la respuesta inflamatoria *in vivo* en ratones inmunizados con MAVAC-BD-2

Para determinar la alergenicidad *in vivo* de la proteína MAVAC-BD-2 se realizó la prueba de anafilaxia cutánea pasiva (PCA). El nivel de extravasación del colorante azul de Evans por la administración del pool de suero perteneciente a los ratones inmunizados con MAVAC-BD-2 fue similar al hallado en el grupo control, (concentración control $\bar{X} = 1.35 \mu\text{g/mL}$ vs concentración MAVAC-BD-2 $\bar{X} = 1.5 \mu\text{g/mL}$), (Fig 20A), sugiriendo la ausencia de activación y degranulación de mastocitos cutáneos. Mientras que el pool de suero perteneciente a los ratones inmunizados con *B. tropicalis*, indujo una extravasación extendida del colorante de azul de Evans más allá del sitio de inyección del antígeno, con cantidades significativamente mayores que en el suero de los ratones inmunizados con MAVAC-BD-2 ($p < 0.01$), Fig 20B.

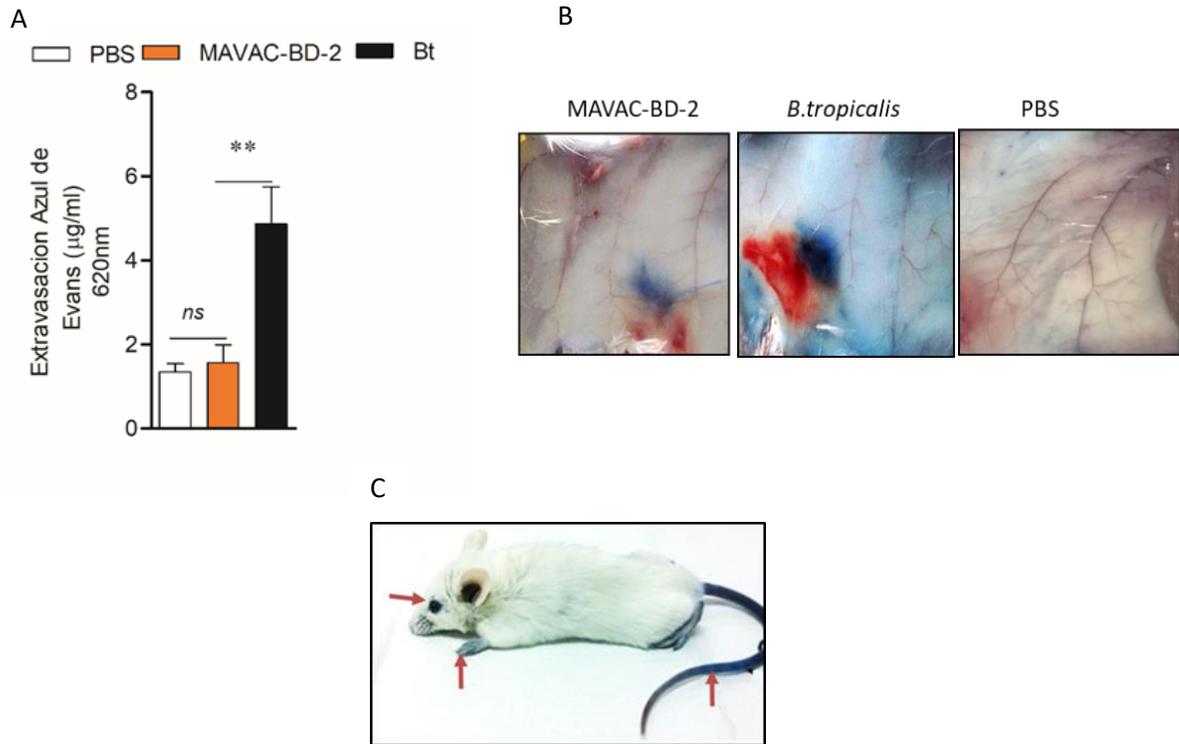


Figura 20. Prueba de anafilaxia cutánea pasiva.

A) Gráficas representativas de la cuantificación del contenido de azul de Evans extravasado al tejido de la piel de ratones. B) Imágenes fotográficas representan la extravasación del colorante en la piel de abdomen de los ratones “naive” inyectados con suero anti-MAVAC-BD-2, anti- *B. tropicalis* y anti- PBS. C) Imagen ilustra el éxito en la administración i.v. del colorante. Los datos representan la media \pm SEM. * $P < 0.05$. Anova de un factor ns= No significativo

5.2 Purificación y Caracterización Molecular e Inmunológica de la proteína híbrida DPx4

5.2.1 Diseño de la proteína DPx4

Para la generación del modelo tridimensional (3D) de la proteína DPx4 se usó como plantilla la estructura 3D de Der p 1 (PDB 3F5V). Los resultados con ProSA-web mostraron que la estructura DPx4 tiene una buena calidad global y local, con un valor “Z” de -0.78. El análisis Ramachandran para DPx4 mostró las siguientes estadísticas: residuos en regiones favorecidas 174 (77.3%) en regiones permitidas 42 (18.7%), en regiones no permitidas 9 (4.0%).

La representación esquemática del orden en que fueron ensamblados los segmentos de alergen con una etiqueta histidina, en la región amino terminal es mostrado en la Figura 21. Las imágenes representan la estructura tridimensional de DPx4 generadas por el programa PyMOL. La concentración de LPS obtenida mediante el estuche ToxinSensor TM estuvo por debajo de 0.25 EU/mL.

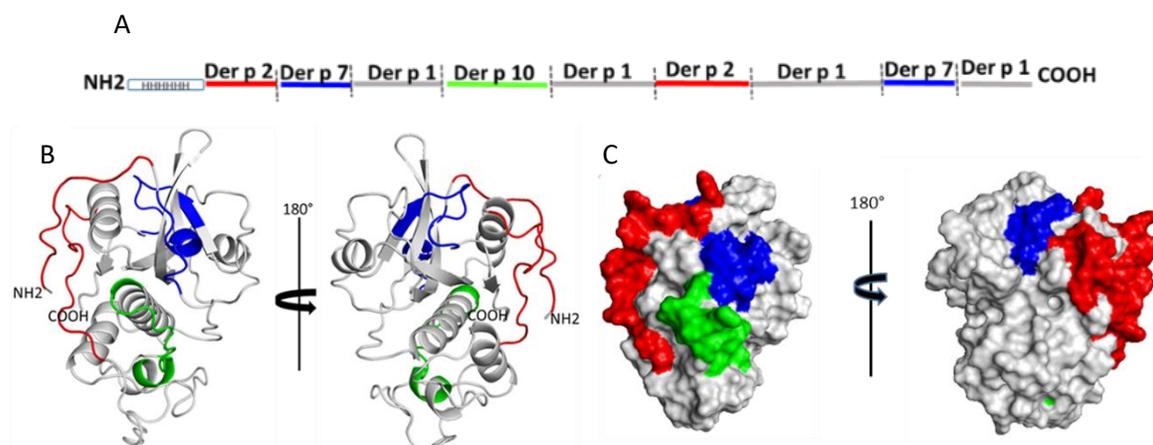


Figura 21. Representación de la estructura de la proteína DPx4.

A) Representación esquemática del orden en que fueron ensamblados los segmentos de alergen. El modelo 3D de DPx4 representado en cinta (B) y en superficie (C), indicando las regiones de Der p 1 (blanco), Der p 2 (Rojo), Der p 7 (azul) y Der p 10 (Verde).

5.2.2 La proteína DPx4 se obtuvo en forma parcialmente plegada

La proteína DPx4 se expresó con alto grado de pureza, mostrando una banda única con peso molecular aproximado de 27.2 kDa (Fig 22A), consistente con la masa molecular teórica de la proteína.

El espectro de DC de DPx4 mostró que está parcialmente plegada, con un mínimo de coeficiente de elipticidad en 215 nm, lo cual indica un alto contenido de estructura de cintas β . El programa Dichroweb mostró un 10 % de contenido de hélice α , 39% de cintas β y 51% de otros. A modo de comparación se obtuvo el espectro de nDer p1, el cual mostró dos mínimos a 208 nm y 220 nm, indicando un alto contenido de estructura α hélice, (Fig 22 B).

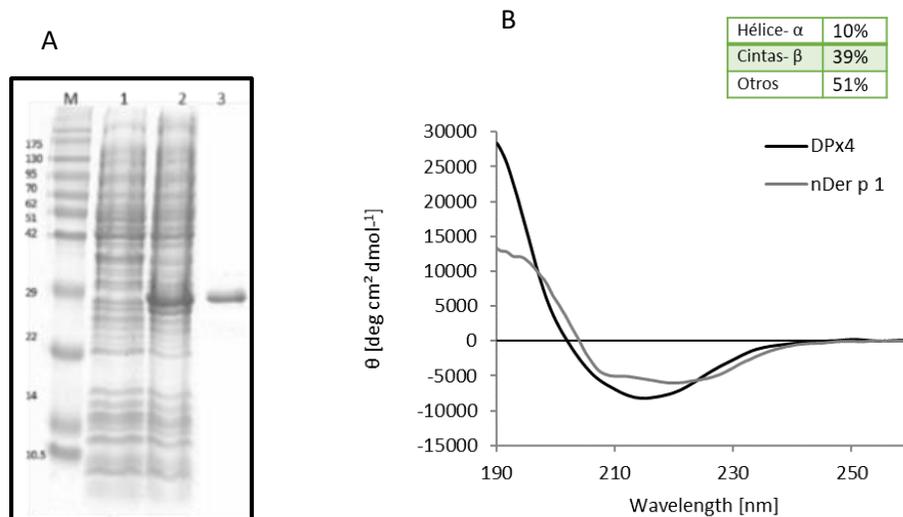


Figura 22. Purificación y espectro de dicroísmo de la proteína DPx4. (A) Electroforesis en SDS-PAGE, con tinción con azul brillante de Comassie. MW: marcador de peso molecular. Carril 1: muestra de cultivo celular sin inducción. Carril 2: muestra de cultivo inducido con IPTG 1mM, Carril 3: muestra purificada con resina Ni-NTA. (B) Espectro de dicroísmo circular (DC) de DPx4. Los valores de DC se expresaron como elipticidad molar por residuo θ .

5.2.3 DPx4 muestra baja capacidad de unión a IgE de sueros de alérgicos a los ácaros

Al evaluar la frecuencia de reconocimiento de la IgE de sueros de alérgicos hacia la proteína híbrida, se encontró una frecuencia de reactividad IgE del 45% (41/90). Los niveles de anticuerpo IgE en sueros alérgicos fueron significativamente menores hacia DPx4 que al extracto de *D. pteronyssinus* ($p < 0.001$), (Fig. 23A), Der p 1 y Der p 2 ($p < 0.001$), (Fig. 23B).

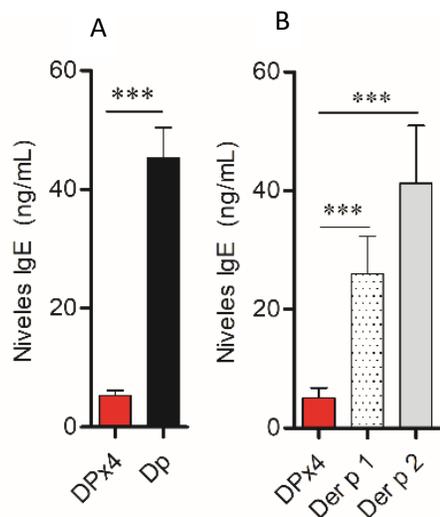


Figura 23. Niveles de IgE a DPx4 por ELISA en sueros de alérgicos a los ácaros. A) Niveles de IgE con DPx4 y Dp en 90 sueros de individuos alérgicos. B) Niveles de IgE con DPx4, nDer p 1, rDer p 2 en 32 sueros alérgicos (***) P < 0.001). Para los análisis se usó test de U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis. Dp: *D. pteronyssinus*

El ensayo de Dot-blot mostró que de los 24 sueros evaluados 21 no muestran reactividad hacia DPx4, solo 3 sueros (#19, #20 y #26) mostraron una débil unión a IgE. Por otra parte, como se esperaba, todos los sueros mostraron una alta reactividad IgE hacia el extracto de *D. pteronyssinus*. También se observa que la mayoría de los sueros muestran reactividad IgE hacia rDer p 2 y algunos de ellos hacia Der p 1. Ninguno de los individuos no alérgicos mostró reactividad IgE hacia las proteínas ensayadas. Los datos obtenidos en conjunto sugieren, que DPx4 es débilmente reconocida por la IgE de los alérgicos a los ácaros del polvo doméstico. (Fig 24).

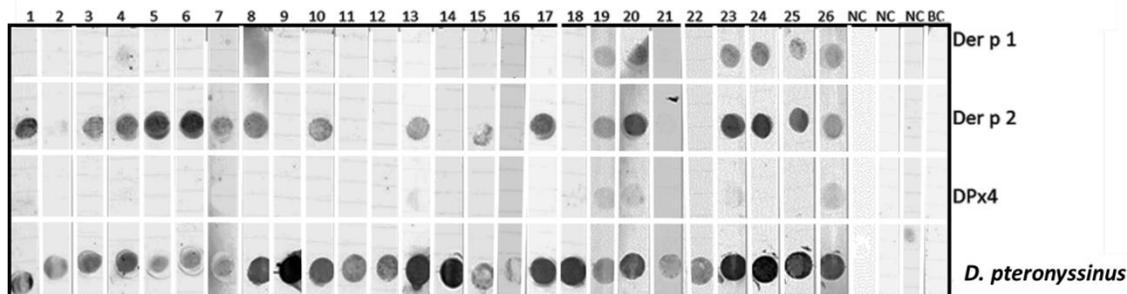


Figura 24. Reactividad de la IgE a DPx4 por ensayo de dot-blot. DPx4, Der p 1, Der p 2 y *D. pteronyssinus* se pegaron en membranas de nitrocelulosa e incubaron con 26 sueros de pacientes alérgicos a los ácaros (columna 1–26), con 3 sueros de sujetos no alérgicos (NC) o con buffer sin suero (BC).

Al evaluar la capacidad de DPx4 de unir anticuerpos de clase IgG, el híbrido mostró la capacidad de unir IgG en sueros de pacientes alérgicos como también en sueros de individuos sin alergia (\bar{X} alérgico = 0.9447 vs \bar{X} No-alérgico = 0.7821). Los niveles de IgG fueron significativamente mayores en el grupo de los alérgicos, (Fig 25).

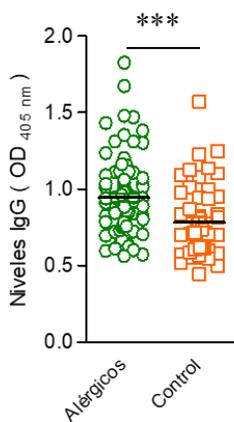


Figura 25. Reactividad IgG mediante ELISA. Reactividad IgG a DPx4 en 90 sueros de sujetos alérgicos y 55 no alérgicos a los ácaros. *** $P < 0.001$. El análisis se realizó usando el test de U de Mann-Whitney.

5.2.4 DPx4 contiene epítopes B de los alérgenos del ácaro *D. pteronyssinus*

El ensayo de inhibición del ELISA mostró que a la concentración de 25 µg/mL DPx4 es capaz de inhibir la unión de la IgE del pool C hacia Der p 1 y Der p 2 en un 38% y 26% respectivamente (Fig 26 A y B). Al comparar la inhibición entre DPx4 y el extracto *D. pteronyssinus* se encontró que el extracto inhibió la unión de IgE hacia DPx4 en un 78.3%, mientras que DPx4 fue capaz de inhibir hasta en un 35% la unión de IgE hacia *D. pteronyssinus* (Fig 26 C y D).

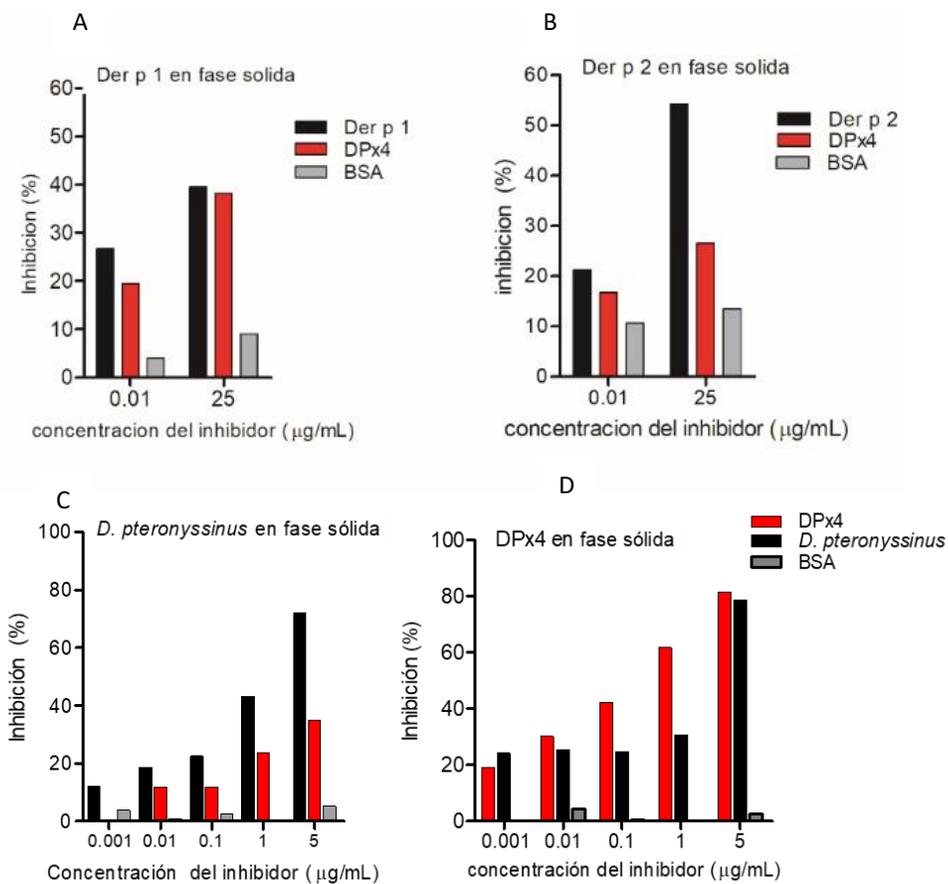


Figura 26. Inhibición de ELISA de unión de la IgE a extractos y alérgenos purificados por DPx4.

Los gráficos muestran los porcentajes de inhibición de la reactividad IgE de un pool de sueros por DPx4 a Der p 1 (A), Der p 2 (B) y *D. pteronyssinus* (C). inhibición de la reactividad IgE de pool a DPx4 por *D. pteronyssinus* (D).

Los ensayos de Dot-blot con los anticuerpos monoclonales anti- Der p 1 (mAb 4C1) y anti-Der p 2 (mAb Dpx-A9), mostraron reactividad hacia DPx4 (Fig 27). Los resultados de estos estudios sugieren que DPx4 conserva epítopes B de los principales alérgenos del ácaro *D. pteronyssinus*.

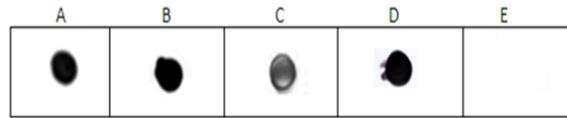
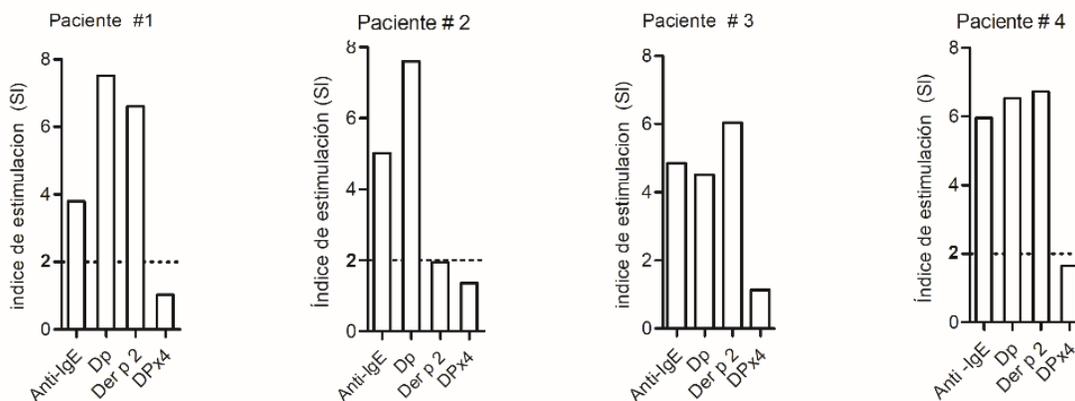


Figura 27. Ensayo de Dot-blot con anticuerpos monoclonales. DPx4, Der p 1, Der p 2 y BSA se pegaron en la membrana de nitrocelulosa y se incubaron con los mAb como se indica (Proteína/mAb): A) Der p 1/anti-Der p 1, B) Der p 2/anti- Der p 2, C) DPx4/anti-Der p 1, D) DPx4/anti-Der p 2 y E) BSA/anti- Der p 1.

5.2.5 DPx4 induce menor activación de basófilos que los alérgenos recombinantes y el extracto de ácaro.

Al estimular los basófilos de pacientes alérgicos con 10 µg/mL de rDer p 2 y de extracto *D. pteronyssinus* se observó una sobreexpresión del marcador CD203c en los basófilos de todos los pacientes (\bar{x} SI = 5.5). Mientras que DPx4 no indujo activación en ninguna de las muestras de los alérgicos (\bar{x} SI = 1.1). No se observó activación de basófilos en la muestra de un individuo sin alergia (\bar{x} SI = 1.1). Los datos descritos sugieren que DPx4 posee una menor capacidad alérgica que Der p 2 y el extracto de *D. pteronyssinus*, Fig 28.



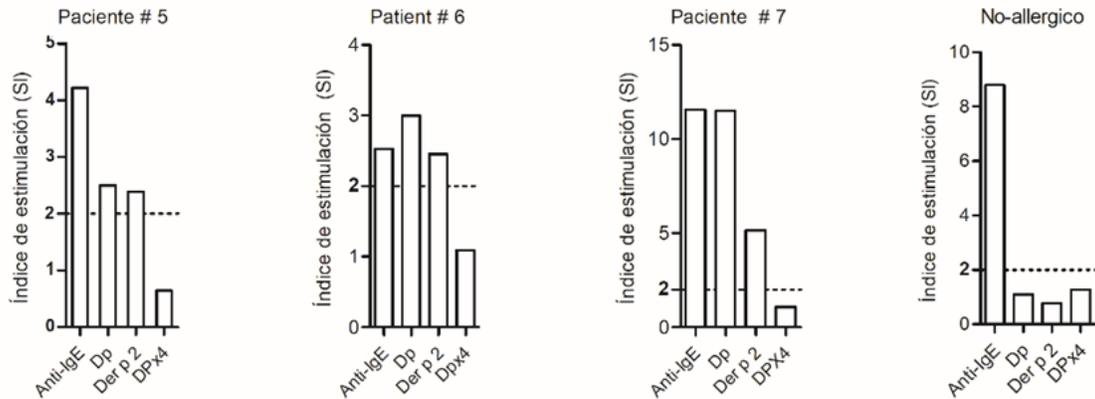


Figura 28. Ensayo de activación de basófilos.

Índice de estimulación (SI) obtenido en 7 muestras de pacientes alérgicos a los ácaros y un sujeto no alérgico expuestas a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DPx4, Der p 2, y Dp. Anti-IgE o PBS (controles). Activación positiva con $\text{SI} \geq 2$. Dp (*Dermatophagoides pteronyssinus*)

5.2.6 DPx4 induce mayores niveles de IL-10 y menores de IL-5 que el extracto de *D. pteronyssinus* en PBMC de pacientes alérgicos a los ácaros.

El extracto alergénico *D. pteronyssinus* indujo en las PMBC de los sujetos alérgicos niveles de IL-5 estadísticamente mayores que los niveles inducidos por DPx4 (1.9 $\text{pg}/\text{mL} \pm 23.2 \text{ pg}/\text{mL}$) vs. (0.38 $\text{pg}/\text{mL} \pm 3.07 \text{ pg}/\text{mL}$), $p < 0.01$, (Fig 29A).

La estimulación con DPx4 indujo niveles de IL-10 estadísticamente mayores que los inducidos por el extracto *D. pteronyssinus* (747.9 $\text{pg}/\text{mL} \pm 918.4 \text{ pg}/\text{mL}$) vs. (45.4 $\text{pg}/\text{mL} \pm 152.3 \text{ pg}/\text{mL}$), $p < 0.001$ (Fig 29B). Por otra parte, aunque se aprecia una tendencia en el incremento de $\text{IFN}\gamma$ no se hallaron diferencias significativas en los niveles de esta citoquina inducidas por los diferentes estímulos usados (Fig 29 C).

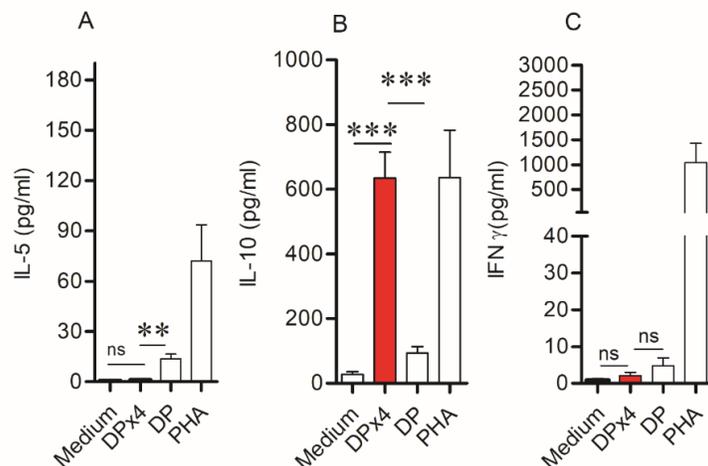


Figura 29. Niveles de citoquinas inducidos por DPx4 en cultivos de PBMC de 6 pacientes alérgicos a los ácaros.

Se cuantificaron los niveles de IL-5, IL-10 e IFN γ en el sobrenadante de cultivo celular mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de las muestras. *p <0.05, ** p<0.01 *** p<0.001. Los datos se analizaron por la prueba de Friedman. DP = *D. pteronyssinus*, PHA =Fitohemaglutinina

5.2.7 DPx4 no posee actividad de cisteína proteasa

El ensayo enzimático mostró los siguientes valores de actividad enzimática específica: 67.040×10^{-4} μ Mol/min para papaína, 48.691 μ Mol/min para DPx4 y 76.5 μ Mol/min para FABP4, lo cual indica que el DPx4 tiene aproximadamente 7.000 veces menos actividad proteasa comparada con la papaína utilizada como control positivo. La actividad enzimática obtenida de DPx4 fue similar a la obtenida con el recombinante FABP4, una proteína que carece de actividad proteasa.

5.2.8 DPx4 no mostró degradación en almacenamiento a 4°C durante tres semanas

Al analizar la estabilidad de la proteína en condiciones de almacenamiento a 4°C durante 3 semanas, no se observó ningún tipo de degradación visual de la proteína en los diferentes tiempos analizados (0 días, 3 días, 1-3 semanas) (Fig.30).

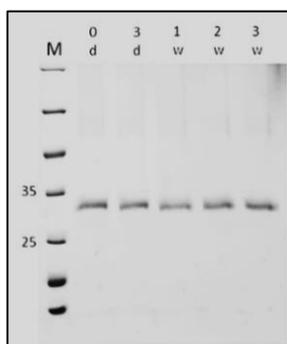


Figura 30. Análisis de la estabilidad de DPx4 después de un periodo de almacenamiento de 21 días a 4°C.

SDS-PAGE al 12 %. M: Marcador de peso molecular. Carril 0 d y 3d: Muestra almacenada 0 y 3 días respectivamente. Carril 1w, 2w y 3w: Muestra almacenada durante 1, 2 y 3 semanas, respectivamente.

5.2.9 DPx4 forma agregados de alto peso molecular

El ensayo de DLS mostró que DPx4 forma agregados moleculares de alto peso molecular con una amplia distribución de tamaños. A partir de los datos de DLS se puede estimar que los agregados consisten en aproximadamente 2000 moléculas DPx4 en su estado oxidativo (Fig 31).

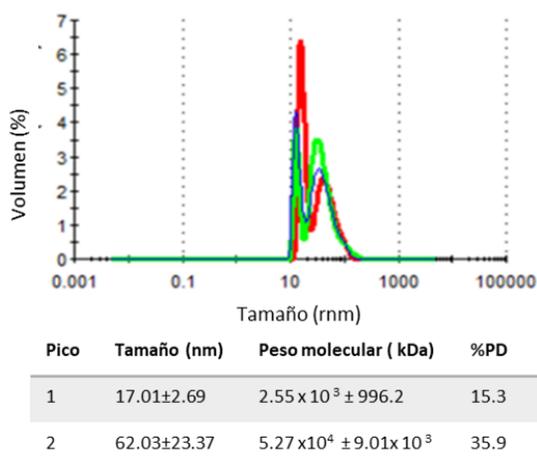


Figura 31. Resultados DLS con DPx4.

Se muestra la distribución del tamaño en r.n.m por masa de DPx4 con tres mediciones repetidas cada una. El tamaño en r.n.m, el peso molecular estimado en kDa y la polidispersidad (Pd) en porcentajes de los picos individuales se enumeran debajo de la figura.

5.2.10 La inmunización con DPx4 induce anticuerpos IgG que reaccionan con el extracto de *D. pteronyssinus* y con los alergenios purificados

Para evaluar la especificidad e inmunogenicidad de los anticuerpos IgG inducidos en ratones BALB/c por la inmunización con DPx4 se realizaron ensayos de dot-blot y ELISA.

La administración de DPx4 indujo un aumento significativo en los niveles de IgE, IgG1 e IgG2a en comparación con el grupo que recibió PBS (Fig 32A). Los niveles de IgG2 fueron significativamente mayores a los de IgG1 (Fig 32B). La relación IgG1/IgG2a en suero de los inmunizados con DPx4 mostró un valor de 0.7, mientras que en los inmunizados con el extracto de *D. pteronyssinus* esta relación fue de 1.3 (Fig 32 C), sugiriendo que DPx4 induce una respuesta humoral inclinada hacia Th1.

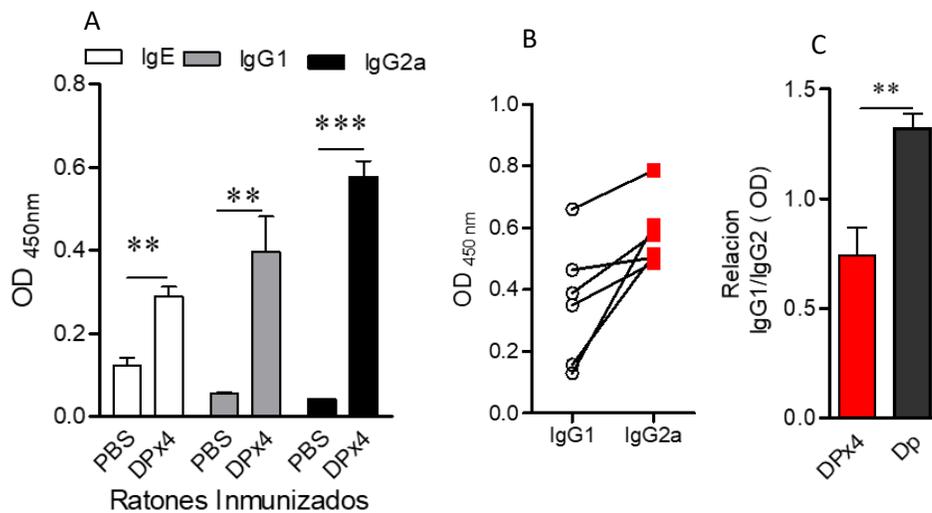


Figura 32. Niveles de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados con DPx4.

A) Reactividad IgE, IgG1 e IgG2 específicos a MAVAC-BD-2 en suero de ratones inmunizados con MAVAC-BD-2 y PBS. B) Relación IgG1 e IgG2a a DPx4 (barra roja) y al extracto (barra negra). Los datos corresponden a la media \pm SEM (n=6/grupo), **p<0.01.

Al evaluar la reactividad anti-IgG a DPx4 frente al extracto de *D. pteronyssinus* y alergenios recombinantes mediante Dot-blot, se observó reactividad frente a DPx4, y el extracto de *D. pteronyssinus*. No se observó reactividad frente al antígeno no relacionado Bet v 1 ni se observó reactividad con un pool de suero preinmune frente a la proteína, (Fig 33).

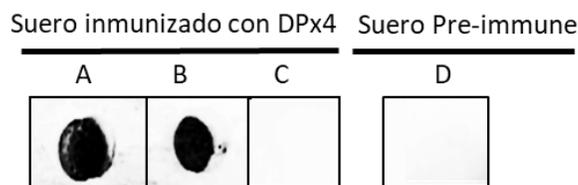


Figura 33. Reactividad de anticuerpos IgG inducidos en ratones BALB/c inmunizados con DPx4.

Las proteínas se pegaron en la membrana de nitrocelulosa como se indica: A) *D. pteronyssinus*, B) DPx4, C) Bet v 1 y D) DPx4. Las membranas se incubaron con un pool de sueros de ratones inmunizados con DPx4 (A- C) y con un pool de sueros pre-inmune (D).

Al comparar los niveles de anticuerpos inducidos en ratones inmunizados con DPx4 y el extracto de *D. pteronyssinus* (grupo alérgico), en el grupo de ratones inmunizado con DPx4 se observó un incremento significativo en los niveles de IgG2a (* $p < 0.05$), acompañado con menor producción de IgE (* $p < 0.05$) e IgG1 (** $p < 0.001$), respecto al grupo alérgico, que mostró una respuesta humoral características de un estado alérgico con un incremento en los niveles séricos de anticuerpos IgE e IgG1 específicos, (Fig 34).

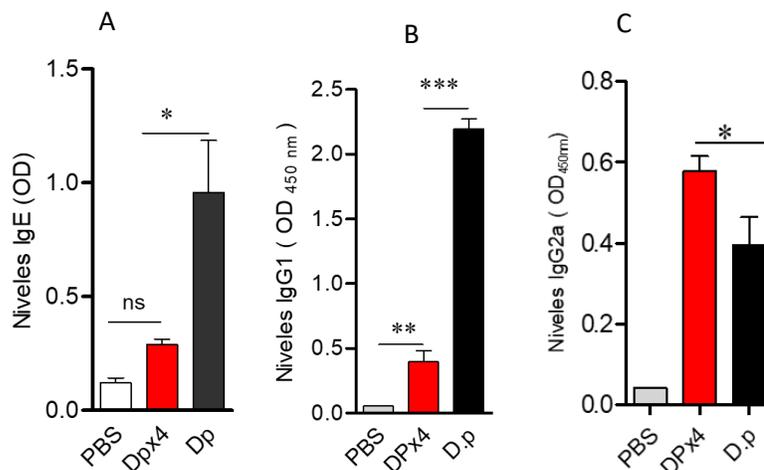


Figura 34. Reactividad de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados con DPx4 y *D. pteronyssinus* por ELISA.

A) Niveles de IgE. B) Niveles de IgG1. C) Niveles de IgG2a. Los datos corresponden a la media \pm SEM (n=7/grupo DPx4; n=6/grupo Dp). Dp= extracto de *D. pteronyssinus*. Test de ANOVA, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. ns= No significativo.

5.2.11 Los anticuerpos IgG específicos a DPx4 inhiben la unión de la IgE humana hacia el extracto de ácaros y alergenios purificados.

La capacidad de la IgG específica a DPx4 de inhibir la unión de la IgE de 9 pacientes alérgicos al extracto de *D. pteronyssinus* y alergenios purificados se evaluó por inhibición de ELISA. Los anticuerpos IgG específicos a DPx4 inhibieron la unión de la IgE de pacientes hacia el extracto de *D. pteronyssinus* entre un 39% y 78% (\bar{X} inhibición= 59%). La inhibición de la unión de IgE en suero de un individuo sano por la anti-IgG a DPx4 alcanzó solo el 6%, Tabla 11.

Al evaluar la actividad bloqueadora frente alergenios purificados, se encontró que la IgG a DPx4 inhibió la reactividad IgE del suero de alérgicos hacia Der p 1 entre 5.3% y 65% (\bar{X} inhibición= 40%) y hacia Der p 2 entre un 1.8% y 76.8% (\bar{X} inhibición = 33%), (Tabla 11).

Tabla 11. Inhibición de la reactividad IgE hacia *D. pteronyssinus* en suero de alérgicos, por anticuerpos IgG de ratón inmunizado con DPx4

<i>D. pteronyssinus</i> en fase sólida			
Niveles de IgE (OD)			
Pacientes	pre-immune	Inmunizado	% inhibición
1	2.564	1.232	52
2	2.963	1.095	63
3	2.658	0.939	65
4	2.421	0.963	60
5	0.695	0.258	63
6	0.486	0.185	62
7	0.315	0.193	39
8	2.014	0.901	53
9	0.683	0.147	78
Promedio	2.524	1.164	59
No- Alérgico	0.087	0.093	6

Tabla 12. Inhibición de la reactividad IgE a Der p 1 y Der p 2 en sueros de alérgicos por anticuerpos IgG de ratón inmunizados con DPx4

Paciente	Der p 1 en fase sólida			Der p 2 en fase sólida		
	Niveles de IgE (DO)					
	pre incubado con			pre incubado con		
	Pre-inmune	Inmunizado	% de inhibición	Pre-inmune	Inmunizado	% de inhibición
1	3.391	1.958	42.3	3.362	2.339	30.4
2	3.347	1.174	65	3.376	2.577	23.7
3	3.435	3.254	5.3	3.366	3.305	1.8
4	1.607	0.376	76.6	0.889	0.206	76.8
Promedio	3.02	1.95	40	2,6	2.1	33
No alérgico	0.06	0.09	0	0.05	0.05	0

5.2.12 DPx4 no induce hiperreactividad de las vías respiratorias al reto con metacolina en ratones

Los ratones inmunizados con DPx4 presentaron menor hiperreactividad de las vías respiratorias en respuesta al reto con metacolina comparado con los ratones inmunizados con el extracto de *D. pteronyssinus*, los cuales presentaron significativamente mayores signos de inflamación de las vías respiratorias a la dosis de metacolina 25 mg/mL, (Fig 35).

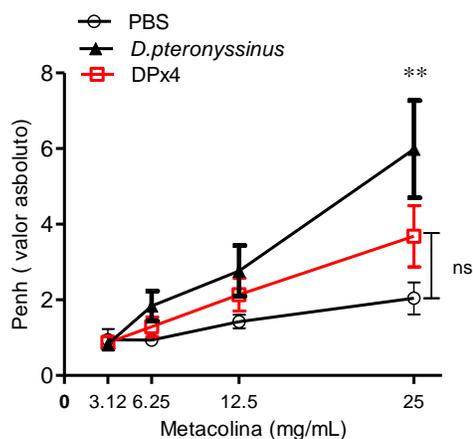


Figura 35. Evaluación de la hiperreactividad de las vías respiratorias al reto con metacolina en ratones inmunizados con DPx4.

La medición se realizó usando el pletismógrafo de cuerpo entero (Buxco). Los datos se expresan mediante el parámetro Penh. Los datos se presentan como la media \pm SEM. Los resultados se analizaron mediante el test de ANOVA de dos vías. ** $p < 0.01$ grupo inmunizado con DPx4 vs el grupo inmunizado con *D. pteronyssinus*.

5.2.13 Disminución de la respuesta inflamatoria in vivo en ratones inmunizados con DPx4.

En la prueba de PCA con antisuero obtenido en ratones inmunizados con DPx4, se observó una menor extravasación del colorante azul de Evans que el grupo que recibió antisuero de ratones inmunizados con el extracto, los cuales presentaron un incremento en la permeabilidad vascular con la consecuente extravasación del colorante ($p < 0.01$) (Fig 36A). La extravasación del colorante inducida por antisueros específico a DPx4 es similar a la observada con el antisuero del grupo control (Fig 36B)

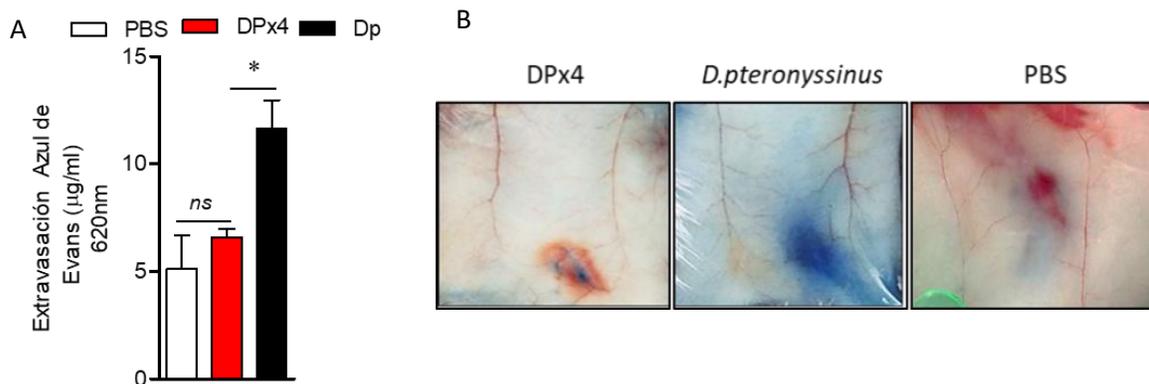


Figura 36. Prueba de anafilaxia cutánea pasiva.

A) Gráficas representativas de la cuantificación del contenido de azul de Evans extravasado al tejido de la piel de los ratones. B) Las imágenes fotográficas representan la extravasación del colorante en la piel de abdomen de los ratones "naive" donde se inyectó el suero proveniente de ratones inmunizados con DPx4, Dp y PBS. Los datos se representan la media \pm SD. * $P < 0.05$. Anova de un factor. ns= No significativo

6 DISCUSIÓN

Para la selección de los alérgenos de los ácaros que hacen parte de las moléculas híbridas se consideró la frecuencia de sensibilización de estos alérgenos en nuestra población (31). Para la selección de los segmentos de los alérgenos seleccionados, se tomó la información sobre los estudios de mapeo de epítopes B de unión a IgE que estaban disponibles al momento en que se diseñaron (año 2010). Los alérgenos del grupo 1 y 2 son alérgenos clínicamente importantes, debido a su alta frecuencia de sensibilización en alérgicos a los ácaros, por lo que se consideran componentes esenciales que deberían estar incluidos en los paneles de alérgenos para el diagnóstico y vacunas para las alergias por ácaros (39). De hecho, existen moléculas hipoalérgicas construidas con la combinación de estos alérgenos que muestran buenas propiedades para ofrecer tratamiento de las alergias, por su baja capacidad de unión a IgE y baja actividad alérgica (84, 85). Blo t 5 es un alérgeno de gran importancia en las regiones tropicales y subtropicales, con frecuencia de reactividad IgE entre 70% y 80% en pacientes alérgicos a los ácaros en estas regiones; por lo tanto se ha sugerido que debe incluirse en la formulación de productos para el diagnóstico o la inmunoterapia en estas regiones (36).

Los alérgenos del grupo 7, 8 y 10 aunque muestran una baja frecuencia de reactividad IgE en pacientes alérgicos a los ácaros son importantes inductores de reacción alérgica en algunos pacientes (37, 39, 40). La selección del segmento de Der p 7 también obedeció al hecho que durante el proceso de diseño se observó que al introducir los segmentos cortos de este alérgeno en la molécula DPx4 se mejoraron los parámetros estructurales del modelo 3D, como el aumento en el número de aminoácidos en las regiones favorecidas, según el gráfico de Ramachandran y un mejor valor de puntuación Z para la predicción de la calidad global y local de la estructura según ProSA-web. Por lo que segmentos de este alérgeno están incluidos en la molécula DPx4.

Con el concepto que la combinación de alérgenos importantes como Der p 1 y Der p 2 junto con otros alérgenos de menor frecuencia de reactividad como Der p 10 se

incrementa la probabilidad de un diagnóstico apropiado de la población alérgica a los ácaros y por tanto se mejora la selección de candidatos para IEA, nos planteamos la hipótesis que un número importante de pacientes alérgicos a los ácaros podría ser diagnosticado con la combinación de estos particulares alergenos y que la construcción de una sola molécula representando sus epítopes, podría servir para el desarrollo de una vacuna para las alergias inducidas por ácaros.

En este estudio se destaca haber logrado la expresión de dos proteínas híbridas recombinantes diseñadas *in-silico* en un sistema procariota que permitió la obtención de las proteínas recombinantes, conservando parte los epítopes B de los alergenos con que fueron escogidos para su diseño (resultados de los ensayos de Dot blot con monoclonales e inhibición de ELISA). Una de las principales etapas de esta investigación estuvo enfocada a la puesta a punto de la expresión de las proteínas híbridas en el sistema de expresión procariota *E. coli*. Las proteínas se obtuvieron en cuerpos de inclusión, lo cual no es sorprendente, ya que muchos de los polipéptidos recombinantes producidos en *E. coli* se localizan en el citoplasma en forma insoluble y compacta debido a plegamientos intermedios y no nativos (98).

Diferentes reactivos se utilizan para solubilizar las proteínas y eliminar los cuerpos de inclusión, como sarkosyl, cloruro de guanidina y el Ditiotreitól (DTT). Sin embargo, la urea ha tenido una mayor aplicación en los últimos tiempos y es especialmente recomendada en proteínas con etiquetas de histidina, como las proteínas de este trabajo (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). La aplicación del buffer de urea 8 M permitió recuperar satisfactoriamente las proteínas de los cuerpos de inclusión y su purificación por cromatografía de afinidad en condiciones desnaturalizantes. Para que las proteínas recuperaran su plegamiento se eliminó la urea mediante diálisis. En la literatura existen multitud de sistemas para realizar la renaturalización de las proteínas, en nuestro caso, se usó la re-naturalización con cisteína/cistina asistida con arginina. Este procedimiento permitió obtener las proteínas parcialmente plegadas como lo indican los estudios de dicróismo circular. Las proteínas recombinantes diseñadas *in silico* mostraron elementos de estructuras secundarias propios de proteínas que se encuentran en la naturaleza.

Con características estructurales que mostraron actividad antigénica e inmunológica como lo revelan los ensayos de unión a anticuerpos IgE e IgG mediante ELISA, dot-blot y los ensayos en el modelo animal.

Para conocer la capacidad de estas proteínas de unir anticuerpos de tipo IgE, se analizó la reactividad IgE en alérgicos a los ácaros del polvo doméstico mediante ELISA y dot blot. Los resultados con ELISA mostraron que MAVAC-BD-2 tiene una frecuencia de reactividad IgE del 40% en los sueros de alérgicos a los ácaros y niveles de IgE significativamente menores que los obtenidos con Der p 1, Der p 2, Blo t 5 y los extractos de ácaros (Fig 7). De otro lado, DPx4 mostró una frecuencia de reactividad IgE del 45% y niveles de IgE significativamente menores que los obtenidos con Der p 1, Der p 2 y el extracto de *D. pteronyssinus* (Fig 23). Estos resultados indican que un alto porcentaje de los alérgicos no fueron detectados con estas moléculas y por lo tanto su valor para diagnóstico de alergia a los ácaros sería pobre. Un análisis en un mayor número de alérgicos se debería realizar para seguir explorando este uso. No obstante, esta reactividad IgE comparativamente más baja, sugiere que parte de la actividad específica hacia los alérgenos nativos se mantiene y puede explorarse su utilidad en el desarrollo de vacunas para inmunoterapia.

Como se mencionó anteriormente los mecanismos por los cuales la IEA disminuye la inflamación alérgica incluyen cambios celulares y humorales. Entre los cambios humorales se halla la producción de anticuerpos IgG específicos, especialmente de la subclase IgG4 (99). Es interesante observar que las proteínas híbridas muestran reactividad IgG con todos los sueros analizados (Fig 9 y Fig 25) indicando que tienen capacidad antigénica, probablemente debido a que tienen representados epítopes B de los alérgenos naturales. Esta característica puede ser ventajosa si se piensa en su utilidad para el tratamiento de las alergias a los ácaros, ya que en un esquema de inmunoterapia la inducción de IgG en alérgicos podría activar mecanismos anti-alérgicos (57, 59, 61, 63), que suprimirán o contrarrestarán la respuesta inflamatoria de tipo Th2.

La medición de la expresión del marcador de activación de basófilos humanos (CD203c) mediante citometría de flujo, es aceptada como un método rápido y

sensible para estimar la actividad alérgica de alérgenos y sus derivados (100). Al evaluar la actividad alérgica de las proteínas híbridas en función de la expresión del marcador CD203c, se observó que inducen una baja o nula activación de basófilos, en comparación con el alérgeno Der p 2 y con los extractos de ácaros, a pesar que MAVAC-BD-2 y DPx4 unen IgE (ensayos de Elisa, Dot blot). Esto sugiere que de ser aplicadas en un esquema de inmunoterapia apropiado estas proteínas podrían tener una menor probabilidad de inducir efectos adversos mediados por la IgE, ya que tienen menor capacidad de inducir la liberación de mediadores inflamatorios en células efectoras.

Estos resultados podrían explicarse por el plegamiento parcial que adoptan las proteínas, lo que puede influir en la posición y orientación relativa de los epítopes de unión a IgE en la superficie, resultando en una menor afinidad de la unión antígeno-anticuerpo, afectando el entrecruzamiento de los anticuerpos IgE unidos a receptores FcεRI adyacentes y en consecuencia produciendo una menor degranulación de los basófilos.

Es probable que la formación de agregados por las moléculas híbridas constituya otra característica fisicoquímica que contribuya en la baja capacidad de unión a IgE y actividad alérgica de estas proteínas. En moléculas recombinantes para el diagnóstico y el tratamiento de las alergias las propiedades fisicoquímicas de estas tales como la solubilidad, estabilidad, glicosilación, la formación de agregados y cambios conformacionales en su estructura pueden ocultar epítopes B, influyendo directamente en su capacidad alérgica. Por ejemplo, la isoforma Bet v 1d (101), el trímero Bet v 1 (102), un derivado hipoalérgico de Fel d 1 (103) y la molécula híbrida Phl p 5- Bet v 1 (104), forman agregados de alto peso molecular lo cual modifica los epítopes de unión a IgE accesibles en la superficie de estas moléculas desfavoreciendo el entrecruzamiento de la IgE en los basófilos y disminuyendo su alergenidad. El análisis DLS mostró que MAVAC-BD-2 y DPx4 forman agregados de alto peso molecular. Hipotetizamos que similar a los estudios arriba señalados el estado agregado de MAVAC-BD-2 y DPx4 podría influir en sus propiedades alérgicas, alterando la presentación espacial de los epítopes IgE en la superficie

de la molécula, lo que explicaría en parte la baja unión a IgE y la baja actividad alérgica obtenida con sueros de alérgicos a los ácaros. Sin embargo, la formación de agregados puede ser un problema no solo en medicina, sino también en aplicaciones biotecnológicas, farmacéuticas y en la industria alimentaria que involucran la producción de proteínas, ya que podría afectar la estabilidad y la reproducibilidad de los efectos biológicos de las proteínas. En este sentido, será necesario aplicar buenas prácticas de manufacturas que garanticen una reproducibilidad de estos agregados y estandarizar su comportamiento y estabilidad en la preparación farmacéutica. De otra parte, se podría ensayar sistemas de expresión de proteínas que eviten la formación de agregados. Hay que tener en cuenta que en este caso se puedan afectar las propiedades biológicas mostradas por estas proteínas.

El monoclonal anti-4C1 con especificidad para Der p 1 mostró reactividad frente a DPx4 y MAVAC-BD-2 indicando la presencia de epítopes que contiene los a.a Glu¹³, Arg¹⁷, Gln¹⁸ y Asp¹⁹⁸ descritos en estas moléculas (105, 106). Por otra parte, el monoclonal anti-Der p 2 (Dpx-A9), también mostró reactividad frente a las moléculas híbridas, sugiriendo, que estas proteínas conservan parte de los epítopes B de los alérgenos nativos Der p 1 y Der p 2. Los residuos 47 a 52 y 101 a 102 que pertenecen a epítopes de Der p 2 reconocidos por este monoclonal están presentes en DPx4 y MAVAC-BD-2 respectivamente (107). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición del ELISA con una mezcla de sueros humanos, donde DPx4 inhibió la reactividad IgE hacia el extracto de *D. pteronyssinus* y hacia Der p 1 en un 38% y 35%, respectivamente y donde MAVAC-BD-2 inhibió la unión IgE hacia el extracto de *B. tropicalis* y Blo t 5 en un 20% y 26%, respectivamente. Los resultados en los ensayos de dot-blot, junto con la inhibición de ELISA indican que las moléculas híbridas tienen epítopes B relevantes de los alérgenos de ácaros.

Los porcentajes de inhibición de la reactividad IgE hacia los extractos y los alérgenos recombinantes por las dos proteínas híbridas en ningún caso alcanzaron una inhibición del 50%, resultado predecible ya que estas proteínas están

constituidas solo por segmentos de cuatro a siete alergenos representando solo un pequeño porcentaje de todos los epítopes B de los alergenos presentes en el extracto alergénico y en un alérgeno purificado completo. Estos resultados también podrían depender del plegamiento parcial y la formación de agregados que presentan los híbridos, que como se mencionó anteriormente podrían ocultar o alterar los epítopes B. La naturaleza de los sueros usados para preparar las mezclas de sueros (pools) también puede estar influyendo en estos hallazgos, ya que al usar una mezcla de sueros con un repertorio de anticuerpos de diferentes especificidades a los alergenos que están representados en las proteínas se podría modificar el porcentaje de inhibición.

Estudios complementarios deberán realizarse en el futuro, como por ejemplo investigar la inhibición de la reactividad IgE hacia los otros alergenos representados en sus estructuras, proporcionando mayor claridad sobre cuáles son los epítopes B de los alergenos de ácaros que se conservan en las moléculas.

Es de notar que el porcentaje de inhibición de la reactividad IgE hacia Der p 2 por DPx4 alcanzó solo el 26%, comparado con el 38% de inhibición de la reactividad IgE hacia Der p 1. Esta diferencia puede ser explicada en gran parte, por el bajo porcentaje de la secuencia de Der p 2 que está presente en la estructura de DPx4 (11.4%) comparado con el 79% de secuencia de Der p 1 presente en ésta proteína híbrida.

El ensayo de actividad de cisteína proteasa mostró que DPx4 carece de actividad de proteasa, ya que su actividad fue 7000 veces menor que la actividad de la papaína que se usó como control positivo. Esta actividad se observó a pesar de que la estructura primaria de DPx4 conserva la secuencia de cisteína proteasa y que el análisis bioinformático predice que los residuos esenciales para el sitio activo de la proteasa existen en DPx4. La ausencia de esta actividad podría deberse a que la estructura que adopta DPx4 impide mostrar el sitio activo para la unión al sustrato. Esta característica podría representar una ventaja para el uso de DPx4 en IEA ya que permitiría administrar dosis más altas y lograr la eficacia en menor tiempo, con menores efectos adversos. La actividad de proteasa de alergenos como el Der p 1

se ha asociado con la respuesta alérgica al inducir una serie de cambios en las células epiteliales que favorecen el desarrollo de la inflamación alérgica. Por ejemplo, en el estudio realizado por Gough y colaboradores quienes en un modelo murino demostraron que la inmunización con Der p 1 inactivado por el inhibidor de la cisteína proteasa E-64, indujo una disminución significativa en la producción de IgE total y específica, sugiriendo que la respuesta inmune a este alérgeno puede modularse alterando su actividad proteolítica (108). Recientemente, se halló que una amplia variedad de alergenios ambientales con actividad de proteasa, regulan la activación de la IL-33 lo que promueve la producción de citoquinas inflamatorias como la IL-4, IL-5, IL-13 en las células ILC2 (27), sustentando el papel esencial de la inmunidad innata en el desarrollo de las enfermedades alérgicas. Lo anterior ha promovido el diseño de estrategias para inhibir la actividad de cisteína proteasa del alérgeno Der p 1 con el fin de obtener nuevas vacunas para el tratamiento de las alergias.

La evaluación de la reactividad IgE e IgG, así como también la actividad alérgica *in vitro* de una molécula hipoalérgica es importante para conocer su potencial utilidad para el tratamiento de las alergias. Además, es necesario determinar la capacidad de modular el balance de citoquinas del perfil Th2 hacia el perfil Th1 o de inducir la activación de linfocitos T reg.

La IL-10 es una citoquina involucrada en los mecanismos reguladores de la respuesta alérgica que promueve la producción de IgG4, regula la activación y proliferación de linfocitos Th2 y suprime la producción de IgE (69, 72). Es conocido que al estimular PBMC de sujetos alérgicos con el alérgeno sensibilizantes se induce la secreción de citoquinas del perfil Th2 (109). En este escenario, las moléculas diseñadas para el tratamiento de las alergias deberían modular la respuesta hacia un fenotipo más tolerogénico, aumentando la secreción de citoquinas de perfil Treg y/o Th1 en favor de la disminución de la respuesta celular Th2. Los resultados de la estimulación de PBMC indican que los híbridos son capaces de inducir un aumento significativo en la producción de IL-10 en células de alérgicos al mismo tiempo que inducen una menor secreción de IL-5, citoquina

relacionada con la inflamación y el reclutamiento de eosinófilos en los procesos alérgicos (110). Estos datos sugieren que MAVAC-BD-2 y DPx4 inducen una respuesta inmune diferente a la clásica respuesta Th2 alérgica. En nuestra opinión, es probable que MAVAC-BD-2 y DPx4 puedan durante el curso de una inmunoterapia, alterar el fenotipo Th2 establecido en pacientes alérgicos creando un ambiente tolerogénico con producción de IL-10, lo que a su vez favorecería la producción de IgG4 bloqueadora y la disminución de la síntesis de IgE. Para sustentar mejor esta opinión, es necesario analizar la capacidad de estas proteínas en modular la actividad de las células efectoras de la respuesta Th2.

La secreción de IFN γ , principal citoquina efectora de la vía Th1, que no interviene en los efectos producidos por MAVAC-BD-2 y DPx4, ya que se hallaron niveles similares de esta citoquina en las condiciones de cultivo con y sin estímulo.

Hay que señalar varias limitaciones en los estudios con las PBMC, que llaman a tomar con cautela estos resultados, por lo que en el futuro se requerirá realizar experimentos que permitan resultados más concluyentes, como, por ejemplo: evaluar un mayor número de muestras de pacientes alérgicos; ampliar el panel de citoquinas analizadas que incluya la cuantificación de los niveles de IL-13, IL-17, TGF β y de esta forma establecer un patrón de secreción diferencial inducido por las proteínas híbridas. Igualmente será necesario identificar la fuente de producción de la IL-10, ya que esta citoquina es producida por diferentes células que están presentes en las PBMC tales como CD, monocitos y linfocitos B.

La respuesta inmune *in vivo* inducida por las proteínas híbridas, se evaluó en un modelo agudo de inflamación alérgica. Se eligió la cepa BALB/c para realizar nuestros experimentos por varios motivos. En estudios previos de nuestro grupo donde se utilizó esta cepa, Zakzuk y colaboradores (95), lograron inducir una respuesta inflamatoria de tipo Th2 con la administración intraperitoneal del extracto de *B. tropicalis*, induciendo niveles elevados de IgE y una mayor hiperreactividad bronquial e inflamación de las vías respiratorias en comparación con el grupo control al que se le administró PBS. La cepa BALB/c a pesar de que no desarrolla asma bronquial de forma espontánea, presenta una gran susceptibilidad para desarrollar

una respuesta Th2 y se ha usado ampliamente para evaluar la capacidad alergénica de proteínas y para evaluar nuevas moléculas para inmunoterapia (111).

Al evaluar el efecto que tienen las proteínas híbridas en el modelo de inflamación alérgica, se observó que éstas inducen una respuesta inmune humoral con mayor peso del perfil Th1, como es sugerido por la baja relación IgG1/IgG2a (0.46 para MAVAC-BD-2 y 0.7 para DPx4). Estos resultados sugieren que se generaron moléculas con gran capacidad inmunogénica, propiedad esencial para su posible uso como vacunas.

Por otra parte, al comparar los niveles de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a inducidos en ratones se encontró que la administración de las moléculas híbridas en los ratones produjo mayores niveles séricos significativamente mayores de IgG2a específicos, junto con niveles significativamente menores de IgE e IgG1, que los producidos en los ratones inmunizados con los extractos de ácaros, que como se esperaba mostraron una respuesta humoral tipo Th2 característica del modelo de inflamación alérgica. Estos resultados sugieren que MAVAC-BD-2 y DPx4 pueden inducir una respuesta inmune humoral inclinada hacia el perfil Th1 aún en presencia del adyuvante de Al(OH)₃, usado en la inmunización.

Los ratones inmunizados con MAVAC-BD-2 y DPx4 produjeron altos títulos de IgG2a que a su vez reaccionaron con los extractos de ácaros y alergenos purificados. No se observó reactividad hacia antígeno no relacionado, apoyando la antigenicidad y especificidad inducida por las proteínas híbridas. También se observó que los anticuerpos IgG anti MAVAC-BD-2 tienen la capacidad de inhibir la unión a IgE en sueros alérgicos hacia los extractos *D. pteronyssinus* (\bar{X} = 86%) y *B. tropicalis* (\bar{X} = 57%), como también hacia Blo t 5 (\bar{X} = 43%) y Der p 2 (\bar{X} = 61%). Los anticuerpos IgG anti DPx4 mostraron la capacidad de inhibir la unión a IgE en sueros alérgicos a los ácaros hacia el *D. pteronyssinus* (\bar{X} = 59%), hacia Der p 1 (\bar{X} = 40%) y Der p 2 (\bar{X} = 33%). Estos resultados sugieren que las dos proteínas híbridas comparten epítopes comunes con los alergenos naturales y que tienen requerimientos estructurales para inducir una respuesta inmune adaptativa que podría proteger contra futuras exposiciones a los alergenos naturales. La capacidad

bloqueadora de la reactividad IgG es una característica clave para una potencial vacuna para las alergias inducidas por ácaros. Por otra parte, el alto porcentaje de inhibición de la reactividad IgE contra los extractos alérgicos, sugiere que MAVAC-BD-2 y DPx4 inducen también anticuerpos IgG con otras especificidades, representadas en el amplio repertorio de epítopes que se puede encontrar en un extracto de ácaro. De manera similar a nuestros resultados, otros estudios han demostrado que moléculas recombinantes diseñadas para el tratamiento de las alergias, inducen la producción de anticuerpos IgG bloqueadores que inhiben la unión de la IgE humana a los alérgenos naturales en pacientes alérgicos usando ensayos de inhibición del ELISA sugiriendo que estas moléculas podrían inducir una respuesta de anticuerpos *in vivo* durante el curso de la inmunoterapia, disminuyendo la respuesta inflamatoria (81, 84, 85, 97).

El efecto bloqueador de la reactividad de la IgE humana por la IgG de ratones inmunizados con las proteínas híbridas puede explicarse por las siguientes razones: primero, por fenómenos de impedimento estérico, donde la IgG específica reconoce sitios cercanos a los epítopes de reactividad IgE y bloquea la unión de este anticuerpo a los epítopes. Segundo, la IgG generada pueda tener especificidad por las mismas regiones de epítopes de la reactividad IgE y al ocupar estos sitios, impide la reactividad de este anticuerpo. Esta última posibilidad podría estar respaldada por el hallazgo de que la inhibición de la unión a la IgE sólo se observó con sueros de pacientes alérgicos y no con sueros de individuos sanos.

Varios estudios en modelos murinos han mostrado el efecto benéfico de los anticuerpos bloqueadores en la inmunoterapia y que estos anticuerpos de tipo IgG que se producen durante el curso de la inmunoterapia están asociados con una mejoría clínica en los síntomas de alergia y en el éxito del tratamiento (61). Este efecto benéfico está relacionado con la capacidad de estos anticuerpos de bloquear la unión del alérgeno hacia la IgE anclada sobre la célula efectora; por lo tanto inhiben de una parte la degranulación de mastocitos y basófilos y de otra parte la presentación antigénica facilitada por la IgE (60). También brindan protección a través de la formación del complejo IgG/FcγRIIb en linfocitos B y células efectoras

(61). En este contexto, bajo un esquema de inmunoterapia, la administración de estas proteínas podría activar estos mecanismos anti-alérgicos. Este tipo de actividad ha sido demostrado con otras moléculas hipoalergénicas candidatas para el tratamiento de las alergias (81, 84, 97).

En este estudio se evaluó el efecto por la administración de las proteínas híbridas sobre la respuesta de las vías respiratorias en los ratones. Los resultados sugieren que las proteínas MAVAC-BD-2 y DPx4 inducen menores signos de inflamación de las vías respiratorias que los extractos de ácaros, como lo señalan los valores significativamente más bajos de Penh obtenidos frente al reto con metacolina. Estos datos apoyan los resultados a nivel humoral, que sugieren que las proteínas híbridas no desencadenan una respuesta de tipo alérgico. Es notable que solo en los ratones inmunizados con MAVAC-BD-2 se observaron valores de Penh similares a los hallados en el grupo de ratones inmunizados con PBS, sugiriendo que MAVAC-BD-2 podría ser más eficiente que DPx4 para prevenir la inflamación de las vías respiratorias inducida por el alérgeno.

La capacidad de las proteínas híbridas de inducir la degranulación de mastocitos fue evaluada *in-vivo* mediante el ensayo de PCA. Los datos sugieren que, a pesar de que las proteínas híbridas tienen epítopes para la reactividad IgE e inducen la producción de anticuerpos de clase IgE, no tienen características estructurales que promuevan la degranulación de los mastocitos. Estos datos sugieren que la administración de estas proteínas en pacientes, durante el curso de una inmunoterapia, no promovería el entrecruzamiento de la IgE específica unida a los receptores FcεRI presentes en los mastocitos sensibilizados, traduciéndose en una menor liberación de mediadores inflamatorios. Por lo tanto, se esperaría que se pudieran administrar mayores dosis de estas proteínas con menor riesgo de producir efectos adversos mediados por IgE que suelen ocurrir en la inmunoterapia con extractos alérgicos. Estos resultados son bastante consistentes con los resultados obtenidos *in vitro* con los basófilos de pacientes alérgicos.

La caracterización inmunológica de estas proteínas amerita que se realicen otros estudios, por lo que se recomienda realizar investigaciones que permitan fortalecer

los datos aquí obtenidos como son: analizar la presencia de infiltrado celular y la producción de moco en el pulmón de ratones tratados con las proteínas híbridas, cuantificar niveles de citoquinas en lavado broncoalveolar y determinar la capacidad de estas proteínas de activar los linfocitos T.

7 CONCLUSIONES

- MAVAC-BD-2 y DPx4 son moléculas híbridas únicas que al estar constituidas por una combinación de epítopes de más de dos alérgenos clínicamente relevantes, permitirían la administración simultánea de componentes de varios alérgenos, y dado que los alérgicos suelen estar sensibilizados a más de un alérgeno, con estas proteínas se podría disminuir el número de alérgenos administrados en el curso de un tratamiento individualizado por componentes.
- La menor capacidad de unión a IgE y la menor alergenicidad de estas proteínas pueden explicarse en parte por el plegamiento parcial de sus estructuras y por la formación de agregados.
- MAVAC-BD-2 y DPx4 conservan epítopes B de los alérgenos nativos. Sin embargo, poseen estructuras que no favorecen el entrecruzamiento de la IgE, lo cual disminuye su actividad alérgica.
- La capacidad de inducir la secreción de IL-10 sugiere que, de aplicarse en un esquema de inmunoterapia estas proteínas se podría favorecer el desarrollo de un ambiente tolerogénico disminuyendo la respuesta alérgica establecida.
- En un enfoque IEA apropiado, estas proteínas híbridas podrían inducir anticuerpos IgG bloqueadores de la reactividad IgE que contrarresten la respuesta alérgica a los ácaros. Esta probabilidad debe analizarse con otros estudios funcionales como ensayos de inhibición de la activación de basófilos.

- La prueba de reto con metacolina en el modelo de inflamación alérgica y el ensayo de PCA indican que MAVAC-BD-2 y DPx4 inducen una menor respuesta proinflamatoria local y tienen menor alergenicidad que los extractos y los alergenios purificados.
- Las propiedades inmunológicas de estas proteínas sugieren que pueden ser útiles para el desarrollo de vacunas para inmunoterapia de las alergias inducidas por ácaros domésticos.

8 DISCUSIÓN GENERAL

Varios aspectos indican que MAVAC-BD-2 y DPx4 son moléculas con propiedades hipoalergénicas y que podrían ser útiles para el desarrollo de una vacuna para tratar la alergia a los ácaros del polvo doméstico: a) Son proteínas con estructuras secundarias definidas con capacidad de inducir una respuesta inmune, lo que permitiría su aplicación en una inmunoterapia a la medida de cada paciente; b) la baja reactividad IgE y activación de basófilos, así como la capacidad de inducir anticuerpos IgG bloqueadores de la IgE humana, son propiedades deseables en moléculas hipoalergénicas para usar en la IEA; c) las dos proteínas contienen segmentos de los dos principales alérgenos de ácaros, Der p 1 y Der p 2, como también segmentos de alérgenos del grupo 7 y 10, lo que permitiría ampliar la gama de pacientes que pueden beneficiarse con la IEA; d) tienen poca capacidad de inducir la degranulación de células efectoras; e) DPx4 carece de actividad de proteasa, un factor que contribuye a una mayor inflamación alérgica y f) son capaces de inducir la producción de citoquinas anti-alérgicas.

Por otra parte, cada una de estas moléculas mostró en los estudios pre-clínicos características que sustentan su utilidad para el desarrollo de vacunas para el tratamiento de las alergias inducidas por ácaros. DPx4 contiene segmentos antigénicos de cuatro alérgenos de la especie *D. pteronyssinus*, con una mayor contribución del alérgeno Der p 1, mientras que MAVAC-BD-2 contiene segmentos antigénicos de cuatro alérgenos de ésta especie de ácaro y tres alérgenos de *B. tropicalis*, con la mayor contribución de Der p 2 y Blo t 5. Teniendo en cuenta que la exposición a los alérgenos de *B. tropicalis* se limita principalmente a las regiones tropicales y subtropicales, se puede especular que MAVAC-BD-2 podría ser más eficaz para los pacientes alérgicos de estas regiones y especialmente pacientes que muestran sensibilización a ambas especies de ácaros. Mientras que DPx4 podría ser eficaz en pacientes alérgicos en todas las regiones del mundo donde se ha reportado la sensibilización a los alérgenos de *D. pteronyssinus*, incluidas las regiones tropicales y subtropicales.

Esta tesis ha aportado una serie de resultados que han permitido, por un lado, expresar en un sistema de expresión basado en *E.coli* proteínas híbridas diseñadas *in silico* construidas por epítopes de los principales alergenios inductores de las alergias y por otro lado, se ha logrado obtener proteínas con una menor reactividad IgE y actividad alérgica *in vitro* e *in vivo*, con capacidad de inducir la producción de anticuerpos IgG bloqueadores de la unión de IgE humana con extractos y alergenios purificados. Estos datos representan perfiles anti-alérgicos que podrían sustentar su uso en el tratamiento de las alergias por ácaros por lo que es pertinente seguir evaluando su eficacia y seguridad clínica.

9 PERSPECTIVAS

La IEA es un campo de mucha investigación en los actuales momentos, en el cual hay esperanza que surjan nuevas herramientas para detener la creciente prevalencia de las enfermedades alérgicas y aliviar a una gran parte de la población afectada. Las propiedades inmunológicas de las dos proteínas caracterizadas en esta tesis doctoral sugieren que pueden tener un gran valor para proponer un esquema de inmunoterapia novedoso y eficaz. Sin embargo, se necesitan otros estudios que permitan conocer con certeza los mecanismos que conducen a los efectos observados en el modelo murino y en los estudios *in vitro* y funcionales, en la perspectiva de aportar, por una parte, al conocimiento sobre los mecanismos que conducen a una inmunoterapia efectiva y, por otra parte, a sustentar el posible tránsito de este tipo de moléculas a la práctica clínica.

Por lo anterior, es conveniente que se adelanten estudios dirigidos a conocer que tipo de células son activadas por estas proteínas híbridas; no solo los linfocitos T efectores (Th1, Th2 y Th17) y los reguladores, sino también, el posible efecto sobre células dendríticas y células ILC2, que también pueden tener una participación importante en la regulación de la respuesta alérgica. Es recomendable también realizar investigación sobre las propiedades fisicoquímicas de estas proteínas, que puedan conducir a ofrecer un producto en una presentación farmacéutica estable, reproducible y segura para uso en humanos, bajo buenas prácticas de manufacturas.

No hay que descartar del todo, la potencial aplicación de estas dos proteínas en el desarrollo de un esquema de diagnóstico de las alergias por ácaros basado en componentes, debido a que mediante pruebas serológicas con éstas moléculas se demostró la sensibilización a los ácaros en un grupo de alérgicos. Estas dos moléculas se pueden ensayar en uso combinado con otros alérgenos purificados y en una población mayor y más diversa. Así, sería posible tener una mayor aproximación a su posible valor para el diagnóstico.

10 REFERENCIAS

1. 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. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2004;93(6):568-74.
2. 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 pulmonary medicine*. 2012;12:17.
3. Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(3):218-30.
4. 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.
5. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):445-54.
6. Punnonen J, Yssel H, de Vries JE. The relative contribution of IL-4 and IL-13 to human IgE synthesis induced by activated CD4+ or CD8+ T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;100(6 Pt 1):792-801.
7. Selb R, Eckl-Dorna J, Neunkirchner A, Schmetterer K, Marth K, Gamper J, et al. CD23 surface density on B cells is associated with IgE levels and determines IgE-facilitated allergen uptake, as well as activation of allergen-specific T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(1):290-9 e4.
8. Romagnani S. Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;113(3):395-400.
9. Soroosh P, Doherty TA. Th9 and allergic disease. *Immunology*. 2009;127(4):450-8.
10. Ubel C, Graser A, Koch S, Rieker RJ, Lehr HA, Muller M, et al. Role of Tyk-2 in Th9 and Th17 cells in allergic asthma. *Scientific reports*. 2014;4:5865.
11. Borish L, Aarons A, Rumblyrt J, Cvietusa P, Negri J, Wenzel S. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;97(6):1288-96.
12. Halim TY, Steer CA, Matha L, Gold MJ, Martinez-Gonzalez I, McNagny KM, et al. Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. *Immunity*. 2014;40(3):425-35.
13. Klein Wolterink RG, Kleinjan A, van Nimwegen M, Bergen I, de Bruijn M, Levani Y, et al. Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma. *Eur J Immunol*. 2012;42(5):1106-16.
14. Davidson CE, Asaduzzaman M, Arizmendi NG, Polley D, Wu Y, Gordon JR, et al. Proteinase-activated receptor-2 activation participates in allergic sensitization to house dust mite allergens in a murine model. *Clin Exp Allergy*. 2013;43(11):1274-85.
15. Redecke V, Hacker H, Datta SK, Fermin A, Pitha PM, Broide DH, et al. Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol*. 2004;172(5):2739-43.
16. Fernandez-Caldas E, Puerta L, Caraballo L. Mites and allergy. *Chemical immunology and allergy*. 2014;100:234-42.
17. Manolio TA, Barnes KC, Naidu RP, Levett PN, Beaty TH, Wilson AF. Correlates of sensitization to *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus* in asthma in Barbados. *International archives of allergy and immunology*. 2003;131(2):119-26.

18. Kuo IC, Yi FC, Cheong N, Shek LP, Chew FT, Lee BW, et al. Sensitization to *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*-a comparative study between Singapore and Taiwan. *Asian Pacific journal of allergy and immunology*. 1999;17(3):179-88.
19. Fernandez-Caldas E, Baena-Cagnani CE, Lopez M, Patino C, Neffen HE, Sanchez-Medina M, et al. Cutaneous sensitivity to six mite species in asthmatic patients from five Latin American countries. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 1993;3(5):245-9.
20. Martinez Jimenez NE, Aguilar Angeles D, Rojas Ramos E. [Sensitization to *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*, *farinae* and *siboney* prevalence in patients with rhinitis, allergic asthma, or both, in a population of a metropolitan area of Mexico City]. *Revista alergologia Mexico*. 2010;57(1):3-10.
21. Puerta L, Fernandez-Caldas E, Lockey RF, Caraballo LR. Mite allergy in the tropics: sensitization to six domestic mite species in Cartagena, Colombia. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 1993;3(4):198-204.
22. Zakzuk J, Acevedo N, Cifuentes L, Bornacelly A, Sanchez J, Ahumada V, et al. Early life IgE responses in children living in the tropics: a prospective analysis. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2013;24(8):788-97.
23. Tovey ER, Chapman MD, Platts-Mills TA. Mite faeces are a major source of house dust allergens. *Nature*. 1981;289(5798):592-3.
24. Meno KH, Kastrup JS, Kuo IC, Chua KY, Gajhede M. The structure of the mite allergen Blo t 1 explains the limited antibody cross-reactivity to Der p 1. *Allergy*. 2017;72(4):665-70.
25. Schulz O, Sewell HF, Shakib F. Proteolytic cleavage of CD25, the alpha subunit of the human T cell interleukin 2 receptor, by Der p 1, a major mite allergen with cysteine protease activity. *The Journal of experimental medicine*. 1998;187(2):271-5.
26. Kato T, Takai T, Fujimura T, Matsuoka H, Ogawa T, Murayama K, et al. Mite serine protease activates protease-activated receptor-2 and induces cytokine release in human keratinocytes. *Allergy*. 2009;64(9):1366-74.
27. Cayrol C, Duval A, Schmitt P, Roga S, Camus M, Stella A, et al. Environmental allergens induce allergic inflammation through proteolytic maturation of IL-33. *Nature immunology*. 2018;19(4):375-85.
28. Derewenda U, Li J, Derewenda Z, Dauter Z, Mueller GA, Rule GS, et al. The crystal structure of a major dust mite allergen Der p 2, and its biological implications. *J Mol Biol*. 2002;318(1):189-97.
29. Trompette A, Divanovic S, Visintin A, Blanchard C, Hegde RS, Madan R, et al. Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature*. 2009;457(7229):585-8.
30. Posa D, Perna S, Resch Y, Lupinek C, Panetta V, Hofmaier S, et al. Evolution and predictive value of IgE responses toward a comprehensive panel of house dust mite allergens during the first 2 decades of life. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(2):541-9 e8.
31. Jimenez S. PL, Chua., Mercado D., Caraballo L. IgE Antibody Response to Recombinant Allergen of *Blomia tropicalis* and *D. pteronyssinus* in a tropical environment. *Allergy Clin Immunol Int J World Allergy Organ*. 2007;9:233-8.
32. 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. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2003;111(3):603-9.
33. 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. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2011;22(2):202-10.

34. Arruda LK, Vailes LD, Fernandez-Caldas E, Naspitz CK, Montealegre F, Chapman MD. Use of recombinant group 5 allergens to investigate IgE-mediated sensitization to *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Advances in experimental medicine and biology*. 1996;409:173-6.
35. 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.
36. Caraballo L, Mercado D, Jimenez S, Moreno L, Puerta L, Chua KY. Analysis of the cross-reactivity between BtM and Der p 5, two group 5 recombinant allergens from *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *International archives of allergy and immunology*. 1998;117(1):38-45.
37. Mueller GA, Edwards LL, Aloor JJ, Fessler MB, Glesner J, Pomes A, et al. The structure of the dust mite allergen Der p 7 reveals similarities to innate immune proteins. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(4):909-17 e4.
38. Shen HD, Chua KY, Lin WL, Chen HL, Hsieh KH, Thomas WR. IgE and monoclonal antibody binding by the mite allergen Der p 7. *Clin Exp Allergy*. 1996;26(3):308-15.
39. 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.
40. Acevedo N, Mohr J, Zakzuk J, Samonig M, Briza P, Erler A, et al. Proteomic and immunochemical characterization of glutathione transferase as a new allergen of the nematode *Ascaris lumbricoides*. *PloS one*. 2013;8(11):e78353.
41. O'Neill GM, Donovan GR, Baldo BA. Glutathione S-transferase a major allergen of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Immunology letters*. 1995;48(2):103-7.
42. Huang CH, Liew LM, Mah KW, Kuo IC, Lee BW, Chua KY. Characterization of glutathione S-transferase from dust mite, Der p 8 and its immunoglobulin E cross-reactivity with cockroach glutathione S-transferase. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2006;36(3):369-76.
43. Asturias JA, Arilla MC, Gomez-Bayon N, Martinez A, Martinez J, Palacios R. Sequencing and high level expression in *Escherichia coli* of the tropomyosin allergen (Der p 10) from *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Biochimica et biophysica acta*. 1998;1397(1):27-30.
44. 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.
45. Weghofer M, Thomas WR, Kronqvist M, Mari A, Purohit A, Pauli G, et al. Variability of IgE reactivity profiles among European mite allergic patients. *European journal of clinical investigation*. 2008;38(12):959-65.
46. 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.
47. Hagner S, Rask C, Brimnes J, Andersen PS, Raifer H, Renz H, et al. House Dust Mite-Specific Sublingual Immunotherapy Prevents the Development of Allergic Inflammation in a Mouse Model of Experimental Asthma. *International archives of allergy and immunology*. 2016;170(1):22-34.
48. Bozek A, Ignasiak B, Filipowska B, Jarzab J. House dust mite sublingual immunotherapy: a double-blind, placebo-controlled study in elderly patients with allergic rhinitis. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2013;43(2):242-8.
49. Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. *International archives of allergy and applied immunology*. 1953;4(4):285-8.

50. Eifan AO, Shamji MH, Durham SR. Long-term clinical and immunological effects of allergen immunotherapy. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2011;11(6):586-93.
51. Sahin E, Bafaqeeh SA, Guven SG, Cetinkaya EA, Muluk NB, Coskun ZO, et al. Mechanism of action of allergen immunotherapy. *American journal of rhinology & allergy*. 2016;30(5):1-3.
52. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. *World Allergy Organ J*. 2015;8(1):17.
53. Gomez E, Fernandez TD, Dona I, Rondon C, Campo P, Gomez F, et al. Initial immunological changes as predictors for house dust mite immunotherapy response. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(10):1542-53.
54. Siman IL, de Aquino LM, Ynoue LH, Miranda JS, Pajuaba AC, Cunha-Junior JP, et al. Allergen-specific IgG antibodies purified from mite-allergic patients sera block the IgE recognition of *Dermatophagoides pteronyssinus* antigens: an in vitro study. *Clinical & developmental immunology*. 2013;2013:657424.
55. Flicker S, Linhart B, Wild C, Wiedermann U, Valenta R. Passive immunization with allergen-specific IgG antibodies for treatment and prevention of allergy. *Immunobiology*. 2013;218(6):884-91.
56. Holm J, Willumsen N, Wurtzen PA, Christensen LH, Lund K. Facilitated antigen presentation and its inhibition by blocking IgG antibodies depends on IgE repertoire complexity. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(4):1029-37.
57. van Neerven RJ, Wikborg T, Lund G, Jacobsen B, Brinch-Nielsen A, Arned J, et al. Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4+ T cells by inhibiting serum-IgE-facilitated allergen presentation. *J Immunol*. 1999;163(5):2944-52.
58. Jacobsen L, Wahn U, Bilo MB. Allergen-specific immunotherapy provides immediate, long-term and preventive clinical effects in children and adults: the effects of immunotherapy can be categorised by level of benefit -the centenary of allergen specific subcutaneous immunotherapy. *Clinical and translational allergy*. 2012;2:8.
59. van Neerven RJ, Knol EF, Eijrnaes A, Wurtzen PA. IgE-mediated allergen presentation and blocking antibodies: regulation of T-cell activation in allergy. *International archives of allergy and immunology*. 2006;141(2):119-29.
60. Cassard L, Jonsson F, Arnaud S, Daeron M. Fcγ receptors inhibit mouse and human basophil activation. *J Immunol*. 2012;189(6):2995-3006.
61. Cady CT, Powell MS, Harbeck RJ, Giclas PC, Murphy JR, Katial RK, et al. IgG antibodies produced during subcutaneous allergen immunotherapy mediate inhibition of basophil activation via a mechanism involving both FcγRIIA and FcγRIIB. *Immunol Lett*. 2010;130(1-2):57-65.
62. James LK, Shamji MH, Walker SM, Wilson DR, Wachholz PA, Francis JN, et al. Long-term tolerance after allergen immunotherapy is accompanied by selective persistence of blocking antibodies. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;127(2):509-16 e1-5.
63. Shamji MH, Kappen J, Abubakar-Waziri H, Zhang J, Steveling E, Watchman S, et al. Nasal allergen-neutralizing IgG4 antibodies block IgE-mediated responses: Novel biomarker of subcutaneous grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143(3):1067-76.
64. Palomares O, Akdis M, Martin-Fontecha M, Akdis CA. Mechanisms of immune regulation in allergic diseases: the role of regulatory T and B cells. *Immunological reviews*. 2017;278(1):219-36.
65. Leech MD, Benson RA, De Vries A, Fitch PM, Howie SE. Resolution of Der p1-induced allergic airway inflammation is dependent on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory cells. *J Immunol*. 2007;179(10):7050-8.
66. Noval Rivas M, Chatila TA. Regulatory T cells in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(3):639-52.

67. Schulke S. Induction of Interleukin-10 Producing Dendritic Cells As a Tool to Suppress Allergen-Specific T Helper 2 Responses. *Front Immunol.* 2018;9:455.
68. Kearley J, Barker JE, Robinson DS, Lloyd CM. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *The Journal of experimental medicine.* 2005;202(11):1539-47.
69. Coomes SM, Kannan Y, Pelly VS, Entwistle LJ, Guidi R, Perez-Lloret J, et al. CD4(+) Th2 cells are directly regulated by IL-10 during allergic airway inflammation. *Mucosal immunology.* 2017;10(1):150-61.
70. Lin AA, Freeman AF, Nutman TB. IL-10 Indirectly Downregulates IL-4-Induced IgE Production by Human B Cells. *ImmunoHorizons.* 2018;2(11):398-406.
71. van de Veen W, Stanic B, Wirz OF, Jansen K, Globinska A, Akdis M. Role of regulatory B cells in immune tolerance to allergens and beyond. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138(3):654-65.
72. van de Veen W, Stanic B, Yaman G, Wawrzyniak M, Sollner S, Akdis DG, et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(4):1204-12.
73. Nacaroglu HT, Erdem SB, Sumer O, Karaman S, Unsal Karkiner CS, Asilsoy S, et al. Local and systemic reactions to subcutaneous allergen immunotherapy: Ten years' experience in a pediatric clinic. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology.* 2016;116(4):349-53.
74. Trivedi B, Valerio C, Slater JE. Endotoxin content of standardized allergen vaccines. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(4):777-83.
75. Focke M, Marth K, Valenta R. Molecular composition and biological activity of commercial birch pollen allergen extracts. *Eur J Clin Invest.* 2009;39(5):429-36.
76. Brunetto B, Tinghino R, Braschi MC, Antonicelli L, Pini C, Iacovacci P. Characterization and comparison of commercially available mite extracts for in vivo diagnosis. *Allergy.* 2010;65(2):184-90.
77. Pauli G, Larsen TH, Rak S, Horak F, Pastorello E, Valenta R, et al. Efficacy of recombinant birch pollen vaccine for the treatment of birch-allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122(5):951-60.
78. Satitsuksanoa P, Globinska A, Jansen K, van de Veen W, Akdis M. Modified Allergens for Immunotherapy. *Current allergy and asthma reports.* 2018;18(2):9.
79. Cantillo J PL. From Molecular Cloning to Vaccine Development for Allergic Diseases, An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology In: D DGR-BEI, editor. *From Analytical Procedures to Biomedical Applications*2013.
80. Zhernov Y, Curin M, Khaitov M, Karaulov A, Valenta R. Recombinant allergens for immunotherapy: state of the art. *Current opinion in allergy and clinical immunology.* 2019;19(4):402-14.
81. Bonura A, Passantino R, Costa MA, Montana G, Melis M, Bondi ML, et al. Characterization of a Par j 1/Par j 2 mutant hybrid with reduced allergenicity for immunotherapy of Parietaria allergy. *Clin Exp Allergy.* 2012;42(3):471-80.
82. Linhart B, Hartl A, Jahn-Schmid B, Verdino P, Keller W, Krauth MT, et al. A hybrid molecule resembling the epitope spectrum of grass pollen for allergy vaccination. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(5):1010-6.
83. Kussebi F, Karamloo F, Rhyner C, Schmid-Grendelmeier P, Salagianni M, Mannhart C, et al. A major allergen gene-fusion protein for potential usage in allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(2):323-9.

84. Asturias JA, Ibarrola I, Arilla MC, Vidal C, Ferrer A, Gamboa PM, et al. Engineering of major house dust mite allergens Der p 1 and Der p 2 for allergen-specific immunotherapy. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(7):1088-98.
85. Chen KW, Blatt K, Thomas WR, Swoboda I, Valent P, Valenta R, et al. Hypoallergenic Der p 1/Der p 2 combination vaccines for immunotherapy of house dust mite allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(2):435-43 e4.
86. Acevedo N, Mercado D, Vergara C, Sanchez J, Kennedy MW, Jimenez S, et al. Association between total immunoglobulin E and antibody responses to naturally acquired *Ascaris lumbricoides* infection and polymorphisms of immune system-related LIG4, TNFSF13B and IRS2 genes. *Clin Exp Immunol*. 2009;157(2):282-90.
87. Puerta Llerena L, Fernandez-Caldas E, Caraballo Gracia LR, Lockey RF. Sensitization to *Blomia tropicalis* and *Lepidoglyphus destructor* in *Dermatophagoides* spp-allergic individuals. *J Allergy Clin Immunol*. 1991;88(6):943-50.
88. Buendia E, Zakzuk J, Mercado D, Alvarez A, Caraballo L. The IgE response to *Ascaris* molecular components is associated with clinical indicators of asthma severity. *World Allergy Organ J*. 2015;8(1):8.
89. Meno K, Thorsted PB, Ipsen H, Kristensen O, Larsen JN, Spangfort MD, et al. The crystal structure of recombinant proDer p 1, a major house dust mite proteolytic allergen. *J Immunol*. 2005;175(6):3835-45.
90. Chan SL, Ong TC, Gao YF, Tiong YS, Wang de Y, Chew FT, et al. Nuclear magnetic resonance structure and IgE epitopes of Blo t 5, a major dust mite allergen. *J Immunol*. 2008;181(4):2586-96.
91. Chou H, Tam MF, Lee SS, Tang RB, Lin TH, Tai HY, et al. Asp159 is a critical core amino acid of an IgE-binding and cross-reactive epitope of a dust mite allergen Der f 7. *Molecular immunology*. 2010;48(15-16):2130-4.
92. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
93. Whitmore L, Wallace BA. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic acids research*. 2004;32(Web Server issue):W668-73.
94. Katsaros GI, Giannoglou MN, Taoukis PS. High hydrostatic pressure inactivation kinetics of the plant proteases ficin and papain. *Journal of Food Engineering*. 2009;91:42-8.
95. 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. *International archives of allergy and immunology*. 2014;163(2):119-29.
96. Hochreiter R, Ferreira F, Thalhamer J, Hammerl P. TH1-promoting DNA immunization against allergens modulates the ratio of IgG1/IgG2a but does not affect the anaphylactic potential of IgG1 antibodies: no evidence for the synthesis of nonanaphylactic IgG1. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112(3):579-84.
97. Banerjee S, Weber M, Blatt K, Swoboda I, Focke-Tejkl M, Valent P, et al. Conversion of Der p 23, a new major house dust mite allergen, into a hypoallergenic vaccine. *J Immunol*. 2014;192(10):4867-75.
98. Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2005;99(4):303-10.
99. Wurtzen PA, Lund G, Lund K, Arvidsson M, Rak S, Ipsen H. A double-blind placebo-controlled birch allergy vaccination study II: correlation between inhibition of IgE binding, histamine release and facilitated allergen presentation. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(8):1290-301.

100. 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.
101. Zaborsky N, Brunner M, Wallner M, Himly M, Karl T, Schwarzenbacher R, et al. Antigen aggregation decides the fate of the allergic immune response. *J Immunol*. 2010;184(2):725-35.
102. Campana R, Vrtala S, Maderegger B, Dall'Antonia Y, Zafred D, Blatt K, et al. Altered IgE epitope presentation: A model for hypoallergenic activity revealed for Bet v 1 trimer. *Molecular immunology*. 2011;48(4):431-41.
103. Curin M, Weber M, Thalhamer T, Swoboda I, Focke-Tejkl M, Blatt K, et al. Hypoallergenic derivatives of Fel d 1 obtained by rational reassembly for allergy vaccination and tolerance induction. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(6):882-94.
104. Najafi N, Hofer G, Gattinger P, Smiljkovic D, Blatt K, Selb R, et al. Fusion proteins consisting of Bet v 1 and Phl p 5 form IgE-reactive aggregates with reduced allergenic activity. *Scientific reports*. 2019;9(1):4006.
105. Osinski T, Pomes A, Majorek KA, Glesner J, Offermann LR, Vailes LD, et al. Structural Analysis of Der p 1-Antibody Complexes and Comparison with Complexes of Proteins or Peptides with Monoclonal Antibodies. *J Immunol*. 2015;195(1):307-16.
106. Chruszcz M, Pomes A, Glesner J, Vailes LD, Osinski T, Porebski PJ, et al. Molecular determinants for antibody binding on group 1 house dust mite allergens. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(10):7388-98.
107. Mueller GA, Smith AM, Chapman MD, Rule GS, Benjamin DC. Hydrogen exchange nuclear magnetic resonance spectroscopy mapping of antibody epitopes on the house dust mite allergen Der p 2. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(12):9359-65.
108. Gough L, Campbell E, Bayley D, Van Heeke G, Shakib F. Proteolytic activity of the house dust mite allergen Der p 1 enhances allergenicity in a mouse inhalation model. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(8):1159-63.
109. Raulf-Heimsoth M. T cell - primary culture from peripheral blood. *Methods in molecular medicine*. 2008;138:17-30.
110. Nakajima H, Takatsu K. Role of cytokines in allergic airway inflammation. *International archives of allergy and immunology*. 2007;142(4):265-73.
111. Chen C, Sun N, Li Y, Jia X. A BALB/c mouse model for assessing the potential allergenicity of proteins: comparison of allergen dose, sensitization frequency, timepoint and sex. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2013;62:41-7.

Publicaciones científicas relacionadas a esta tesis

Artículos

- Martínez D, Munera M, Zakzuk J, Wortmann J, Keller W, Caraballo L, Puerta. An Engineered Hybrid Protein from *Dermatophagoides pteronyssinus* Allergens Shows Hypoallergenicity. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 3025.
- Martínez D, Cantillo J, Herazo H, Wortmann J, Keller W, Caraballo L, Puerta. Characterization of a Hybrid protein designed with segments of allergens from *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Immunology Letters.* 2018;196, 103–112.

Abstracts

- Martínez, D, Benedetti, I, Muleth, B; Caraballo, L, Puerta, L, Allergenic evaluation of a *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus* hybrid protein in a murine model of asthma. *Allergy* 2016; 71, Suppl. 102, 300–389.
- Martínez D, Múnera M, Cantillo J, Caraballo L, Puerta L. A hybrid protein designed with epitopes from *B. tropicalis* and *D. pteronyssinus* allergens showed reduced IgE binding and allergenic activity. *Frontier. Immunology.* 2015 doi: 10.3389/conf.fimmu.2015.05.00078.
- Martínez D, Puerta L, Benedetti I, Munera M, Caraballo L. Evaluation of the immune response induced by a mite derived fusion protein in BALB/c mice. *The World Allergy Organization Journal.* 2015;8, Suppl 1:A18.

Premios y distinciones

- Tercer puesto en la presentación de trabajos libres del WAO SYMPOSIUM/CONGRESO ACAAI 2017. Modalidad de presentación Oral. Trabajo. Immune response to multi-epitope *B. tropicalis* hybrid protein in mice.
- Beca FELLOW TRAVEL AWARD concedida por la World Allergy Organization (WAO), para la presentación oral del trabajo investigativo “Evaluation of the immune response induced by a mite derived fusion protein in BALB/c mice” 6 diciembre, Rio Janeiro, Brasil 2014.

- Beca Movilidad Internacional en la primera Convocatoria de Movilidad Internacional para estudiantes a grupos de Investigación reconocidos por Colciencias y avalados por la Universidad de Cartagena. Resolución 00496-2013. Para realizar la pasantía en Inmunología en la División de Alergia e Inmunología, Departamento de Medicina Interna, Universidad del Sur de Florida, Tampa –Florida

Anexos

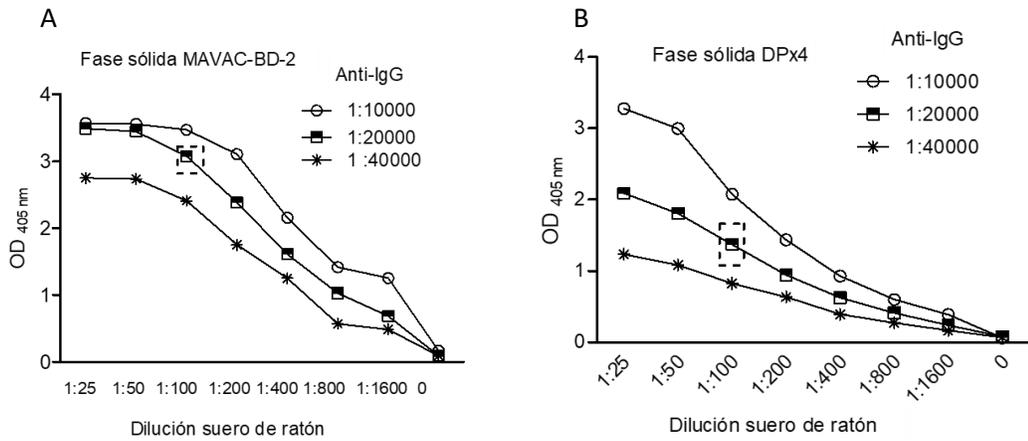


Figura S1. Titulación de la dilución del suero y del segundo anticuerpo anti- IgG. Se determinaron los niveles de IgG en sueros de alérgicos a los ácaros mediante ELISA. A) IgG hacia MAVAC-BD-2 y B) IgG hacia DPx4.

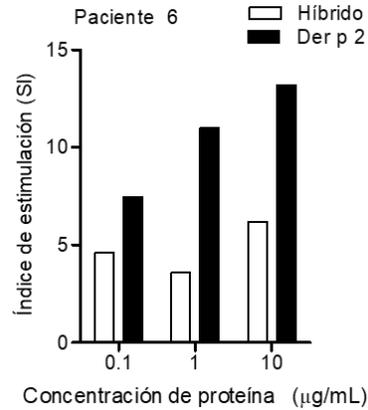


Figura S2. Titulación de la dilución del antígeno para los ensayos de activación de basófilos. Basófilos de un paciente alérgico a los ácaros fueron estimulados con dosis crecientes de Der p 2 y la proteína híbrida (0.1, 1 y 10 µg/mL).

Tabla S1. Análisis de la viabilidad del cultivo celular (PBMC) mediante citometría usando el marcador 7-amino-actinomicina D (7AAD). Se muestran los porcentajes de células vivas obtenidos en presencia de diferentes concentraciones de MAVAC-BD-2 y DPx4, después de seis días de incubación.

Concentración de Antígeno	DPx4			MAVAC-BD-2			PHA (5 µg/mL)
	1 µM	1.5 µM	2 µM	1 µM	1.5 µM	2 µM	
% de Viabilidad Celular	81.25	53.27	55.54	93.6	90.82	89.61	88.81

Tabla S2. Inactivación térmica de la IgE en el suero de ratones inmunizados con las proteínas híbridas

	Terminación de la IgE a 56°C					
	Sueros Anti-MAVAC-BD-2			Suero Anti-DPx4		
	IgE	IgG1	IgG2a	IgE	IgG1	IgG2a
Antes del tratamiento	0.803	1.222	1.330	0.298	0.537	0.586
Después del tratamiento	0.136	1.549	1.272	0.045	0.619	0.600

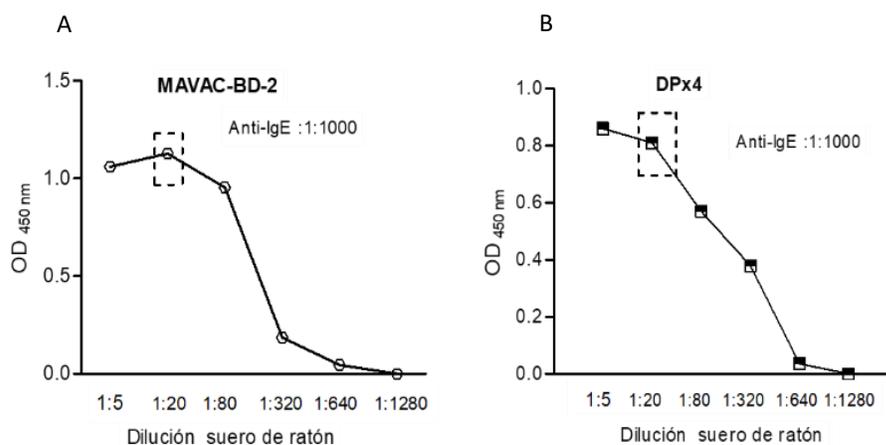


Figura S3. Titulación de la dilución del suero de ratones inmunizados con MAVAC-BD-2 y DPx4. La reactividad IgE a MAVAC-BD-2 (A) y DPx4 (B) se evaluó mediante ELISA usando diferentes diluciones del suero (Eje X).

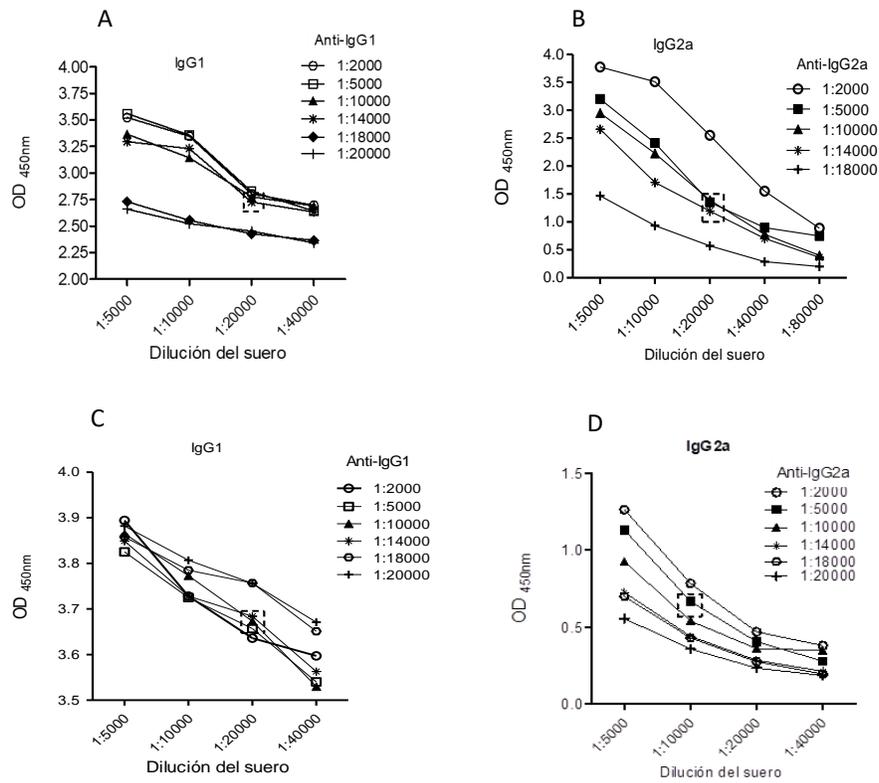


Figura S4. Titulación de las diluciones de suero y anticuerpos conjugados para la determinación de anticuerpos IgG1 e IgG2a en el suero de ratones inmunizados con MAVAC-BD-2 y DPx4. La reactividad IgG1 (A) e IgG2a (B) a MAVAC-BD-2 y la reactividad IgG1 (C) e IgG2 (D) a DPx4, se evaluó mediante ELISA usando diferentes diluciones del suero y del conjugado. Recuadro en puntos indica la dilución seleccionada.

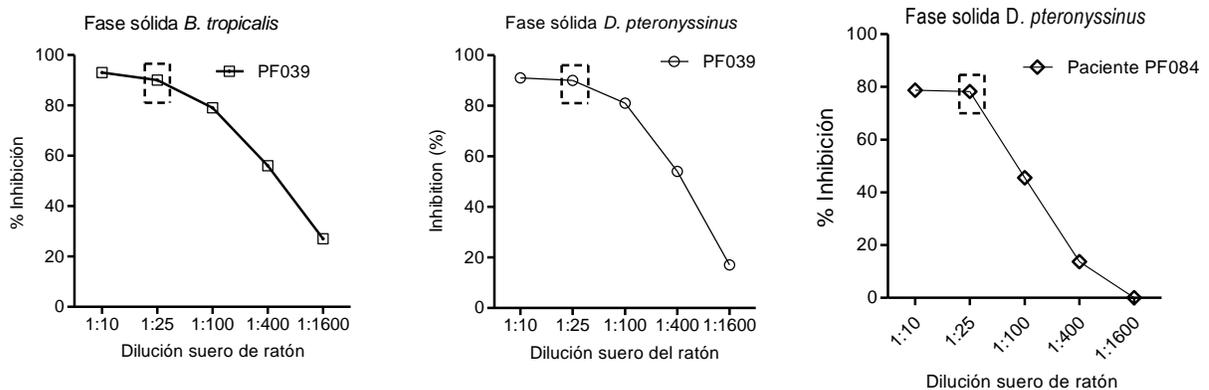


Figura S5. Titulación de la dilución de suero de ratón inmunizado con MAVAC-BD-2 o DPx4 para ensayo de inhibición de la unión IgE de alérgicos a los ácaros por la IgG producida por la inmunización con las moléculas híbridas. El suero de los alérgicos se diluyó 1:5. Recuadro en puntos indica la dilución seleccionada.