

CARACTERIZACIÓN INMUNOQUÍMICA Y MOLECULAR DE LOS ALERGENOS DE *BLOMIA TROPICALIS*, UN ACARO CAUSANTE DE ASMA EN EL TRÓPICO

por

Luis Caraballo, M.D.*

Resumen

Caraballo, L.: Caracterización inmunoquímica y molecular de los alergenos de *Blomia tropicalis*, un ácaro causante de asma en el trópico. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **23**(88): 433-443. 1999. ISSN 0370- 3908.

La mayoría de los casos de asma son de origen alérgico. Esta enfermedad es causada, en personas genéticamente susceptibles, por los alergenos de los ácaros del polvo de habitación. En el trópico, los ácaros más comunes son *B. tropicalis* y *Dermatophagoides pteronyssinus*. La importancia clínica del primero se ha descrito en la última década y gran parte de esta información se ha generado en nuestro laboratorio. Este artículo describe los procedimientos y resultados de la caracterización inmunoquímica y molecular de los alergenos de *B. tropicalis*, en un enfoque general que llevaría a su manipulación genética con el fin de obtener reactivos para el tratamiento de las enfermedades alérgicas.

Palabras clave: Alérgeno recombinante, asma, *Blomia tropicalis*, alergias, IgE.

Abstract

The etiology and pathogenesis of asthma cases involve an allergic mechanism. Allergens from house dust mites are the main cause of asthma within a genetically susceptible population. *B. tropicalis* and *D. pteronyssinus* are the commonest domestic mites in the tropics. During this decade, important advances have been made in our laboratory, in regard to the clinical role of *B. tropicalis*. Here we describe the general approach and results we have obtained in the immunochemical and molecular characterization of several allergens from this mite. This goal includes the possibility of genetic manipulation of the cloned allergens to get safe reagents for diagnosis and Immunotherapy of allergic diseases.

Key words: recombinant allergen, asthma, *Blomia tropicalis*, allergy, IgE.

* Instituto de Investigaciones Inmunológicas. Universidad de Cartagena. Apartado Aéreo 445 Cartagena, Colombia. Fax: 6698491, E-mail: lcarabal@cartagena.cetcol.net.co

Introducción

El asma es un problema respiratorio de distribución mundial cuya incidencia, al igual que la mortalidad, está aumentando en la mayoría de los países. Esta enfermedad es consecuencia del efecto de factores ambientales, los cuales, en personas genéticamente predispuestas, inducen una respuesta alérgica mediada por IgE, que en la mayoría de los casos inicia el proceso inflamatorio crónico del árbol bronquial, característico de este padecimiento. Los factores genéticos parecen ser múltiples y son estudiados ampliamente en la actualidad (Caraballo L., 1999). Los factores ambientales son esencialmente los alérgenos de los ácaros que se encuentran en el polvo de habitación, hoy denominados ácaros domésticos. Aunque no se conoce con exactitud la prevalencia de asma en Colombia, en Cartagena este problema afecta a un 12.2% de la población general (Caraballo L, et al. 1992). Además, la mortalidad por asma es también alta en este país, llegando a ratas de hasta 1.6 por 100.000 habitantes (Vergara C, et al. 1998).

Blomia tropicalis, un ácaro doméstico que pertenece a la familia Echinomphididae (O'Connor B. 1982), es un componente importante del polvo de habitación en regiones tropicales y subtropicales, siendo además muy sensible a las variaciones de temperatura y humedad. En el trópico las condiciones ambientales son tan apropiadas para el crecimiento de estos ácaros (temperatura media de 28°C y humedad relativa de 85% durante todo el año) que la sensibilización (es decir, la inducción de un estado alérgico en una persona) es muy frecuente entre la población y los cultivos de ácaros no requieren condiciones artificiales especiales para crecer bien. Por otro lado, varios estudios han demostrado que la prevalencia de sensibilización por este ácaro es mucho menor en sitios como Santafé de Bogotá y Ciudad de México, donde la humedad relativa es baja (Fernández-Caldas E, et al. 1993). *B. tropicalis* se ha encontrado en todos los países tropicales donde se ha investigado su presencia, con excepción de ciertas regiones de Tailandia. En orden de frecuencia es el cuarto ácaro más común en Estados Unidos, y junto con *D. pteronyssinus*, es uno de los ácaros más comunes en el mundo. *B. tropicalis* también se ha detectado como un ácaro de almacenamiento en el arroz en Filipinas y en una panadería en Barcelona (Portus M, et al. 1976), lo cual muestra que su distribución puede ir más allá de los ambientes tropicales y subtropicales.

Actualmente, la investigación sobre la etiología del asma a nivel mundial se centra en la identificación de los factores de riesgo, tanto genéticos como ambientales. Aunque teóricamente cualquier alérgeno inhalado puede

causar asma, la evidencia indica que los ácaros son las fuentes de alérgenos más frecuentemente asociados con la génesis y la patogénesis de esta enfermedad y por lo tanto el factor de riesgo más importante. La investigación sobre las características de los alérgenos de *B. tropicalis* ha sido particularmente importante en el Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena durante los últimos diez años. En el presente artículo se describe la trayectoria general de esta línea de investigación, así como los adelantos originales obtenidos más recientemente en este campo.

Aspectos metodológicos generales

El proceso de caracterización de un alérgeno comprende varias etapas que van desde confirmar su alergenicidad hasta definir su estructura y función, con el fin de explorar las posibilidades de eliminar la respuesta IgE que dicho alérgeno induce o modificar la ya existente. Los enfoques y técnicas empleadas pueden variar, pero todos se sustentan esencialmente en el desarrollo de la inmunología, la bioquímica y la biología molecular. Los alérgenos tienen distintos orígenes, denominados fuentes de alérgenos. Las fuentes más comunes son los ácaros, los pólenes, los mohos, los alimentos, los epitelios de animales, los insectos, etc. A continuación se enumeran los principales pasos que hemos seguido con el fin de caracterizar los alérgenos de *B. tropicalis*.

Demostración de la unión a la IgE

Siendo estrictos, la demostración de la alergenicidad de un producto biológico debería hacerse experimentalmente, demostrando la capacidad de la molécula (o la fuente de alérgeno) para inducir la respuesta IgE en las personas o animales, ya sea *in vivo* o *in vitro*. Sin embargo, lo que habitualmente se hace es asumir que ésta es capaz de inducir dicha respuesta y evaluar la capacidad de unión del alérgeno a la IgE del suero de pacientes ya sensibilizados, es decir, alérgicos. Para el caso del extracto alérgico, esto se hace con pruebas cutáneas, "radioalergosorbent test" (RAST) o cualquiera de las variantes de ELISA. Si se desea identificar la unión IgE a cada uno de los componentes no purificados, entonces se utiliza el "immunoblotting".

Importancia clínica y epidemiológica

El papel que juega un alérgeno como inductor de síntomas en la población, es decir, como productor de enfermedades alérgicas, muchas veces se sospecha por las historias clínicas acumuladas por los clínicos, y usualmente se demuestra mediante dos métodos. El más di-

recto emplea pruebas de provocación, entre las cuales estan la provocación bronquial, la nasal, la conjuntival, la oral, la cutánea y la prueba de liberación de histamina por los basófilos, que es un ensayo *in vitro*. Una manera indirecta es hacer estudios epidemiológicos, investigando así una relación causa-efecto a nivel de población. Estos estudios han pasado de simples descripciones de prevalencia de reacción IgE contra alergenitos entre los pacientes, a investigaciones rigurosas sobre el impacto clínico de los alergenitos en pacientes y controles.

Purificación

Aislar un alergenito de su fuente es un paso esencial para analizar sus propiedades físicas, químicas, inmunológicas y funcionales. Actualmente el procedimiento más utilizado es clonar el gen del alergenito en un vector y hacer que la proteína recombinante sea producida por bacterias, levaduras u otras células eucariotas. Para esto se necesita construir bibliotecas ("libraries") de cDNA, en donde se almacenan los genes de las proteínas que la fuente de alergenitos utiliza. La identificación de los alergenitos entre esa gran cantidad de proteínas se hace aprovechando la IgE específica de los sueros de pacientes alérgicos. Otra opción para purificar alergenitos es separando los componentes del extracto natural, para lo cual se emplean variadas técnicas de cromatografía e inmunológica. Aunque es más dispendioso que el anterior, este enfoque tiene la ventaja de que se aísla y purifica el alergenito nativo, que conserva la mayoría de sus propiedades biológicas, lo que no siempre sucede con los recombinantes.

Cuando se obtiene un alergenito purificado, es posible entonces denominarlo de acuerdo a las normas internacionales (WHO/IUIS). La nomenclatura incluye básicamente las tres primeras letras del género seguidas de la primera letra de la especie y finalmente un número que indica el grupo a que pertenece dicho alergenito. Por ejemplo, un alergenito de *Blomia tropicalis* que pertenezca al grupo 5 se denominará Blo t 5. Los grupos resultan de similitudes estructurales (especialmente de la secuencia de aminoácidos), funcionales o inmunológicas de los alergenitos y están limitados a cada fuente de alergenitos. Es decir, el grupo 5 de alergenitos provenientes de pólenes de árboles es distinto al grupo 5 de los alergenitos de ácaros.

Secuencia de aminoácidos

Para esto se usan métodos químicos convencionales, actualmente bastante automatizados, que dan resultados confiables siempre que la proteína esté lo suficientemente

purificada. Sin embargo, en el caso de proteínas grandes no es fácil obtener toda la secuencia por estos métodos y se acostumbra a secuenciar sólo el extremo N-terminal de la molécula. Cuando se clona el gen del alergenito, se puede predecir la secuencia de aminoácidos de la proteína, empleando el código genético. Generalmente esto se confirma secuenciando químicamente el segmento N-terminal de la proteína recombinante. De la secuencia de aminoácidos, se derivan muchas de las propiedades fisicoquímicas del alergenito, pero es especialmente importante su comparación con las restantes proteínas descritas, para determinar homologías con la secuencia de otros alergenitos, lo que a su vez, permite predecir aspectos relevantes como la reactividad cruzada y la función biológica.

Reactividad cruzada

La propiedad de una molécula alérgica de inducir la producción de anticuerpos IgE capaces de reaccionar contra otras tiene implicaciones clínicas muy importantes. Teóricamente, el número y características de las reacciones alérgicas no podrá conocerse mientras no se determinen completamente las reacciones cruzadas entre los alergenitos. Para esto se emplean estudios de correlación estadística y pruebas de inhibición de la unión a IgE entre diferentes moléculas. De estas pruebas, las más populares son la inhibición del RAST y del "immunoblotting". El principio básico es el siguiente: si una molécula B es capaz de inhibir la unión de la IgE específica contra la molécula A, es porque comparte sitios de unión de IgE con la molécula A. El uso de monoclonales y clonas de células T también ha sido de mucha utilidad para estudiar este fenómeno.

Identificación de epitopes

Con el fin de analizar en detalle la respuesta inmunológica contra los alergenitos, es muy conveniente disecar los componentes inmunogénicos de estos, ya sea a nivel celular (epitopes T) o humoral (epitopes B). Simplificando, puede decirse que los epitopes son las unidades mínimas reconocidas por los anticuerpos o los receptores de los linfocitos T. Generalmente, para identificar y localizar epitopes ("epitope mapping") es necesario conocer la secuencia de aminoácidos, a partir de la cual se sintetizan pequeños péptidos que, superponiéndose parcialmente en sus extremos, equivalen a toda la secuencia del alergenito. Observando la linfoproliferación inducida por esos péptidos o sus combinaciones, se pueden identificar los epitopes T. De manera similar, estudiando la unión de esos péptidos a los anticuerpos (monoclonales o contenidos en el suero de pacientes) se detectan los

epitopes B. Cuando los anticuerpos que se unen al epitope son del isotipo IgE, se denominan epitopes alergénicos.

Utilidad diagnóstica

La utilidad diagnóstica de un extracto alergénico, ya sea de pólen, ácaro, alimento, epitelio de gato, etc., se calcula por la correlación positiva entre las pruebas cutáneas o el RAST con dicho extracto y la sintomatología clínica. La utilidad diagnóstica de una molécula alergénica se mide por su potencial para reemplazar al extracto total, ya sea por sí solo o en compañía de otros alergenios purificados del extracto. Los alergenios mayores son los que inducen la producción de IgE específica en más del 50% de los pacientes y son responsables de más del 10% de la actividad alergénica del extracto total. Un alergenio contra el cual reaccione el 90% de los pacientes sería un buen candidato para reemplazar el extracto total. Por lo anterior, actualmente se evalúa la prevalencia de positividad contra cada uno de los alergenios purificados, en la perspectiva de que sirvan como reactivos diagnósticos, tanto para pruebas cutáneas como para pruebas *in vitro*.

Potencial terapéutico

Desde el punto de vista médico, el objetivo principal de la caracterización de los alergenios es su aplicación para el control de las enfermedades alérgicas. Durante el presente siglo la inmunoterapia ("hiposensibilización") con extractos alergénicos se ha mantenido como la única opción terapéutica capaz de modificar el curso natural de las enfermedades alérgicas, especialmente la anafilaxia por picaduras de insectos y los problemas respiratorios provocados por aeroalergenios. Sin embargo, este tratamiento aún se puede mejorar en cuanto a riesgos y eficacia. Como consecuencia de los avances logrados en la caracterización de los alergenios, para el próximo siglo se proyectan alternativas terapéuticas novedosas. Estas van desde su modificación química o genética para disminuir la reactividad IgE hasta su administración conjunta con secuencias de nucleótidos inmunoestimuladoras de la respuesta Th1, dado que las alergias están dirigidas básicamente hacia una respuesta Th2. También se contempla la posibilidad de profilaxis con vacunación temprana de la población genéticamente susceptible. Teóricamente, el potencial terapéutico de los alergenios purificados es grande, aunque su demostración mediante ensayos clínicos en animales y en humanos tomará todavía algún tiempo.

Determinación de la función biológica

La función que desempeña una molécula cuando está en su fuente natural pudiera estar relacionada con su po-

tencial alergénico. Sin embargo, esto ha podido demostrarse sólo en algunos casos. La mayoría de los alergenios son enzimas con funciones importantes en el metabolismo o en las defensas de las plantas o los animales de donde provienen. Las pruebas empleadas para establecer la función biológica de un alergenio dependen del tipo de proteína y su homología con las ya existentes. Actualmente la determinación de la función biológica de los alergenios es más que todo de interés científico y está muy relacionado con el estudio de la estructura de dichas moléculas.

Estructuras secundaria y terciaria

La estructura tridimensional de un alergenio puede predecirse mediante programas de modelaje molecular que aprovechan su homología con moléculas estudiadas experimentalmente con anterioridad. Sin embargo, para establecer con certeza la estructura nativa son necesarios los estudios de espectroscopía (con resonancia magnética nuclear o dicroísmo circular) y cristalografía mediante difracción de rayos X. Al definir la estructura, se pueden analizar mejor las regiones alergénicas e inmunogénicas, así como su relación con las regiones biológicamente activas. Los cambios estructurales globales secundarios a la mutagénesis dirigida también se perciben mejor en estas condiciones. Dado que estos procedimientos corresponden a disciplinas hasta el momento poco relacionadas con la alergología experimental, su aplicación ha sido escasa, a pesar del gran potencial informativo que ofrecen. Sin embargo los adelantos que se han obtenido en el análisis inmunológico y funcional de diversos alergenios cuya estructura primaria está definida, hacen pensar que en los próximos años se obtendrán muchos avances en esta importante etapa de la caracterización de los alergenios.

Los alergenios de *B. tropicalis*

El número exacto de alergenios que contiene un extracto de *B. tropicalis* no se ha definido todavía ya que esto depende del origen de los sueros utilizados para detectarlos, los que a su vez contienen un conjunto policlonal de anticuerpos que reflejan el grado de exposición y susceptibilidad genética de la población. Por ejemplo, mediante "immunoblotting" revelados con sueros de pacientes asmáticos de Cartagena, encontramos 25 fracciones alergénicas en un rango de 11 a 85 Kd en un extracto de cuerpo de *B. tropicalis*. En ese estudio se pudieron identificar un alergenio mayor de 11-13 Kd y tres importantes alergenios adicionales con porcentaje de unión cercano al 50% y correspondiendo a las bandas de 64, 36 y 33 Kd (Caraballo L, et al. 1994). En otro estudio, usando sueros de pacientes asmáticos de Taiwan se

detectaron tres alérgenos mayores en el extracto de *B. tropicalis*, con pesos moleculares de 14.3, 106.5 y 94 Kd (Tsai J, et al. 1998). Estos resultados sugieren la existencia de diferencias en el patrón de sensibilización en los pacientes que viven en ambientes tropicales, lo que también puede estar influido por las características genéticas tanto de la población como de los ácaros.

Distribución de los alérgenos de *B. tropicalis*

Los alérgenos de *B. tropicalis* se pueden encontrar durante todo el año en los colchones y pisos de las casas en las regiones tropicales, tal como fué detectado en Cartagena usando un extracto de polvo de habitación para inhibir la reactividad IgE (RAST) contra el extracto total del ácaro (Puerta L, et al. 1996) y en Singapore empleando una prueba de inhibición similar a la anterior (FAST) la cual emplea fluorescencia en lugar de material radioactivo (Zhang L, et al. 1997). También se obtuvieron resultados semejantes cuando se determinaron de manera secuencial los alérgenos de *D. pteronyssinus*, lo cual indica que en el trópico los niveles de alérgenos de ácaros no están sometidos a variaciones estacionales. Esta permanencia de los alérgenos en el ambiente durante todo el año es posible que suceda también con otros ácaros y puede explicar el alto grado de sensibilización en la población afectada, aún en aquellos lugares en donde las concentraciones de algunos alérgenos mayores se han encontrado por debajo de lo esperado.

Impacto clínico de los alérgenos de *B. tropicalis*

Aunque la concurrencia de otros ácaros (como por ejemplo, *D. pteronyssinus*, *D. farinae*, *Suidasia medanensis*) en el polvo de habitación dificulta la evaluación del papel específico de *B. tropicalis* en la etiología y patogénesis de las enfermedades alérgicas respiratorias, el impacto clínico de este ácaro se ha asumido con base en estudios epidemiológicos y de provocación *in vivo*, los cuales han mostrado su gran importancia entre los pacientes con asma y rinitis. Según resultados derivados de estudios que utilizan pruebas cutáneas, RAST y pruebas de linfoproliferación, la sensibilización a *B. tropicalis* es frecuente e intensa en los pacientes con asma y rinitis en las regiones tropicales y subtropicales. Usando cualquiera de estas pruebas, la diferencia de reactividad entre los pacientes y las personas normales es altamente significativa ($p \sim 0.0001$). Las cifras de prevalencia de sensibilización contra este ácaro (Figura 1) pueden ser tan altas como un 92%, como fué encontrado (usando RAST) en niños asmáticos de 6 a 16 años de Sao Paulo, Brasil (Rizzo M, et al. 1997); 87% en ni-

ños de Singapore (Lee B. 1997); 85% en Cuba (Ferrandiz R, et al. 1996); 80.5% en Cartagena (Puerta L, et al. 1993) y 73.3% en Taiwan (Tsai J, et al. 1998).

La sensibilización por *B. tropicalis* también es alta entre los pacientes que consultan las salas de emergencias por crisis de asma aguda. Dos estudios, uno realizado en Tampa, Florida, una región subtropical y otro en Cartagena, una ciudad del Caribe (Tabla 1), han demostrado que la sensibilización a *B. tropicalis* es mucho más frecuente ($p = 0.0001$) y más intensa ($p = 0.001$) en pacientes asmáticos (tanto niños como adultos) que consultan por crisis de asma que en aquellos pacientes que consultan a la misma sala de urgencias por motivos distintos a asma (Nelson R, et al. 1996; Caraballo L, et al. 1998). Es importante anotar que en el estudio de Tampa, la prevalencia de RAST positivos contra *B. tropicalis* entre los controles no asmáticos fué cero ($p = 0.0002$). Por otro lado, la especificidad de la respuesta alérgica hacia *B. tropicalis* encontrada en los pacientes también se ha verificado *in vivo* mediante provocación nasal, lo

Tabla 1. Influencia de dos ácaros en el asma aguda

Sensibilización por ácaros asma aguda			
Acaro	Pacientes	Controles	OR
<i>D. pteronyssinus</i>	64/99	28/100	4.9
<i>B. tropicalis</i>	74/99	40/100	4.4

Niveles de IgE específica en asma aguda			
Alérgeno	Pacientes	Controles	p
<i>D. pteronyssinus</i>	8.4	3.6	0.001
<i>B. tropicalis</i>	5.6	2.2	0.001

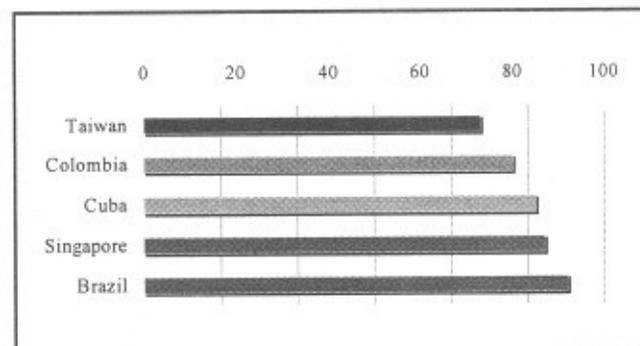


Figura 1. La prevalencia de sensibilización a *B. tropicalis* en niños y adultos en países tropicales de Asia y Sur América es muy alta. Aunque también se ha descrito en otras regiones tropicales y subtropicales, las cifras de esta figura son las más elevadas.

que sugiere que éste ácaro debería considerarse como una causa de rinitis alérgica cuando se evalúan pacientes que viven en áreas donde este ácaro es endémico (Stanaland B, et al. 1996). En este último estudio, solamente aquellos pacientes con prueba cutánea positiva a *B. tropicalis* tuvieron una prueba de provocación nasal positiva, aunque todos eran sensibles a *D. pteronyssinus*.

Reactividad cruzada con alérgenos de otros ácaros

Dado que la población está expuesta a alérgenos provenientes de diversos ácaros del polvo de habitación, la reactividad cruzada entre los alérgenos de *B. tropicalis* y aquellos de otros ácaros es un tema de mucha importancia y por lo tanto ha merecido la atención de varios grupos de investigación. Algunos estudios han encontrado que existe una reactividad cruzada entre *B. tropicalis* y *D. pteronyssinus* cercana al 30%, la cual, según nuestros estudios se sustenta principalmente en los alérgenos del grupo 5 (Arruda K, et al. 1991; Stanaland B, et al. 1994; Caraballo L, et al. 1998).

Lo anterior sugiere que la mayoría de los alérgenos de estos dos ácaros son especie-específicos, sustentando la necesidad de incluir los alérgenos de *B. tropicalis* en el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades alérgicas respiratorias en el trópico, donde ambos ácaros son abundantes en el polvo de habitación (Figura 2). Sin

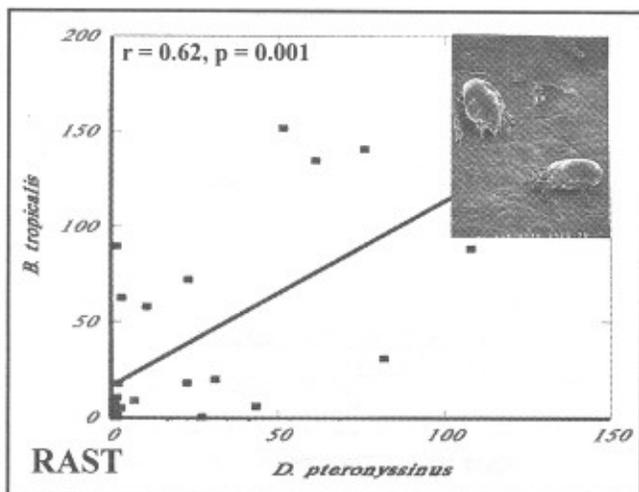


Figura 2. Debido a que los ácaros *B. tropicalis* y *D. pteronyssinus* son endémicos en el polvo de habitación en el trópico, es frecuente que los pacientes presenten sensibilización simultánea a los alérgenos de ambos.

Sin embargo, esta respuesta común, cuya correlación altamente significativa se puede observar en esta gráfica, también está influida por la reactividad cruzada entre algunos de sus alérgenos, especialmente los del grupo 5.

embargo hay otros alérgenos que podrían estar involucrados en la reactividad cruzada de estos dos ácaros. Por ejemplo, usando radioinmunolectroforesis cruzada se han encontrado dos componentes adicionales de reactividad cruzada entre ellos (Arlan L, et al. 1993). Además, el alérgeno recombinante Lep d 2, del ácaro *Lepidoglyphus destructor*, parece tener reactividad cruzada con una banda de 14.5 Kd del extracto de *B. tropicalis*, cuando los "immunoblots" se detectan con un "pool" de sueros de pacientes procedentes de Suecia (Johansson E, et al. 1997).

Por otro lado, nosotros hemos observado recientemente que el alérgeno recombinante Der p 2, del ácaro *D. pteronyssinus*, puede inhibir la unión de IgE de un "pool" de sueros alérgicos, a una banda de 14.8 Kd del extracto de *B. tropicalis*. Las dos evidencias anteriores sugieren que *B. tropicalis* contiene un alérgeno del grupo 2, aunque hasta el momento su aislamiento ha sido particularmente difícil. Entre *B. tropicalis* y *L. destructor* existe una mayor reactividad cruzada (Puerta L, et al. 1991) y los resultados obtenidos al estudiar la reactividad cruzada entre *B. tropicalis* y *D. siboney*, aunque demuestran reactividad cruzada, la intensidad de ésta ha mostrado

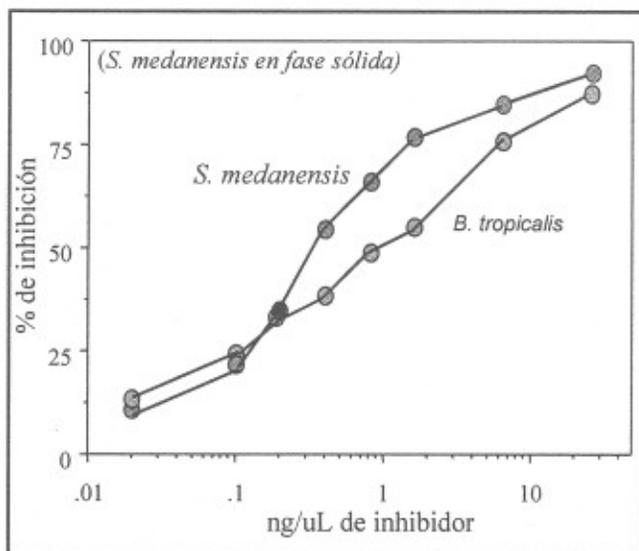


Figura 3. Resultado de un experimento de inhibición del RAST entre *B. tropicalis* y *S. medanensis*. En este caso el extracto de *S. medanensis* está en la fase sólida, es decir fijado en la placa de ensayo. Una mezcla de sueros con alta reactividad contra *B. tropicalis* y *S. medanensis* fue adsorbida por separado con concentraciones crecientes de *B. tropicalis* y *S. medanensis*. Luego de la adsorción, se repite el RAST y se cuantifica el porcentaje de inhibición. Obsérvese que ambos extractos inhiben la unión de la IgE casi completamente.

algunas contradicciones (Ferrandiz R, et al. 1995; Ferrandiz R, et al. 1998).

Actualmente en nuestro laboratorio estamos estudiando la reactividad cruzada entre *B. tropicalis* y *S. medanensis*, un ácaro que también se encuentra con frecuencia en el trópico y cuyo papel en el asma está en investigación. Hemos encontrado que existe reactividad cruzada entre los dos ácaros, pero *B. tropicalis* contiene la mayoría de los epítopes de *S. medanensis* (Caraballo L, et al. 1999). Las Figuras 3 y 4 muestran los resultados de experimentos de inhibición del RAST con extractos de estos dos ácaros. Estos experimentos sugieren que tal vez no sea necesario incluir de rutina la evaluación de alergia a *S. medanensis* en pacientes asmáticos, puesto que la mayoría de los epítopes de este ácaro están contenidos en el extracto de *B. tropicalis*. Sin embargo, un número pequeño de pacientes pudiera reaccionar exclusivamente a los pocos epítopes específicos de *S. medanensis*, por lo tanto se necesita ampliar estas investigaciones para definir con certeza el impacto clínico de este ácaro.

Alergenos recombinantes de *B. tropicalis*

Durante los últimos 5 años hemos obtenido varios de los alergenicos de *B. tropicalis* mediante tecnología de DNA

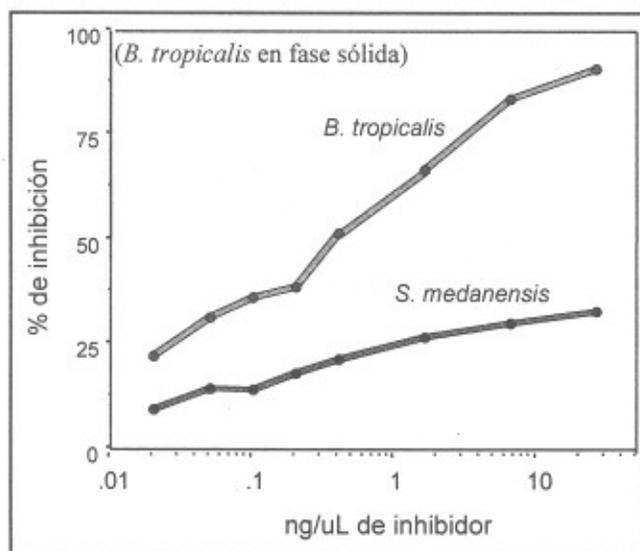


Figura 4. Cuando *B. tropicalis* está en la fase sólida, *S. medanensis* es capaz de inhibir solamente el 30% de la unión IgE contra *B. tropicalis*. Esto, de conjunto con el experimento de la Figura 2, demuestra que existe reactividad cruzada entre los dos extractos de ácaros, pero *B. tropicalis* tiene casi todos los epítopes de *S. medanensis* y además un número importante de epítopes específicos de especie.

recombinante (Tabla 2). Esto ha permitido tenerlos de manera purificada y en cantidades apropiadas para caracterizarlos mejor desde el punto de vista inmunológico y para explorar formas de manipular su alergenicidad y antigenicidad. El primer alérgeno recombinante descrito para *B. tropicalis* fue BtM (Caraballo L, et al. 1996), el cual resultó ser un alérgeno del grupo 5, cuya secuencia de amino ácidos muestra una alta homología con el alérgeno Der p 5 (del *D. pteronyssinus*) y es idéntico al extremo C-terminal de Blo t 5, otro alérgeno recombinante de *B. tropicalis* (Arruda K, et al. 1997).

Parece ser que BtM es una clona parcial de Blo t 5, sin embargo, esta molécula posee la mayoría de los epítopes del equivalente natural y comparte epítopes con alergenicos de 14 y 16 Kd del extracto de *B. tropicalis*. El mapeo de epítopes B de BtM (Figura 5) sugiere que esta

Tabla 2. Alergenicos recombinantes de *Blomia tropicalis*

Nombre	%Unión-IgE	Función	MW (Kd)	Referencia
Bt-M	52-79 %	desconocida	8,5	Caraballo L, et al. 1996
Blo t 5	45-73 %	desconocida	14	Arruda L, et al. 1997
Blo t 12	18-50 %	desconocida	14,2	Puerta L, et al. 1996
Blo t 13	11 %	FABP	14,8	Caraballo L, et al. 1997

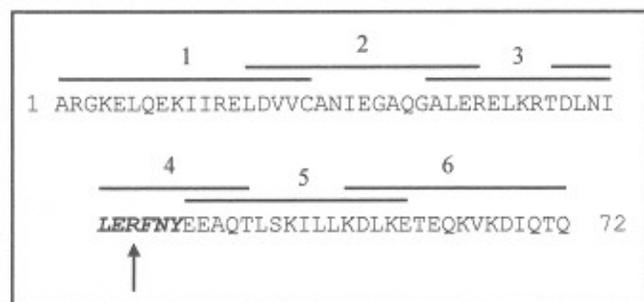


Figura 5. La secuencia de amino ácidos de BtM comprende 72 residuos.

Las líneas horizontales sobre la secuencia indican los péptidos sintetizados. Cada péptido comparte residuos con el siguiente. De acuerdo con la capacidad que tenga cada péptido de inhibir la unión de la IgE a la molécula completa de BtM, se pueden localizar los epítopes correspondientes. En este experimento, el péptido 4 fue el que mostró la mayor capacidad inhibitoria. Dado que los péptidos 3 y 5 mostraron una inhibición mucho menor, se concluye el péptido 4 define un epítipo secuencial (lineal) en la molécula de BtM, dicho epítipo parece estar limitado a sólo 6 residuos.

molécula tiene un epítipo alergénico mayor de carácter lineal, detectado mediante inhibición de la unión IgE con péptido superpuestos (Moreno L, et al. 1997). La frecuencia de unión de IgE de éste alérgeno recombinante varía entre 52 y 79%, de acuerdo a dos estudios con sueros de pacientes asmáticos de Cartagena, alérgicos a los ácaros. Por su parte, el recombinante Blo t 5 reacciona con el 45% de los sueros de asmáticos alérgicos a *B. tropicalis* procedentes de Brasil. Ambos recombinantes inducen pruebas cutáneas positivas entre los pacientes pero no entre los controles.

Se han producido anticuerpos monoclonales contra Blo t 5, uno de los cuales se ha propuesto como útil para monitorear los niveles de exposición a este alérgeno (Baybek S, et al. 1997). El anticuerpo monoclonal 3G8 producido contra BtM, detecta solamente una banda de 8-10 Kd en el extracto total de *B. tropicalis* y no tiene ninguna reactividad cruzada con Der p 5. Esta banda parece corresponder al alérgeno de bajo peso molecular identificado con los sueros de los pacientes, lo cual indica que este monoclonal pudiera ser útil para monitorear la concentración de este alérgeno mayor de *B. tropicalis* en los extractos y en el medio ambiente.

Recientemente, han sido clonados otros alérgenos de *B. tropicalis*, entre ellos, Blo t 12, que tiene una frecuencia de unión a IgE entre 18 y 50% entre pacientes asmáticos y cuya función es desconocida (Puerta L, et al. 1996); Blo t 13, una proteína de unión a ácidos grasos que pertenece a la superfamilia de FABP/Lipocalinas, con 10% de frecuencia de unión a IgE (Caraballo L, et al. 1997) y un alérgeno de 18 Kd identificado como troponina C (Simpson A, et al. 1997).

Función biológica de Blo t 13

La función biológica de Blo t 13 ha sido confirmada experimentalmente usando ensayos de unión de ligandos fluorescentes. La proteína es capaz de unir los ácidos cis-parinarico y oleico. Este es, hasta el momento, el único alérgeno de *B. tropicalis* cuya función (proteína de unión a ácidos grasos, FABP) se ha demostrado experimentalmente después de que esta función fué sugerida por la homología en la secuencia de amino ácidos con ese grupo de proteínas (Puerta L, et al. 1999). Como parte de un estudio colaborativo con el Centro Nacional de Biopreparados de La Habana hemos obtenido anticuerpos monoclonales contra este recombinante (manuscrito en preparación) para investigar las relaciones entre las propiedades inmunológicas y biológicas de esta molécula.

Sistemas de expresión de los alérgenos recombinantes

En nuestro laboratorio, la mayoría de los alérgenos recombinantes se han clonado como proteínas de fusión con la "Gluthione-S-transferase", empleando vectores como el pGEX-4T-3 y cepas de *E. coli* como sistemas de expresión. De esta hemos alcanzado a producir hasta 0.8 mg de alérgeno por litro de cultivo (Figura 6). Sin embargo, con el fin de obtener mayores cantidades de alérgenos y analizar mejor sus propiedades biológicas y estructurales, últimamente hemos expresado algunos de ellos (Blo t 12 y Blo t 13) en la levadura *Pichia pastoris*, lo cual brinda mayor cantidad de producción (60 mg/L de cultivo) y las moléculas mantienen su capacidad alergénica natural (Puerta L, et al. 1999).

Análisis estructural de Blo t 13

Dado que gran parte de los epítipes alergénicos (B) son conformacionales, es decir, que dependen de la estructura terciaria de la proteína, en algunos casos es necesario obtener experimentalmente la estructura terciaria de la molécula. En el caso de Blo t 13, los estudios preliminares de mapeo de epítipes B con péptidos superpuestos efectuados en colaboración con científicos de la Universidad de Kuala Lumpur en Malasia, sugieren que esta molécula no tiene epítipes lineales (secuenciales) importantes y que posiblemente sus epítipes mayores sean conformacionales. Por otra parte, la estructura secundaria de esta molécula ya fué obtenida experimentalmente mediante dicroísmo circular, lo cual permitió proponer un modelo de estructura terciaria (Figura 7), basa-

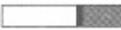
Vector	Producto	Unión a IgE	Unión ácidos grasos	Rendimiento
pGEX-4T3/ <i>E. coli</i>		+	+	0.8 mg/L
pGEX-4T3/ <i>E. coli</i>		+	+	< 0.8 mg/L
pPIC9/ <i>P. pastoris</i>		+	+	60 mg/L



Figura 6. Diferentes propiedades de Blo t 13 analizadas después de su expresión en sistemas procaríotes (*E. coli*) y eucariotes (*P. pastoris*). Puede verse que en ambos sistemas las propiedades inmunológicas (unión a IgE) y funcionales (unión a ácidos grasos, FAB) persisten, pero la productividad en cuanto a concentración de proteína por litro de medio de cultivo es mucho mayor cuando se expresa en levadura.

dos en la homología de este alérgeno con otras FABPs cuyas estructuras ya habían sido establecidas de manera experimental. Esto, sumado al interés de establecer la relación estructura-función en este alérgeno, ha llevado a nuestro grupo al proyecto de obtener, en colaboración con científicos de la Universidad de Glasgow, la estructura terciaria de Blo t 13 mediante cristalización y difracción de Rayos X. Este proyecto, actualmente en curso, nos permitirá dar pasos concretos en la manipulación genética de esta proteína alérgica, con el fin de obtener isoformas hipoalérgicas que puedan ser experimentadas en inmunoterapia.

Utilidad diagnóstica de los alérgenos recombinantes

Dado que tanto *B. tropicalis* como *D. pteronyssinus* están fuertemente asociados con asma y rinitis en el trópico, se hace necesario definir la utilidad diagnóstica que puedan tener los alérgenos purificados de estos ácaros en comparación con la del extracto total. En ese sentido, recientemente hicimos un estudio para definir la prevalencia de la IgE específica contra algunos de los alérgenos purificados de estos ácaros en 90 pacientes asmáticos procedentes del medio ambiente tropical, con pruebas cutáneas positivas a los extractos totales de dichos ácaros y en individuos con pruebas cutáneas negativas, con el fin de evaluar el uso de estos alérgenos en el diagnóstico de enfermedades respiratorias en el trópico. Los alérgenos recombinantes utilizados fueron: BtM, Blo t 12 y Blo t 13 de *B. tropicalis* y Der p 1, Der p 2, Der p 5, Der p 7, y

Der p 10 de *D. pteronyssinus*. Exceptuando Blot 12 que fue expresado en la levadura *P. pastoris*, las otras moléculas fueron expresadas en *E. coli*, como proteínas de fusión con Glutathione-S-transferasa (GST). El Der p 1 fue aislado y purificado del extracto de *D. pteronyssinus*, como alérgeno nativo. La IgE específica fue determinada mediante RAST.

Ochenta y cinco por ciento de los pacientes fueron alérgicos al extracto de *D. pteronyssinus*, y la distribución de la IgE específica dentro de este grupo fue (Figura 8): para Der p 2, 75% (valores de RAST entre 0.5 – 55%); Der p 1, 70% (0.5- 58%); Der p 5, 41% (0.5-60%); Der p 10, 19% (0.6-66%); Der p 7, 17% (0.6-45%). Al tomar de conjunto las reactividades positivas de Der p 1, Der p 2 y Der p 10, se pudo detectar el 93% de los sueros positivos a *D. pteronyssinus*. Setenta y ocho por ciento de los pacientes reaccionaron al extracto de *B. tropicalis*, siendo la distribución por alérgenos así: BtM, 52% (0.6-64%); Blo t 12, 18% (0.5-26%); Blo t 13, 10%, (0.6-54%). Setenta y dos por ciento de los pacientes fueron alérgicos a ambos extractos y se encontró una correlación significativa entre los niveles de IgE específica contra Der p 1 y Der p 2 ($p > 0.0001$) y entre BtM y Der p 5 ($p > 0.0001$).

Este estudio muestra el potencial que tienen los alérgenos recombinantes como elementos diagnósticos en las enfermedades alérgicas. En el caso de *B. tropicalis*, aunque la reactividad contra BtM es frecuente, no tenemos todavía un grupo de alérgenos que pueda reemplazar el extracto total, lo que significa que deben aislarse más recombinantes de este ácaro y determinar sus frecuencias de positividad al RAST entre pacientes y con-

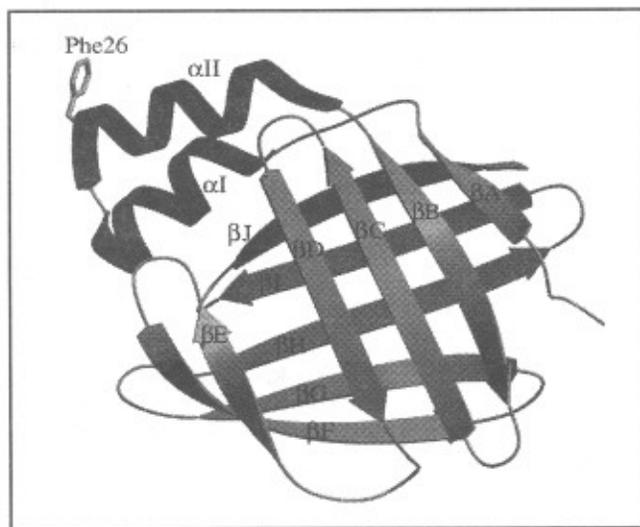


Figura 7. Modelo de estructura tridimensional del alérgeno Blo t 13, obtenido a partir de su estructura secundaria y la homología que presenta con otras FABPs.

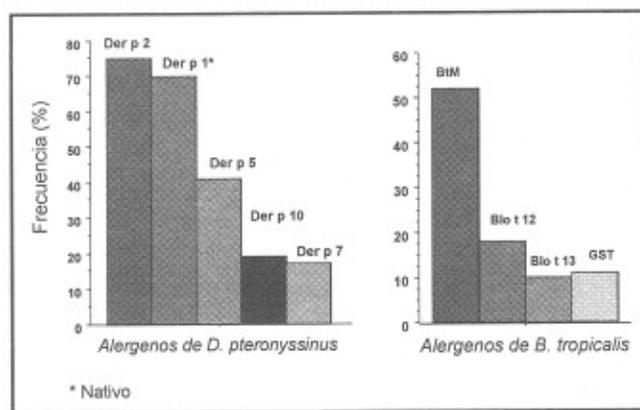


Figura 8. Frecuencia de reactividad alérgica (IgE específica) de pacientes asmáticos contra un grupo de alérgenos purificados de *D. pteronyssinus* y *B. tropicalis*.

troles. Sin embargo, en relación con el *D. pteronyssinus* encontramos que, para diagnóstico, un grupo de 3 alérgenos de este ácaro podría reemplazar el extracto total. Actualmente estamos evaluando las pruebas cutáneas hechas con los alérgenos recombinantes, ya que sería una manera más fácil para su utilización por los médicos en sus consultorios.

Referencias

- Arlian L, Vyszanski-Moher D, & Fernández-Caldas E.** 1993. Allergenicity of the mite, *Blomia tropicalis*. *J Allergy Clin Immunol* 91:1042-50.
- Arruda K, Rizzo M, Chapman M, Fernández-Caldas E, Baggio D, Platts-Mills T, & Naspitz C.** 1991. Exposure and sensitization to house dust mite allergens among asthmatic children in Sao Paulo, Brazil. *Clin Exp Allergy* 21: 433-439
- Arruda K, Vailes L, Platts-Mills T, Fernández-Caldas E, Montealegre F, Lin K, Chua K, Rizzo M, Naspitz C, & Chapman M.** 1997. Sensitization to *Blomia tropicalis* in patients with asthma and identification of allergen Blo t 5. *Am J Resp Crit Care med* 155: 342-350.
- Bavbek S, Vailes L, Wah L, Arruda L, & Chapman M.** 1997. Development of an ELISA for recombinant *Blomia tropicalis* allergen, Blo t 5: use in monitoring environment allergen exposure. *J Allergy Clin Immunol* (Abstract) 99: S162.
- Caraballo L, Puerta L, Fernandez-Caldas E, Lockey R, & Martínez B.** 1998. Sensitization to mite allergens and acute asthma in a tropical environment. *J Invest Allergol Clin Immunol* 8.
- Caraballo L, Avgioglu A, Marrugo J, Puerta L, & Marsh D.** 1996. Cloning and expression of cDNA coding for an allergen with common antibody binding specificities with three allergens of the house dust mite *Blomia tropicalis*. *J. Allergy Clin Immunol* 98: 573-579.
- Caraballo L, Puerta L, Martínez B, & Moreno L.** 1994. Identification of allergens from the mite *Blomia tropicalis*. *Clin Exp Allergy* 24: 1056-1060.
- Caraballo L, Lagares A, Mercado D, Puerta L, & Fernández-Caldas E.** 1999. Sensitization to the mite *Suidasia medanensis* in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* (Abstract) 103:S189.
- Caraballo L, Mercado D, Jiménez S, Moreno L, & Puerta L.** 1998. Analysis of the cross-reactivity between BitM and Der p 5, two Group 5 recombinant allergens from *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Int Arch Allergy Immunol* 117:38-45
- Caraballo L.** 1999. The influence on genes on the etiology of asthma. *Allergy and Clin Immunol International*. 11: In press.
- Caraballo L, Cadavid A, & Mendoza J.** 1992. The prevalence of asthma in a tropical city of Colombia. *Annals of Allergy* 68:525-529.
- Caraballo L, Puerta L, Jiménez S, Martínez B, Mercado D, Avgioglu A, & Marsh D.** 1997. Cloning and IgE binding of a recombinant allergen from the mite *Blomia tropicalis*, homologous with fatty acid-binding proteins. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 112: 341-347
- Ferrandiz R, & Casas R, Dreborg S.** 1998. Cross-reactivity between *Dermatophagoides siboney* and other domestic mites. *Int Arch Allergy Immunol* 116:206-214
- Fernández-Caldas E, Baena-Cagnani C, López M, Patiño C, Neffen H, Sánchez-Medina M, Caraballo L, Huerta J, Malka S, Naspitz C, & Lockey R.** 1993. Cutaneous sensitivity to six mite species in asthmatic patients from five Latin American countries. *J Invest Allergol Clin Immunol* 3:245-249
- Ferrandiz R, Casas R, & Dreborg S.** 1996. Sensitization to *Dermatophagoides syboney*, *Blomia tropicalis* and other domestic mites in asthmatic patients. *Allergy* 51:501-505
- Ferrandiz R, Casas R, Dreborg S, Einarsson R, & Fernández B.** 1995. Crossreactivity between *Dermatophagoides siboney* and other house dust mite allergens in sensitized asthmatic patients. *Clin Exp Allergy* 25:929-934
- Johansson E, Schmidt M, Johansson S, Machado L, Olsson S, & van Hage-Hastem M.** 1997. Allergenic cross-reactivity between *Lepidoglyphus destructor* and *Blomia tropicalis*. *Clin Exp Allergy* 27:691-699
- Lee B.** 1997. An evaluation of indoor allergens and the efficacy of allergen control modalities in Singapore. *Singapore Paediatric Journal* 39(Suppl):8-27
- Moreno L, Hamilton R, Rafnar T, Jiménez S, Marsh D, & Caraballo L.** 1997. Identification of an IgE-binding epitope of a recombinant allergen from the mite *Blomia tropicalis* (Bt). *J Allergy Clin Immunol* [Abstract] 99:S351
- Nelson R, DiNicolo R, Fernández-Caldas E, Seleznick M, Lockey R, & Good R.** 1996. Allergen-specific IgE levels and mite allergen exposure in children with acute asthma first seen in an emergency department and in non asthmatic control subjects. *J Allergy Clin Immunol* 98:258-263
- Oconnor B.** 1982. Astigmata. in: Parker S (ed): *Synopsis and Classification of living Organisms*. Vol 2. New York, Mc Graw Hill, 1982, pp 146-169.
- Portus M, Blasco C, & Fontarnau R.** 1976. Presencia en España de *Blomia tropicalis* (Bronswijk, Cock y Oshima, 1973, Glycyphagidae, sarcoptiformes) y estudio de su morfología al SEM. *Rev Iber Parasitol* 36:175-180
- Puerta L, Jiménez S, Lagares A, & Caraballo L.** 1999. High level expression of the *Blomia tropicalis* allergen, Blo t 13, in *Pichia pastoris*. *J Allergy Clin Immunol* (Abstract) 103:S185
- Puerta L, Kennedy M, Jiménez S, & Caraballo L.** 1999. Structural and ligand binding analysis of recombinant Blo t 13 allergen from *Blomia tropicalis* mite, a fatty acid-binding protein. *Int Archives Allergy Immunol* 119: En Prensa
- Puerta L, Fernández-Caldas E, Lockey R, & Caraballo L.** 1993. Mite allergy in the tropics: Sensitization to six domestic mite species in Cartagena, Colombia. *J Invest Allergol Clin Immunol* 3:198-204
- Puerta L, Caraballo L, Fernández-Caldas E, Avjioglu A, Marsh D, Lockey R, & Dao M.** 1996. Nucleotide sequence analysis of a complementary DNA coding for a *Blomia tropicalis* allergen. *J Allergy Clin Immunol* 98:932-937
- Puerta L, Fernández-Caldas E, Mercado D, Lockey R, & Caraballo L.** 1996. Sequential determinations of *Blomia tropicalis* allergens in

- mattress and floor dust samples in a tropical city. *J Allergy Clin Immunol* 97:689-91
- Puerta L, Fernández-Caldas E, Caraballo L, & Lockey R.** 1991. Sensitization to *Blomia tropicalis* and *Lepidoglyphus destructor* in *Dermatophagoides* spp-allergic individuals. *J Allergy Clin Immunol* 88:943-950
- Rizzo M, Fernández-Caldas E, Sole D, & Naspitz C.** 1997. IgE antibodies to aeroallergens in allergic children in Sao Paulo, Brazil. *J Investig Allergol Clin Immunol* 7:242-248
- Simpson A, Arruda K, & Chapman M.** 1997. Antigenic Interrelationships among mite allergens (*Blomia* and *Dermatophagoides* spp). *Clin Rev Allergy Immunol* 15:461-469
- W, Lockey Stanaland B, Fernández-Caldas E, Jacinto C, & Trudeau R.** 1994. Sensitization to *Blomia tropicalis*: Skin test and cross-reactivity studies. *J Allergy Clin Immunol* 94:452-457
- Stanaland B, Fernández-Caldas E, Jacinto C, Trudeau W, & Lockey R.** 1996. Positive nasal challenge responses to *Blomia tropicalis*. *J Allergy Clin Immunol* 97:1045-9
- Tsai J, Wu H, Shen D, Hsu E, & Wang S.** 1998. Sensitization to *Blomia tropicalis* among asthmatic patients in Taiwan. *Int Arch Allergy Immunol* 115:144-149
- Vergara C, Caraballo L.** 1998. Asthma mortality in Colombia. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 80:55-60.
- Zhang L, Chew F, Soh S, Yi F, Law S, Goh D, & Lee B.** 1997. Prevalence and distribution of indoor allergens in Singapore. *Clin Exp Allergy* 27:876-885.