

**TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA OBTENCIÓN DE ALÉRGENOS  
RECOMBINANTES DE LA ESPECIE *BLOMIA TROPICALIS* DE USO EN  
EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE ENFERMEDADES ALÉRGICAS**

*PASANTÍA REALIZADA  
EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES INMUNOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD DE  
CARTAGENA  
CARTAGENA-COLOMBIA*

**DALGYS MARTINEZ DE LA OSSA**

**AREA DE PROFUNDIZACIÓN  
BIOTECNOLOGÍA**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE  
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS  
PROGRAMA BIOLOGÍA  
SINCELEJO – COLOMBIA  
2004**

**TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA OBTENCIÓN DE ALÉRGENOS  
RECOMBINANTES DE LA ESPECIE *BLOMIA TROPICALIS* DE USO EN  
EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE ENFERMEDADES ALÉRGICAS**

*PASANTÍA REALIZADA*

*EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES INMUNOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD DE  
CARTAGENA  
CARTAGENA-COLOMBIA*

**DALGYS MARTINEZ DE LA OSSA**

**AREA DE PROFUNDIZACIÓN  
BIOTECNOLOGÍA**

**DIRECTOR: LUIS CARABALLO, MD.**

**CODIRECTOR : PEDRO BLANCO TUIRAN, MD.**

**TUTORA: SILVIA JIMENEZ, LB.**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE  
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS  
PROGRAMA BIOLOGÍA  
SINCELEJO – COLOMBIA**

**2004**

## INTRODUCCIÓN

La Biotecnología utiliza sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación, modificación de productos y procesos para usos específicos. Para el desarrollo de la biotecnología se hace necesario el fortalecimiento del conocimiento básico y experimental de las diferentes técnicas en esta disciplina, para lograr desarrollar los resultados y mejorar los procesos productivos en el sector privado como también en el bienestar y beneficio de la calidad de vida de una sociedad.

A nivel mundial la biología molecular y la biotecnología han revolucionado diferentes áreas tales como la medicina, la agricultura, la alergología y la ecología. Estas técnicas han permitido grandes avances especialmente en la alergología experimental, debido a que han ayudado a la obtención de un gran número de alérgenos de ácaros del polvo casero de las especies *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Blomia tropicalis*, *Lepidoglyphus destructor* y *Euroglyphus maynei*.

La Universidad de Sucre a pesar de tener bases teóricas y personal idóneo, no cuenta con toda la infraestructura física y tecnológica necesaria para desarrollar investigación en algunas áreas biotecnológicas, por ende esta Institución educativa promueve la proyección investigativa y científica, al establecer la vinculación con el Instituto de Investigaciones Inmunológica de la Universidad de Cartagena(I.I.I) dirigida por el Doctor Luis Caraballo, para la cooperación académica complementaria y adquisición de nuevas habilidades de pasantes, que contribuyan a la formación de un espíritu científico, permitiendo así desarrollar condiciones que favorezcan la elevación de su calidad de vida como profesionales.

## **OBJETIVO GENERAL DE LA PASANTÍA**

- ❖ Profundizar los conocimientos teóricos y adquirir nuevas destrezas en biotecnología, inmunología e inmunoquímica.

## **OBTETIVOS ESPECIFICOS DE LA PASANTÍA**

1. Aumentar los conocimientos teóricos en inmunología básica.
2. Aumentar los conocimientos teóricos en biotecnología.
3. Adquirir nuevas destrezas en inmunoquímica de alergen.
4. Adquirir nuevas destrezas en la lectura, análisis y presentación de artículos científicos.
5. Fortalecer la vocación por la investigación científica.

Durante el desarrollo de la pasantía estuve vinculada en el laboratorio de biotecnología bajo la asesoría de la Dra. Silvia Jiménez y el Dr. Luis Caraballo. Trabajé dentro del marco de dos líneas de investigación establecidas en el Instituto: Caracterización de alergen y genética molecular del asma con permanencia de tiempo completo y dedicación exclusiva en el área de biotecnología.

Los resultados de los experimentos llevados a cabo durante la pasantía no podrán ser divulgados por ser derechos pertenecientes al Instituto de Investigaciones Inmunológica de la Universidad de Cartagena. Por lo cual su ejecución o divulgación pública solo se llevará acabo si es autorizada.

## DEDICATORIA

*Agradezco a Dios por su inmenso amor y por enseñarme que todo es posible.*

*A mi Nani por su esfuerzo y amor a quien le dedico este triunfo mas en mi vida.*

*A mi padre por su enseñanza en el estudio a quien estaré agradecida toda la vida.*

*A mis hermanos del alma Guillo, Meli, Toño .*

*A Mane por su paciencia , su amor, su compañía y apoyo incondicional.*

*A mis familiares especialmente a mi tía Amparo por su cariño, confianza y sus consejos .*

Gracias a todos por ayudar a alcanzar una meta mas e mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sucre por formarme como profesional.

Al Doctor Luis Caraballo por promover en mi la vocación científica al permitir realizar la pasantía en su institución.

Al profesor Pedro Blanco por creer en mí, por toda su colaboración, paciencia y consejos.

A mi tutora Silvia por su colaboración y apoyo.

A todo el personal del Instituto especialmente a los chicos de maestría, gracias Cande, Kelly y Fran por su colaboración incondicional.

Al profe Wilson Cadrazco y a Carlos por su colaboración personal, siempre estaré agradecida.

A mis profesores a quien enormemente le agradezco sus enseñanzas durante mi carrera, Dary luz, Beltran, Consuegra, Juan Manuel, Santiago.

A mis amigos que siempre estuvieron conmigo especialmente a Julio, Yura, Edwin, Anais, Licho, Mari, Pao, Carlos, Oscar, Adri .....

## **CAPITULO I**

### **Informe crítico**

#### **INFORME CRÍTICO DEL TRABAJO DESARROLLADO DURANTE LA PASANTIA EN EL ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA.**

El asma alérgica es un trastorno inflamatorio de las vías aéreas, que limita el flujo del aire del árbol respiratorio con sintomatología de dificultad para respirar. El asma es una enfermedad con altas tasas de mortalidad que se presenta en todas las edades y estratos socioeconómicos, está asociado con componentes ambientales y genéticos, considerándose una enfermedad compleja.

En Europa, el número de muertes por esta causa se ha duplicado en los últimos diez años. En E.E.U.U. la tasa de mortalidad es de 0.4 por 100.000 habitantes entre las edades de 5 a 34 años(1). En 1994 estudios realizados en Latino América con el apoyo de la Asociación Latino Americana de Alergia, Asma e Inmunología se reportó un incremento de mortalidad por asma, en los países de Costa Rica, Argentina, Cuba, Uruguay y Venezuela con porcentajes de: 3.76, 3.38, 4.09, 5.63, 3.31 respectivamente, sin embargo en Colombia los promedios de mortalidad fueron de: 2.15%(1975), 3.3%(1985) y 1.6%(1994) (2). De esta manera se visualiza el papel trascendental que toma el asma en la comunidad científica y la necesidad de ampliar sobre el conocimiento de esta enfermedad.

Entre los factores que originan el asma se encuentran: Factores ambientales tales como alérgenos inhalados (Epitelio de animales, moho, ácaros, polen, entre otros) y factores genéticos (genes asociados que se han identificados en los cromosoma 5 y 11) (3), considerándose una enfermedad multifactorial



y compleja, pues requiere la acción de múltiples genes y la influencia ambiental.

Dentro de los factores ambientales más relevantes en el desencadenamiento del asma se encuentra los alergenos de ácaros. De estos se han identificado más de 40.000 especies distintas, que en su mayoría parasitan animales y plantas. Sin embargo, las especies relacionadas con las alergias no superan las 25 especies. De estas especies las más relevantes desde el punto de vista alergológico son los ácaros del polvo doméstico.

Los alergenos, antígenos capaces de inducir una respuesta mediada por IgE, son proteínas o glicoproteínas con peso molecular de 5–100 kd, que poseen diferentes propiedades alergénicas una vez entran en contacto con el sistema inmunológico de pacientes alérgicos, éstas moléculas se unen a la IgE específica ancladas en los mastocitos, provocando la liberación de un gran número de mediadores alergénicos, tales como la histamina, serotoninas y braquidinina (4).

Los ácaros del polvo casero pertenecen a la subclase *Acari* y el orden *Astigmata*, son considerados inofensivos para el ser humano, pero son perjudiciales para las personas genéticamente predispuesta. Sus heces se consideran la fuente de alergenos con mayor implicación en las enfermedades alérgicas (5).

Entre los factores determinantes para el desarrollo de los ácaros se encuentra la temperatura que oscila entre 25°C – 28°C y la humedad relativa de 70 – 80%, su alimentación esta basada en descamación de piel de humanos y animales, son ciegos, poseen una respiración traqueal y cútanea (6). Los alergenos se hallan principalmente en las alfombras, colchones, almohadas y otros textiles del entorno doméstico (7).

Lo anterior demuestra que la exposición a altos niveles de alérgenos especialmente de ácaros del polvo casero y una predisposición genética al padecer enfermedades alérgicas son factores fundamentales para la sensibilización y el desarrollo posterior de sintomatología alérgica, respiratoria o cutánea. Por lo tanto, las alergias juegan un papel relevante, considerándose una respuesta exagerada del organismo cuando entra en contacto con determinadas sustancias provenientes del exterior; en consecuencia, el programa del Instituto de Investigaciones Inmunológica de la Universidad de Cartagena se enfoca en el estudio y caracterización de las alergias producidas por *Blomia tropicalis* y de esta manera contribuye no solo al conocimiento etiopatogénico sino también a encontrar cuales son los factores que inducen el desarrollo de las alergias para el diagnóstico, tratamiento y prevención.



Ácaro del Polvo doméstico de la especie *Blomia tropicalis*.

### **Distribución geográfica de la especie *Blomia tropicalis*.**

En diferentes regiones geográficas del mundo, los ácaros de la familia *Fyrcg'yphidae* de la especie *Dermatcphagoides pteror.yssinus* y *Eurcgyphus*

*maynei* constituyen el 90% de los ácaros encontrados en el polvo casero, considerados como causa principal de alergia a ácaros. Sin embargo los ácaros denominados de almacenamiento, que pertenecen a la familia *Glycyphagidae* del género *Biomia*, *Lepidoglyphus*, *Tyrophagus*, se encuentra también distribuidos ampliamente en las diferentes regiones del mundo, especialmente en las regiones subtropicales y tropicales, constituyendo el ácarofauna de estas regiones. Por ello más que un ácaro de almacenamiento puede considerarse ácaro del polvo doméstico (8),(9).

La distribución de *Biomia tropicalis* alrededor del mundo es bastante representativa, especialmente en las zonas tropicales y subtropicales del mundo así como E.E.U.U, Hong Kong (10), Brasil, Venezuela(11) y Colombia, en donde se encontraron frecuencias del 84% y el 64% para las especies *Biomia tropicalis* y *Dermatophagoides pteroyssinus* respectivamente (12).

La sensibilización a *Biomia tropicalis* es otro factor importante para el padecimiento de asma y rinitis alérgica. *Biomia tropicalis* ha sido encontrado en un 16% y 96% de las muestras de polvo de las casas de las regiones tropicales(13).

Pacientes de Sur América sensibilizados a *Biomia tropicalis*, presentaron reacción positiva en un rango del 40 % y 60% aproximadamente a los ácaros *Dermatophagoides pteroyssinus*, *Dermatophagoides farine*, *Chortoglyphus arcatus*, *Biomia tropicalis* y *Lepidoglyphus destructor* (14), igualmente estudios llevados a cabo en diferentes partes del mundo presentan sensibilización a *Biomia tropicalis*, con porcentajes bastantes representativos(15)(Tabla 1).

En Cartagena, Colombia, el patrón de sensibilización para *Blomia tropicalis* tiene un promedio de 80.5% para asma y 38.8% para rinitis alérgica (16). Por lo anterior se demuestra el papel que juega *Blomia tropicalis* en la sensibilización y padecimiento de enfermedades alérgicas, así mismo se manifiesta la importancia de identificar alérgenos de este ácaro necesario para obtener reactivos apropiados para el diagnóstico y tratamiento.

Tabla 1. Sensibilización a *Blomia tropicalis* en individuos alérgicos que habitan en diferentes poblaciones del tropico.

Población	% de IgE
Indonesia	82
Chiag mai	76
Singapur	54
Bankok	41
India	40
Florida	38
Argentina	25
<i>Cartagena</i>	80.5

En consecuencia, el Instituto de Investigaciones Inmunológica de la Universidad de Cartagena (I.I.I), desde hace tiempo ha trabajado en la identificación, obtención y expresión de alérgenos recombinantes del ácaro *Blomia tropicalis*, mostrando la alergenidad de este ácaro en la población alérgica de Cartagena, donde la prevalencia de asma es del 12% y rinitis del 16.4% (17).

Para el año de 1993 el Instituto publicó la identificación de 25 fracciones alérgicas del extracto de *Blomia tropicalis*, empleando la técnica de inmunoblotting con sueros de pacientes sensibles a *Blomia tropicalis*; en este estudio se identificaron 4 importantes alérgenos con peso molecular de 11-13, 33, 36 y 64 kd, siendo las bandas (fragmento) de 11-13 kd alérgeno mayor, además con una reactividad cercana al 50% de los sueros de los pacientes (18). Otros estudios muestran la prevalencia de IgE específica a *Blomia tropicalis* (Bt M, Blot 12, Blot 13) y *Dermatophagoides pteronyssinus* (Derp 2, Der p 5, Derp 10) en 90 pacientes alérgicos de la ciudad de Cartagena, utilizando el ensayo radioalergosorbent test (RAST). Los

resultados hallados muestran que los sueros de los pacientes son altamente reactivos a los ácaros purificados *Dermatophagoides* y *Blomia* (19). También se han llevado a cabo ensayos de reactividad cruzada, pretendiendo elucidar las características de las reacciones alergénicas de las molécula. Utilizando extracto de *Blomia tropicalis* y *Suidasia medanensis* se demostró que la mayoría de los epitopes de *S. medanensis* están contenidos en el extracto de *Blomia tropicalis*, es decir que se ha encontrado reactividad cruzada entre los dos ácaros y de esta manera no es necesario incluir en el diagnóstico diario de alergias a *S. medanensis* (20). Del mismo modo se evidenció resultados similares entre *Blomia tropicalis* y *Lepidoglyphus destructor* (21). Igualmente el Instituto realizó ensayos de inhibición de Rast utilizando los alergen recombinantes del grupo 5, Bt M y Der p 5. En este estudio se observa la importancia de la reactividad cruzada entre los dos alergen mayores de esta zona trópic y la prevalencia de anticuerpo IgE para alergen de *Blomia tropicalis* y *Dermatophagoides pteroryssinus* por parte de los pacientes de esta ciudad (22).

El I.I.I de la Universidad de Cartagena ha venido utilizado la tecnología del DNA recombinante en alergología experimental para la obtención y caracterización de alergen recombinantes especialmente del ácaro *Blomia trcpicalis*. Mediante esta tecnología se ha podido obtener 3 alergen recombinates de *Blomia trcpicalis*. Bt-M (clon parcial del alergen Blo t 5) con un peso molecular de 8.385 Kd (23), Blo t 12 cuya función es desconocida, con un peso de 14.2 Kd (24), Blo t 13 una proteína de unión a ácido graso que pertenece a la familia de FABPL/lipocalinas peso molecular 14.8 Kd (25). Con frecuencias de unión a IgE entre 57-79%, 18-50% y 10% respectivamente. No obstante dichos recombinantes obtenidos hasta el momento no son lo suficiente para remplazar el extracto total de *Blomia trcpicalis*, lo cual no tiene un valor significativo como fuente de reactivo para el desarrollo de esquema de diagnóstico y tratamientos de alergias inducidas

por estas especies de ácaro en la población cartagenera (26). En consecuencia se hace necesario la búsqueda de otros alergenios de la especie *Bíomia tropicalis* que llenen las expectativas de encontrar una mezcla de alergenios recombinantes que pueda reemplazar el extracto alérgico natural y de este modo utilizarlo para el diagnóstico en pacientes alérgicos a este ácaro.

### **Alergenios del grupo 1 de los ácaros.**

En los extractos de ácaros de polvo doméstico se ha identificado un gran número de diferentes proteínas que induce la producción de anticuerpo IgE en pacientes alérgicos a polvo doméstico. Dichas proteínas o alergenios pueden realizar una gran variedad de funciones biológicas; ellas pueden ser enzimáticas, inhibidores de enzimas, proteínas estructurales, proteínas de unión a ligando (lipocalinas). Entre los alergenios de origen enzimático se encuentra la cisteína proteasa (pertenece al grupo 1) serina proteasa (pertenece al grupo 3), amilasa (pertenece al grupo 4) (27).

Los alergenios del grupo 1 (Der p1, Eur m1, Der f 1,) tienen un peso molecular de 25 Kd pertenecen a la familia de la papaína, son secretadas por el tracto digestivo de los ácaros y se encuentran en altas concentraciones en las partículas fecales (27).

El alérgeno Der p1 de la especie *Dermatophagoides pteronyssinus*, por su actividad enzimática puede alterar el epitelio respiratorio y aumentar la permeabilidad de la mucosa bronquial, además tiene la capacidad de escindir el receptor de baja afinidad de la IgE CD23 de la superficie de las células B, también escinde el receptor CD25 (receptor de la interleuquina 2), favoreciendo una respuesta de tipo Th2 y presumiblemente al desarrollo de alergias (5),(28).

Entre las actividades desarrolladas durante la pasantía se encuentra la participación en el proyecto de Alergenos Recombinantes para el uso potencial del asma Fase 2 financiado por COLCIENCIAS, dirigido por el Dr. Luis Caraballo, con la vinculación del Dr. Leonardo Puerta y la Dr. Silvia Jiménez, así como la colaboración adicional en los experimentos para la identificación de genes candidatos de asma ( genes STAT 6 y Rantes), llevados acabo en el laboratorio de genética con la cooperación de la Dr. Beatriz Martínez y la Dr. Silvia Jiménez.

En este trabajo se describirá los pasos o procesos que conllevan al **Aislamiento de un segmento de ADN que codifica para el alergeno Blo t 1 de *Blomia tropicalis* a partir de una biblioteca de ADNc de este ácaro.**

En este proyecto se plantea la búsqueda de nuevos genes que codifique alergenitos de *Blomia tropicalis*, contribuyendo a un mayor conocimiento de la composición alérgica de estos ácaros. Pretendiendo de esta manera fortalecer las bases teóricas en biotecnología e inmunología, además contribuir en el fortalecimiento del espíritu científico y en la adquisición de habilidades en el manejo de alergenitos recombinantes de *Blomia tropicalis*, protocolos y equipo de laboratorio.

Para el aislamiento de un segmento de ADN que codifica para el alergeno Blo t 1 de *Blomia tropicalis* a partir de una biblioteca de ADNc, se realizarán los siguientes pasos:

Aislamiento y Detección de clonas Recombinantes.

Existen diferentes métodos o técnicas para detectar ADN que exprese la proteína de interés en este caso los alergenitos de *Blomia tropicalis* a partir de una biblioteca de ADNc. Entre estas técnicas la ensayada en este estudio se

encuentran el tamizaje inmunológico (inmunoscreening) y PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

### **Tamizaje inmunológico**

Consiste en el empleo de anticuerpos de pacientes alérgicos a *Blomia tropicalis* que reconozcan clonas que estén expresando la proteína recombinante de interés, en este caso el alérgeno, a partir de una biblioteca de ADNc de *Blomia tropicalis*. Dentro de este tipo de tamizaje el anticuerpo primario (anticuerpo del paciente que reconoce la proteína alérgica) puede ser detectado incubando con anticuerpo secundario específico (anti-IgE) conjugado con enzimas (fosfatasa alcalina o peroxidasa) o isótopos radiactivos ( $P^{32}$   $I^{125}$ ).

La técnica radioactiva, es una de las técnicas más tradicionales empleada para detectar y aislar proteínas recombinantes, además fue la empleada por el Instituto para la obtención de los 3 alérgenos recombinantes Bt-M, Blo t 12 y Blo t 13, (23), (24), (25). Este procedimiento consiste en la utilización de métodos autorradiográficos para la detección del anticuerpo de IgE unido a anti-IgE marcados con isótopos radioactivos ( $P^{32}$   $I^{125}$ ). Muestra ventajas como su alta sensibilidad y resolución en los resultados, sin embargo durante la investigación esta técnica no fue seleccionada debido a su elevado costo, perjuicios al medio ambiente y al ser humano, instalaciones o áreas apropiadas, generando sobrecosto, lo que hace de esta técnica perder aplicabilidad en el área de alergología experimental (29).



Para el aislamiento y análisis de la clona que está expresando la proteína de interés (Blot 1), se experimentó el tamizaje inmunológico con anti-IgE marcada con fosfatasa alcalina reemplazando el material radioactivo. Esta técnica proporciona bajo costo y alta sensibilidad. No obstante en este trabajo el uso de esta técnica no fue de utilidad, ya que presentó inconvenientes, como su alta inespecificidad y baja resolución entre las muestras de control positivo y negativo, generando señales parecidas, lo cual impide identificar las clonas que estuvieran expresando la proteína, manifestando poca confiabilidad y certeza en los resultados obtenidos.

Estas dificultades que se presentan son debido a la actividad endógena de las especies, por lo cual se recomienda antes de la aplicación del anticuerpo, bloquear o inhibir la actividad de la enzima endógena, empleando levamisol al 0.1m (30). Se hallan otras técnicas no radioactivas como la quimioluminiscencia que se pueden considerar como alternativa para solucionar los problemas señalados por los tamizaje inmunológicos. Esta técnica es rápida, sensible y específica con una vida media de seis meses aproximadamente, es empleada para el tamizaje de proteínas recombinantes y el análisis de variaciones genéticas (31). De igual forma se pueden encontrar los fluorocromos los cuales pueden ser un atractivo para la detección de clonas debido a su elevada resolución y especificidad. Sin embargo las técnicas de mayor uso en la alergología y que se consideran como excelentes alternativas para el aislamiento de genes codificadores de proteínas por su alta sensibilidad, especificidad y óptimos resultados son: la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) e hibridación.

Para la realización de screening por hibridación y PCR es necesario el conocimiento previo de las secuencias de interés. Consecuentemente hoy en

día se dispone de bases de datos como centro de referencias para la búsqueda de secuencias de nucleótidos que infiere la secuencia de aminoácidos de la proteína alergénica clonada. Facilitando de esta manera el estudio y el conocimientos en las áreas tales como la biotecnología, genética, biología molecular y otras áreas relacionadas.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica que permite la obtención de enormes copias *in vitro* de secuencias específicas de ADN. Fue desarrollada por Kary Mullis en 1985. Se caracteriza por su alta sensibilidad y especificidad convirtiéndose en una herramienta fundamental en diferentes campos como la investigación (clonación de genes, detección de clonas recombinantes), medicina forense, criminalística, sanidad, genéticas y la medicina (diagnóstico de enfermedades) (32), (33).

La tecnología de PCR es la aplicada con frecuencia en alergología experimental y la elegida como opción para el aislamiento del nuevo alérgeno Blo t 1 representado en el lisado amplificado de la biblioteca de *Bíomia tropicalis*. Este procedimiento permite evaluar rápidamente si el gen que expresa la proteína de interés se halla en la biblioteca de ADNc de *Bíomia tropicalis*. Para la realización de esta metodología es necesario el uso de cebadores específicos a la secuencia diana, que se sintetizan gracias a las bases de datos existentes, obteniendo de este modo la secuencia de interés y el estudio posterior para conocer si tiene homología con otras proteínas que se encuentran en las bases de datos como el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (Genbank) y el EMBL (European Molecular Biology Laboratory), permitiendo luego la subclonación y caracterización de la proteína. Durante el desarrollo de este trabajo se aplicó la técnica PCR utilizando los cebadores informados por Mora y colaboradores

(34). El producto de PCR mostró una banda de aproximadamente 690 pb. (Franklin Torrez, Tesis.U.de Cartagena)

Existen otra metodología o aplicaciones de PCR que están siendo utilizada en la actualidad para clonar genes codificadores de proteínas alergénicas tal como el RACE PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) (34),(35). Esta técnica muestra ser bastante sensible y específica con un alto porcentaje de aislar el producto recombinante de interés. Pero su aplicación es bastante costosa y el instituto no cuenta actualmente con el presupuesto necesario para llevarlo a cabo esta metodología, lo que representa una gran dificultad a la hora de aislar la secuencia completa de ADN que codifique la proteína o el alérgeno Blo t 1.

### **Unión de fragmentos al vector o vehículo de clonación (ligación)**

Uno de los principales pasos de la clonación de genes es la ligación del gen de interés dentro de un vector plasmídico. En este procedimiento es necesario tener en cuenta la cantidad de nanogramos del producto amplificado para una excelente ligación con el vector seleccionado (36).

El proceso de ligación se puede llevar a cabo, por vía convencional de clonaje, donde se realiza la digestión del fragmento a clonar con las mismas enzimas empleadas para digerir el vector de clonación ó mediante ligación direccional, es decir a partir del fragmento amplificado sin digerir (no se realiza digestión), para este tipo de procedimiento existen vectores que proporcionan estas ventajas, como el pCRII (vector by using the TA cloning kit Invitrogen Corporation, San Diego, Calif).

Durante el proceso de ligación, se empleó la estrategia de clonación de inserción directa; utilizando vectores como el pCRII. Este vector modificado

posee características como residuos de timina (T) en los extremos 3' para la ligación complementaria con el ADN amplificado (muestra) que poseen residuos de adenina (A) en el extremo 3', producto de la reacción de la polimerasa termoestable usada en la reacción de PCR, facilitando así la ligación. Así mismo este vector ofrece sitios de clonación en el gen Lac Z, facilitando la selección de las clonas positivas (color blanco), también posee a los lados de la región de clonación secuencias de promotores de T7 y Sp6 (primer universales) que permiten utilizar para los procesos de secuenciación. Este tipo de vectores comerciales proporciona muchas ventajas para el investigador, dentro de las que se encuentra, disminución del tiempo laboral, reducción en el costo y resultados excelentes.

### **Introducción del vector recombinante en la célula hospedadora (Transformación)**

En este proceso es necesario que las células (E.coli) se ha tratada con sales como CaCl<sub>2</sub> en frío, seguido de una breve exposición 42°C, modificando la permeabilidad de la membrana bacteriana permitiendo la transformación del plasmido recombinante (37).

Este tipo de procedimiento se puede efectuar manualmente, sin embargo hoy en día existen compañías comerciales que ofrecen paquetes (Kit) de vectores con bacterias químicamente transformable brindando la inclusión exitosa del plasmido recombinante, este tipo de tecnología ha sido utilizada o seleccionada para esta investigación, evitando de esta forma los numerosos pasos que requiere su preparación. En este trabajo se utilizó Plamid Mini-Prep Kit (Qiagen Inc).

La electroporación es otro método que sirve para la introducción del DNA plasmídico en bacteria ó células vegetales. Este método consiste en someter las bacterias a un campo eléctrico de 12000volt/cm en cubetas de 0.1 y 0.4 cm de anchos estas condiciones se generan poros transientes en la membrana que permiten la entrada del DNA plasmídico. Presenta una alta eficiencia de transformación que alcanza entre  $10^9$  y  $10^{10}$  células transformadas; no obstante su manejo inadecuado provoca decrecimiento en la viabilidad de las células, por lo que su aplicabilidad ha sido escasa en alergología experimental (38).

Luego de una exitosa transformación es necesario obtener el ADN recombinante puro, lo cual se requiere la purificación del plasmido recombinante y de esta manera proseguir en la caracterización del alérgeno o proteína alérgica. Para la realización de este procedimiento actualmente se dispone de estuches (kit) como Wizard miniprep de Invitrogen usado en este trabajo, que permite la obtención pura del plasmido recombinante en grandes cantidades y la posterior obtención del ADN de interés para ligarlo en un sistema de expresión como el pGEX para expresar la proteína. Este tipo de alternativas (kit comerciales) son las más utilizadas que los procedimientos manuales por su facilidad, calidad, rapidez y óptimos resultados.

Análisis de los productos amplificados y digeridos en geles de agarosa utilizando el método electroforético.

Este método es utilizado para la separación de moléculas por su tamaño, dichas separación se realizan en geles de agarosa o poliacrilamida. Los geles de agarosa son una forma altamente purificada de agar y los más utilizados para la separación de ácidos nucleicos. Debido a su alta polimerización tienen la capacidad de separar ácidos nucleicos hasta un rango de 2000 pb a diferencia de los geles de poliacrilamida que separar

fragmentos de rangos menores. Los diferentes tamaños de ADN que se quieren aislar pueden ser separando ajustando según la concentración de agarosa. Durante el proceso de visualización del fragmento de Blo t 1 se utilizó geles de agarosa 2% por su alta resolución y fácil manipulación.

La detección se realiza mediante agentes intercalantes como el bromuro de etidio, naranja de acridina, proflavina que se intercalan entre las bases del ADN y las bandas son visualizados directamente en transiluminador de UV (39).

## **ACTIVIDADES ACADÉMICAS**

Durante el transcurso de la pasantía, tuve la oportunidad de asistir al curso teórico de inmunología dictada por los docentes del Instituto, donde tuve la oportunidad de reforzar las bases teóricas en la área de inmunología, así mismo participé en la presentación y análisis de artículos científicos presentados por docentes y estudiantes pertenecientes al Instituto en donde realicé dos presentaciones (Anexos). En este tipo de actividades se enfatiza en la presentación de artículos actualizados de temas y técnicas referente sobre el área de profundización, mostrando nuevas herramientas para el aislamiento y caracterización de los alérgenos de ácaro, así mismo fundamentar las bases genéticas que pueden estar influenciando en una determinada población para el desarrollo de la enfermedad. Además permite adquirir destreza en el manejo y presentación de artículos científicos.

### **Curso teórico de Inmunología**

- Antígenos y alérgenos
- Sistema HLA y procesamiento de antígenos

- Aspectos moleculares y funcionales de los anticuerpos
- Receptores y activación de los linfocitos T
- Moléculas de adhesión y tráfico celular
- Respuesta inmune innata (1ª parte)
- Respuesta inmune innata (2ª parte)
- Citoquinas y quimoquinas
- Respuesta inmune efectora
- Inmunidad frente a tumores
- Transplantes
- Autoinmunidad
- Inmunodeficiencias
- La respuesta alérgica

## **DISCUSION**

Se ha demostrado que el establecimiento de alergenios de ácaro del polvo doméstico ha sido importante para el desarrollo de asma alérgica y rinitis alérgica. De esta manera mediante estudios inmunoquímicos fisicoquímicos y moleculares se han podido identificar múltiples alergenios de las diferentes especies del ácaro del polvo casero. De estos alergenios la cisteína proteasa perteneciente al grupo 1 cuya actividad proteolítica, se ha asociado con el aumento en el desarrollo de asma alérgica, constituye una buena

herramienta para el estudio y diagnóstico de alergias en pacientes alérgicos a *Bíomia tropicalis*.

Estudios *in vitro* demuestran que los alérgenos del grupo 1 (Der p 1) por su actividad enzimática puede tener efecto directo en el aumento de la alergenicidad (5). En este contexto el estudio de Blo t 1 tiene una gran importancia debido a la alta frecuencia de sensibilización que presenta en individuos alérgicos al ácaro *Bíomia trcpicalis*. Por consiguiente clonar, expresar y caracterizar a nivel molecular la cisteína proteasa de *Bíomia trcpicalis* en nuestro medio es una excelente estrategia, especialmente para el desarrollo de nuevos reactivos de alta calidad, que mejoren el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades alérgicas.

La obtención y aislamiento de un segmento de Blo t 1 es de gran interés para el instituto, ya que de esta forma se amplía el número de alérgenos del ácaro *Bíomia tropicalis* disponibles en el Instituto de Investigaciones Inmunológica, mejorando así la mezcla de alérgenos necesarios para diagnosticar la mayoría de pacientes alérgicos sensibles al extracto de *Bíomia tropicalis*, además fortalece la línea de investigación de biotecnología y contribuye aún más en el conocimiento sobre los alérgenos del ácaro *Bíomia tropicalis*.

La selección del tamizaje inmunológico presenta desventajas como la necesidad de disponer de sueros altamente reactivos y suficientes capaces de reconocer la proteína recombinante, de esta forma se evitan los falsos positivos que se producen por la inespecificidad del anticuerpo primario (suero del paciente) y la proteína endógena de la bacteria. Sin embargo esta técnica presenta ventajas ante los tamizaje de PCR; como no se requiere información previa sobre la estructura del gen, esto facilita el aislamiento de



nuevos alérgenos que puedan ser trascendentales en el desencadenamiento de asma y rinitis alérgica en la población alérgica de Cartagena.

La obtención de alérgenos recombinantes es de gran ayuda, puesto que se puede disponer de grandes cantidades de alérgenos que son difícil obtenerlos naturalmente, también, permite realizar estudios de mapeos de epitopes, reactividad cruzada entre alérgenos y avanzar en la búsqueda de vacunas efectivas para el mejoramiento de enfermedades alérgicas.

La especie *Biomia tropicalis* es la especie más revelante dentro del estudio del asma alérgica en la población Cartagenera, debido al número de pacientes que están sensibilizados contra este ácaro y su presencia intradomiciliar en esta zona. De allí su importancia en nuestro medio y la necesidad de incluirla en las técnicas habituales de diagnóstico y tratamiento de enfermedades alérgicas como el asma y la rinitis.

## CONCLUSIONES

El Instituto de Investigaciones Inmunológica de Cartagena ha contribuido en el desarrollo y avance de soluciones a las enfermedades que acarrear la sociedad, como el asma y la rinitis. Como lo demuestran los resultados de los estudios publicados en diferentes revistas de circulación internacional y nacional citadas en este informe. Así mismo dispone de investigadores con un amplio conocimiento y experiencia en la aplicación de técnicas moleculares básicas, facilitando la transferencia del conocimiento y la formación necesaria para alcanzar la competitividad en el ámbito profesional. También posee laboratorios bien dotados y áreas adecuadas para la práctica y fortalecimiento de la tecnología básica de alergología experimental. Lo anterior le permite al Instituto no solo estar a la vanguardia de la

investigación básica en alergología y asma a nivel nacional, sino que también le permite formar jóvenes en el campo investigativo, contribuyendo de esta forma al bienestar de la sociedad.

El área de Biotecnología donde desempeñé la pasantía, se enfatiza principalmente en el estudio, características, función, reproducción, manejo y la utilización de proteínas recombinantes inductoras de alergias, aplicando las áreas básicas como la biología molecular, la biotecnología e inmunología. La participación en cada uno de los experimentos llevados a cabo en la línea de biotecnología me permitió analizar e interpretar críticamente los resultados obtenidos, así como participar en la búsqueda de soluciones a los problemas que se presentan durante la realización de los experimentos. De igual forma considero que las disciplinas académicas y las metodologías aplicadas en biología molecular y biotecnología se encuentran bien consolidadas. Todo lo anteriormente expuesto me permite afirmar que el Instituto de Investigaciones Inmunológicas contribuyó en el fortalecimiento de mis conocimientos teóricos, fomentó mi capacidad investigativa, estimuló mi interés en los conocimientos y técnicas de vanguardia para la práctica de la biotecnología que me permitirá desempeñarme en diferentes áreas como la salud, agropecuaria industrial y del medio ambiente.

En conclusión, considero que he culminado satisfactoriamente la complementación académica de la carrera de Biología con énfasis en biotecnología.

## REFERENCIAS

1. Jorge Salazar MD, Asma bronquial. Estado del arte. Colombia Medica 2001; Vol 32 N°2:76-82.
2. Vergara C, Caraballo L, Asthma mortality in Colombia. Ann Allergy Asthma Immunol.80:55-60.
3. Caraballo L, Hernández M, HIA haplotype segregation in families with allergic asthma. Tissue antigens 1990;35:182-186.
4. Rojas Montoya Wllian. Inmunología 2001. Duodécima edición. Cooperación para investigaciones Biológica Medellín-Colombia. pagina 293-321.
5. Takahashi Kyoko, Takai Toshiro et al. Production of enzymatically and immunologically active Der f 1 in escherchia coli. Int Arch Allergy and Immunol:2000;122:108-114.
6. Mario Sánchez Medina, Enrique Fernandez-Caldas. Ácaros en Colombia y su relación con las alérgias respiratorias. Editora Guadalupe Ltda. Santafe de Bogotá, D.C- Colombia,1994.
7. Dilia Mercado, Leonardo Puerta, Luis Caraballo. Niveles de alergenode ácaros en el polvo de habitación en Cartagena, Colombia Biomédica.1996; 16:307-14.
8. Arlian L, Berstein D, Bertein I et al. Prevalence of dust mites in the home of people with asthma living in eight different geographic areas of the United States. J Allergy Clin Immunol 1992;90:292-300.
9. Van Hage-Hamstenm M, Johansson E. Clinical and immunologic aspects of storage mite allergy. Allergy 1998;53:49-53.
10. Gabriel M, Cunnington A, Allan W, et al. Mite allergy in Hon Kong. Clin Allergy 1982;12:157-171.
11. Arruda L.K, Rizzo MC, Chapman MD, Fernandez-Caldas E, Baggios D, Platts-Mills TE: Exposure and sensitization to dust mite allergens among asthmatic children in Sao Paulo, Brazil. Clin Exp Allergy 1991;21:433-439.

12. Fernández-Caldas E, Puerta L, Mercado D, et al. Mite fauna Der p 1, Der f 1 and *Biomia tropicalis* allergens levels in a tropical environment. Clin Exp Allergy. 1993;23:292-297.
13. Stanaland Brett, Fernández-Caldas Enrique, Jacinto Carlos, Trudeau Walter and Lockey Richard. Sensibilization to *Biomia tropicalis*: Skin test and cross-reactivity studies. J Allergy Clin Immunol 1994;94:452-457.
14. Platt Mills-TAE, Chapman M.D. Dust mite immunology allergy disease and environment control. J Allergy Clin Immunol. 1987;80:755-775.
15. Lim DL, Shek Lp, Shaikh WA, Baratawidjaja K, et al. Pattern of sensitization to *Biomia tropicalis* and its recombinant allergens in four tropical asian population. J Allergy Clin Immunol 2002;109:179 Abstract.
16. Puerta L, Fernández-Caldas. Lockey RF, Caraballo L. Mite allergy in tropics sensitization to six domestic mite species in Cartagena Colombia. J. Investig Allergology Clin Immunol 1993;3:198-204.
17. Caraballo L, Cadavid diana, Mendoza Juan. Prevalence of asthma in tropical city of Colombia. Reprinted from Annals of allergy; 1992;68 number 6:525-529
18. Caraballo L, Puerta L, Martínez B, and Moreno L. Identification of allergens from the mite *Biomia tropicalis*. Clinical and Experimental Allergy, 1993,24:1056-1060.
19. Jiménez S, Caraballo L, Chua KY, Mercado Dilia, Puerta L, Mendoza D, IgE antibody response to recombinant allergen of *Biomia tropicalis* (Bt) and *Dermatophagoides pteror.ysinus* (Dp). J Allergy Clin immunol vol 103 number1, parte 2.
20. Caraballo L, Lagares A, Mercado D, Puerta L, and Fernández-Caldas Enrique. Sensitization to the mite *Suidasia medanensis* in asthmatic patients. J Allergy Clin Immunol (abstract)103:S189.
21. Puerta L, Fernández-Caldas E, Caraballo L, y Lockey R. Sensitization to *Biomia tropicalis* and *Lepidoglyphus destructor* in *Dermatophagoides* spp-allergic individuals. J Allergy Clin Immunol. 1991;88:943-950.

22. Caraballo Luis, Mercado D, Jiménez S, Moreno L, Puerta L, Chua KY. Analysis of the cross-reactivity between BtM and Der p 5, two group 5 recombinant allergens from *Biomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteror. yssinus*. International Archives of Allergy and Immunology. 1998; 117:38-45.
23. Caraballo Luis, Avjioglu A, Marrugo Javier Puerta L, Marsh D. Cloning and expression of complementary DNA coding for allergen with common antibody-binding specificities with three allergens of house dust mite *Biomia tropicalis*. J. Allergy Clin Immunol. 1996;98:573-579.
24. Puerta L, Caraballo L, Fernández-Caldas, Avjioglu A, Marsh D, Lockey R y Dao M. Nucleotide sequence analysis of a complementary DNA coding for *Biomia tropicalis* allergen. J Allergy Clin Immunol. 1996;98:932-937.
25. Caraballo L, Puerta L, Jiménez S, Matínez B, Mercado D, Avjioglu A and Marsh D. Cloning and IgE Binding of a recombinant allergen from the mite *Biomia tropicalis*, homologous with fatty acid-binding proteins. 1997. Int Arch Allergy Immunol 1997;112:341-347.
26. Jiménez S, Caraballo L, Chua KY, Mercado D, Puerta L, Mendoza D. IgE antibody response to recombinant allergens of *Biomia tropicalis* (Bt) and *Dermatophagoides pteror. yssinus* (Dp). J Allergy Clin Immunol. 2000;103:185 Abstracts.
27. Thomas Wayne R, Smith Wendy Anne, Hales Belinda. Characterization and Immunobiology of House Dust mite allergens. Int Arch Allergy Immunol. 2002;129:1-18
28. Miike Satoshi, Kita Hirohito. Human eosinophils are activated by cysteine proteases and release inflammatory mediators. J Allergy Clin Immunol. 2003;111: 704 –713.

29. Two Dimensional electrophoresis and immunological techniques. Bonnie S Dandar. 1987 plenum press, New York, pag 118.

30. Harlow, David Lane. Antibodies a laboratory manual. 1988 by Cold Spring Harbor Laboratory. Pag: 396-398.

31. Neiviny-Stickel C, Bettinotti M.d.l.p, Andreas A, et al. Noradioactive HLA class II typing using polymerase chain reaction and digoxigenin-11-2'3'-dideoxy-uridine- triphosphate-labeled oligonucleotide probes. Human Immunology. 1991;31:7-13.

32. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989 p. 14.26-14.36.

33. Innis Michael, Gelfand David, Sninsky John, White Thomas J. PCR protocols a guide to Methods and applications. 1990 by Academic Press. Inc. p. 3-11.

34. Mora C, Flores I, Montealegre F, and Diaz A. Cloning and expression of Blot 1, a novel allergen from the dust mite *Blomia tropicalis*, homologous to cysteine proteases. Clin Exp Allergy 2002;32:1-7.

35. Cheong N, Soon C, Chua K.Y. et al. Lack of human IgE cross-reactivity between mite allergens Blo t1 and Der p 1. Allergy. 2003;58:912-920.

36. Titus David. Protocols and Applications Guide second edition. 1991 promega corporation, pag 52-53.

37. Micklos David & Freyer Gred Dna science. 1990 Cold Spring Harbor laboratory Press and carolina biological company. pag 74-78.

38. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989 p. 14.26-14.36.

39) Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989 p. 6.3-6.9.

## CAPITULO II

### Revisión de tema

#### PRUEBAS CUTANEAS CON ALERGENOS RECOMBINANTES DERIVADOS DE ACAROS

\*Dalgys Martínez, Luis Caraballo.

\*Universidad de Sucre, Universidad de Cartagena.

#### **Alergenos naturales**

Los extractos alérgicos naturales han sido utilizados tradicionalmente para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades alérgicas; en los últimos años los conocimientos sobre su composición química, contenido y estabilidad han mejorado sustancialmente. Hoy se cuenta con extractos alérgicos aprobados por la Federación de Drogas y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos, la Comunidad Económica Europea y diferentes países individuales, estos extractos están disponibles comercialmente y entre ellos se encuentran el epitelio de gato, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, Veneno de Hymenoptera, extractos de pólenes, etc. (1), los cuales se han utilizados para el diagnóstico en ensayos *in vivo* (pruebas cutáneas, broncoprovocación) e *in vitro* (ELISA, RAST, etc.)

Los extractos naturales son una mezcla de moléculas las cuales pueden ser alérgicas y no alérgicas; pueden contener carbohidratos, lípidos, enzimas, inclusive pueden estar contaminados con otras fuentes de alergenos(2, 3). Además pueden contener enzimas proteolíticas que causan deterioro de su contenido y estabilidad (4). Lo anterior sustenta la importancia de la estandarización de los productos para optimizar la potencia y la estabilidad de los alergenos con el fin de obtener resultados confiables. Esto ha dirigido la atención hacia el uso de la tecnología del DNA

recombinante como opción para el mejoramiento de los reactivos empleados en el diagnóstico y tratamiento de pacientes alérgicos.

### ***Alergenos recombinantes***

Uno de los objetivos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS) es la estandarización y regulación de los alergenios, estableciendo guías que puedan ser usadas por Agencias Internacionales, Industrias y laboratorios experimentales para pruebas *in vitro* e *in vivo* (5), proporcionando mejores condiciones de investigación, al disminuir las discrepancias cuando se comparan resultados obtenidos en distintos ensayos. El trabajo de la estandarización de alergenios por parte del comité de la OMS y la IUIS está basado en la utilización de anticuerpos monoclonales y policlonales que identifiquen alergenios específicos y sus variantes, creando criterios estándares, aceptados y evaluados por las sociedades Internacionales que incentiven su uso alrededor del mundo (6).

La Biología molecular así como sus ramas afines, han permitido el avance de la alergología experimental para dar respuesta a los diferentes interrogantes que se plantea en el campo de la alergología clínica. Además la biotecnología ha permitido lograr la pureza, estabilidad y en general, la caracterización de alergenios libres de contaminantes y listos para ser empleados como referencias.

Los alergenios recombinantes minimizan el problema presente en los extractos, debido a que su proceso de obtención permite especificar concentraciones, contenido, estabilidad y potencia para su uso en ensayos *in vivo* e *in vitro*.



Tabla 1 Ventajas de la Tecnología del DNA Recombinante en la sensibilidad y especificidad del diagnóstico de las enfermedades alérgicas.

- 
- ◆ Caracterización estructural y molecular de los alergenios.
  - ◆ Obtención de grandes cantidades de alergenios.
  - ◆ Estudio de epitopes (identificación de determinantes antigénicos)
  - ◆ Resolución de la estructura tridimensional
  - ◆ Identificación de la molécula a la cual el paciente esta sensibilizado.
  - ◆ Desarrollo de suficientes alergenios recombinantes para un diagnóstico y tratamiento seguros.
- 

### ***Obtención de alergenios recombinantes***

El principal requisito es la obtención del cADN, el cual se entiende como la molécula que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína o fragmento de proteína. En primera instancia se obtiene el mRNA del tejido del organismo en estudio y mediante la enzima transcriptasa reversa se realiza una copia de cADN, posteriormente se hace una genoteca y las clonas de interés que contengan la secuencia pueden ser identificadas por hibridación, donde se utiliza una sonda de cadena simple de DNA radiomarcada; "inmunoscreening" utilizando sueros de pacientes alérgicos con IgE específica para el alergenio de interés o un anticuerpo monoclonal o mediante PCR (reacción en cadena mediante polimerasa), utilizando "primers" específicos para las clonas de interés.

El cADN es subclonado en un sistema de expresión (eucariótico o procariótico) para futuras manipulaciones (7). La elección de vectores de expresión juega un papel crucial en la obtención y reproducción de la proteína, por lo cual es necesario tener en cuenta ciertos criterios. La

disponibilidad del tiempo y recursos, la experiencia en el trabajo con sistemas de expresión y la naturaleza u origen de los alergenos.

La evolución de la biotecnología y sus disciplinas afines han sido esenciales en el desarrollo de la alergología experimental. En los últimos años el número de alergenos recombinantes se ha aumentado debido a la aplicación de la tecnología del DNA recombinante; incluso se han podido identificar alergenos que no habían podido ser aislados de su fuente natural, como por ejemplo el Bla g 4, Der p 5 y Der f 7 (6, 8), permitiendo su utilización en métodos serológicos de diagnóstico de alergias y su uso en pruebas cutáneas .

En 1988 la Doctora Chua KY y sus colaboradores, clonaron el primer alergeno recombinante de un ácaro del polvo casero, *Dermatophagoides pteroyssinus*. Este alergeno actualmente se denomina Der p 1 (9). En 1992 se publicó el primer estudio donde se empleaban pruebas cutáneas con alergenos recombinantes (10) y de allí en adelante las investigaciones con alergenos recombinantes han aumentado y ocupado un destacado lugar en las nuevas alternativas para el diagnóstico y tratamiento de alergias.

### ***Las pruebas cutáneas en el diagnóstico de alergias***

La introducción directa de un antígeno dentro de la piel de un paciente provee una técnica simple y eficiente para determinar anticuerpos IgE contra antígenos específicos. La significancia clínica de las reacciones positivas depende en gran parte de la correlación con la historia, la sintomatología presentada y otros ensayos de laboratorio.

Durante el diagnóstico de las enfermedades alérgicas la reacción inmediata es inducida por la liberación de ciertos mediadores proinflamatorios una vez la inmunoglobulina E hace contacto con su antígeno específico, uniéndose

por su Fc a los mastocitos ó basofilos y provocando la liberación de mediadores, entre los que se encuentra la Histamina, PGP2, LTC4, Triptasa, PAF y mediadores neurogénicos (sustancia p), (11).

Para las pruebas cutáneas se han utilizado diferentes técnicas. En 1860, Charley Backley realizó la primera prueba cutánea por escarificación utilizando polen de pasto, contribuyendo en parte a resolver el diagnóstico de alergias (12); en 1908 Mantoux realizó el método de intradermoreación y a partir de 1921 se inició la estandarización de los extractos. Cuatro años más tarde Lewis y Grant describieron la técnica de prick, procedimiento que más adelante fue modificado por el Dr. Pepys. Además de su utilidad en asma las pruebas cutáneas también brindan la oportunidad de identificar la etiología de la rinitis, urticarias, dermatitis y alergias.

En general las pruebas cutáneas se utilizan con el fin de:

- Confirmar el diagnóstico de alergia.
- Identificar otros alergenos no sospechosos
- Guiar para un adecuado tratamiento ó terapia.

Para realizar pruebas cutáneas debe tenerse en cuenta la historia clínica con el fin de establecer la sospecha del alergeno específico ó grupo de alergenos responsables del problema. De igual manera es indispensable la suspensión de antihistaminicos (13, 14). Todo lo anterior nos permitirá la selección de los alergenos apropiados y avanzar hacia la búsqueda de terapias (15). Entre los ensayos cutáneos tenemos, la **Prueba de puntura** (prick test), **Prueba de escarificación** (scratch test) y la **Prueba intradérmica**.

El prick es el método más utilizado por los alergólogos. Consiste en depositar una gota del extracto o solución del alergeno en estudio en la piel del paciente y con una lanceta con punta de 1 mm o una aguja hipodérmica fina

y desechable, se atraviesa la gota insertándola en la epidermis con un ángulo de 45°, luego se prosigue a levantar un poco la epidermis sin producir sangrado, provocando la entrada del alérgeno. Posteriormente se realiza la lectura de la reacción producida por la histamina a los 12 -15 minutos y para los alérgenos a los 15 - 20 minutos

(16) (Figura 1 anexo). La prueba intradérmica sólo se utiliza en caso en que se necesita aumentar la sensibilidad, o cuando la prueba de prick es negativa aún con una historia clínica sugestiva (17). Esta prueba consiste en la introducción de alérgenos en la epidermis, es mucho más dolorosa y riesgosa por la frecuencia de reacciones anafilácticas.

Es necesario el uso de controles positivo y negativos para obtener una correcta interpretación de los resultados. Para una apropiada lectura de las áreas de los habones presentados durante la realización de la prueba cutáneas, es indispensable la utilización del papulómetro y la posterior comparación con las áreas de los controles (18) (Anexo Tabla 1).

Durante la realización de pruebas cutáneas existen factores que pueden dificultar, interferir e incluso contraindicar la interpretación de los resultados, entre los que se encuentran los medicamentos, la edad del paciente puesto que la reactividad tanto en lactantes como ancianos puede ser menor, la existencia de dermatografismo, dermatitis u otras lesiones de la piel y la cualificación del personal que realiza la prueba, el cual es un factor decisivo a la hora de dar valores a los resultados. (Anexo Tabla 2)

### ***Alérgenos recombinantes empleados en pruebas cutáneas***

Entre los alérgenos recombinantes de ácaros empleados para pruebas cutáneas se encuentran:

Del género *Dermatophagoides* se han descrito 16 alérgenos aproximadamente: Der 1 a 11 y Der 14 a 16, siendo la especie *D.*

*pterior.yssinus* de mayor importancia por el alto número de pacientes alérgicos que están sensibilizados a esta especie.

Actualmente se hallan estudios que evalúan el potencial de los alérgenos recombinantes en el diagnóstico diario de las enfermedades alérgicas como el asma y la rinitis empleando las pruebas cutáneas (Tabla 2).

Para el año 2000 la revista J Allergy Clin Immunol divulga estudios que evalúan el potencial de los alérgenos recombinantes y de los extractos alérgicos, utilizando pruebas intradérmicas y de puntura. Para este experimento se usó el alérgeno Der p 5 y Blot 5 a una concentración de 5mg/ml para el ensayo prick y 5-20mg/ml para el ensayo intradérmico. Los resultados fueron excelentes, detectándose reacciones positivas aún en cantidades pequeñas como picogramos, confirmando el potencial de los alérgenos recombinantes (6). Simpson y colaboradores realizaron un estudio para estimar la reactividad cruzada entre alérgenos de las especies *Dermatophagoides* y *Blomia tropicalis* en una población expuesta a *Dermatophagoides* (19 pacientes) en el Reino Unido, el tipo de prueba cutánea utilizada en este estudio fue intradérmica, la concentración ensayada fue  $10^{-4}$ ug/ml. Los resultados presentaron 100% de positividad para el recombinante *Der p 5* y ninguna para el recombinante *Bio t 5*, demostrando así la especificidad de los alérgenos del grupo 5 (19). De igual manera para el año 1994 la revista J Allergy Clin Immunol publicó la caracterización y el análisis de la reactividad mediada por IgE contra el recombinante *Der p 5*, el número de voluntarios alérgicos a *D. pterior.yssinus* para el estudio fue de 45. El análisis señaló que el 50% de los pacientes con asma y el 29% con rinitis alérgica presentaron reactividad cutánea positiva a este alérgeno, el tipo de prueba empleada fue intradérmica y la concentración ensayada 1mg/l (20).

Chua y colaboradores para los años 1990 y 1993 caracterizaron los alérgenos del grupo 2 (peso molecular 14 Kd) y 7 (peso molecular 22 Kd) de

la especie *D. pteroyssinus* utilizado sistema de expresión eucariótica, sus funciones biológicas aún no son conocidas.

Lynch y colaboradores publicaron la reactividad (mediante prueba prick), del 70%, 60% y 52% con los alérgenos recombinantes Der p2, Der p5 y Der p7 respectivamente. En este ensayo se estudiaron 60 pacientes alérgicos y 12 pacientes como controles; 1, 10 y 100 mg/L fueron las concentraciones utilizadas. Además se pudo demostrar que el alérgeno Der p2, es uno de los alérgenos mayores de este género, al mismo tiempo que los alérgenos Der p5 y Der p7 se comportaron como alérgenos menores (21). De igual manera el Dr. Lynch demostró una actividad biológica del 60% y del 80% del alérgeno Der p5 en pacientes alérgicos al polvo casero y al extracto de ácaro, en comparación con su contraparte nativa, empleando la prueba prick. Las concentraciones utilizadas fueron de 1, 10, y 100 mg/l y 5mg/ml (22).

De la especie *Dermaioophagoides farine* se encuentra el alérgeno del grupo 11, sobre el cual existen ensayos con prueba cutánea del tipo intradérmicos, la población en estudio fue 21 pacientes sensibilizados a esta especie y la concentración empleada fue de 1mg/l (23).

**Tabla 2**

**Alergenos Recombinantes de la familia *Pyroglyphidae* empleados en prueba Cutáneas.**

<b>Alergeno</b>	<b>PM(KD)</b>	<b>Función Biológica</b>	<b>Tipo de prueba</b>	<b>Concentración</b>	<b>Ref.</b>
Der p 1	25-30	Cisteína proteasa	Prick	5mg/ml	26
Der p2	14	Desconocida	Prick	1-100mg/ml	21
			Prick	5mg/ml	26
			Prick	5µg/ml	29
			intradérmica	10 <sup>-4</sup> µg/ml	19
Der p 5	14	Desconocida	Prick	1mg/ml	20
			Prick	10mg/ml	21
			Prick	1,10,100mg/ml	22
			Prick	5mg/ml	26
			Prick	5mg/ml	28
			Prick	25mg/ml	29

Der p 7	22-28	Desconocida	Prick	100mg/ml	21
Der f 1	25	Cisteína proteasa	Prick	5µg/ml	26
Der f 11	96	Paramiosina	Intradérmica	1mg/ml	23

Estudios evidencian la relación de ciertos ácaros de almacenamiento y la sintomatología alérgica que presentan los individuos en el medio laboral. Kronqvist M y colaboradores evaluaron la reactividad de los alérgenos recombinantes *Lep d2* y *Tyr p2* cuya expresión se llevó a cabo en sistemas E.coli/Baculovirus, en este estudio se aplicó la prueba de puntura con concentraciones de 1, 10 100 mg/l y métodos serológicos en 44 granjeros sensibilizados y 38 no sensibilizado a polvo casero, los resultados indicaron que los alérgenos del grupo 2 son una herramienta útil para el diagnóstico de alergia (24).

*Blomia tropicalis* es uno de los ácaros doméstico con más relevancia en las áreas tropicales y subtropicales, con gran representación en la ciudad Cartagena, considerado uno de los principales causantes de las enfermedades alérgicas. De esta especie se han encontrado un gran número alérgenos recombinantes que han sido utilizados para el diagnóstico de las enfermedades alérgicas, con resultados bastante favorables (Tabla 3).

El alérgeno Blo t 5 tiene peso molecular de 14 kd y su función biológica no ha sido definida aún, su sistema de expresión fue en E.coli, al igual que los alérgenos del grupo 2 y 7. Son reconocidos por la mayoría de pacientes sensibilizados a ácaros del polvo casero. Existen estudios que confirman la capacidad de este grupo 5 en provocar reacciones de hipersensibilidad de tipo I. Arruda y colaboradores para el año de 1997 publicaron la utilización de

alergenos recombinantes del grupo 5 en prueba cutáneas, utilizando 139 pacientes alérgicos. La reactividad fue del 69% y la concentración empleada 5mg/ml. Los resultados fueron satisfactorios, sugiriendo la participación independiente de *Biomia tropicalis* en la sensibilización y el papel primordial que juega el recombinante Blo t 5 en el entendimiento del asma causada por la participación de este ácaro (25). Estudios realizados en Brasil revelan la seguridad y efectividad de los cócteles de alergenos recombinantes usados para el diagnóstico de pacientes alérgicos a ácaros del polvo casero. El número de pacientes ensayado fue de 58 y los alergenos utilizados individualmente en la prueba cutánea fueron: rDer p 2, rDer p 5, rBlo t 5 y los alergenos asignados en el coctel, grupo 1 (rDer p1, rDer f 1, y rDer p 2) y el segundo grupo (rDer p 1, rDer f 1, rDer p 2, rDer p 5 y el Blo t 5). La concentración ensayada fue 5mg/ml. La frecuencia de la prueba cutánea para los alergenos recombinantes fue la siguiente rDer p 1 (77.6%), rDer f 1 (78.9%), rDer p 2 (85%), rDer p 5 (54.2%), rBlo t 5 (47.1%); coctel 1 (94.8%), cóctel 2 (98.3%) (26).

Dawn y colaboradores determinaron los patrones de sensibilización para los alergenos recombinantes de *Biomia tropicalis* en cuatro ciudades de Asia. El número de voluntarios para esta investigación fueron: 101 de la India, 105 de Indonesia (Yakarta), 148 de Singapur, 108 de Chian Mai (Norte de Thailandia) y 89 de Bangkok (Tailandia). Los recombinantes estudiados fueron BtA2, Bt3, Bt6, Bt6, Bt10, Bt11, Bt12, Bt13 y Bt4, todos se obtuvieron en sistemas de expresión E.coli excepto el Bt4 que fue producido en *P. pastoris*, la concentración utilizada fue de 25µg/ml, para la prueba cutánea. En este ensayo también mostraron la unión a IgE por medio de dot blot o Elisa con suero de pacientes. Los resultados arrojados por las pruebas *in vivo* e *in vitro* confirman que *Biomia tropicalis* es el principal ácaro alérgico en áreas tropicales y al parecer la sensibilización a *Biomia* prevalece también en las ciudades cercanas al trópico. Además resaltan que los diferentes



patrones de sensibilización presentados pueden ser justificados por las variaciones del ácaro fauna en dichas ciudades (27). Kuo y colaboradores analizaron la reactividad cruzada de IgE entre los alergenos Blo t 5 y Der p 5, utilizando sueros de niños asmáticos de ciudades tropicales y subtropicales. Los alergenos fueron obtenidos en sistemas eucarióticos (*Pichia pastoris*). La reactividad de IgE fue directamente ensayada *in vivo e in vitro*, inhibición por Elisa y ensayos cutáneos. Los resultados indican que el alergeno mayor de *Bíomia*, Blo t 5 tiene poca reactividad cruzada con el alergeno Der p 5, indicando de esta manera que la alta especificidad clínica de los recombinantes es necesaria para el diagnóstico y tratamiento de inmunoterapia de individuos sensibilizados (28).

Estudios *in vivo e in vitro* han demostrado que la reactividad IgE es similar entre alergenos recombinantes y alergenos nativos; Los alergenos utilizados en este estudio fueron: rDer p 2, rDer p 5 y Blo t 5, a una concentración de 5µg/ml para la prueba prick. Se seleccionó un grupo de niños (n=40) y uno de adultos (n=11) con asma y rinitis residentes en Brasil. Todos los pacientes dieron resultados positivos a la prueba Prick con los extractos *D. pteror.yssinus* y *D. farine*, solo 41 de los pacientes fueron positivas a *B. trcpicalis*. La prueba cutánea para los alergenos rDer p 2 y rDer p 5 fueron positivas en un 82% y 51% de los pacientes alérgicos a *D. pteror.yssinus*, de igual manera la prueba fue realizada con Blo t 5, obteniendo resultados positivos en 52% de aquellos pacientes alérgicos a *B. trcpicalis*, también se halló reacción negativa a los tres alergenos Der p 2 Der p 5 Blo t 5 en 2 de los 51 pacientes positivos a ambos extractos. De esta manera se demuestra la efectividad en un 96% de la prueba cutánea en el diagnóstico de las enfermedades alérgicas y las nuevas alternativas del uso de cocteles de alergenos recombinates en el diagnóstico y tratamiento de alergias (29).

El aislamiento y caracterización de los alérgenos de *Biomia tropicalis* es de mucho interés para los alergólogos con el fin de aumentar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico en pacientes alérgicos. Cheong N y su grupo aislaron y caracterizaron un importante alérgeno de esta especie, el Blo t 3, el cual presenta homología en un 47%, 48% y 47% con Der p 3, Der f 3 Eur m 3 respectivamente. En este trabajo fue evaluado la alergenicidad de la proteína GST- Blo t 3 por inmunoensayo enzimático (ELISA) y prueba cutánea prick. Se seleccionaron 45 sueros de pacientes quienes resultaron positivos al extracto de *B. tropicalis*. La prueba cutánea prick fue realizada a una concentración de 25µg/ml (solución del alérgeno), también se emplearon soluciones glicerinadas (25µg/ml) y histamina (1mg/ml) como controles negativos y positivos respectivamente. Los datos obtenidos mostraron la alergenicidad *in vivo e in vitro* de la proteína (30).

Existen reportes donde se exponen la contaminación de los extractos alérgicos de ácaros del polvo casero con otros orígenes de alérgenos, manifestando poca confiabilidad en los diagnósticos de las enfermedades alérgicas. Van der venn MJ y colaboradores, revelaron discrepancias en el diagnóstico *in vivo e in vitro* utilizando extractos de epitelio de perro comerciales. Se incluyeron pacientes sensibilizados a alérgenos mayores de ácaros del polvo casero (Der p 1 y Der p 2) que presentaron reacciones positivas a la prueba cutánea de puntura con extractos de epitelios de perro, lo que no guarda ninguna relación. Los resultados indicaron que existe contaminación de los extractos de epitelio de perro disponibles comercialmente con ácaros del polvo casero (*Dermatophagoides pteroyssinus*) obteniendo falsos positivos durante el desarrollo de pruebas cutáneas para la determinación de enfermedades alérgicas (2).

Witterman y su grupo demostraron la relación existente entre la reactividad de los alérgenos mayores de polvo casero (Der p 1, Der p 2, Fel d 1, Lol p 1 y

Lol p 5) en prueba cutánea y ensayo de IgE específica (RAST), además especificar que otros factores pueden estar favoreciendo en los resultados de la prueba cutánea. Demostrando así que los niveles de IgE, IgE serica total y el tipo de respuesta del anticuerpo IgE, contribuyen significativamente al desarrollo de los ensayos cutáneos (31).

**Tabla 3.**

**Alergenos Recombinantes de la familia Glycyphagidae empleados en prueba cutánea**

<b>Alergenos</b>	<b>PM(kD)</b>	<b>Función Biológica</b>	<b>Tipo de prueba</b>	<b>Concentración</b>	<b>Ref</b>
Lep d 2	14	Desconocida	Prick	1,10,100 mg/ml	24
Tryp 2	14	Desconocida	Prick	1,10,100mg/ml	24
Blot 3	23.8	Serina proteasa	Prick	25µg/ml	30
Blot 5	14	Desconocida	Prick	5mg/ml	25
			Prick	25µg/ml	28
			Prick	5 µg/ml	29

### **Conclusiones**

- ❖ Las pruebas cutáneas con alergenos recombinantes de ácaros ofrece alta especificidad, rapidez y seguridad para elucidar patrones de sensibilización específicas de las enfermedades alérgicas.
- ❖ El diagnóstico de alergia de tipo I con extracto alergénicos puede identificar el origen del alergeno que causa la enfermedad pero no puede revelar la identidad molecular de las proteínas que provocan la enfermedad.

- ❖ Las pruebas cutáneas con alergen recombinante constituyen una excelente alternativa en el futuro para mejorar el diagnóstico de las enfermedades alérgicas.

## **REFERENCIAS**

1. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (AAAAI): The use of standardized allergen extract. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:583-586
2. Van der Venn MJ, Mulder M, Witteman AM, Van Ree R, Aalberse RC, Jansen HM, Van der Zee JS: False positive skin prick test responses to commercially available dog dander extracts caused by contamination with house dust mite (*Dermatophagoides pteroyssinus*) allergen. *J Allergy Clin Immunol*.1996;98:1028-1034 Abstract.
3. Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Grönlund H: The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy* 1999;29:896-904.
4. Woo RA, Phipatanakul W, Hamilton RG, Eeglestone PA: A comparison of skin prick tests, intradermal skin tests, and RASTs in the diagnosis of cat allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 21:683-688.
5. Alain L. de Weck. Allergen standardization at a crossroad? *ACI International*, 1997;9:25-30.
6. Chapman MD, Smith AM, Vailes LD, Arruda LK, Dhanaraj V, Pomes A: Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106: 409-418.
7. M. Schmidt, Hoffman D: Expression System for production of recombinant allergen: *International Archives Allergy and Immunology* 2002;128:264-270.
8. Sub committee on skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology: Position paper. Skin test used in type I allergy testing. *Allergy* 1989; 44:1-59.
9. Chua KY , Stewor GA, Thomas WR, Simpson RJ, Dilworth RJ, Plozza TM, Turner KJ: Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Derp 1. Homology with cysteine proteases. *J Exp Med* 1988;167:175-182.
10. Monser M, Cramer R, Menz G, Schneider T, Dudler T, Virchow C, Gmachl M, Blaser K, Suter M: Cloning and expression of recombinant *Aspergillus*

*fumigatus* allergen I/a (rAsp f I/a) with IgE binding and type I skin test activity. J Immunol 1992;149: 454-460.

11. Ebisawa M, Tachimoto H, Akisama K, Satio H: Role of cytokines and chemokines in the late phase allergic reaction. En: Progress in Allergy and Clinical Immunology. Vol 4:1-16. Oehling Ak and Huerta López JG editor, Cancún: C.V. Mosby Company, 1997.

12. Bousquet J, Demoly P: Allergens in 1998: from molecular biology to improved patient care. Allergy 1998;53:549-551.

13. Nelson HS. Variables in allergy skin testing. Allergy proc 1994;15: (6):265-268.

14. Malling HG. Skin prick testing and the use of Histamine references. Allergy 1984;39 (8) : 596-601.

15. Nelson HS. Variables in allergy skin testing. Allergy Proc 1994;15:256-258.

16. Demoly P, Michael FB, Bousquet J. In vivo methods for study of allergy: Skin tests, techniques, and interpretation. En : Allergy, principles and practice. Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW, editores, 5<sup>ed</sup>, St.Louis, Mosby 1998:430-439.

17. Bernestein L, Storms WW. Practice parameters for allergy diagnostic testing. Ann Allergy Asthma Immunol, 1995;75:543-525.

18. Dreborg S, Frew A. Position paper: Allergen standardization and skin test. Allergy 1993, 48 (14suppl): 48-52.

19. Simons A, Gree R, Woodcock A, Arruda LK, Chapman MD: Skin tests reactivity to natural and recombinant *Biomia* and *Dermaicphagooides* spp allergen among mite allergic patients in UK. Allergy 2003 Jan; 58 (1) 53-6.

20. Lin KL, Hsieh KH, Thomas WR, Chiang BL, Chua KY: Characterization of Der p 5 Allergen, cDNA analysis, and IgE-mediated reactivity to the recombinant protein. J Allergy Clin Immunol 1994; 94:989-996.

21. Linch NR, Thomas WR, Garcia NM, Di Prisco MC, Puccio FA, López R I, Hazell LA, Shen HD, Lin KL, Chua KY: Biological activity of recombinant Der

p 2, Der p 5, and Der p 7 allergen of the house-dust mite *Dermatophagoides pteroyssinus*. Int Arch Allergy Immunol 1997; 114:59-67.

22.Linch NR, Thomas WR, Garcia NM, Di Prisco MC, Puccio FA, López R: In vivo biological activity of recombinant Der p II allergen of house-dust mite. Int Arch Allergy Immunol 1994; 105:70–74.

23.Tsai L, Sun Y, Chao P, Ng H, Hung M, Hsieh K, Liaw S, Chua K: Sequence analysis and expression of a cDNA clone encoding a 98 kDa allergen in *Dermatophagoides farine*. Clin Exp Allergy 1999; 29:1606-1613.

24.Kronqvist M, Johansson E, Magnussun CG, Olsson S, Eriksson TL, Gafvelin G, Vann Hage, Hamsten M: Skin prick test and dust mite L. destructor and T Putescentiace. Clinical and experimental Allergy 2000; 30:670-676.

25.Arruda k, Vailes L, Platts Millis, Fernandez- Caldas E, Montealegre F, Lin K, Chua K, Rizzo M, Naspitz C, Chapman: Sensitization to *Biomia tropicalis* in patients with asthma and identification of allergen Blot 5. Am J Resp Crit Care Med 1997; 155: 342-3-50.

26. Genov R I, Jorge PO P, Fávaro AP, Tobias K, Leme VP, Smith A, Chapman MD, Arruda L: Use of Cocktails of recombinant allergens for diagnosis of mite Allergy in patients with Asthma and /or Rhinitis. J Allergy Clin Immunol volume 109, Numbers 1 page 480.

27. Lim D, Shek L, Shaikh W, Baratawidjaja K, Trakultivakorn M, Vichyanond, Cheong N, Chua KY, Lee B: Pattern of sensitization to *Biomia tropicalis* and its recombinant Allergen in four tropical Asian populations. J Allergy Clin Immunol Vol 109 Number 1 page 531.

28.Kuo I, Cheong N, Trakultiva Korn M, Lee B, Chua K: An extensive study of human IgE Cross reactivity of Blot 5 and Der p 5. 2003 March III; (3) 603 -9 J Allergy Clin Immunol. (Abstract)

29.Jorge P, Tobias K, Ferrirani V, Smith A, Chapman M, Arruda L: Recombinant allergens for diagnosis of mite allergy in children with asthma

and/or rhinitis: Comparison with commercial extracts. J Allergy Clin Immunol 2000;105:S169.

30.Cheong N, Yang L, Lee B, Chua KY. Cloning of a group 3 allergen from *Biomia tropicalis* mite: Allergy 2003; 58:352-356.

31.Witteaman A, Stapel S, Perdok G, Sjamsoendin D, Jansen H, Aalberse R, Vander Zee J: The relationship between RAST and skin test results in patients with Asthma or rhinitis: a quantitative study with purified mayor allergen. J Allergen Clin Immunol 1996; 97:16-25.



# ANEXOS

**TABLA 1**

**LECTURA DE TEST CUTÁNEOS**

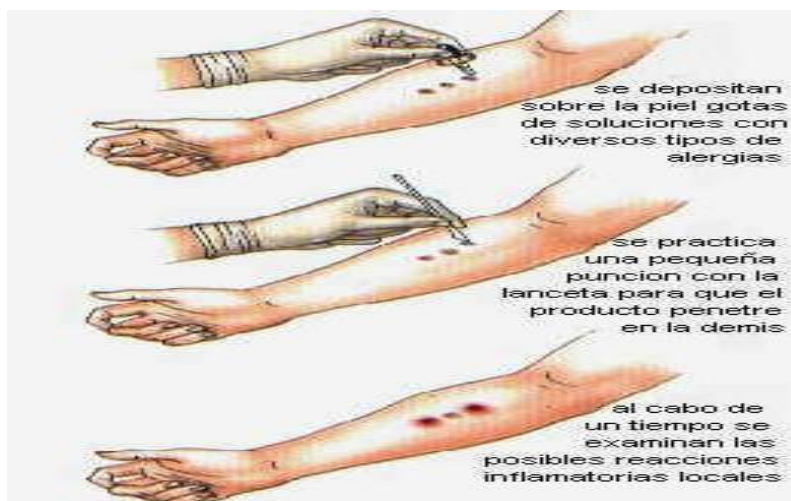
<i>Prick</i>		<i>Intradérmica</i>	
<i>Edema</i>	<i>Eritema</i>	<i>Edema</i>	<i>Eritema</i>
<i>Ctrl(+): mayor de 3mm.(histamina)</i>		<i>Ctrl(+): mayor de 5mm.(histamina)</i>	
<i>Ctrl(-): Igual a cero</i>		<i>Ctrl(-): Igual a cero</i>	
<i>Cero: Igual o menor que el control negativo</i>		<i>Cero: Igual o menor que el control. Negativo</i>	
<i>1+: 2mm &gt; el ctrl negativo</i>		<i>1+: 5-10mm</i>	<i>11-21mm</i>
<i>2+: 5-7mm</i>	<i>10mm</i>	<i>2+: 5-10mm</i>	<i>11-21mm</i>
<i>3+: 7-10mm</i>	<i>20mm</i>	<i>3+: 10-15mm</i>	<i>31-40mm</i>
<i>4+: &gt; 10mm</i>	<i>&gt;20mm</i>	<i>4+: &gt; 15mm</i>	<i>&gt;40mm</i>

**TABLA 2**

**FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS CUTÁNEAS**

- Uso de medicamentos.
- Tipo y dosis de antígeno.
- Presencia de dermografismo, dermatitis.
- Interpretación de los resultados.
- Técnica traumática.
- Potencia de los extractos.

**Figura 1 Metodología de las Pruebas cutáneas**



## Actividades Académicas

### Asistencia y presentación de Club de Revistas

Febrero 11 2003

Paul Wentetworth Jr., Jonathan E. et all. Evidence for Antibody- Catalyzed Ozone formation in Bacterial Killing and Inflammation.

Science 2002;298:2195-2199.

Presentado por: Franklin Torres, Estudiante de Maestría de la Universidad de Cartagena.

Febrero 25 2003.

Chistato Wakabayashi, Takahiro Adachi, Jurge Wienands, Takeshi Tsubata. A Distinct Signaling Pathway Used by the IgG- Containing B Cell Antigen Receptor. Science 2002;298:2392-2395.

Presentado por: Kelly Barrios, Estudiante Maestría de la Universidad de Cartagena

Marzo 4- 2003

C.Mora, I. Florez, F Montealegre and A. Diaz. Cloning and expression of Blot1, novel allergen from the dust mite *Blomia tropicalis*, homologous to cysteine proteases. Clin Exp Allergy. 2002;32:1-7.

Presentado por: Doctora Silvia Jimenez.LB. Instituto de Investigaciones Inmunológica de U. De Cartagena

Marzo 18 2003

Hori Shohei, Nomura Takashi, Sakaguchi Shimon. Control of regulatory T cell Development by the Transcription Factor Foxp3. Science 2003; 299:1057-1061.

Presentado por: Doctora Melba Muñoz. M.D

Abril 1- 2003

Pastrello Elide A., MD, Laura Farioli, BSc, Valerio Pravettoni,MD, Identification of grape and Wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin. Journal Allergy of Clinical and Immunolgy. 2003;111:350-359.

Presentado por: Vivian Villalba, Estudiante de Medicina de la U. de Cartagena.

Abril 8 2003

H.P.Rihs, B. Dumont,P.Roznek,Lundberg M, Cremer R, Bruning T, Raulf-Heimsoth M. Molecular cloning, purification, and IgE-binding of a recombinant class I chitinase from *Hevea brasiliensis* leaves (rHevB110102). Allergy 2003;58:246-251.

Presentado por: Doctora Dilia Mercado.Q.F

Abril 15 2003

Ithem Messaoudi, Jose A. Guevara Patiño, Ruben Dyal, Joel LeMaout, Janko Nikolich- Zugich. Direct Link Between mhc Polymorphismo, T cell Avidity, and Diversity in inmune Defense. Science 2002;298:1797-1800.

Presentado por: Candelaria Vergara, Estudiante de Maestría de la Universidad de Cartagena

Abril 22 2003

Platts-Mills TA, et al. The Relevance of maternal immune responses to Inhalant allergens to maternal symptoms, passive transfer to the infant, and development of antibodies in the first two years of life. J. Allergy Clin Immunol. 2003;111,(1):123-130.

Presentado por: Leonar Arroyo. Estudiante de Biología con énfasis en Biotecnología de la Universidad de Sucre.

Abril 29 2003

Karisola P, Alenius Harri, Mikkola Jari, Kalkkinen Nisse, Helin Jari, Pentikainen Olli, Repo Susana, Reunala Timo, et al. The Major Conformational IgE-binding Epitopes of Hevein (Hev b6.02) are identified by a novel Chimera-based allergen epitope mapping strategy. The journals of Biological Chemistry 2002; 277(5)pp,22656-22661.

Presentado por: Ilich de la hoz. Estudiante de medicina de la Universidad de Cartagena.

Mayo 6 2003

Diaz-Perales Araceli, Sanz Maria L, García-Casado Gloria, Sánchez-monge Rosa, García-Selles Francisco, Lombardero Manuel, Polo florentino, Gamboa Pedro M, Barber domingo and Salcedo Gabriel. Recombinant Pru p 3 and natural Pru p 3, a major peach allergen, show equivalent immunologic reactivity: A new tool for the diagnosis of fruit allergy. Journal Allergy of Clinical and Immunol 2003;111:628-633.

Presentado por: Javier Marrugo, MD, MsC. Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena.

Mayo 13 2003

Kruse S, Kuehr Joachim, Moseler Michael, Kopp Matthias V, et al. Polymorphisms in the IL-18 gene are associated with specific sensitization to common allergens and allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol 2003;111(1):117-22.

Presentado Por: María Angélica Trespalcio, pasante, estudiante de Biología con énfasis en Biotecnología Universidad de Sucre.

Mayo 20 2003

Gabriele Duetsch et al. STAT- 6 as an asthma candidate gene : Polymorphisms-Screening association and haplotype analysis In a caucasian Sib-Pair Study. Human Molecular Genetics 2002;11,(6):613-621.

Presentado por: Beatriz Martinez,Bact., McSInstituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena.

**Mayo 27 2003**

A Simpsom, R. Green, et al. Skin test reactivity to natural and recombinant *Blomia* and *Dermatophagoides* Spp. allergens among mite allergic patients in the UK. Allergy 2003; 58: 53-56.

**Presentado por : Dalgys Martínez. Estudiante de Biología con énfasis en Biotecnología de la Universidad de Sucre.**

Junio 3 2003

Stumvoll S, et al. Identification of cross-reactive and genuine *Parietaria judaica* pollen allergens. J Allergy Clin Immunol.2003;111(5):974-979.

Presentado por: leonardo Puerta.Q.F.Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena

Junio 10 2003

Ricci G, Capelli M, et al. A comparison of different allergometric tests, skin prick test, Pharmacia UniCAP and ADVIA Centaur,for diagnosis of allergic diseases in children. Allergy 2003;58:38-45.

Presentado por: Maricela Mendoza L. Estudiante de Biología con énfasis en Biotecnología de la Universidad de Sucre.

Junio 17 2003

Rodriguez-Perez R, et al. Profilin is a relevant melon allergen susceptible to pepsin digestion in patients with oral allergy syndrome. J Allergy Clin Immunol 2003; 111(3): 634-9.

Presentado por: Luz Hernández, Odont. Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena.

Junio 24 2003

Ramos J.D.A,Teo A.S.M,Ou K.L,et al. Comparative allergenicity studies of native and recombinant *Blomia tropicalis* paramiosin (Blo t 11). Allergy 2003; 58:412-419.

Presentado por: Franklin Torres, Bact. Estudiante de Maestría de la U. de Cartagena.

Julio 1 2003

Morafo V, et al. Genetic susceptibility to food Allergy is linked to differential  $T_H2$ - $T_H1$  responses in C3H/HeJ and BALB/c mice. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(5):1122- 1127.

Presentado por: Nacira Pérez. Estudiante de Química U.de Cartagena.

Julio 8 2003

Zhang Yuming, I Leaves Nicholas, Anderson Gavin G, Potting Chris P, et al. Positional cloning of a quantitative trait locus on chromosome 13q14 that influences immunoglobulin E levels and asthma. *Nature Genetic* 2003; (2)34:181-186.

Presentado por: Dr. Luis Caraballo. M.D Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena.

Julio 15 2003

Autoevaluación de los Club de revista.

Julio 29 2003

Iacovacci. P, Afferni. C, Butteroni. C, Pironi. L, Puggioni. E.M.R., Orlandi.A, Barletta.B, Tinghino.R, Ariano.R, Panzani.R.C, and Pini C. Comparison between the native glycosylated and the recombinant Cup a 1 allergen: role of carbohydrates in the histamine release from basophils. *Clin Exp Allergy* 2002;32:1620-1627.

Presentado por : Leonar Arroyo G, estudiante de Biología de la Universidad de sucre.

Agosto 5 2003

Chakir Jamila, Shannon Joanne, Molet Sophie, Fukakusa Motonori, Elias Jack, Laviolette Michel, Boulet Louis, Hamid Qutayba. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: Effect of steroids on TGF- $\beta$ , IL-11, IL1, and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111( 6):1293-1298.

Presentado por: Nathalie Acevedo. Estudiante de Medicina de la Universidad de Cartagena.

Agosto 12 2003

Newton Derek C, Bevan Sian C, Choi Stephen,RobbG. Brett, Millar Adam, Wang Yang, Marsden Philip. Translation regulation of human neuronal nitric-oxide synthase by an alternatively spliced 5'- untranslated region leader exon.*The Journal of Biological chemistry.*2003;vol 278,( 1):636-644.

Presentado por: Maria angelica Trespalacio. Estudiante en pasantia de la Universidad de Sucre

Agosto 19 2003

Maleki sohelia J, Viquez Olga, Jacks Thomas, Dodo Hortense, Champagne Elaine, Chung Si Yin, Landry Samuel J. The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function.

J. Allergy Clin Immunol.2003;112(1):190–195.

Presentado por : Franklin Torres. Estudiante de Maestría en Inmunología de la Universidad de Cartagena.

Agosto 26 2003

Yao TC, Kou ML, See LC, Chen LC,et al. The RANTES promoter polymorphism: A genetic risk factor for near-fatal asthma in chinese children. J Allergy Clin Immunol 2003; 111(6): 1285-92.

Presentado por: Beatriz Martínez, Bact, MsC. Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena

Septiembre 2 del 2003

Grendelmeier peter, Holzmann David, Himly Martin, Weichel Michael, Tresch Sandra, Ruckert Beate, Menz Gunter, Ferreira Fatima, Blaser Kurt, Wuthrich Brunello Cramer Reto. Native Art V 1 and recombinant Art v 1 are able to induce humoral and t cell- mediated in vitro and in vivo responses in mugwort allergy. J Allergy Clin Immunol.vol 111,número 6 2003;1328-1336.

Presentado por : Julieth Mora G, Estudiante de la Universidad de Pamplona

Septiembre 9 2003

Chatel JM, Song I, Bhogal B,Orson F.M. Various factors (allergen nature, mouse strain, CpG/recombinant protein expressed) influence the immune response elicited by genetic immunization. Allergy 2003;58:641-7.

Presentado por: Leonardo puerta. Q.F.phD. Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena

Septiembre 16 2003

Jambou Florence, Zhang Wei, Menestrier Monique, Klingel-Schmitt Isabelle, Michael Olivier, Cillat- Zucman Sophie, Circulating regulatory anti-T cell receptor antibodies in patients with myasthenia gravis. The Journal of Clinical Investigation.2003;112:265-274.

Presentado por: Dilia,estudiante de Maestría en Microbiología de la U. De Cartagena.

Septiembre 23 2003

Miike Satoshi, Kita Hirohito. Human eosinophils are activated by cysteine proteases and release inflammatory mediators. J Allergy Clin Immunol.2003;111: 704 –713.

Presentado por : Rosa Valdiri,estudiante de Maestría en Microbiología de la U. de Cartagena.

Septiembre 30 2003

Mochizuki Akinori, McEuen Alan, Buckley Mark, Walls Andrew F. The release of basogranulin in response to IgE-dependent and independent stimuli: Validity of basogranulin measurement as an indicator of basophil activation. J Allergy Clin Immunol.2003;112:102-108.

Presentado por: Ganivet, estudiante de Maestría en Microbiología de la U. de Cartagena.

Octubre 7 2003

Claeys S, Belder de T, holtapples G, Gevaert P, Verhasselt B, Van Cauwenberge P, Bchert C. Human *B*-defensins and toll –like receptors in the upper airway. Allergy 2003;58:748-753.

Presentado por : Monica Moreno, estudiante de Maestría en Microbiología de la U. de Cartagena.

Octubre 14 2003

Cheong N, Yang L, LeeB.W, Chua K.Y. Cloning of a group allergen from *Bíomia tropicalis* mite. Allergy 2003;58:352-356.

Presentado por: Maricela Mendoza L, Estudiante de Biología de la Universidad de Sucre.

Octubre 21 2003

Rodriguez-Perez R, Fernandez rivas M, González Mancebo E, Sanchez-Monge R, Díaz-perales A, Salcedo G. Peach profilin Cloning, heterologous expression and cross-reactivity with Bet V 2. Allergy 2003;58:635-640.

Presentado por: Doctora Luz Elena Hernandez.Odont. Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena

**Octubre 28 2003**

Kuo I C, Cheong Nge, Trakultivakorn, Lee BW,Chua KY. An extensive study of human Ige cross-reactivity of Blo t 5 aand Der p 5. J Allergy Clin Immunol 2003;111:603-609.

**Presentado por : Dalgys Martínez De la O. Estudiante de Biología de la Universidad de Sucre.**

4 de Noviembre 20003

Herranz J cuesta, Pastor C, Figueredo E, Vidarte L, De las Heras M, Durán C, Fernández-Caldas E, Miguel De J and Vivanco F. Identification of Cucumisin (CuC m1), a subtilisin-like endopeptidase, as major allergen of melon fruit. Clin Exp Allergy 2003;33:827-833.

Presentado por: Nacira Perez, estudiante de Química de la U. de Cartagena.



Noviembre 18 2003

Ueda Hironori, Howson Joanna, Esposito Laura, Heward Joanne, Snook Hywel, Chamberlain Giselle et all. Association of the T cell Regulatory genes CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. Nature 2003;423:506-510.

Presentado por: Kelly Barrios. Estudiante de Maestría en inmunología de la Universidad de Cartagena.

Noviembre 25 2003.

Noguchi e, Nakayama J, Kamioka M, Ichikawa K, Shibasaki M, and Arinami T. Insertion/deletion coding polymorphisms in hHAVcr-1 are not associated with atopic asthma in the Japanese population. Genes and Immunity 2003; 4:170-173.

Presentado por: Candelaria Vergara . Estudiante de Maestría de la Universidad de Cartagena.

Diciembre 2 2003

Weber Eric, Hunter Shirley, Stedman Kim, Olivry Thierry, Dr Vett, Hillier Andrew and McCall Catherine. Identification, Characterization, and cloning of complementary DNA encoding a 60-kd house dust mite allergen (Der f 18) for human beings and dogs. J Allergy Clin Immunol. 2003;112:79-86

Presentado por : Doctora Silvia Jimenez. LB. Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena

Diciembre 9 2003

Westphal Sandra, Kolarich Daniel, Foestisch Kay, Lauer Iris, Altmann Friedrich, Conti Amedeo, Crespo Jesus F, Rodriguez Julia, Enrique Ernesto, Viets Stefan and Scheurer. Molecular characterization and allergenic activity of Lyc e 2 (*B*-fructofuranosidase), a glycosylated allergen of tomato. Eur. J. Biochem. 2003;270:1327-1337.

Presentado: Vivian villaalba. Estudiante de Medicina de la U. de Cartagena.

Diciembre 16 2003

Cheong N, Soon S.C. Ramos J D. A., Kuo IC, Kolortkar P.R, Lee B.W, Chua K.Y. Lack of human IgE cross-reactivity between mite allergens Blot 1 and Der p 1. Allergy 2003;58:912-920.

Presentado por: Dilia Mercado. Q.F. Instituto de Investigaciones Inmunológica de la U. de Cartagena.

### **Asistencia a Seminarios:**

Marzo 31 2003

Caracterización y expresión de un gen de un alérgeno del ácaro *Biomia trcpicalis*. (finalmente llamado: Aislamiento del segmento de ADN codificador para el alérgeno Blo t 1 a partir de una biblioteca de ADNc del ácaro *Biomia trcpicalis*).

Presentado por: Franklin Torres, Bact. Estudiante de Maestría en Inmunología de la U. De Cartagena

Julio 22 2003

Células NK en la respuesta inmune innata y adaptativa.

Presentado por: Candelaria Vergara, MD. Estudiante de Maestría en Inmunología de la U. De Cartagena.

Julio 23 2003: Regulación de la respuesta inmune.

Presentado por: Kelly Barrios, Bact. Estudiante de Maestría en Inmunología de la U. De Cartagena.

Octubre 8 2003

Aislamiento del segmento de ADN codificador para el alérgeno Blo t 1 en una biblioteca de ADNc del ácaro *Biomia trcpicalis*. Sustentación trabajo de grado Franklin Torres, Bact. Estudiante de Maestría en Inmunología de la U. De Cartagena.

17 de Diciembre 2003

Estrategias de epidemiología genética en enfermedades complejas.

Presentado por: Candelaria Vergara.M.D. Estudiante de Maestría en inmunología de la U. de Cartagena.

18 de Diciembre 2003

Técnica de genotipificación de marcadores para el estudio de enfermedades complejas. Presentado por: Kelly Barrios. Bact. Estudiante de Maestría en inmunología de la U. de Cartagena.