

Respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica frente al alérgeno recombinante BtM del ácaro del polvo casero *Blomia tropicalis*

C. Parga Lozano^a, J. Marrugo Cano^b y L. Hernández Bonfante^b

^aFacultad de Medicina. ^bInstituto de Investigaciones Inmunológicas. Universidad de Cartagena. Colombia.

RESUMEN

Las enfermedades alérgicas se desencadenan cuando los individuos que tienen predisposición genética a desarrollar algún tipo de alergia (atópicos), se exponen a alérgenos sensibilizantes. Estos alérgenos son captados y procesados por las células presentadoras de antígenos (CPA), que de igual forma los presentan a los linfocitos T. Algunos de estos alérgenos tienen una mayor incidencia en el desarrollo de este tipo de patologías y son causantes de las mayores molestias en individuos alérgicos alrededor del mundo, son ellos los encontrados en las heces de los ácaros del polvo casero, los cuales tienen un origen diverso y variado en varias especies, como por ejemplo el ácaro *Blomia tropicalis*. En Cartagena de Indias, este ácaro de alta prevalencia, ha sido objeto central de estudio por el instituto de investigaciones inmunológicas de la Universidad de Cartagena, en donde se han logrado clonar, secuenciar y expresar varios de sus alérgenos como proteínas recombinantes, además se les ha estudiado su capacidad y frecuencia de unión a la IgE. El presente estudio se realizó con el objetivo de

analizar la respuesta linfoproliferativa de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de individuos alérgicos y sanos, a uno de los alérgenos recombinantes de *Blomia tropicalis*, el BtM. Dicha respuesta se estudió en CMSP de 6 pacientes alérgicos a Bt (con prueba cutánea positiva al extracto de la misma), utilizando una la técnica de proliferación celular, con incorporación de timidina tritiada, a 3 y 6 días de cultivo y a tres diferentes concentraciones de BtM. De los resultados obtenidos se destaca, la alta proliferación causada por las células del paciente JF018 a los 3 días de estímulo (41,7 IE), con la concentración más baja de proteína (100 µg/mL), además, sobresale el hecho que esta concentración fue la causante de la mayor proliferación, de las células, en todos los experimentos. También, se indujo alguna respuesta del control LAC012, contra la glutatión-S-transferasa (GST). En conclusión, los resultados del presente estudio demostraron que el alérgeno recombinante BtM, es capaz de inducir una respuesta celular en CMSP de pacientes alérgicos a Bt, además, tiene la capacidad de inducir una respuesta similar a la producida por los alérgenos naturales, pues su patrón de respuesta se asemeja al mostrado por las células estimuladas con el extracto del ácaro. Además estos resultados muestran, que se puede estar desarrollando un proceso de anergia en las células cuando estas se encuentran en presencia de exceso de antígeno. También es de resaltar que en algunos individuos (tanto alérgicos como sanos), la GST es capaz de causar respuesta proliferativa indicando su potencial poder sensibilizante en estos individuos.

Palabras clave: *Blomia tropicalis*. IgE. Linfoproliferativa. Linfocitos T.

Correspondencia:

C. Parga Lozano
Universidad de Cartagena
Facultad de Medicina
Cartagena. Bolívar (Colombia)
E-mail: chparga@hotmail.com

Proliferative response of peripheral blood mononuclear cells to the recombinant allergen BtM of the *Blomia tropicalis* mite

ABSTRACT

Allergic diseases are triggered when individuals genetically predisposed to developing an allergy (atopy) are exposed to sensitizing allergens. These allergens are captured and processed by antigen-presenting cells (APC) which presents them to T lymphocytes. Some of these allergens have a significant influence on the development of this type of disease and cause most of the symptoms in allergic individuals around the world. They are found in the feces of house dust mites, which have diverse and varied origin in several species, for example the *Blomia tropicalis* (Bt) mite. In Cartagena (Colombia), this highly prevalent mite has been a central object of study by the Institute of Immunological Research of the University of Cartagena, where several of its allergens have been cloned, sequenced and expressed as recombinant allergens. Moreover, their capacity to bind to IgE and the frequency of this process has been studied. The aim of the present study was to analyze the lymphoproliferative response of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in healthy and allergic individuals to one of the recombinant allergens of *B. tropicalis*, BtM. This response was studied in PBMC from six patients with allergy to Bt (positive cutaneous test to Bt extract), using a cellular proliferation technique, with incorporation of 3H thymidine at days 3 and 6 days of culture, and at three different concentrations of BtM. Notable among the results was the high proliferation produced by cells from patient JF018 at 3 days of stimulus (41.7 IE), with the lowest concentration of protein (100µg/mL). Moreover, in all the experiments this concentration was the cause of most of the cell proliferation. In addition, some response to control LAC012 against glutathione-S-transferase (GST) was induced. In conclusion, the results of the present study demonstrate that the recombinant allergen BtM is able to induce a cellular response in the PBMC of patients allergic to Bt. Moreover, it is able to induce a response similar to that produced by natural allergens, because its pattern of response is similar to that shown by cells stimulated with Bt extract. These results also show that a process of anergy can be produced in cells when excess antigen is present. In some individuals (both allergic and nonallergic), GST is able to cause a proliferative response, indicating its sensitizing potential in these individuals.

Key words: *Blomia tropicalis*. IgE. Lymphoproliferative. T lymphocytes.

INTRODUCCIÓN

Los alérgenos son moléculas que se derivan de muchas fuentes entre las que se encuentran los ácaros del polvo de habitación, además de los pólenes, los mohos, los animales domésticos, etc.¹. En la actualidad se han logrado clonar, secuenciar y expresar en diversos sistemas varios de ellos, mediante uso de la tecnología del DNA recombinante². La mayoría de estos alérgenos son glicoproteínas de variadas actividades biológicas, un gran número de estos han sido clonados, secuenciados y expresados en diversos sistemas tanto procarióticos como eucarióticos. A muchos alérgenos recombinantes se les ha podido probar tanto su capacidad de unirse a la IgE como de inducir respuesta de LT, en sueros y células provenientes de individuos alérgicos, lo anterior hace vislumbrar la posibilidad de ser utilizados como herramientas diagnósticas y terapéuticas en un futuro³. Tanto en países no tropicales como en los tropicales los ácaros del polvo de habitación son la principal fuente de alérgenos, siendo los del género *Dermatophagoides* y la *Blomia tropicalis* (Bt) los que ocupan los primeros lugares. La Bt se ha descrito como la principal fuente de alérgenos del polvo de habitación en Cartagena.

OBJETIVO DEL TRABAJO

Probar la capacidad del alérgeno rBtM de inducir una respuesta proliferativa en células mononucleares (CMSP) de pacientes alérgicos a Bt y en individuos no alérgicos.

MÉTODOS

Biología molecular

Obtención del extracto, construcción de la biblioteca de DNA complementario en el vector γ gt11, aislamiento del cDNA del alérgeno de *Blomia tropicalis* desde la biblioteca de cDNA γ gt11, aislamiento de DNA de las clonas de cDNA insertadas en γ gt11, subclonaje del inserto en un vector plasmídico⁴.

Selección de pacientes

Los pacientes (seis) se seleccionaron entre aquellos que cumplieron con los criterios clínicos y paraclí-

nicos de asma y rinitis alérgica y que además presentaron prueba cutánea positiva a un extracto del ácaro *Blomia tropicalis*. Como controles se utilizaron individuos sanos (cuatro) con prueba cutánea negativa.

Obtención de las muestras

A cada paciente y control se le tomaron 10 mL de sangre periférica que se disolvieron en 5 mL de RPMI-1640. Para separar la células mononucleares de sangre periférica (CMSP) por el método de Ficoll-Hypaque. Se realizó el conteo con Azul de tripano. El "pellet" se resuspendió en RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 2 % de antibiótico (Penicilina/Estrptomocina) y 0,01 % de β 2-mercaptoetanol (RPMI-10), a una concentración de 2×10^6 células/mL⁵.

Ensayos de linfoproliferación

En un plato de cultivo de 96 pozos fondo redondo se hicieron los cultivos con 100 μ L células y 100 μ L de los diferentes estímulos (RPMI-10, fitohemaglutinina (PHA) 5 μ g/mL, extracto de Bt (Ext) 5 μ g/mL,

GST 100 μ g/mL (GST1), GST 200 μ g/mL (GST2), BtM 100 μ g/mL (BtM1), BtM 150 μ g/mL (BtM2), BtM 200 μ g/mL (BtM3). Este procedimiento se aplicó a los seis pacientes y los cuatro controles por duplicado para 72 y 144 horas. Luego se incubaron a 37 °C en atmósfera de 5 % en CO₂, con 20 μ L de timidina tritiada a 0,5 μ Ci. Luego se cosechó y se hizo la lectura en el contador de centelleo beta⁵.

Análisis de la información

Los resultados en cpm se transformaron a Índices de Estimulación (IE)⁶. Junto con estos resultados, se graficó la media y la desviación estándar para cada estímulo, tanto de los pacientes a los 3 y 6 días como a los controles, así como el t de Student con una significancia del 0.05 (Pharm 4.1) (tablas I y II). Además, para determinar la diferencia entre los resultados de BtM a los 3 y a los 6 días.

RESULTADOS

Respuesta de las CMSP de pacientes alérgicos a Bt a los tres días de estímulo: Los resultados mues-

Tabla I
Resultados de la proliferación celular de los pacientes a los 3 y 6 días de estímulo con los diversos estímulos. Diagnóstico clínico. Resultados presentados como índices de estimulación

Paciente	Diagnóstico	Sexo	Bt (5 μ g/mL)	GST1 (100 μ g/mL)	GST2 (200 μ g/mL)	BTM1 (100 μ g/mL)	BTM2 (150 μ g/mL)	BTM3 (200 μ g/mL)
3 días								
PC 010	AA ^a	M	3,88	3,72	3,9	4	2,4	2
TA 011	RA ^b	F	4,9	3,7	5,1	2,3	2,2	1,6
CM 012	RA	F	7,2	5,6	4,9	12	2,2	2,3
ED 016	RA	F	0,91	3,1	2,9	0,6	1,05	1,15
PC 017	RA	F	3,3	3,1	2,9	1,7	1,7	1,2
JF 018	RA, AA	F	14,4	1,4	4,9	41,7	15,5	32,5
M \pm DS			5,8 \pm 4,7	3,4 \pm 1,36	4,1 \pm 1	10,4 \pm 15,9	4,2 \pm 5,6	6,8 \pm 12,6
6 días								
PC 010	AA ^a	M	5,8	4,4	2	2,4	1,9	2,6
TA 011	RA ^b	F	10,9	3,6	6,9	2,4	4,1	2,3
CM 012	RA	F	98,3	23,4	14,7	18,5	9,6	15,1
ED 016	RA	F	0,6	1,3	1	0,8	1	1,5
PC 017	RA	F	0,4	0,4	0,3	0,4	0,5	10,6
JF 018	RA, AA	F	0,7	1,05	2,3		0,7	0,9
M \pm DS			19,5 \pm 38,9	5,7 \pm 8,8	4,5 \pm 5,5	4,9 \pm 7,7	3 \pm 3,5	5,5 \pm 5,9

^a Asma alérgica.

^b Rinitis alérgica.

Las diferencias en la proliferación de las células con BtM 100 mg/mL, con respecto a las de 150 y 200 mg/mL es significativa, P > 0,05, a los 3 y 6 días.

M \pm DS = Media \pm Desviación estándar.

Tabla II

Resultados de la proliferación celular de los controles a los 3 y 6 días de estímulo con los diversos estímulos. Resultados presentados como índices de estimulación

Control	Sexo	Bt (5 µg/mL)	GST1 (100 µg/mL)	GST2 (200 µg/mL)	BTM1 (100 µg/mL)	BTM2 (150 µg/mL)	BTM3 (200 µg/mL)
3 días							
GY C009	M	6,4	5,2	4,6	3,3	4	1,4
AL C010	M	1,98	1,8	1,9	1,1	7,8	1,3
CM C011	F	3,4	3,2	3,8	2,2	1,7	1,4
LA C012	M	6,5	8,2	14,4	2,1	2,8	0,9
M ± DS		4,6 ± 2,3	4,6 ± 2,8	6,2 ± 5,6	2,2 ± 0,9	4,1 ± 2,7	1,3 ± 0,2
6 días							
GY C009	M	42,4	13,1	7,2	12,1	10,5	1,1
AL C010	M	9,5	3,1	2,2	2	2,2	1,5
CM C011	F	1,3	1,3	0,7	0,6	0,6	1,2
LA C012	M	9,2	6,7	12,8	1,6	3	2,7
M ± DS		15,6 ± 18,3	6,1 ± 5,2	5,7 ± 5,5	4,1 ± 5,4	4,1 ± 4,4	1,6 ± 0,7

Las diferencias en la proliferación de las células de los pacientes, con todos los estímulos, con respecto a las de los controles es significativa, $P > 0,05$, a los 3 y 6 días. M ± DS = Media ± Desviación estándar.

tran como la mayoría de los pacientes respondieron de forma leve al estímulo con las tres concentraciones de BtM, solo el paciente JF018 reaccionó fuertemente a las tres concentraciones de BtM, con un valor máximo de 41,7 IE (100 µg/mL), 32,5 (200 µg/mL) de y 15,5 (150 µg/mL), valores por encima de los producidos por los demás pacientes (tabla I). Este mismo patrón de estimulación también se observó con el extracto, con un valor de 14,4 IE (tabla I). De otra parte, los resultados obtenidos con el paciente CM012, presentan una respuesta importante con un valor de 12 IE (100 µg/mL) (tabla I), valor por encima del obtenido con las otras concentraciones en el mismo experimento.

Respuesta de las PBMC de pacientes alérgicos a Bt, a los seis días de estímulo

Los resultados muestran que el paciente JF018 que había producido una fuerte respuesta a los tres días de estímulo con BtM, disminuyó significativamente ($P > 0,05$) a los 6 días, con valores por debajo de 1 IE (tabla I). Y el paciente CM012, que había reaccionado débilmente a las tres concentraciones de BtM, esta vez aumentó sus índices de estimulación significativamente ($P > 0,05$) con respecto a los tres días, 18,5 IE (100 µg/mL), 9,6 (150 µg/mL) y 15,1 (200 µg/mL). Al igual que los tres días, predomina el hecho que la concentración con mayor influencia en la proliferación de las células es la de

100 µg/mL, $P > 0,05$ (tabla I). Por otra parte, se destacan los valores de IE del paciente CM012 con las concentraciones de GST, de 23,4 y 14,7 (tabla I), para GST1 y GST2, respectivamente.

Respuesta de las PBMC de controles, a los tres días de estímulo

En los resultados obtenidos con los pacientes, se aprecia que las CMSP de los controles, no reaccionaron de forma considerable al estímulo con las tres concentraciones de BtM, esta diferencia en índices de estimulación es significativa, $P > 0,05$ (tabla II), con respecto a los pacientes, tanto a los 3 días como a los 6 días de estímulo. Se destaca la alta estimulación que produjeron las células del control LAC012 con GST, con valores de IE de 8,2 y 14,4 (tabla II), para las concentraciones de GST1 y GST2, respectivamente.

Respuesta de las CMSP de los controles, a los seis días de estímulo: En estos resultados se observa que, al igual que lo sucedido a los tres días de estímulo los valores de IE, se conservan menores que los producidos en los pacientes, con diferencia significativa ($P > 0,05$). A pesar de esto se destaca una ligera respuesta de estimulación del control GYC009 con el extracto, con el BtM1 y BtM2, con valores de IE 42,4, 12,1 y 10,5 (tabla II), respectivamente. También es importante el hecho que los IE del control LAC012 para GST, disminuyeron, tanto para GST1 6,7 como para GST2 12,8 (tabla II).

CONCLUSIONES

Este estudio produjo un aporte interesante para el conocimiento de la respuesta celular, que se origina a partir del estímulo de las CMSP de pacientes alérgicos a *Blomia tropicalis*. Como parte inicial del estudio, la capacidad de la proteína recombinante BtM de inducir una respuesta en CMSP de pacientes alérgicos a Bt, y que esta respuesta, conserva un patrón de proliferación similar a las CMSP estimuladas con el extracto de Bt, lo que se presenta como un punto de discusión interesante, al mostrar a las proteínas recombinantes como imitadoras de la respuesta inmunológica celular^{3,7-8}. También se logró determinar que los promedios de las estimulación de las células de los pacientes a los 3 y a los 6 días, generados por el estímulo con la proteína recombinante, era de magnitud superior a la vista en los controles ($P > 0,05$). Resultado que va de la mano, con los datos obtenidos en las pruebas cutáneas. Esto se suma a la creencia que, la liberación de histamina por las células cebadas, después de la unión a la IgE a sus receptores en la superficie de la misma, y que es medido de manera cualitativa en la prueba cutánea, están en relación estrecha con la proliferación de las CMSP, concluyendo que la respuesta alérgica va acompañada por una producción de IgE y liberación de histamina, así como proliferación específica de linfocitos T alérgico específicos^{3,8}. De igual forma, se destaca que no todas las CMSP de los pacientes reaccionaron de manera apreciable cuando fueron estimulados con las diferentes concentraciones de la proteína recombinante. A pesar de que los pacientes presentaron prueba cutánea positiva con el extracto de Bt. Mostrando que, a pesar que el BtM es un segmento del alérgeno mayor de Bt, algunos de los pacientes muestran mayor respuesta a otros alérgenos del extracto, de aquí el hecho que algunos de los pacientes de este estudio, no presentaron niveles altos de proliferación cuando fueron estimulados con la proteína recombinante. Por otro lado, es importante que la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que es la más baja de las utilizadas en el estudio, produce una proliferación significativamente mayor que las demás concentraciones ($P > 0,05$), lo cual hace pensar que el exceso de antígeno provoca anergia clonal dosis dependiente en las células de los pacientes, y produjeran respuestas celulares rápidas a los tres días y disminuyeran a los 6 días. Otro he-

cho a destacar de los resultados es lo ocurrido con el control LAC012, el cual presenta bajos niveles de proliferación con el extracto y con las diferentes concentraciones de la proteína recombinante, pero produjo altos niveles de proliferación cuando sus células fueron estimuladas con GST. Posiblemente, esté sucediendo que este individuo esté sensibilizado contra esta proteína y de allí su respuesta⁹. Partiendo de todo lo anterior, se puede sugerir a los alérgenos recombinantes, como una buena y novedosa forma de tratamiento inmunoterapéutico, con notables resultados a nivel experimental en trabajos anteriores y en el presente estudio^{2,10,11}.

BIBLIOGRAFÍA

1. Holgate S, Robinson C, Church M. Mediators of Immediate Hypersensitivity. En: Middleton, et al, eds. Allergy Principles and Practice. Fourth edition. Mosby. Press 1993; vol. I. pp. 267-301.
2. Ong E, Griffith I, Knox R, Singh M. Cloning of a cDNA encoding a group-V (group-IX) allergen isoform from rye-grass pollen that demonstrates specific antigenic immunoreactivity. *Gene* 1993;134:235-40.
3. Valenta R, Vrtala S, Laffer S, Spitzauer S, Kraft D. Recombinants allergens. *Allergy* 1998;53:552-61.
4. Caraballo L, Avjioglu A, Marrugo J, Puerta L, Marsh D. Allergens, IgE, mediators, inflammatory mechanisms. Cloning and expression of complementary DNA coding for an allergen with common antibody-binding specificities with three allergens of the house dust mite *Blomia tropicalis*. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:573-9.
5. Fernandez-Botran R, Vetvicka V. Cells. En: Methods in cellular Immunology. CRS press. 1995;s pp. 1-28.
6. O'Brien R, Thomas W, Tait B. An immunogenetic analysis of T-cell reactive regions on the major allergen from the house dust mite, Der p 1, with recombinant truncated fragments. *J Allergy Clin Immunol* 1994;93:628-34.
7. Smith A, Chapman M, Taketomi E, Platts-Mills T, Sung S. Recombinant allergens for immunotherapy: A Der p 2 variant with reduced IgE reactivity retains T-cell epitopes. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:423-5.
8. Valenta R, Sperr R, Ferreira F, Valent P, Sillaber C, Tejkl M, et al. Induction of specific histamine release from basophils with purified natural and recombinant birch pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1993;91:88-97.
9. Mosmann T, Sad S. The expanding universe of T-Cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today* 1996;17(3):138-46.
10. Platts-Mills T, Mueller G, Wheatley L. Future directions for allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:335-43.
11. Bousquet J, Lockey R, Malling H, WHO panel members. Allergen immunotherapy: Therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:558-62.