



CIENCIAS BIOMÉDICAS

Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba, 2020

Avances en la caracterización inmunobiológica, molecular y clínica de los alérgenos de *Blomia tropicalis*

Alexis Labrada Rosado 1 * <https://orcid.org/0000-0003-0956-7946>
Momtchilo Russo 2 <https://orcid.org/0000-0003-3553-3184>
Raúl Lázaro Castro Almarales 1 <https://orcid.org/0000-0002-9344-473X>
Leonardo Puerta 3 <https://orcid.org/0000-0003-2246-9697>
Wendy Ramírez González 1 <https://orcid.org/0000-0001-6349-1116>
Maytee Mateo Morejón 1 <https://orcid.org/0000-0003-2606-3416>
Mirta Álvarez-Castelló 4 <https://orcid.org/0000-0003-0370-3759>
Damaris Torralba Averoff 1 <https://orcid.org/0000-0002-4212-9203>
Anette García Freijo 1 <https://orcid.org/0000-0002-1813-7318>
Mercedes Ronquillo Díaz 4 <https://orcid.org/0000-0001-9778-0557>
Alain Morejón Calderón 1 <https://orcid.org/0000-0002-2233-1922>
Mary Carmen Reyes Zamora 1 <https://orcid.org/0000-0002-8374-9011>
María del Carmen Luzardo Lorenzo 5 <https://orcid.org/0000-0001-7550-3268>
Luis Caraballo 3 <https://orcid.org/0000-0002-5204-1109>

¹ Centro Nacional de Biopreparados, Bejucaí. Mayabeque, Cuba

² Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil

³ Instituto de Investigaciones Inmunológicas, Universidad de Cartagena. Cartagena, Colombia

⁴ Hospital Universitario Calixto García. La Habana, Cuba

⁵ Facultad de Biología, Universidad de La Habana. La Habana, Cuba

*Autor para la correspondencia: labrada@biocen.cu

RESUMEN

Palabras clave

alérgenos; inmunoterapia; asma; ácaros; *Blomia tropicalis*

Introducción. El ácaro del polvo doméstico *Blomia tropicalis* (Bt) es un agente etiológico importante del asma alérgica en zonas tropicales, que se distingue sustancialmente del género *Dermatophagoides*, más común globalmente. El objetivo de este trabajo fue evaluar las propiedades inmunobiológicas de los alérgenos de Bt. **Métodos.** Se emplearon alérgenos purificados de cultivo de Bt, como plataforma tecnológica desarrollada en el Centro Nacional de Biopreparados (BIOCEN), se evaluaron formulaciones de Bt en modelos murinos de alergia respiratoria y en estudios clínicos de inmunoterapia en asmáticos con la vacuna VALERGEN®-BT. Se empleó espectrometría de masa para la caracterización molecular y anticuerpos monoclonales anti Blo_t13, obtenidos en BIOCEN, para el mapeo de epítopes. **Resultados y discusión.** Se evidenció por primera vez la interacción de Bt con receptores TLR de la inmunidad innata e inducción de inflamación neutrofílica, característica del fenotipo severo del asma. Se identificó a Blo_t2 como el componente predominante en los extractos alérgicos, con alto reconocimiento de IgE en asmáticos cubanos (80 %), mayor que Blo_t5, considerado actualmente el alérgeno principal. Se identificaron epítopes de otra molécula:



Blo_t_13 y su reactividad cruzada con proteínas humanas. Se obtuvieron las primeras evidencias en humanos del efecto específico y no cruzado de la inmunoterapia con Bt hacia *Dermatophagoides*. Estos resultados guiaron el diseño de la vacuna terapéutica de segunda generación Prolinem®-BT empleando como adyuvante alúmina y ligandos TLR4. Los resultados preclínicos mostraron su efecto antialérgico con solo 3 dosis y su seguridad. Como conclusiones se confirma la necesidad de la inclusión de la inmunoterapia a Bt, para el manejo efectivo del asma alérgica en los trópicos.

Progress in the immunobiologic, molecular and clinical characterization of *Blomia tropicalis* allergens

ABSTRACT

Keywords

allergens; immunotherapy; asthma; mites; *Blomia tropicalis*

Introduction. The House Dust Mite *Blomia tropicalis* (Bt) is an important etiological agent of allergic asthma in tropical areas. Bt is substantially apart from the genus *Dermatophagoides*, which is more common globally. The objective of this paper was to assess the immunobiological features of Bt allergens. **Methods.** Purified allergens from Bt cultures were used, based on a technological platform developed at BIOCEN. Bt formulations were evaluated in murine models of respiratory allergy and in clinical studies of asthma immunotherapy with the VALERGEN®-BT vaccine. Mass spectrometry was used for molecular characterization and anti-Blo_t_13 monoclonal antibodies, obtained in BIOCEN, for epitope mapping. **Results and Discussion.** For the first time, the interaction of Bt allergens with innate immunity TLR receptors and the induction of neutrophilic inflammation, a known feature of the severe asthma phenotype, was identified. Native Blo_t_2 was identified as the predominant component of allergenic extracts, showing high IgE binding frequency in Cuban asthmatics (80 %), greater than Blo_t_5, currently considered the major allergen. Moreover, the IgE epitopes and cross-reactivity to human proteins of another Bt allergen, Blo_t_13, were identified. The first piece of evidence in humans of the specific and non-cross-reactive effect of Bt immunotherapy towards *Dermatophagoides* allergens was obtained. These results guided the design of a second-generation therapeutic vaccine, Prolinem®-BT, using alumina and TLR4 ligands as adjuvants. Its pre-clinical development results showed its antiallergic effect with only three doses, and its safety. Conclusion: Overall, these results confirm the need for the inclusion of Bt-specific immunotherapy for the effective management of allergic asthma in tropical countries.

INTRODUCCIÓN

Los ácaros del polvo doméstico constituyen el principal agente etiológico del asma alérgica en los ambientes tropicales. Las especies *Dermatophagoides pteronyssinus* y *D. farinae* son las de mayor importancia a nivel mundial. Sin embargo, en regiones tropicales húmedas la especie *Blomia tropicalis* (Bt) compite en importancia o incluso puede ocupar el primer lugar en cuanto a sensibilización alérgica poblacional. ⁽¹⁾ Se han identificado 15 proteínas alergénicas provenientes de este ácaro; ⁽²⁾ no obstante, a pesar de que varias poseen homología con las de *Dermatophagoides*, muestran una escasa reactividad cruzada con las mismas. Trabajos previos identificaron el perfil de sensibilización de los alérgicos cubanos a este ácaro. ⁽³⁾ En Cuba la sensibilización a Bt puede alcanzar el 75 % entre los asmáticos. ⁽⁴⁾ BIOCEN desarrolló e introdujo

en el sistema de salud cubano desde 2007 las primeras 3 vacunas de alérgenos de ácaros para la inmunoterapia del asma alérgica. ⁽⁵⁾ Entre ellas, VALERGEN®-BT que constituye la primera de Bt que haya logrado registro sanitario como producto farmacéutico a nivel mundial.

A partir del uso de alérgenos purificados de cultivos de Bt, como plataforma tecnológica desarrollada en BIOCEN, este compendio de trabajos aporta nuevos conocimientos sobre las características inmunobiológicas de las moléculas alergénicas de Bt y su aplicación para el desarrollo de vacunas antialérgicas de segunda generación.

MÉTODOS

Fueron empleados un conjunto diverso de metodologías que se describen en cada una de las publicaciones que con-

forman este resultado.^(6,7,8,9,10) Los extractos alérgicos fueron obtenidos a partir del cultivo de ácaros de Bt, purificados mediante ultrafiltración, liofilizados y estandarizados en cuanto a actividad de unión de IgE humana, expresada en unidades biológicas.⁽⁵⁾ La fracción de bajo peso molecular (FBPM) del extracto de Bt se obtuvo por precipitación con sulfato de amonio 60 % del mismo y se fraccionó en una columna Superdex 75 HR. Para la caracterización molecular de sus componentes alérgicos se empleó espectrometría de masa (Orbitrap) a partir de bandas separadas por SDS-PAGE. Para el mapeo de epítopes de Blo t 13 se emplearon anticuerpos monoclonales generados previamente en BIOECN contra esa molécula.⁽¹¹⁾ En adición a las proteínas nativas de Bt se usaron los alérgenos recombinantes rBlo t 2 y rBlo t 5, provistos por el Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena.

Se realizaron experimentos en modelos murinos de sensibilización alérgica respiratoria con ratones C57/BL6 y Balb/C en 2 instalaciones: Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Sao Paulo, Brasil y BIOECN, Cuba. Se evaluó la respuesta inmune por ELISA para anticuerpos séricos, respuesta celular sistémica en ganglios mediante citometría de flujo, respuesta inflamatoria local en las vías respiratorias inferiores mediante determinación de citocinas y análisis histológico. Para la evaluación de mecanismos inmunitarios se emplearon ratones genéticamente modificados *knockout* de diferentes moléculas, en la primera instalación. Los experimentos en animales contaron con la aprobación de los respectivos comités de ética institucionales. Se evaluó la toxicidad aguda del producto de acuerdo a las guías recomendadas internacionalmente para productos farmacéuticos.

Las investigaciones clínicas fueron llevadas a cabo con los productos VALERGEN; los protocolos fueron aprobados prospectivamente por Comités de Ética y por la Autoridad Regulatoria Nacional Cubana (CECMED) y fueron registrados en el Registro Público Cubano de Ensayos Clínicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización molecular e inmunobiológica de alérgenos individuales de Bt

Los alérgenos mayores o principales se definen como aquellos componentes que contribuyen en mayor medida a la actividad IgE de la fuente alérgica con reconocimiento de al menos 50 % de los pacientes.⁽¹²⁾ Los alérgenos mayores de Bt no están aún caracterizados completamente.⁽¹³⁾ Hasta ahora se considera a Blo t 5 como su componente principal en cuanto a unión de IgE, reportándose valores de hasta 54,5 % en Brasil.⁽¹⁴⁾ Sin embargo, otros alérgenos como Blo t 2 pudieran también ser igualmente importantes.⁽¹⁵⁾ Este trabajo arrojó datos al respecto en la población alérgica cubana.

La fracción alérgica de bajo peso molecular (FBPM) purificada de Bt fue caracterizada mediante espectrometría de masa. Blo t 2 se identificó como una doble banda que migra en SDS-PAGE a 17KDa (figura1) contando con 6 isoformas y constituyó el 92 % de esta banda. Su frecuencia de unión de IgE, evaluada por *Immunoblotting* con sueros de 63 pacientes alérgicos a Bt, fue de 80 %. Los positivos a la banda correspondiente a Blo t 2 no lo fueron a Der s 2 (homólogo de Blo t 2 en *D. siboney*), lo cual indica que la positividad a Bt no fue consecuencia de reactividad cruzada con *Dermatophagoides*.^(16,17) Por otra parte, la reactividad IgE a rBlo t 5, evaluada por ELISA en sueros de 115 pacientes, fue de solo 38 %, mientras que para rBlo t 2 alcanzó 53 %. La correlación con la prueba cutánea resultó mayor para rBlo t 2 ($r = 0,391$; $p < 0,0001$) que para rBlo t 5 ($r = 0,263$; $p < 0,005$). O sea, rBlo t 2 fue el mejor correlato de sensibilización a Bt en la población cubana. Estos resultados sugieren la clasificación de Blo t 2 como alérgeno mayor, aspecto muy actual, teniendo en cuenta que la mayor parte de los trabajos publicados han usado Blo t 2 recombinante y no la molécula nativa.⁽¹⁵⁾

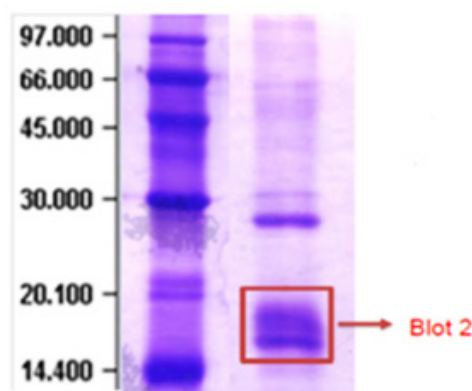


Fig.1. Caracterización por SDS-PAGE de la fracción alérgica purificada (FBPM) de Bt. La doble banda a 17KDa contiene 6 isoformas de Blo t 2, según identificación por espectrometría de masa.

Adicionalmente a Blo t 2 y Blo t 5, un trabajo previo había identificado a Blo t 13, proteína de unión de ácidos grasos (FABP), como un componente con alto reconocimiento por la IgE de pacientes alérgicos en áreas tropicales y en Cuba, donde alcanzó 53 %.⁽¹⁸⁾ Blo t 13 es un componente presente en VALERGEN-BT.⁽¹¹⁾ Con la ayuda de un panel de sueros de pacientes alérgicos y anticuerpos monoclonales específicos a Blo t 13 (BIOECN),⁽¹¹⁾ se identificaron 2 epítopes reconocidos por las IgE e IgG humanas. La reactividad cruzada de rBlo t 13 con las proteínas homólogas humanas FABP3 y FABP4 superó 40 %. El epítipo principal resultó estar involucrado en la reactividad cruzada a las FABP. Este hallazgo, ha constituido el primero en identificar reactividad cruzada

de alérgenos de ácaros con proteínas autólogas y sugiere un posible papel de Blo t 13 como enlace entre la alergia y la autoinmunidad.

Respuesta inmune a alérgenos de Bt en modelos murinos

Mientras la definición clásica de alergenicidad se limita al reconocimiento de una molécula por la IgE, la génesis de esa respuesta depende de la capacidad intrínseca de los alérgenos de inducir una inmunidad adaptativa de tipo Th2. Esta inmunogenicidad suele estar ligada a la función biológica intrínseca de estas proteínas y a interacciones inespecíficas con receptores de la inmunidad innata.⁽¹⁹⁾ En ese contexto es relevante evaluar los alérgenos de *Bt* en modelos de alergia respiratoria *in-vivo*.

En un primer trabajo fruto de la colaboración entre BIOCEN y la Universidad de São Paulo⁽⁹⁾ se evaluaron extractos de Bt en modelos de sensibilización alérgica en ratones C57/BL6. Los animales fueron sensibilizados con inyecciones de Bt en alúmina (con o sin LPS) y retados con dosis intranasales del alérgeno. El hallazgo principal fue la identificación de un fenotipo de inflamación pulmonar neutrofílica por la combinación de Bt con LPS (componente usualmente presente en el polvo doméstico), mientras que en ausencia de LPS, la inflamación fue la típica de la respuesta Th2 (figura 2). Empleando ratones

knockout se identificó que dicho mecanismo fue dependiente de IL-17RA, MyD88, CD14, TLR4, y TLR2. El efecto no fue dependiente de la actividad de las proteasas presentes en el extracto (Blo t 1, Blo t 3). De ese modo, este trabajo seminal sugirió que los alérgenos de Bt juegan un papel importante en la activación de los receptores de la inmunidad innata TLR4 y TLR2, de la que se deriva una inflamación neutrofílica, la cual es un atributo del asma severa en los humanos.

En 2 trabajos posteriores, se expandieron los hallazgos del primero, evaluando el efecto de la adición de un potente agonista de TLR9 (CpG), en combinación con alúmina o liposomas, respectivamente, en el desarrollo o tratamiento del asma inducida por Bt en ratones C57/BL6.^(10,7) Los resultados confirmaron los hallazgos anteriores, sugiriendo que la inflamación eosinofílica inducida se deriva fundamentalmente de la inmunidad adaptativa (Th2/IgE), mientras que el influjo neutrofílico estaría probablemente ligado a la interacción de Bt con receptores de la inmunidad innata. Se demostró la importancia de la IL10 para controlar no solo la respuesta Th2, sino también, la respuesta neutrofílica y Th1. La formulación en liposomas se evaluó en un modelo murino de tipo terapéutico, en el cual se induce primeramente sensibilización a Bt y después se evalúan intervenciones. El tratamiento con 3 dosis revirtió la inflamación pulmonar alérgica inducida previamente y proporcionó protección a largo plazo. En su conjunto

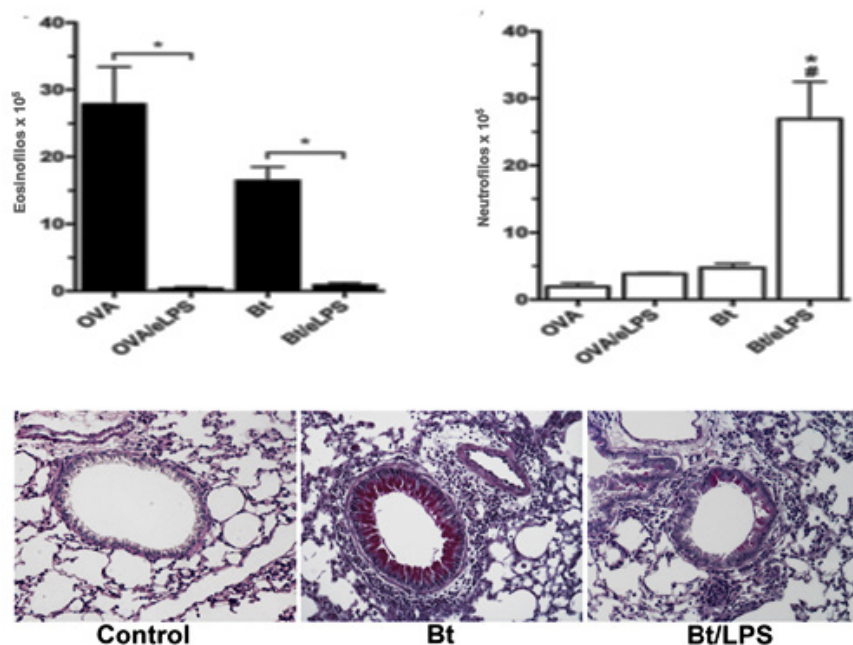


Fig. 2. Inflamación pulmonar inducida por alérgenos de Bt en ratones C57/BL6 sensibilizados con inyecciones de Bt (o Bt+LPS) con alúmina y retados intranasalmente con Bt. El grupo control no fue sensibilizado. Igual protocolo se siguió con ovoalbúmina (OVA) como modelo comparativo. Las gráficas muestran los niveles de neutrófilos y eosinófilos en lavado broncoalveolar después del reto. Las microfotografías corresponden a la tinción con *schiff*-ácido periódico de secciones histológicas pulmonares.⁽⁹⁾ (*) P < 0,05.

los resultados, además de profundizar en las características de los alérgenos de Bt y su interacción inmunitaria, sustentan el uso potencial de la formulación de Bt+CpG en alúmina o liposomas para el tratamiento de las enfermedades alérgicas.

Especificidad del efecto de la inmunoterapia con VALERGEN®-BT en humanos

La disponibilidad comercial en Cuba de la vacuna VALERGEN-BT, desarrollada por BIOCEN, ha permitido realizar investigaciones en humanos. Un aspecto importante es la especificidad de la respuesta inducida y, por lo tanto, el posible efecto cruzado de la inmunoterapia hacia otra especie de ácaro. *Bt* es una especie alejada taxonómicamente del género *Dermatophagoides* y su reactividad cruzada *in vitro* con la IgE de pacientes alérgicos es muy limitada.⁽²⁰⁾ No obstante, no se conocían datos obtenidos de pacientes sometidos a inmunoterapia con Bt. Este trabajo consistió en un ensayo clínico a doble ciegas, controlado por placebo, donde se evaluó el efecto terapéutico de VALERGEN-BT por vía subcutánea, en 35 adultos asmáticos sensibilizados.⁽⁶⁾ La reactividad cutánea hacia cada uno de los alérgenos: Bt, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) y *D. siboney* (Ds) fue determinada mediante la prueba por punción cutánea, a partir del área del habón con relación al producido por la histamina (Ch10). El tratamiento con VALERGEN-BT logró una disminución significativa ($p < 0,001$) de los síntomas (41 % IC:26-61) y el consumo de medicamentos antiasmáticos (34,5 % IC:22,4-63,3) respecto al valor promedio del placebo, para un OR de mejoría clínica

de 32 (IC:17-102). La magnitud del efecto fue incluso mayor de lo que se ha informado con tratamientos equivalentes de Dp y Ds en asmáticos cubanos.⁽⁵⁾ La reactividad cutánea específica a Bt se redujo significativamente ($p < 0,0001$), aumentando 148 veces el umbral de alérgeno para provocar una prueba cutánea positiva. Como hallazgo importante, este efecto desensibilizante fue específico a Bt y no modificó significativamente la reactividad cutánea hacia Dp o Ds (figura 3). Por otra parte, el cambio de la reactividad a Bt se correlacionó ($p < 0,05$) con la mejoría clínica, lo cual concuerda con el papel de Bt como desencadenante importante de síntomas asmáticos.

Otro resultado clínico se derivó de un estudio de farmacovigilancia que abarcó el tratamiento de 2108 pacientes asmáticos con alguno de los 3 productos VALERGEN, incluyendo mezclas de los mismos, en condiciones de la práctica clínica habitual.⁽²¹⁾ El tratamiento más usado (41 %) fue la mezcla de Bt con Dp y Ds, administrado a los pacientes polisensibilizados. La efectividad fue, en general, similar con los 3 productos por separado y para la mezcla de Bt con 1 o los 2 *Dermatophagoides*. Las variables de eficacia mostraron mejorías altamente significativas ($P < 0,0001$); en específico, incremento en la calidad de vida en el 84,2 % de los pacientes, reducción de la severidad del asma en 87,9 %, la medicación en 56,0 %; e incremento del número de días libres de crisis de 85,1 % a 99,1 %. Este estudio fue el primero en aportar evidencias sobre la eficacia y seguridad de las mezclas. Los pacientes que recibieron mezclas mostraban mayor frecuencia de crisis, lo

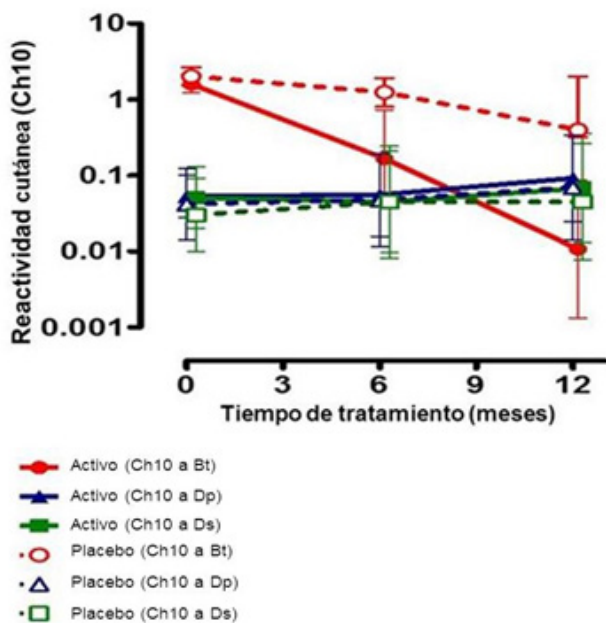


Fig. 3. Efecto de la inmunoterapia con VALERGEN-BT (*Blomia tropicalis*) en humanos sobre la reactividad cutánea (Ch10), hacia el propio alérgeno (Bt) y hacia otras especies de ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) y *D. siboney* (Ds). La reactividad se reduce significativamente ($p < 0,05$) en el grupo activo, solo hacia Bt.⁽⁶⁾

cual es consistente con la polisensibilización, al estar expuestos a una mayor diversidad de desencadenantes. Se sugiere, asimismo, que la naturaleza intrínseca del asma inducida por Bt aporte características de mayor severidad, algo congruente con los hallazgos en modelos animales.

Desarrollo de la vacuna terapéutica antialérgica de segunda generación Prolinem®-BT

Los resultados de las investigaciones anteriores guiaron el diseño de la vacuna terapéutica de segunda generación Prolinem®-BT. En la misma se aplicó una plataforma adyuvante previamente evaluada en el desarrollo de la vacuna homóloga Prolinem-DS (con alérgenos de *D. siboney*) que combina gel de hidróxido de aluminio y vesícula de membrana externa (VME) de *Neisseria meningitidis*, la cual actúa como ligando TLR4 y TLR2.^(22,23,24) A continuación, se resumen los principales resultados en el desarrollo preclínico del producto.

Para evaluar la inmunogenicidad se emplearon 2 modelos, ambos en ratones Balb/C. El modelo profiláctico evaluó la capacidad de la vacuna de prevenir el desarrollo de alergia en ratones vírgenes, expuestos a un reto respiratorio con aerosol de alérgenos.⁽²³⁾ En el modelo terapéutico, primeramente, se sensibilizan los ratones, los cuales desarrollan una respuesta de IgE y síntomas alérgicos, posteriormente, se les administró 3 dosis de la vacuna, a intervalos de 7 días, con un propósito terapéutico.

En el modelo profiláctico se evaluaron 3 variantes de formulación para la selección del antígeno, empleando rBlo t 2, rBlo t 5, y la fracción nativa FBPM. Todas indujeron respuesta mixta de anticuerpos IgG1 e IgG2a, así como, menores niveles de IgE respecto al modelo alérgico. La respuesta de IgG2a fue estrictamente dependiente de la inclusión en la formulación de VME. Los cocientes IgG1/IgE e IgG2a/IgE se emplearon como marcadores de inmunogenicidad protectora.⁽²⁵⁾ Los mismos mostraron resultados significativos ($p < 0,01$) para todas las variantes, pero más elevados para FBPM (figura 4). En cuanto a la respuesta inflamatoria local (figura 5) las vacunas indujeron niveles menores de IL5 ($p < 0,001$) con relación al modelo alérgico.

Para el modelo terapéutico se seleccionó la variante con mejores resultados en el profiláctico, aquella basada en FBPM. Los resultados confirmaron el efecto protector de la vacuna. Ambos cocientes de anticuerpos fueron significativamente más elevados ($P < 0,001$) manteniéndose después del reto, lo cual sustenta la funcionalidad de dicha respuesta ante exposición al alérgeno por inhalación (figura 4). La respuesta inflamatoria local mantuvo el mismo perfil del modelo profiláctico con disminución de los niveles de IL5 (figura 5).

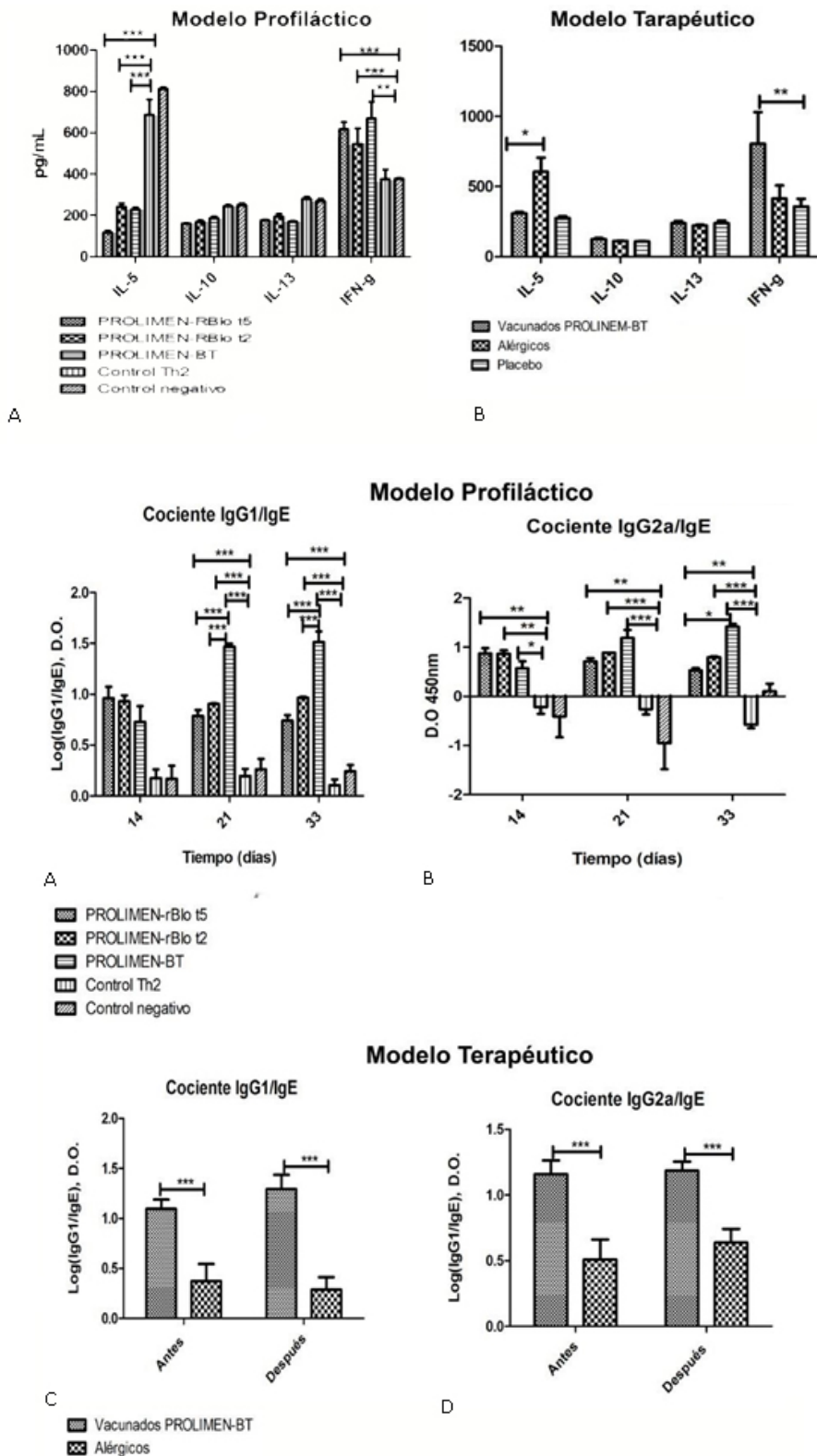
Estos modelos se emplearon también para las evaluaciones farmacológicas de seguridad, incluyendo tolerancia local y toxicidad. Los resultados en ese sentido fueron positivos. El único efecto adverso evidenciado fue la inducción de nódulos subcutáneos reversibles en el sitio de inyección, asociado al gel de hidróxido de aluminio; no obstante, el mismo fue minimizado mediante la reducción de su contenido en la vacuna hasta 1 mg/mL. Un estudio de toxicidad aguda en 2 especies: conejos y ratones sirvió para completar esta fase preclínica de seguridad.

El desarrollo farmacéutico del producto ha abarcado la definición del espacio de diseño de la formulación, para lo cual se evaluaron diferentes contenidos de hidróxido de aluminio y tampón fosfato salino. Este experimento resultó en la selección en una variante óptima en cuanto a adsorción del antígeno, la cual se escaló hasta fase piloto en condiciones de procesamiento aséptico con buenas prácticas de fabricación en la planta de parenterales 3 de BIOCEN. 3 lotes consecutivos fueron fabricados a escala de 1000 viales de 0,5 mL. Se evidenció la consistencia de los atributos de calidad críticos y se determinó la estabilidad, tanto del ingrediente farmacéutico activo como del producto terminado en condiciones de conservación de 2 °C a 8 °C.

Discusión del impacto científico y social

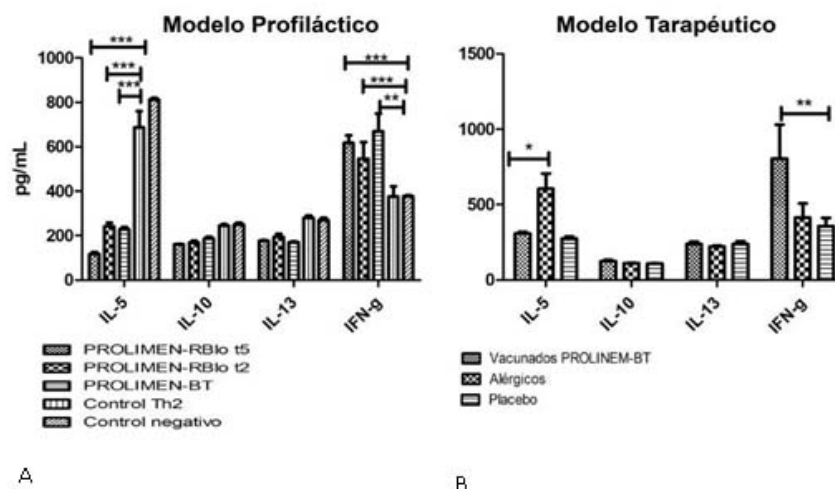
Los alérgenos de Bt y la respuesta inmunoalérgica provocada por ellos se distinguen sustancialmente de las especies del género *Dermatophagoides*, más comunes en zonas templadas. Varias evidencias apuntan a una mayor severidad del asma asociada a la sensibilización a Bt en ambientes tropicales.^(26,27) Este trabajo aporta nuevos conocimientos sobre las características inmunobiológicas de las moléculas alérgicas de Bt. En particular, los hallazgos referentes a su interacción con receptores de la inmunidad innata (TLRs) en presencia de LPS y la consiguiente inducción de inflamación neutrofílica son congruentes con las observaciones clínicas sobre una mayor severidad del asma en los alérgicos a Bt, obtenidas aquí o por otros autores,⁽²⁸⁾ y refuerzan la comprensión de la complejidad en la exposición al polvo doméstico y su relación con los diferentes fenotipos de asma. Igualmente, los mecanismos de inmunogenicidad protectora antialérgica de las formulaciones combinadas de hidróxido de aluminio y ligandos de TLR9 y TLR4, expanden los conocimientos actuales y contribuyen al diseño de nuevos productos inmunoterapéuticos.

La elucidación de la importancia relativa de los componentes alérgicos de Bt es un problema muy actual. Aquí, se aportan datos novedosos sobre la prevalencia en la población cubana de la sensibilización a Blo t 2 (en contraste con



(ANOVA *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001).

Fig. 4. Respuesta de anticuerpos alérgeno-específicos expresada como los cocientes IgG1/IgE e IgG2a/IgE, en los modelos murinos profiláctico y terapéutico (antes y después del reto alérgico con Bt). En el primero se evaluaron 3 variantes de formulación vacunal conteniendo, respectivamente, rBlo t 5, rBlo t 2 y la fracción nativa FBPM. En el modelo terapéutico que consiste en una etapa previa de sensibilización con Bt, seguida de la administración de la vacuna, se evaluó la formulación con FBPM.



(ANOVA *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001).

Fig. 5. Respuesta de citocinas en fluido bronco alveolar en los modelos murinos profiláctico y terapéutico, posterior al reto alérgico con Bt.

Blo t 5) y su presencia en los extractos alérgicos. El hallazgo es congruente con la acción biológica proinflamatoria de los alérgenos homólogos del Grupo 2 de los ácaros, en su interacción con LPS bacteriano, aún cuando dicha actividad para Blo t 2 no haya aún sido bien esclarecida.⁽¹⁵⁾ Además, se identificaron los epítopes de Blo t 13, otro alérgeno con alta prevalencia en la población cubana⁽¹⁸⁾ y su reactividad cruzada con proteínas humanas, sugiriendo un vínculo entre alergia y autoinmunidad. Este alérgeno ha dado lugar recientemente a una nueva clase biológica de proteínas alérgicas que interactúan con el amiloide sérico A1 iniciando la repuesta Th2 en mucosa a través de IL33, lo cual amplía la comprensión de la etiología de las enfermedades alérgicas.⁽²⁹⁾

Un aporte científico importante, a su vez con implicación social, se obtuvo a partir de las investigaciones clínicas en humanos con la vacuna VALERGEN®-BT, introducida en Cuba desde 2007 y con una aplicación amplia en nuestro sistema público de salud,⁽³⁰⁾ un caso único en el contexto latinoamericano.⁽³¹⁾ Se obtuvieron así las primeras evidencias de la inexistencia de efecto cruzado de la inmunoterapia con Bt hacia *Dermatophagoides*, confirmando así, en humanos, la especificidad de la respuesta inducida. Este estudio ha resultado en la primera publicación en una revista de alto impacto, indexada en PUBMED de un ensayo clínico de inmunoterapia con Bt y ha reafirmado la necesidad de contar con vacunas de este ácaro para lograr una inmunoterapia efectiva del asma en países tropicales.

Desde el punto de vista tecnológico se realizan también aportes. Se confirma la vigencia de la plataforma tecnológica de cultivo de ácaros y purificación de alérgenos nativos como

fuente competitiva de ingredientes farmacéuticos. Los modelos murinos de alergia a Bt establecidos aquí y aplicados en 2 instituciones de países diferentes constituyen aportes metodológicos y confirman la utilidad de los mismos como herramientas de evaluación preclínica de productos. Otro aspecto remarcable ha sido el modelo de colaboración científica internacional entre instituciones latinoamericanas.

Los resultados de las investigaciones básicas encontraron aplicación en el diseño de la vacuna terapéutica de segunda generación ProlinEM®-BT, que hace uso de una plataforma adyuvante conteniendo alúmina y ligandos TLR4/2 de origen bacteriano. El producto tendría ventajas en cuanto a eficacia y seguridad con respecto a la inmunoterapia convencional: menor cantidad de inyecciones y mayor perdurabilidad del efecto con mayor memoria inmunológica, así como, mejor seguridad, al reducirse la cantidad de alérgeno necesaria para lograr el efecto terapéutico, y por consiguiente, los riesgos de reacciones anafilácticas inherentes al mismo. Esto conduciría a una mayor adherencia al tratamiento. Los resultados preclínicos de esta nueva vacuna evidencian su inmunogenicidad y efecto antialérgico con solo 3 dosis en modelos murinos de alergia respiratoria, además de su seguridad. El desarrollo de este producto novedoso se inscribe en las tendencias más actuales en la temática de inmunorregulación de la respuesta alérgica⁽³²⁾ y de la aplicación de la inmunoterapia para el manejo del asma.^(33,34)

Conclusiones

En su conjunto, se aportan nuevos conocimientos sobre la etiología del asma alérgica y el papel de la sensibilización a

Bt en nuestra área geográfica, que se traducen en una mejor comprensión de la respuesta inmune hacia este alérgeno y confirman la necesidad de la inclusión de la inmunoterapia con Bt para el manejo adecuado del asma alérgica en los trópicos. Al mismo tiempo, sustentan el avance hacia el desarrollo y evaluación clínica de una segunda generación de productos innovadores con el potencial de convertir a la inmunoterapia en un enfoque de primera línea en el tratamiento de esta enfermedad de alto impacto socioeconómico.

AGRADECIMIENTOS

Marlon Múnera, Dalgys Martínez, Josefina Zakzuk, Fernanda Peixoto Barbosa Nunes, Ricardo Wesley Alberca-Custódio, Luciana Mirotti; Eliane Gomes, Denise Morais Da Fonseca; Nicole H. Yokoyama, Renato Barboza, Anderson Sá-Nunes, Esther Borges Florsheim, Rafael Ribeiro Almeida; Niels Olsen Saraiva Câmara, Bárbara Luis Rodríguez, Benito L. Espinosa Cheo, Raysa Cruz Jiménez, Yenisleydis Revilla Fernández, Taimí Espinosa Reyes, Deibbys Martínez García, Deylien Quesada Corp, Laudelina Lazo Campello, Cristian H Pérez Rodríguez, Anna Tsoraeva, Vilmail Quintana Linares, Ilvis Zambrana, Luis C Hidalgo, Marco Álvarez Soto, Beatriz Tamargo Santos, José Rodríguez Canosa, Irene Enríquez-Domínguez García, Mayda González León, Ada del Castillo Méndez.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fernández Caldas E and Lockey RF. *Blomia tropicalis*, a mite whose time has come. *Allergy* 2004;59(11):1161-4.
2. Santos da Silva E, Asam C, Lackner P, Hofer H, Wallner M, Silva Pinheiro C, Alcântara-Neves NM, Ferreira F. Allergens of *Blomia tropicalis*: An Overview of Recombinant Molecules. *Int Arch Allergy Immunol* 2017;172(4):203-14. DOI: <https://doi.org/10.1159/000464325>
3. Aranda RE, Labrada A, Facenda E, Diéguez R, Martínez N *et al.* Respuesta IgE a *Blomia tropicalis*, *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2000;52(1):31.
4. Castro RL, Mateo M, Naranjo RM, Navarro B, Álvarez M, Ronquillo M, García I, Oliva Y, González M, Rodríguez J and Labrada A. Correlation between skin tests to *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides siboney* and *Blomia tropicalis* in Cuban asthmatics. *A. Allergol et Immunopathol* 2006;34(1):23-6.
5. Labrada A. Desarrollo a ciclo completo de las primeras vacunas estandarizadas de alérgenos de ácaros en Cuba. Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. Editorial Universitaria, La Habana 2012. ISBN 978-959-16-1711-8-193p. Disponible en línea: <http://tesis.repo.sld.cu/145/>
6. Castro-Almarales RL, Ronquillo-Díaz M, Álvarez-Castelló M, Rodríguez-Canosa J, González León M, Enríquez Domínguez I, Navarro Viltre BI, Mateo Morejón M, Oliva-Díaz Y, Ramírez González W, Cox L & Labrada-Rosado A. Subcutaneous allergen immunotherapy for asthma: A randomized, double-blind, placebo-controlled study with a standardized *Blomia tropicalis* vaccine. *World Allergy Org J* 2020;13(4):100098. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2020.100098>

7. Alberca-Custodio RW, Faustino LD, Gomes E, Nunes FPB, de Siqueira MK, Labrada A, Almeida RR, Câmara NOS, da Fonseca DM and Russo M. Allergen-Specific Immunotherapy With Liposome Containing CpG-ODN in Murine Model of Asthma Relies on MyD88 Signaling in Dendritic Cells. *Front Immunol* 2020;11:692. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00692>
8. Múnera M; Martínez D; Labrada A; Caraballo L; Puerta L. Identification of B Cell Epitopes of Blo_t_13 Allergen and Cross-Reactivity with Human Adipocytes and Heart Fatty Acid Binding Proteins *Int J Mol Sci* 2019;20:6107.
9. Barboza R, Câmara NO, Gomes E, Sá-Nunes A, Florsheim E, Mirotti L, Labrada A, Alcântara-Neves NM & Russo M. Endotoxin Exposure during Sensitization to *Blomia tropicalis* Allergens Shifts TH2 Immunity Towards a TH17-Mediated Airway Neutrophilic Inflammation: Role of TLR4 and TLR2. *PloS one* 2013;8(6),e67115. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067115>
10. Nunes F, Alberca-Custódio RW, Gomes E, Fonseca DM, Yokoyama NH, Labrada A & Russo M. TLR9 agonist adsorbed to alum adjuvant prevents asthma-like responses induced by *Blomia tropicalis* mite extract. *J Leukoc Biol* 2019;106:653-64. DOI: <https://doi.org/10.1002/JLB.MA1218-475RR>
11. Labrada M; Uyema K; Sewer M; Labrada A; Gonzalez M; Caraballo L; Puerta L. Monoclonal antibodies against Blo_t13, a recombinant allergen from *Blomia tropicalis*. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;129:212-18.
12. Pomés A, Davies JM, Gadermaier G, Hilger C, Holzhauser T, Lidholm J, Lopata AL, Mueller GA, Nandy A, Radauer C, Chan SK, Jappe U, Kleine-Tebbe J, Thomas WR, Chapman MD, van Hage M, van Ree R, Vieths S, Raulf M, Goodman RE. WHO/IUIS Allergen Nomenclature: Providing a common language. *Mol Immunol* 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.03.003>
13. Santos da Silva E, Asam C, Lackner P, Hofer H, Wallner M, Silva Pinheiro C, Alcântara-Neves N, M, Ferreira F: Allergens of *Blomia tropicalis*: An Overview of Recombinant Molecules. *Int Arch Allergy Immunol* 2017;172:203-14. DOI: <https://doi.org/10.1159/000464325>
14. Urrego JR, Hofer H, Aglas L, Pinheiro CS, Briza P, Wallner M, Alcântara-Neves NM, Ferreira F: Physico-chemical and immunological characterization of the recombinant *Blomia tropicalis* allergen Blo_t2: EAACI, OAS 31, abstract 182. Vienna, Wiley, 2016.
15. Reginald K, Pang SL, Chew FT. Blo_t_2: Group 2 allergen from the dust mite *Blomia tropicalis*. *Scientific reports*. 2019;229(1):1-3.
16. Mateo M, Pérez Y, Capote Tabares M, García JA, Cruz R, Luzardo M and Labrada A (2015). Allergenic activity of the native Blo_t_2 purified from *Blomia tropicalis* culture. *Front. Immunol.* Conference Abstract: IMMUNOCOLOMBIA 2015-11th Congress of the Latin American Association of Immunology. DOI: <https://doi.org/10.3389/conf.fimmu.2015.05.00263>
17. Mateo M, García JA, Luzardo MC, Labrada A. Characterization of the immunoallergenic profile of the low molecular weight fraction of the allergenic extract of the mite *Blomia tropicalis*. (Immuno Mexico 2018 429) XII Congress of the Latin American Association of Immunology and XXIII Congress of the Mexican Society of Immunology. Eds. Rosana Pelayo, Leopoldo Santos-Argumedo. Frontiers Media SA. ISBN: 978-2-88945-511-9. Disponible en: https://www.frontiersin.org/books/Immuno_Mexico_2018_XII_Congress_of_the_Latin_American_Association_of_Immunology_and_XXIII_Congress_/1637

18. Puerta L, Labrada A, Labrada M, Uyema K, Jiménez S, Caraballo L. Blo_t_13 allergens from *Blomia tropicalis* shows high frequency of IgE binding in allergic Cuban patients and cross-reactivity with *Dermatophagoides siboney* extract. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(1 Supplement 2):S325.
19. Reithofer M, Jahn-Schmid B. Allergens with Protease Activity from House Dust Mites. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(7): 1368. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18071368>
20. Ferrándiz R, Casas R, Dreborg S: Cross-Reactivity between *Dermatophagoides siboney* and other Domestic Mites. *Int Arch Allergy Immunol* 1998;116:206-14. DOI: <https://doi.org/10.1159/000023946>
21. Mateo Morejón M, Labrada A, Castro Almarales RL, Jiménez López G, Alfonso Orta I, Reyes Zamora MC. Safety of sublingual immunotherapy for asthma with standardized house dust mite vaccines in a tropical setting: Results of a nation-wide pharmacovigilance study. *World Allergy Organization Journal* 2015;8(Suppl 1):A40. DOI: <https://doi.org/10.1186/1939-4551-8-S1-A40>
22. Pérez O, Romeu B, Cabrera O, Gonzalez E, Batista-Duarte A, Labrada A, Pérez R, Reyes L, Ramírez W, Sifontes A, Fernández N, Lastre M. Adjuvants are key factors for the development of future vaccines: Lessons from the Finlay adjuvants platform. *Front Immunol* 2013;4:407. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.0040>
23. Ramírez W, Bourg V, Torralba D, Facenda E, Tamargo B, González BO, Sierra G, Pérez O, Pérez-Llano Y, Labrada A. Safety of a proteoliposome from *Neisseria meningitidis* as adjuvant for a house dust mite allergy vaccine. *J Immunotoxicology* 2017;14(1):152-9.
24. Reyes Zamora MC, Castro Almarales RL, Mateo Morejón M, Ramírez González W, Torralba Averoff D, Ronquillo Díaz M, González Paredes AC, Tamayo Gutiérrez MA, Álvarez Castelló M, Rodríguez Canosa JS, Leyva Márquez Y, Duarte Suarez A, Reyes Díaz LM, Lastre González M, Pérez Martín O, Labrada Rosado A. Evaluación de la tolerabilidad y seguridad de una nueva vacuna terapéutica antialérgica Adyuvada. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 2017;36(Suplemento).
25. Ramírez González W, Samalea R, Averoff DT, Morejón A, Perez O, Infante JF, Labrada A. IgG1/IgE ratio is relevant for the protective effect of an alum-adjuvanted allergen vaccine in a murine model of local allergen challenge. *World Allergy Org J* 2015;8(1):A42.
26. Caraballo L, Valenta R, Puerta L, Pomés A, Zakzuk J, Fernández-Caldas E, Acevedo N, Sánchez-Borges M, Ansotegui I, Zhang L, Hage M, Abel-Fernández E, Arruda L, Vrtala S, Curin M, Gronlund H, Karsonova A, Kilimajer J, Ryabova K, Karaulov A. The allergenic activity and clinical impact of individual IgE-antibody binding molecules from indoor allergen sources. *World Allergy Org J* 2020;13. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2020.100118>
27. Caraballo L, Acevedo N, Zakzuk J. Ascariasis as a model to study the helminth/allergy relationships. *Parasite Immunology* 2018.41. e12595. DOI: <https://doi.org/10.1111/pim.12595>
28. Caraballo L, Zakzuk J, Lee BW, Acevedo N, Soh J et al. (2016). Particularities of allergy in the Tropics. *World Allergy Org Journal* 2016;9. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40413-016-0110-7>
29. Smole, U., Gour, N., Phelan, J. et al. Serum amyloid A is a soluble pattern recognition receptor that drives type 2 immunity. *Nat Immunol* 2020;21:756-65. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0698-1>
30. Labrada A, Morejón MM, Gonzalez WR, Almarales RL, Castello MA. Allergen Immunotherapy for asthma in a public healthcare setting: The Cuban experience. *J Allergy Clin Immunol* 2018 Feb 1;141(2):AB68. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.12.216>
31. Díaz Rodríguez A, Labrada A, Castro Almarales RL and Álvarez Castelló M: Current status and future perspectives of immunotherapy in Latin America and Cuba. *World Allergy Org J* 2014;7:28.
32. Gamazo C, D'Amelio C, Gastaminza G, Ferrer M, Irache JM. Adjuvants for allergy immunotherapeutics. *Hum Vaccin Immunother* 2017; 13(10): 2416-2427. DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1348447>
33. Jutel M, Agache I, Bonini S, Burks AW, Calderon M, Canonica W, Cox L, Demoly P, Frew AJ, O'Hehir R, Kleine-Tebbe J, Muraro A, Lack G, Larenas D, Levin M, Nelson H, Pawankar R, Pfaar O, van Ree R, Sampson H, Santos AF, Du Toit G, Werfel T, Gerth van Wijk R, Zhang L, Akdis CA International Consensus On (ICON) Allergy Immunotherapy (AIT). *J Allergy Clin Immunol* 2015 Sep;136(3):556-68
34. Agache, I, Lau, S, Akdis, CA, et al. EAACI Guidelines on Allergen Immunotherapy: House dust mite-driven allergic asthma. *Allergy* 2019;74:855-73. DOI: <https://doi.org/10.1111/all.13749>

Recibido: 17/06/2021

Aprobado: 23/11/2021

Conflicto de intereses

Los autores declaran no presentar conflicto de intereses en relación con la investigación realizada.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Alexis Labrada Rosado, Momtchilo Russo, Raúl L. Castro Almarales, Leonardo Puerta, Luis Caraballo.

Análisis formal: Alexis Labrada Rosado, Momtchilo Russo, Raúl L. Castro Almarales, Leonardo Puerta, Wendy Ramírez González, Maytee Mateo Morejón.

Adquisición de fondos: Alexis Labrada Rosado, Momtchilo Russo, Leonardo Puerta, María del Carmen Luzardo Lorenzo, Luis Caraballo.

Investigación: Alexis Labrada Rosado, Raúl L. Castro Almarales, Leonardo Puerta, Wendy Ramírez González, Maytee Mateo Morejón, Damaris Torralba, Alain Morejón Calderón, Anette García Freijo; Mirta Álvarez Castelló, Mercedes Ronquillo Díaz, Mary Carmen Reyes Zamora.

Metodología: Alexis Labrada Rosado, Momtchilo Russo, Leonardo Puerta, Wendy Ramírez González, Raúl L. Castro Almarales, Mirta Álvarez Castelló, Alain Morejón Calderón, Mercedes Ronquillo Díaz, María del Carmen Luzardo Lorenzo, Luis Caraballo.

Administración del proyecto: Alexis Labrada Rosado.

Recursos: Alexis Labrada Rosado, Momtchilo Russo, Leonardo Puerta.

Supervisión: Alexis Labrada Rosado, Momtchilo Russo, Luis Caraballo.

Validación: Wendy Ramírez González, Maytee Mateo Morejón, Damaris Torralba Averoff, Anette García Freijo.

Visualización: Alexis Labrada Rosado, Momtchilo Russo, Raúl L. Castro Almarales, Leonardo Puerta, Wendy Ramírez González.

Redacción-borrador original: Alexis Labrada Rosado.
Redacción-revisión y edición: Momtchilo Russo, Leonardo Puerta,
Wendy Ramírez González, María del Carmen Luzardo Lorenzo, Luis
Caraballo.

Financiación

Se recibió financiamiento del Fondo Nacional de Ciencia e Innovación
del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente de Cuba
(Proyecto 76-2017), Cuba y del proyecto bilateral Brasil-Cuba CNPq

No 053/2010, Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovaciones de
Brasil.

Cómo citar este artículo

Labrada Rosado A, Russo Momtchilo, Castro Almarales RL, Puerta
L *et al.* Avances en la caracterización inmunobiológica, molecular y
clínica de los alergenos de *Blomia tropicalis*. Anales de la Academia
de Ciencias de Cuba [internet] 2022[citado en día, mes y año];12(1):
e1109. Disponible en: [http://www.revistaccuba.cu/index.php/
revacc/article/view/1109](http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1109)

