

Optimización y caracterización del proceso de polimerización de *Dermatophagoides pteronyssinus* modificado químicamente con glutaraldehído.

Silvia Froilán Muñoz¹, Fernando Pineda de la Losa² y David Rodríguez Gil²

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. **2** Laboratorios Diater, Leganés, Madrid, España.

Resumen

La inmunoterapia es el único tratamiento que puede alterar el curso natural de las enfermedades alérgicas. La eficacia de las vacunas inmunoterapéuticas está asociada a la capacidad de activar el sistema inmunológico responsable de la síntesis de anticuerpos IgG y la reducción a largo plazo de IgE, causante de las reacciones alérgicas inmediatas. Se han hecho mejoras en los extractos alérgicos de las vacunas para reducir los efectos secundarios ocasionados con la inmunoterapia como la modificación química de éstos, obteniendo un polimerizado de alto peso molecular. Se ha demostrado la capacidad que tienen reduciendo la alergenidad y manteniendo su inmunogenicidad. Hemos realizado modificaciones con glutaraldehído a un extracto de *Dermatophagoides pteronyssinus* (ácaro del polvo), en dos condiciones de temperatura diferentes, 5°C±3 y a temperatura ambiente, 20°C±3. Se ha comparado la actividad inmunogénica que tienen cada uno de ellos y su alergenidad con respecto al producto nativo sin modificar, confirmando que las muestras polimerizadas poseen una disminución de la fijación de IgE a sus correspondientes epitopos alérgicos, y mantienen su eficacia ya que favorecen la inducción de IgG en el sistema inmunológico, por tanto se consigue obtener vacunas más seguras que permiten un menor número de inyecciones en un periodo más corto de tiempo, disminuyendo así el riesgo de reacciones sistémicas al paciente.

Palabras clave: Inmunoterapia; Polimerizados; Glutaraldehído y *Dermatophagoides pteronyssinus*

Cita: Silvia Froilán, Fernando Pineda, David Rodríguez (2014) Caracterización del polimerizado de *Dermatophagoides pteronyssinus* modificado con glutaraldehído. *Dianas* 3(1): e20140907. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20140907 URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Editores: María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Recibido: 27 de junio de 2014

Copyright: © 2014 Silvia Froilán Muñoz et al.
Este es un artículo open-access distribuido bajo licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

p*E-mail: silviafroilan@hotmail.com



Introducción

La alergia es una enfermedad que afecta a más del 40% de la población de países industrializados. Tiene lugar en dos fases, la primera es conocida como de sensibilización, porque el sistema inmunitario reacciona ante un antígeno, iniciando una respuesta Th2, caracterizada por la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13, que conlleva a la síntesis y producción de IgE, más frecuentemente en las mucosas (nasal, vías respiratorias, conjuntiva, tracto gastrointestinal...) o en la superficie de la piel, regiones anatómicas que contienen altos niveles de mastocitos y basófilos, quienes se encargan de fijar en su superficie la IgE a través de sus receptores de alta afinidad (FcεRI) [1]. La segunda, denominada fase efectora, en la que tras una segunda exposición al alérgeno se desencadena la degranulación de los mastocitos y basófilos, liberándose agentes farmacológicos como la histamina, la serotonina y otros mediadores como los leucotrienos y citoquinas, contribuyendo a la respuesta inflamatoria alérgica [1,2].

El tratamiento de la alergia comprende; la evitación el alérgeno, medicación contra los síntomas e inmunoterapia específica contra el alérgeno causal [1]. La inmunoterapia es el único tratamiento capaz de alterar el curso natural de la enfermedad. Usando apropiadamente los extractos alérgicos en pacientes con rinitis alérgica y asma, la inmunoterapia puede reducir significativamente sus síntomas y mejorar la calidad de vida del paciente [1].

La inmunoterapia consiste en la administración de cantidades pequeñas, pero progresivamente crecientes, del alérgeno causal [2]. Como resultado de este tratamiento se produce la inducción de anticuerpos IgG, particularmente IgG4, con posible efecto bloqueador. Con una reducción a largo plazo de la IgE sérica específica, causante directa de las reacciones alérgicas inmediatas y alteración del balance Th1/Th2 de la

respuesta celular de linfocitos T. La inmunomodulación de los linfocitos Th2, produce una reducción de la respuesta inflamatoria alérgica, tanto de tipo celular (respuesta alérgica tardía, eosinofilia) como la mediada directamente por anticuerpos IgE [2,3].

Los extractos que forman parte de las vacunas, deben estar estandarizados, asegurando la calidad y homogeneidad de los mismos. Es necesario un control del extracto alergénico, verificando la proteína y la composición del alérgeno. Se debe cuantificar el total de alérgenos y su actividad potencial. Por tanto la estandarización tiene un papel muy relevante en la calidad de los extractos alergénicos utilizados para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad alérgica [4]. Las vacunas pueden contener extractos modificados químicamente y/o por adsorción en distintos vehículos. El principio de la preparación de vacunas modificadas es reducir o eliminar la alergenicidad, y al mismo tiempo conservar o aumentar la inmunogenicidad, o la capacidad de modular el sistema inmune y mantener la eficacia clínica. Los tipos de modificaciones pueden ser físicas, químicas y modificaciones combinadas (físicas y químicas) [2]. Entre los químicos más usados tenemos el glutaraldehído. El glutaraldehído reacciona covalentemente con los grupos amino de las lisinas o de las hidroxilinas de las cadenas polipeptídicas de los distintas proteínas que constituyen los extractos alergénicos [5], generando uniones intramoleculares e intermoleculares obteniendo un polímero estable y de alto peso molecular donde los epítomos alergénicos reconocidos por las IgEs quedan escondidos, dejando la mayoría de los determinantes alergénicos accesibles para ser procesados por células fagocíticas, tales como monocitos, macrófagos y células dendríticas, las cuales transmiten la información inmunológica a las células productoras de anticuerpos IgG [6-9], reduciendo así la alergenicidad. Diferentes estudios han demostrado la eficacia clínica de las vacunas modificadas químicamente, siendo más seguras y permitiendo un menor número de inyecciones en un periodo más corto de tiempo, disminuyendo así el riesgo de reacciones sistémicas al paciente [2].

El 90% de las alergias al polvo doméstico están causadas por ácaros, siendo el principal responsable *Dermatophagoides pteronyssinus*. Es un ácaro del polvo, muy frecuente y abundante en domicilios. Induce sensibilización alérgica en pacientes por inhalación o contacto de sus alérgenos. Hasta la fecha se han caracterizado 17 alérgenos, aunque los principales son Der p1 (glicoproteína procedente de las excretas del ácaro) y Der p2 (proteína procedente del cuerpo del ácaro). No todos los alérgenos son reconocidos con la misma frecuencia, ni intensidad por todos los individuos sensibilizados [10,11].

En este artículo describimos la producción del extracto polimerizado de *Dermatophagoides pteronyssinus* sometido a dos condiciones de temperatura diferentes. Los polimerizados también fueron analizados por cromatografía de exclusión molecular y espectrometría de masas. Se midió el contenido de proteína por el método Bradford. Se analizó la inmunogenicidad de los polimerizados con Elisa de inhibición y se analizó el perfil de los extractos a través de un SDS-PAGE y un Western-blot.

Material y Métodos

Polimerización del extracto alergénico

Se usó como material de partida extracto liofilizado de *Dermatophagoides pteronyssinus*. El extracto fue disuelto en PBS pH7.4 a una concentración de 1.4 mg/ml de proteína y un volumen final de 50 ml por cada polimerizado. Se adicionó glutaraldehído (GA) al 25% a una concentración de 0.025M de Merck Schuchardt OHG. La adición del GA se debe realizar lentamente y en pequeñas cantidades, ya que reacciona rápidamente con las lisinas libres y puede polimerizar consigo mismo [5,6]. Se llevó a cabo la incubación de un polimerizado en cámara fría a $5^{\circ}\pm 3$, mientras que el otro extracto fue incubado a temperatura ambiente $20^{\circ}\pm 3$ durante 24 horas.

Ultrafiltración Tangencial

Los polimerizados fueron tratados por ultrafiltración tangencial mediante The Cogent μ Scale tangential flow filtration (TFF) system de Millipore. Las muestras fueron conducidas por un flujo de presiones, a través de toda la superficie de una membrana cuyo tamaño de poro es de 300 kDa, reteniendo todas aquellas moléculas superiores a dicho tamaño. La ultrafiltración se realizó usando 20 volúmenes de agua de calidad inyectable para cada polimerizado. Las presiones a las cuales fueron sometidas variaron, siendo de 2,5 Ba para el polimerizado que estuvo 24 horas a temperatura ambiente y de 1,4 Ba para el que se encontraba en cámara fría.

Análisis del contenido proteico

El producto nativo y los polimerizados fueron analizados por el método Bradford usando una recta estándar cuyos puntos van desde los $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de BSASe utilizó el Akta Purifier 10, con dos bombas de dos pistones cada una, y una presión máxima de 25 MPa. La columna utilizada fue la TSK G2000 SW (Tosho). El volumen de la columna (CV) es de 14,33 mL. La columna se calibró con las siguientes proteínas: Tiroglobulina, se utiliza para calcular el volumen muerto de la columna, (669 KDa), Aldolasa (158 KDa) y/o), Alcohol Deshidrogenasa (150 KDa), Conalbúmina (75 kDa), Anhidrasa Carbónica

(29 kDa), Ovoalbúmina (43 kDa), Ribonucleasa A (13,7 kDa) y Aprotenina (6,5 kDa) Las condiciones en las que se llevó a cabo el proceso fueron con un flujo de 1ml/minuto, una presión de 6MPa y con un gradiente del 100% con tampón fosfato a 0.15 M a pH6.7. Se Inyectaron 300 µL de Der p de la muestra nativa (200 µL de muestra + 100 µL fase líquida), estas mismas condiciones se usaron con los polimerizados.

Espectrometría de masas

Se realizó una digestión en solución según el protocolo: Quantitative assessment of in-solution digestion efficiency identifies optimal protocols for unbiased protein analysis. El digerido se trató con ácido trifluoroacético (TFA). Se realizó una cromatografía en fase reversa con la resina POROS 50 R2 de Applied Biosystems (code 1-1159-05). Los péptidos del eluido se centrifugaron a vacío Speed-Vac de Savant (10 minutos) y se reconstituyeron en 10 µl de ACN 2%, ácido fórmico 0,1%. Los péptidos fueron separados por nano-LC (nanoEasy HPLC (Proxeon)) en una columna Biosphere C18 con un diámetro interno 75 µm, 15 cm de longitud y 3 µm de tamaño de partícula (NanoSeparations) a un flujo de 250 nl/min. El nano-HPLC está acoplado on-line a una fuente nanoelectrospray (Proxeon) de el espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (ThermoScientific) con el que se analizaron los péptidos. Los espectros MS/MS se adquirieron en modo positivo. Los iones fragmento se adquirieron en modo profile con 1 microscan desechando los iones con carga +1 y aquellos con carga sin asignar. Los espectros M/MS adquiridos se analizaron con una licencia local del motor de búsqueda MASCOT v.2.3 acoplado a una base de datos que incluía todos los alérgenos descritos en la web Allergome.

Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de Dodecil Sulfato Sódico (SDS-PAGE)

Se empleó el método propuesto por Laemmli con modificaciones introducidas por los fabricantes de los equipos de electroforesis horizontal utilizados (Mini-Protean II, Bio-Rad). Las muestras nativa y polimerizadas fueron analizadas por SDS-PAGE (geles del 15% de poliacrilamida) se cargaron a 0,5µg de proteína por calle, a 200 voltios durante 45 minutos. Tras la electroforesis, el gel se incubó 20 minutos con fijador de plata que incluye ácido acético, metanol y un agente fijador (Bio-Rad). Se lavó con agua pura 10 minutos, dos veces. Se mezclaron 12.5 ml de acelerador de plata (Bio-Rad) con 7,5 ml de agua pura y 1.25 ml de cada uno de los siguientes reactivos: tinción plata, agente reductor y revelador de imagen (Bio-Rad), se añadieron sobre el gel y se incubó durante 10 minutos. Se paró la reacción con ácido acético al 7% durante 5 minutos. Se lavó con agua pura. El gel fue escaneado y tratado con el programa informático Quantity One de Bio-Rad.

Inmunodetección de proteínas mediante Western-blot

Las muestras se cargaron a 5 µg de proteína por calle en un SDS-PAGE (15% poliacrilamida) y se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) La electrotransferencia se realizó en Trans-Blot Turbo (BioRad) a 1.3Å, 25 V durante 7 minutos. Posteriormente, la membrana fue bloqueada con tampón PBS 0,5% Tween (NaCl 80mg/ml, KH₂PO₄ 2 mg/ml, Na₂HPO₄·2H₂O 11,5 mg/ml, KCL 2 mg/ml y Tween 20) durante 1 hora en agitación e incubada toda la noche con suero de pacientes sensibilizados a *Dermatophagoides pteronyssinus* en dilución 1/1000. La unión específica de IgE fue detectada con anticuerpo de ratón anti- IgE humana conjugado con Estreptavidina-peroxidasa a una dilución 1/1000, (Southern Biotech) durante 2 horas. Se hicieron 4 lavados con PBS Tween al 0.05% y se usó como reactivos para el revelado Western Lightning Plus-ECL (Luminol Reagent y Oxidizing Reagent, 1:1). Los reactivos se dejaron incubar 5 minutos y posteriormente se obtuvo la imagen mediante el programa informático Quantity One de Bio-Rad.

ELISA inhibición

Se midió la actividad alérgica de *D. pteronyssinus* del extracto nativo y de los extractos polimerizados. Se activó una placa con extracto de *D. pteronyssinus* a 250 µg/µl con tampón carbonato/bicarbonato sódico (50mM Na₂CO₃/NaHCO₃). Se incubaron las placas a 4°C toda la noche. Las muestras se ajustaron para iniciar las diluciones a 2µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml de proteína, para el nativo, polimerizado en frío y a temperatura ambiente, respectivamente. Se hicieron diluciones ½ de cada una de las muestras y se mezcló con suero humano de pacientes sensibilizados a *D. pteronyssinus* diluido 1:8 en una proporción 1:1 con las distintas concentraciones de las muestras. Se dejó incubando 1 hora en rotación. La placa se bloqueó con BSA 1% en PBS-Tween 0.05%, 100µl / pocillo durante 1 hora. Se lavó la placa con PBS-Tween 0.05%, esto se llevó a cabo entre cada paso de incubación. Se añadieron 50 µl / pocillo de cada una de las diluciones por triplicado, la placa se dejó incubar durante 2 horas. A partir de este momento se añaden 50 µl / pocillo de cada uno de los anticuerpos y se dejó incubar 30 minutos en cada paso. Se añadió Anti-IgE biotilado (Operon 1:1000). Se añadió Anti-IgG (frente la cadena γ) (1:500). Se añadió estreptavidina-peroxidasa (1:250). Se añadió H₂O₂ y ABTS (1:1000). La reacción se visualizó a 405 nm en un lector de placas Multiskan Ascent. Se calculó la recta logarítmica de inhibición, como la inversa de la unión de antígeno-anticuerpo con respecto al control positivo, se procedió al cálculo de la Ag50.

Búsqueda de alérgenos mayores

La identificación de las bandas en el SDS-PAGE y en los inmunoblot, se llevaron a cabo a través de Allergen Nomenclature IUIS. Se han caracterizado aproximadamente 17 alérgenos, aunque los principales son Der p1 y Der p2 con unos pesos moleculares de 24 y 15 kDa respectivamente [12].

Obtención de sueros humanos

Se usaron sueros humanos de pacientes sensibilizados a *D. pteronyssinus*. Se seleccionaron un mínimo de 10 pacientes según las recomendaciones de la directriz EMA 2009 sobre producción y calidad de extractos alérgicos. Los sueros tenían más de 3,5 kUA/l de IgE específica, es decir clase 3o superior, y estaban libres de enfermedades de transmisión humana.

Detección de IgE específica

Los niveles de IgE específica frente a *Dermatophagoides pteronyssinus* fueron obtenidos mediante el sistema ImmunoCAP (Phadia, Uppsala, Suecia) tras biotinilar y acoplar los extractos a los discos de estreptavidina suministrados por el fabricante. Niveles en suero superiores a 0,35 kUA/L se consideraron positivos.

Resultados

Análisis del peso molecular del polimerizado

Una vez sometido los productos a una ultrafiltración tangencial, se analizó la distribución del peso molecular de las muestras por cromatografía de exclusión molecular. Se comparó el cromatograma de las muestras polimerizadas a temperatura ambiente y polimerizadas en frío con respecto al extracto nativo. Con esto se pudo comprobar el rango de pesos moleculares de los compuestos que constituyen el extracto nativo según los ml de retención, situándose entre los 441kDa y 10,63 kDa. En las muestras polimerizadas sin embargo, el rango de pesos moleculares es diferente, y solo apareció un pico correspondiente al polímero que se formó con el glutaraldehído siendo superior a los 669 kDa de la Tiroglobulina (Fig.1 b y c).

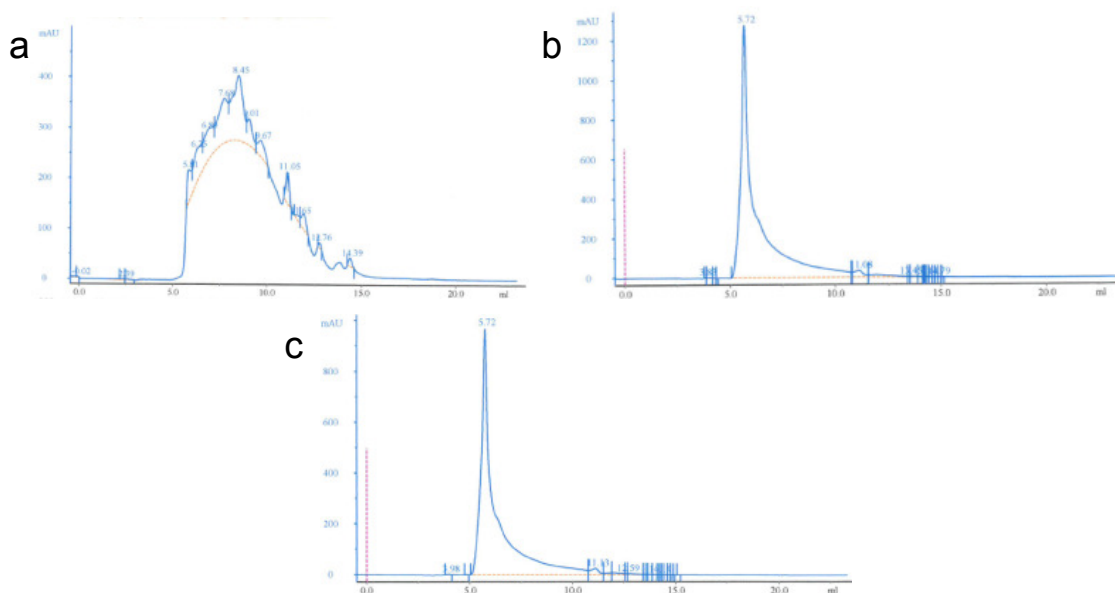


Figura 1.- Cromatogramas. (a) Perfil cromatográfico del extracto nativo. (b) Perfil cromatográfico del polimerizado a temperatura ambiente. (c) Perfil cromatográfico del polimerizado en frío

Espectrometría de masas

Con el espectrómetro de masas pudimos identificar cada una de las proteínas contenidas en la muestra nativa y en las polimerizadas, y las diferentes isoformas que nos podemos encontrar de cada una de ellas (Tabla 2). Con estos resultados pudimos comprobar que no se había producido ninguna modificación en el contenido alérgico de los polimerizados, asegurándonos por tanto la presencia de las proteínas alérgicas características del extracto nativo del ácaro.

Alérgeno	Uniprot ID	Péptidos identificados en Extracto	Péptidos identificados en Polímero	Alérgeno	Uniprot ID	Péptidos identificados en Extracto	Péptidos identificados en Polímero
DER P 1	B5AYU7	2	1	DER P 2	A6XEP9	11	3
	I2CMD2	2	1		B0FRE2	10	3
	Q58HT9	1	1		I2CMD4	11	3
	A8DBQ9	2	1		I2CMD6	11	3
	Q7M431	2	1		I2CMD7	9	2
	C7T6L6	3	2		I2CMD8	11	3
	P08176	2	1		P49278	11	3
	Q3HWZ5	3	2		Q1H8P8	7	3
DER P 10	O18416	32	19		C7T6L5	11	3
	Q304Y3	30	17	DER P 20	B2ZSY4	25	7
	B6E457	33	17	DER P 21	Q2L7C5	11	1
DER P 11	Q6Y2F9	34	10	DER P 3	P39675	3	3
DER P 13	EOA8N8	16	2	DER P 30	Q962I7	11	7
DER P 14	Q8N0N0	78	28	DER P 4	Q9Y197	6	6
				DER P 8	Q2YFE3	15	1
					Q2YFE4	15	5
					Q2YFE5	12	4
					P46419	8	3
				DER P 9	Q8MWR5	1	1

Tabla 2.- Espectrómetro de masas. Se representan las isoformas y el número de péptidos por cada uno de los alérgenos identificados tanto en el extracto nativo como en los polímeros.

Análisis del contenido proteico

Se midió el contenido proteico por el método Bradford. Obteniendo 1.243 mg/ml de proteína para el extracto nativo, 1.131 mg/ml y 0.961mg/ml de proteína para el polimerizado a temperatura ambiente y en frío, respectivamente.

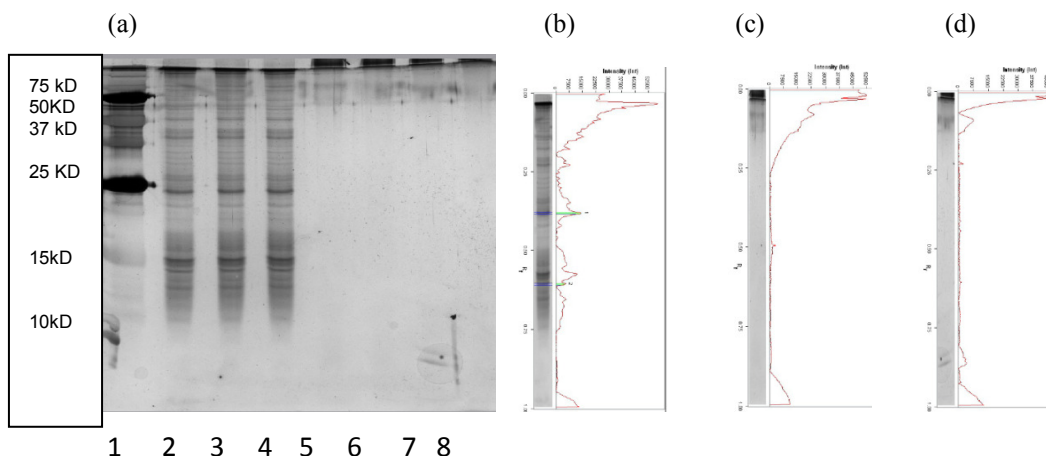


Figura 2.- (a) SDS-PAGE teñido con plata, patrón de pesos moleculares (1), extracto nativo (2-4), *D. pteronyssinus* polimerizado con glutaraldehído en frío (5 y 6), polimerizado *D. pteronyssinus* a temperatura ambiente (7 y 8) después de la diálisis. (b) Perfil del extracto nativo, (c) Perfil del polimerizado en frío y (d) Perfil del polimerizado a temperatura ambiente.

Análisis del perfil proteico

Las muestras fueron analizadas en un SDS-PAGE y teñidas con tinción plata. Con esto pudimos analizar el perfil proteico de las tres muestras. Se pudo observar una única banda en la parte superior del gel correspondiente a las muestras polimerizadas ya que tienen un peso molecular elevado y no fue capaz de

atravesar el gel, mientras que en el nativo pudimos comprobar la presencia de las diferentes proteínas que contiene el extracto de *D. pteronyssinus* a lo largo del carril (Fig.2.a). Con el programa Image Lab se analizó de forma independiente el perfil de cada una de las muestras, confirmando la ausencia de cualquier proteína a excepción del pico que apareció en el inicio de las calles de la 5 a la 8 de los polimerizados (Fig.2. c y d). Por tanto, estos resultados concuerdan con el perfil cromatográfico, demostrando que nuestro producto modificado contiene todos los alérgenos unidos formando un polímero de alto peso molecular.

Alergenicidad del polimerizado

En el inmunoblot se comparó la capacidad de fijación de IgE por parte del extracto nativo en comparación con los extractos polimerizados. En el extracto nativo se reconocieron los alérgenos mayores Der p 1 y Der p 2, correspondientes a las bandas de mayor intensidad que aparecen en las dos primeras calles de la membrana y cuyos pesos moleculares son 24 y 15 kDa, respectivamente (Fig. 3). Sin embargo, en las calles posteriores se cargaron los polimerizados y no apareció unión de IgE, esto confirma, que la modificación del extracto con glutaraldehído se ha llevado a cabo correctamente, ya que las IgE del suero no han sido capaces de reconocer los alérgenos, demostrando la reducción de alergenidad de nuestros alergoides.

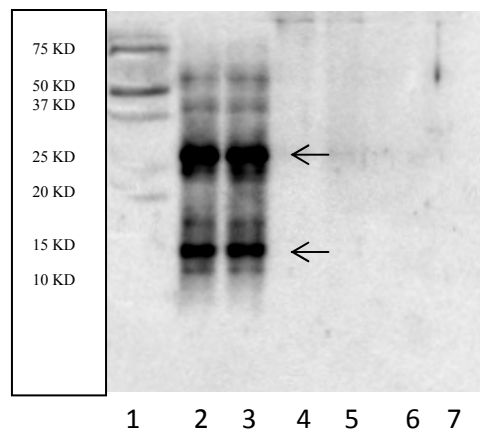


Figura 3.- Inmunoblot. Patrón de pesos moleculares (1), Extracto nativo *D. pteronyssinus* (2 y 3), polimerizado *D. pteronyssinus* en frío (4 y 5) y polimerizado a temperatura ambiente (6 y 7). Las bandas con más intensidad señaladas por las flechas corresponden a Der p 1 (24kDa) y Der p 2 (15 kDa), los alérgenos mayores.

Potencia alérgica del polimerizado

La potencia alérgica de los polimerizados fue comparada con el extracto nativo usando un ELISA inhibición. La recta dosis respuesta fue lineal permitiendo comparar el 50% de inhibición de las diferentes muestras.

El valor del Ag50 de la sustancia nativa fue de 0,435 µg de extracto por ml, frente a 11.427 y 8.884 µg/ml del polimerizado en frío y polimerizado a temperatura ambiente, respectivamente. Se necesitó una concentración 50 veces mayor en los alergoides para alcanzar el mismo grado de inhibición que el encontrado en el alérgeno no modificado, indicando una pérdida de potencia de los polimerizados por encima del 95%.

Discusión

El tratamiento de las enfermedades alérgicas combina el tratamiento farmacológico e inmunológico. Las diferencias entre los tratamientos farmacológicos e inmunológicos de las enfermedades alérgicas no se limitan a la seguridad y eficacia. Los fármacos proporcionan un tratamiento sintomático, mientras que la evitación del alérgeno y la inmunoterapia son las únicas modalidades terapéuticas que tienen la posibilidad de modificar el curso natural de la enfermedad. Los objetivos principales en el tratamiento inmunológico son, a corto plazo, reducir las respuestas a los desencadenantes alérgicos que precipitan los síntomas y, en ocasiones, disminuir la respuesta inflamatoria e impedir el desarrollo de una enfermedad persistente [2].

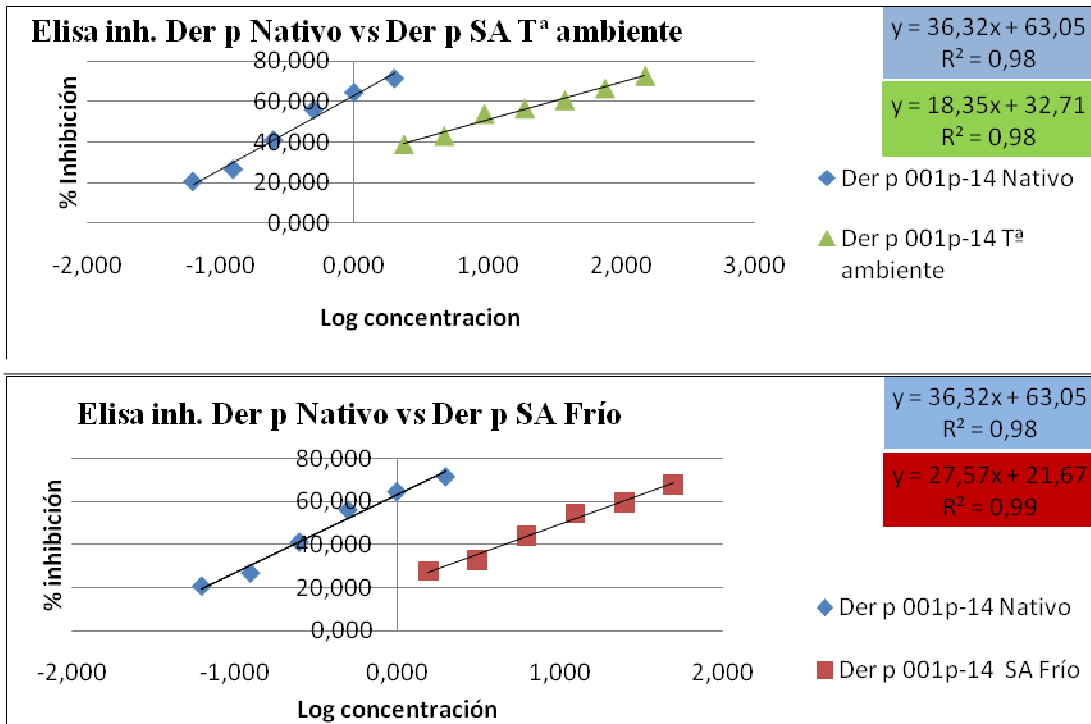


Figura 4. Elisa inhibición. Se midió la pérdida de potencia alérgica de ambos polimerizados comparando su Ag50 respecto al nativo. (a) Comparación del Ag50 del extracto nativo respecto el polimerizado a temperatura ambiente. (b) Comparación del Ag50 del extracto nativo respecto el polimerizado en frío.

Existen varios métodos estandarizados disponibles para la obtención de polímeros con glutaraldehído. Con diversas técnicas analíticas se caracterizaron los extractos polimerizados de *Dermatophagoides pteronyssinus* garantizando su eficacia y seguridad para ser usados como materia prima para futuras vacunas inmunoterapéuticas. Inicialmente el proceso de polimerización se llevaba a cabo a $5^{\circ}\text{C}\pm 3$, puesto que algunos extractos alérgicos presentaban proteasas que podían alterar la estructura de otras proteínas presentes en la muestra y de esta forma se conseguía inhibir su actividad enzimática. Para hacer una evaluación precisa del proceso de polimerización fue necesario realizar la ultrafiltración tangencial a los productos polimerizados para eliminar posibles flavonoides, pigmentos y otras sustancias no proteicas que forman parte del extracto y no hubieran polimerizado [7], además se les sometió a diferentes presiones siendo la del polimerizado a temperatura ambiente superior y obteniéndose así una mayor concentración de proteína, mejorando el rendimiento del proceso. Además se comprobó que la polimerización a temperatura ambiente no afecta a la degradación de las proteínas del extracto, debido probablemente a la rapidez de actuación del glutaraldehído al reaccionar con los grupos amino libres de las proteínas [5]. Posteriormente se aseguró que todos los alérgenos del extracto nativo estuvieran presentes en el polimerizado, confirmando la inalterabilidad de los alérgenos en cuanto a su composición cualitativa por su contacto con el químico. Por otro lado, se aseguró que todos los alérgenos que constituyen el extracto modificado permanecían unidos a través del glutaraldehído formando un polímero superior a 669 kDa, el cual tiene la capacidad de reducir la fijación de IgE presente en sueros de pacientes alérgicos al ácaro, disminuyendo su alergenidad y alcanzando una pérdida de potencia por encima del 95% con respecto al extracto nativo. La reducción de la fijación de IgE es debido a la estructura de las moléculas formadas tras el polimerizado, además tienen una alta capacidad para estimular a las células T de forma específica, induciendo la síntesis de IgG después de una inmunoterapia [12-15]. La estimulación de las células T por parte de los alérgenos parece ser dependiente del tipo de célula presentadora de antígenos, siendo las células dendríticas y macrófagos, las células más efectivas en la presentación de alérgenos. Este efecto induce un equilibrio entre la respuesta Th1/Th2 de los linfocitos T, dando como resultado una disminución de la IgE y una mayor producción de IgG [13,15].

Podemos concluir que el proceso de polimerización se puede llevar a cabo a temperatura ambiente y someterlo a ultrafiltración con una presión de 2,5 Ba, consiguiendo así un aumento del rendimiento proteico en el proceso y un ahorro energético. Se ha comprobado que los extractos alérgicos polimerizados disminuyen la fijación de IgE, minimizando así el riesgo de reacciones sistémicas. Los alérgenos pueden ser administrados en altas dosis, permitiendo disminuir el número de inyecciones y el tiempo de tratamiento para el paciente. En este trabajo se han desarrollado técnicas analíticas que permiten caracterizar el extracto polimerizado, garantizando su seguridad. Por estos motivos se ha incrementado de forma considerable el uso de tratamientos con alérgenos en enfermedades de alergia.

Agradecimientos

Quiero agradecer a los laboratorios Diater haberme dado la oportunidad de trabajar con ellos y en especial al departamento I+D+i, quienes han tenido una perseverancia y constancia en transmitirme todos los conocimientos nuevos y necesarios para la realización de este trabajo.

Referencias

1. Holgate, S.T., M.K. Church, D.H. Broide, and F.D. Martinez. 2012. Allergy. Edinburgo: Elsevier Saunders. 399 pág.
2. Bousquet, J., R. Lockey, and H.J. Mailing. 1998. Artículo de opinión de la O.M.S. Inmunoterapia con alérgenos: Vacunas terapéuticas para las enfermedades alérgicas. World Health Organization
3. Lewkowich, I.P., Rempel, J.D. and K.T. HayGlass. 2005. Prevention of allergen-specific, Th2-biased immune responses in vivo: role of increased IL-12 and IL-18 responsiveness. *J Immunol.* 175(8):4956-62.
4. Lockey, R.F and K.D. Ledford. 2014. Manufacturing and Standardizing allergen Extracts in Europe. Allergens and Allergen immunotherapy: Subcutaneous, Sublingual and oral. Fifth edition. Florida: CRC Press. 289-305.
5. Silva, C. J. S. M., F. Fernanda Sous, G. Gübitz and A. Cavaco-Paulo. 2004. Chemical Modifications on Proteins Using Glutaraldehyde. *Food Technol. Biotechnol.* 42 (1) 51–56.
6. Casanova, M., M. J. Gómez, J. Carnés and E. Fernández-Caldas. 2005. Skin tests with native, depigmented and glutaraldehyde polymerized allergen extracts. *J Invest Allergol Clin Immunol.* 15(1): 30-36.
7. Ibarrola, I., M.L. Sanz, P.M. Gamboa, A. Mir, D. Benahmed, A. Ferrer, M.C. Arilla, A. Martínez and J.A. Asturias. 2004. Biological characterization of glutaraldehyde-modified *Parietaria judaica* pollen extracts. *Clin Exp Allergy.* 34(2):303-9.
8. Grammer, L.C. and R. Patterson. 1983. Development of polymerized allergens for immunotherapy. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 1(1):55-8.
9. John W. Payne. 1973. Polymerization of Proteins with Glutaraldehyde. *Biochem. J.* 135, 867-873.
10. Rodríguez, D. 2013. Tesis. Desarrollo y evaluación de medios de cultivo de ácaros domésticos exentos de carga alérgicas y derivados animales. Universidad del País Vasco, Facultad de farmacia.
11. *Dermatophagoides pteronyssinus*. 2014 (5 Mayo). En Allergen Nomenclature IUIS. http://www.allergen.org/search.php?allergen_source=Dermatophagoides+pteronysinus
12. Gallego, M.T., V. Iraola, M. Himly, D.S. Robinson, C. Badiola, J.C. García-Robaina, P. Briza and J. Carnés. 2010. Depigmented and polymerised house dust mite allergoid: allergen content, induction of IgG4 and clinical response. *Int Arch Allergy Immunol.* 153(1):61-9.
13. Gieni, R. S., X. Yang, A. Kelso and K. T. Hayglass. 1996. Limiting dilution analysis of CD4 T-cell cytokine production in mice administered native versus polymerized ovalbumin: directed induction of T-helper type-1-like activation. *Immunology.* 87(1): 119–126.
14. Asturias J. A., A. Ferrer, M.C. Arilla, C. Andreu, B. Madariaga and A. Martínez. 2007. Tolerance and immunological changes of chemically modified allergen vaccine of *Parietaria judaica* in accelerated schedules. *Clin Exp Immunol.* 147(3): 491–496.
15. Akdis C.A y K. Blaser. 2000. Regulation of specific immune responses by chemical and structural modifications of allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* 121(4):261-9