

# Puesta a punto de un microarray basado en el sistema piezoeléctrico para pronosticar la eficacia y seguridad del tratamiento de la alergia a las proteínas de leche de vaca mediante inmunoterapia oral.

Alberto Rodríguez Alonso<sup>1, a</sup>, Javier Martínez-Botas Mateo<sup>2</sup>

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. Servicio de Bioquímica-investigación, Hospital Universitario Ramón y Cajal, IRYCIS, Madrid, España.

a. albertoroal7511@hotmail.com

**Palabras clave:** alergia a leche de vaca; microarray; biomarcador; péptido; impresión piezoeléctrica

## Resumen

La alergia a la leche de vaca es una de las alergias más frecuentes en la edad pediátrica, afectando aproximadamente al 2.5% de los niños menores de dos años. Actualmente se está implantando un tratamiento denominado inmunoterapia oral a la leche de vaca (ITO) con objeto de conseguir desensibilizar a los pacientes y así, mejorar su calidad de vida. Sin embargo, este tratamiento no está exento de riesgos y requiere del desarrollo de nuevos biomarcadores para predecir su eficacia y seguridad y así poder hacer extensible este tratamiento a más pacientes. En un estudio previo, el grupo investigador de la Unidad de microarrays del Hospital Universitario Ramón y Cajal encontró un conjunto de 27 péptidos que permitía predecir, antes del inicio del tratamiento, la respuesta de los pacientes a la ITO. El objetivo del presente trabajo ha sido la puesta a punto de un nuevo sistema de impresión de microarrays basado en tecnología piezoeléctrica, que permita en un futuro el desarrollo de un dispositivo para la detección estos biomarcadores con mayor eficacia y versatilidad que el sistema utilizado con anterioridad. Para ello, se probaron diferentes tampones de impresión (sciSPOT Protein D1 y D11 de Scienion y Protein Printing Buffer de ArrayIt) y diferentes soportes (cristal, placa y membrana de nitrocelulosa). Los resultados mostraron que el Protein Printing Buffer de ArrayIt es el tampón más adecuado y que los tres soportes son válidos para la detección de proteínas y péptidos biomarcadores. Por último, se analizó mediante microarrays en cristal y placa el suero de 7 pacientes alérgicos antes de ser sometidos a ITO con leche de vaca. Los resultados obtenidos mostraron diferentes patrones de reconocimiento por parte de los pacientes. Actualmente estamos pendientes de poder correlacionar estos resultados con el resultado de la ITO.

**Cita:** Rodríguez Alonso, Alberto; Martínez-Botas Mateo, Javier (2018) Puesta a punto de un microarray basado en el sistema piezoeléctrico para pronosticar la eficacia y seguridad del tratamiento de la alergia a las proteínas de leche de vaca mediante inmunoterapia oral. *dianas* 7 (2): e20180907. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e20180907](http://journal.dianas.e20180907). URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

**Copyright:** © Rodríguez-Alonso A, Martínez-Botas-Mateo J. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

## Introducción

La alergia a proteínas de la leche de vaca (APLV), junto con el huevo, son las alergias alimentarias más frecuentes en edad pediátrica, afectando aproximadamente al 2.5% de los niños menores de dos años (1). La APLV se caracteriza por la producción de anticuerpos IgE frente a proteínas de la leche. Estas proteínas son de los alérgenos mejor caracterizados y se componen fundamentalmente de las proteínas del lactosuero,  $\alpha$ -Lactoalbúmina (Bos d 5) y  $\beta$ -Lactoglobulina (Bos d 5), y del cuajo  $\alpha$ S1-caseína (Bos d 9),  $\alpha$ S2-caseína (Bos d 10),  $\beta$ -caseína (Bos d 11) y  $\kappa$ -caseína (Bos d 12). Las IgE se unen a lugares específicos de las proteínas, denominados epítomos, y desencadenan la reacción alérgica de hipersensibilidad. Los epítomos IgE se pueden clasificar como lineales si los anticuerpos reconocen secuencias contiguas de aminoácidos, o conformacionales si reconocen aminoácidos que se localizan próximos en la estructura terciaria pero no contiguos en la secuencia lineal. Los epítomos lineales parecen tener un papel especialmente importante en las alergias alimentarias, donde el alérgeno, al ser cocinado y digerido tras su ingesta, pierde la estructura terciaria antes de entrar en contacto con el sistema inmune. Por su parte, los epítomos conformacionales están más asociados a alergias respiratorias donde el alérgeno no sufre todo este proceso [2].

Los síntomas tras la exposición a la leche son agudos, incluyendo afectaciones cutáneas, digestivas y/o respiratorias. También se pueden producir reacciones más graves (anafilaxia), donde se necesita atención sanitaria urgente pues se puede comprometer la vida del paciente.

La APLV en el mundo occidental suele debutar a los seis meses, coincidiendo con la transición de la leche materna a la de leche de fórmula en biberón. Una vez diagnosticada la APLV los niños comienzan a

tomar leche altamente hidrolizada como alternativa a la leche de fórmula convencional. En este tipo de leche las proteínas son tratadas químicamente para reducir su tamaño a fragmentos que no puedan ser reconocidos por las IgE. Sin embargo, cuando el niño comienza a tener cierta autonomía y coincidiendo normalmente con la guardería o la escolarización, el riesgo de exposiciones accidentales aumenta. Hasta ahora el único tratamiento de la APLV ha sido el de evitar la ingesta de leche y todo tipo de derivados lácteos. Tras un periodo de evitación, que puede variar de entre 6 meses o un año, se les reevalúa la alergia haciéndoles pruebas cutáneas o ‘prick’ y análisis de anticuerpos en sangre frente a las proteínas de leche de vaca. Si las pruebas son positivas se mantiene la evitación hasta una nueva reevaluación y si son negativas se les somete a una prueba de provocación oral a doble ciego para confirmar la tolerancia a la leche. En la mayoría de los casos los niños superan esta alergia antes de la edad de escolarización [3]. Al analizar la historia natural de la APLV se ha encontrado que a los cuatro años un 66% de los alérgicos ha desarrollado tolerancia espontánea, aumentando hasta un 80% a la edad de los seis años. El 20% restante es considerado alérgico persistente y frecuentemente la alergia a la leche permanece hasta la edad adulta sin que se consiga desarrollar tolerancia. En estos últimos años se ha comenzado a realizar ensayos clínicos de inmunoterapia oral (ITO). La ITO es un tratamiento en el cual a los pacientes se les va dando leche, de menor a mayor concentración, con objeto de conseguir desensibilizar al paciente. Este tratamiento es muy eficaz y se consigue la desensibilización en la mayoría de los casos. Sin embargo, presenta un riesgo importante debido a que son frecuentes las reacciones alérgicas de menor o mayor grado, lo que exige su realización en centros hospitalarios. Dependiendo de las reacciones adversas, el tratamiento suele durar de entre 5 a 20 semanas, con tres sesiones semanales. En cada sesión el niño tiene que permanecer toda la mañana en el hospital acompañado por alguno de sus familiares, al ser menor. Debido a esto, esta terapia presenta un problema en cuanto al consumo de recursos hospitalarios y al esfuerzo que supone para las familias el tener que acudir durante semanas con el paciente. Tras la desensibilización, el paciente no está “curado” del todo y debe tomar al menos 200 ml de leche diarios. Esto mejora enormemente su calidad de vida al eliminarse el riesgo de sufrir reacciones alérgicas tras ingerir leche. Por lo tanto, para reducir gastos en recursos y tiempo es fundamental obtener un método de diagnóstico con el que poder predecir el futuro desarrollo del tratamiento y así poder adaptarlo a cada caso concreto [4].

Actualmente, el diagnóstico utilizado para determinar si existe alergia a la leche consiste en la realización de pruebas ‘prick’ y en la medición de la IgE específica contra las proteínas de la leche. También se asocian con tolerancia a la leche altos niveles de IgG4 y el descenso de la IgE a largo plazo [5]. Sin embargo, estas pruebas no permiten diagnosticar, en el momento previo al comienzo de la ITO, como se va a desarrollar el tratamiento. Existen estudios donde se propone el uso de microarrays de péptidos como una potente herramienta para ver la gravedad de la alergia persistente a la leche de vaca [6], siendo los péptidos de las proteínas que conforman la leche los biomarcadores predictores. El microarray permite el análisis de gran cantidad de péptidos de forma simultánea con una pequeña cantidad de muestra del paciente, hecho importante pues se trata de niños de escasa edad.

El grupo investigador de la Unidad de microarrays del Hospital Universitario Ramón y Cajal encontró, a través del desarrollo de un microarray, un grupo de péptidos que podían ser utilizados como biomarcadores para predecir la respuesta de los pacientes a la ITO con leche de vaca antes de comenzar el tratamiento, en términos de número de reacciones adversas (seguridad) y de tiempo requerido para conseguir desensibilizarse (eficacia). Los resultados mostraron que existía correlación entre el número de péptidos reconocidos en el momento previo al inicio de la ITO y las variables clínicas, y así pacientes con menor número de péptidos reconocidos tenían baja probabilidad de tener reacciones adversas durante la ITO y conseguían desensibilizarse antes que los que reconocían un mayor número de péptidos [7]. Sin embargo, el robot microarray usado en el anterior estudio se basa en la impresión por contacto y no presenta calidad suficiente para el desarrollo de un kit diagnóstico. Tampoco permite mucha versatilidad en cuanto al diseño de la impresión. Por ello, se pretende poner a punto una tecnología que permita la impresión de péptidos y proteínas con mayor versatilidad, en diferentes soportes y con mayor eficacia que la usada previamente.

En este estudio, ponemos a punto un sistema impresión piezoeléctrico para desarrollar un microarray que contenga el conjunto de péptidos biomarcadores anteriormente estudiados, predictores de la respuesta a la ITO con leche de vaca, con el objetivo de que una empresa desarrolle y comercialice un kit basado en estos biomarcadores y pueda ser trasladado a la práctica clínica. Las diferentes impresiones para la puesta a punto se realizaron en tres soportes: cristales, placa y membrana de nitrocelulosa.

## Métodos

### Sueros de pacientes

Los sueros de los pacientes fueron suministrados por el Servicio de Alergia del Hospital Universitario Ramón y Cajal y del Hospital Clínico San Carlos. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de los Hospitales Ramón y Cajal y Clínico San Carlos, y todos los padres o representantes legales de los niños dieron su consentimiento por escrito.

## Impresión de proteínas y péptidos

Para la fabricación de microarrays se usó el robot de impresión piezoeléctrico sciFLEXARRAYER S3 con un PDC 70 Type 2 (Scienion). Las proteínas utilizadas en la impresión de microarrays se obtuvieron comercialmente (Sigma) y los péptidos de 20 aa con un desfase de 3 aa se sintetizaron de acuerdo a la estructura lineal de las proteínas alergénicas de leche de vaca:  $\alpha$ -caseína (Bos d 10),  $\beta$ -caseína (Bos d 11),  $\kappa$ -caseína (Bos d 12),  $\alpha$ -Lactoalbúmina (Bos d 5) y  $\beta$ -Lactoglobulina (Bos d 5) (GenScript Corporation). Las proteínas y los péptidos se disolvieron en diferentes tampones de impresión y se depositaron en placas de 384 pocillos (Greiner bio-one) a una concentración de 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  para las proteínas y de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  para los péptidos.

En la impresión en cristales de vidrio se usaron los tampones de impresión sciSPOT Protein D11 (Scienion), sciSPOT Protein D1 (Scienion) y el Protein Printing Buffer de ArrayIt. Se utilizaron dos sustratos diferentes en cristal NSB27 NHS de NanoSurface Biosciences Postech y los cristales sciCHIP H2 de Scienion. Como soportes para la impresión se utilizaron también placas de 96 pocillos sciPLEXPLATE Type 1 (Scienion) y membranas de nitrocelulosa (Amersham Hybond ECL).

Se programó el robot de impresión específicamente para cada soporte mediante el software Scienion AG (Scienion). Antes de cada impresión se preparó el robot ejecutando el programa "Prime", se ajustó la gota y se realizaron diferentes lavados del PDC tanto por dentro como por fuera del capilar. Las condiciones dentro de la cabina de impresión del robot fueron de 60% de humedad y de 15 °C de temperatura de la placa de impresión. También se activó una bomba de vacío para fijar los sustratos a la bandeja de impresión. Una vez se ajustó el robot y las condiciones fueron adecuadas se procedió a realizar la impresión. El robot se programó para tomar 4  $\mu\text{l}$  de cada muestra y depositar gotas de aproximadamente 370pl y 200  $\mu\text{m}$  de diámetro. Tras la impresión se redujo la humedad hasta la humedad ambiente y se dejaron los sustratos toda la noche en el interior de la cabina del robot para su posterior almacenamiento en cámara desecadora.

## Hibridación microarrays en diferentes soportes

En primer lugar, se delimitó la zona impresa de cada cristal con un rotulador hidrofóbico Liquid Blocker Super San Pen (Sigma-Aldrich) y se bloquearon utilizando 50  $\mu\text{l}$  de la solución Protein Activation Microarray 1x (ArrayIt) por cada matriz impresa. Para la placa se usaron 200 $\mu\text{l}$  de la solución sciBlock Protein D1M 2x (Scienion) por cada pocillo. Para realizar el bloqueo en membrana de nitrocelulosa, previamente se cortó reduciéndola a la zona que tenía matriz impresa, se usó la misma solución que para placa, con un volumen de 200  $\mu\text{l}$  para toda la membrana. Estos volúmenes se mantuvieron para las fases de lavado. Tras esto, los diferentes soportes fueron introducidos en una cámara húmeda en agitación (300 r.p.m) durante 1 hora. Tras la incubación con la solución de bloqueo, se realizaron tres lavados de 10 minutos con la solución Protein Microarray Wash Buffer 5X disuelto en agua destilada, tanto en placa como en membrana. Los lavados en cristales fueron de 5 minutos.

La fase siguiente fue la de incubación con suero de los pacientes alérgicos a leche de vaca. El suero de los pacientes se diluyó con sciBIND Protein D1 2X (ArrayIt) y tampón fosfato salino (PBS), con un volumen final de 100 $\mu\text{l}$  por pocillo en las placas y por cada membrana. Para los cristales se diluyó el suero 1:2 con Protein Microarray Reaction Buffer (ArrayIt) con un volumen final de 50 $\mu\text{l}$  por cada zona delimitada con el rotulador hidrofóbico. La incubación con suero se dejó toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente, se realizaron los lavados como se describieron anteriormente.

Para revelar los microarrays se utilizó un anticuerpo anti-IgE humana conjugado con biotina (BD Biosciences). Para los cristales, se diluyó 1:100 en Protein Microarray Reaction Buffer (ArrayIt) y para las placas y la membrana se diluyó 1:100 en PBS y sciBIND Protein D1 2X Buffer (Scienion). La incubación fue de 2 horas a temperatura ambiente en agitación y posteriormente se volvieron a realizar los lavados de forma similar a las anteriores.

## Métodos de detección: fluorescencia y colorimetría.

La fluorescencia se usó en el caso de los cristales. Para ello, se preparó Streptavidina conjugada con el fluoróforo Cy3 (GE Healthcare) diluida 1:500 en Protein Microarray Reaction Buffer (ArrayIt). Se dejó incubar cada microarray 30 minutos en agitación y en condiciones de oscuridad. Tras los lavados se procedió a escanear los cristales en el ScanArray Express (Packard BioScience -BioChip Technologies). Para la cuantificación de los resultados se utilizó el archivo formato ".gal" generado por el robot y el software del escáner.

La colorimetría se usó en placas y en las membranas de nitrocelulosa ante la imposibilidad de introducirlos en el ScanArray Express. Se preparó una dilución 1:300 de Streptavidina conjugada con HRP en PBS y sciBIND Protein D1 2X Buffer (Scienion) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente para posteriormente repetir los lavados. Tras estos, se añadieron 100 $\mu\text{l}$  del sustrato sciColor T2 (Scienion) por pocillo o membrana y se dejaron incubando sin agitación hasta que se visualizó el color.

Posteriormente se retiró el sustrato y se tomaron fotos de cada pocillo. En el caso de las membranas se escanearon en un escáner de mesa.

## Análisis de datos

Para la cuantificación de los resultados se utilizó la señal de fluorescencia medida como Relación señal/ruido o Signal-to-Noise Ratio (SNR). La matriz de datos fue procesada utilizando el programa Excel (Microsoft).

## Resultados

En este trabajo, el objetivo principal fue la puesta a punto de un robot de impresión de microarrays de péptidos sciFlexarrayer S3. Para ello, se usaron diferentes tampones de impresión y se imprimió en diferentes tipos de sustratos.

### Impresión de proteínas en sciCHIP con diferentes tampones

Como comienzo de la puesta a punto, se buscó determinar que tampón de impresión era el más adecuado. Se probaron los tampones D1 y D11 de Scienion y el Protein Printing Buffer (PPB) de Arrayit, este último utilizado anteriormente en el laboratorio para la impresión de microarrays utilizando el robot de impresión por contacto. Dado el elevado coste de los péptidos, en un primer lugar realizamos las diferentes pruebas de impresiones con proteínas completas de leche de vaca:  $\alpha$ -caseína (Bos d 10),  $\beta$ -caseína (Bos d 11),  $\kappa$ -caseína (Bos d 12),  $\alpha$ -Lactoalbúmina (Bos d 5) y  $\beta$ -Lactoglobulina (Bos d 5). Como control negativo se utilizaron Albúmina humana y PBS. Las muestras se imprimieron por cuadruplicado, en tres localizaciones del microarray: superior (Top), medio (Medium) e inferior (Bottom) según el esquema de la Figura 1.

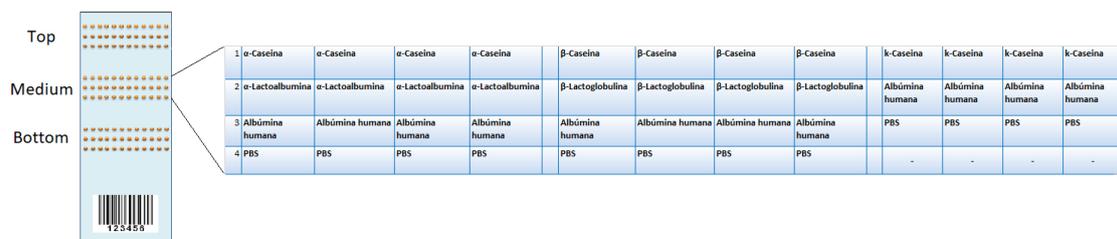


Figura 1. Esquema inicial de la impresión de proteínas en cristales. Cada proteína se imprimió por cuadruplicado

Para la hibridación usamos un pool de sueros de pacientes alérgicos a leche de vaca y se hibridaron 6 microarrays para cada tampón.

Para evaluar la calidad de los diferentes tampones de impresión analizamos en primer lugar el diámetro de los puntos impresos. Como se observa en la Figura 2A, los tampones D1 y D11 dieron puntos muy homogéneos con pequeñas variaciones de diámetro entre proteínas, con un diámetro que oscilaba entre 167,91 y 182,08 para el tampón D1 y 188,33 y 205,83 para el tampón D11. Por el contrario, el PPB presentaba mayores variaciones de diámetro entre las diferentes proteínas con un rango entre 123,33 y 198,61.

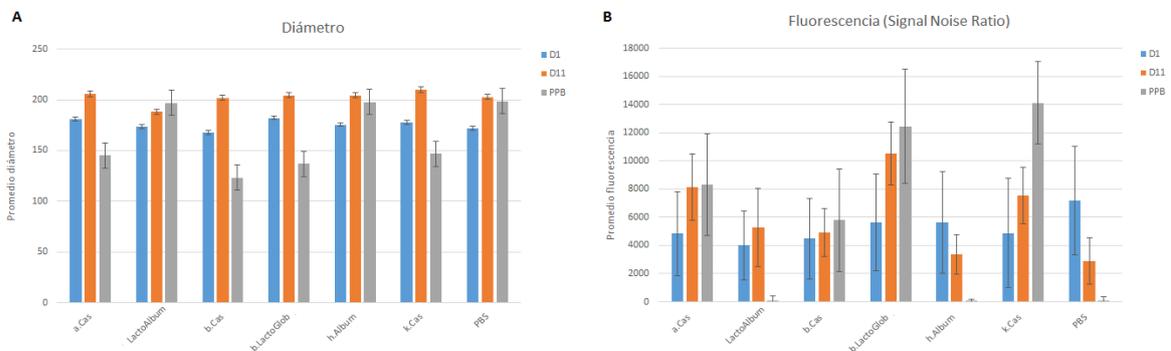


Figura 2. Diferencia entre tampones de impresión. A) Promedio del diámetro de los puntos impresos. B) Promedio de la fluorescencia (Signal-to-Noise Ratio). Los resultados mostrados corresponden a las medias  $\pm$  desviación típica estándar

A continuación, analizamos la señal de fluorescencia correspondiente a la unión de IgE a las distintas proteínas calculada como la Relación señal/ruido o Signal-to-Noise Ratio (SNR). Como se observa en la figura 2B, los tampones D1 y D11 presentan una alta señal de fluorescencia en los controles negativos, en algunos casos incluso superior a la observada para las proteínas de leche. Esto hace pensar que algún

componente de estos tampones interfiere con el suero de los pacientes dando una señal inespecífica. Por el contrario el PPB no presentó fondo en ninguno de los controles negativos (Figura 2B). Estos resultados sugirieron que, a pesar que la morfología de los puntos obtenidos con PPB no era la mejor, este tampón era el único que podíamos utilizar para imprimir los microarrays.

### Impresión de proteínas en cristales, placa y membrana con Protein Printing Buffer

Con objeto de obtener el protocolo definitivo para imprimir en cristales con este robot de impresión, nos dispusimos a comparar los cristales sciCHIP, proporcionados por la casa comercial del robot de impresión, y los cristales NSB27 NHS NanoSurface, usados en el estudio anterior en el cual se había determinado la utilidad de los péptidos como biomarcadores. Los cristales sciCHIP están recubiertos con grupos epóxido que se une covalentemente a los grupos amino de las proteínas. Por su parte, los cristales NanoSurface están recubiertos con un polímero en forma de cono con un grupo reactivo n-hidroxisuccinimida (NHS) en el vértice, el cual también reacciona con el grupo amino de las proteínas. Esta estructura cónica permite una disposición ordenada y contralada de los péptidos y aumenta la distancia con la superficie del sustrato, lo que facilita una unión antígeno anticuerpo más eficaz (Figura 3A). El diseño de impresión fue similar al utilizado previamente, con la variante de que en la primera línea del microarray se añadieron tres controles: un anticuerpo Anti-Rat biotinilado como control positivo y dos péptidos, Angiotensina II y Poly-DL-Alanina, como controles negativos.

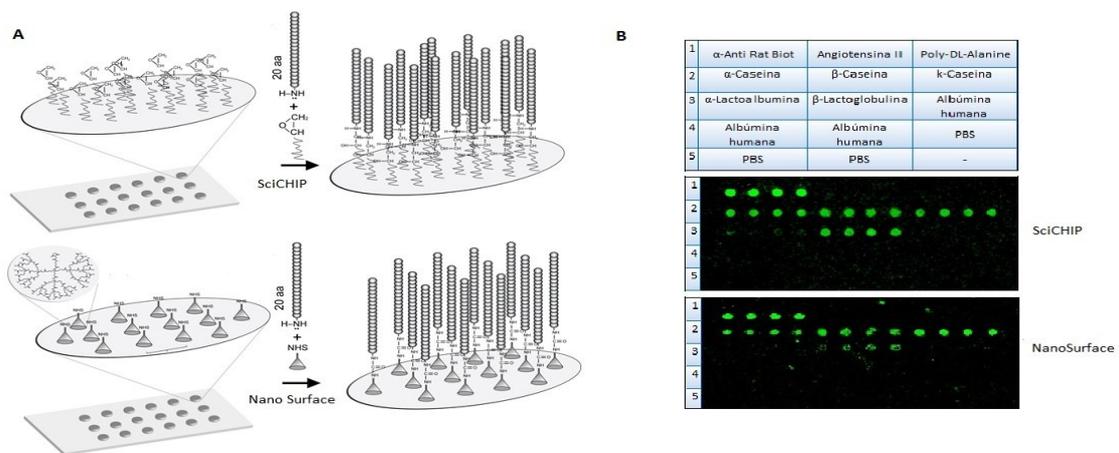


Figura 3. A) Estructura presente en la superficie de los cristales sciCHIP y NanoSurface B) Comparativa de la impresión de proteínas con el tampón de impresión PPB en sciCHIP y NanoSurface. Cada punto se imprimió por cuadruplicado. La imagen muestra dos microarrays hibridados con el mismo suero de un paciente alérgico a la leche de vaca, uno en sciCHIP y otro en NanoSurface.

El revelado mostró que ambos cristales presentaban el mismo patrón de reconocimiento de proteínas. Sin embargo, la morfología de los sciCHIP parecía ser mejor que la que presentaban los cristales NanoSurface (Figura 3B) lo que en futuros análisis podría dificultar la cuantificación.

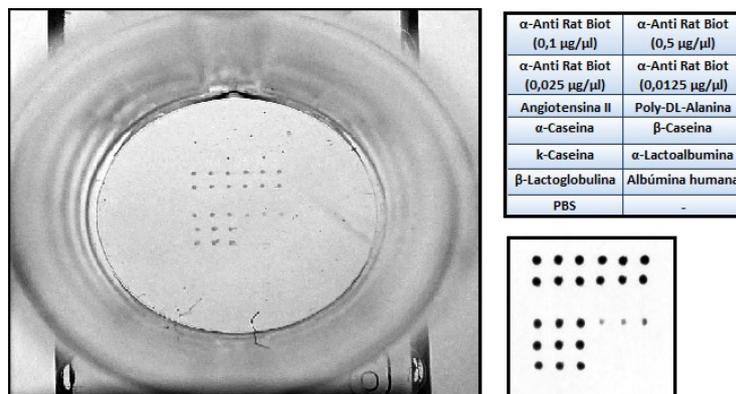


Figura 4. Impresión de un microarray de proteínas en placa y en membrana de nitrocelulosa. La imagen muestra la disposición programada para realizar las impresiones y el resultado obtenido al revelar por colorimetría en ambos soportes. Cada una de las proteínas y controles se imprimieron por duplicado.

Tras la impresión de proteínas en cristales nos dispusimos a programar el robot para imprimir proteínas en placa y en membranas de nitrocelulosa. Como se especifica en el apartado métodos, se usó colorimetría en ambos casos y se volvió a usar el pool de sueros para hibridar 8 pocillos y 7 membranas.

La disposición del microarray fue similar a la realizada en cristales, por triplicado y con el control positivo impreso en diferentes concentraciones.

Como se ve en la figura 4, el patrón de reconocimiento obtenido en pocillos era similar al mostrado en cristales, por lo que asumimos que estos soportes y los respectivos protocolos utilizados también eran válidos para imprimir proteínas.

### Impresión de péptidos en diferentes soportes

En vista de los resultados anteriores, el siguiente paso fue el de poner a punto el robot para la impresión de péptidos en los diferentes soportes.

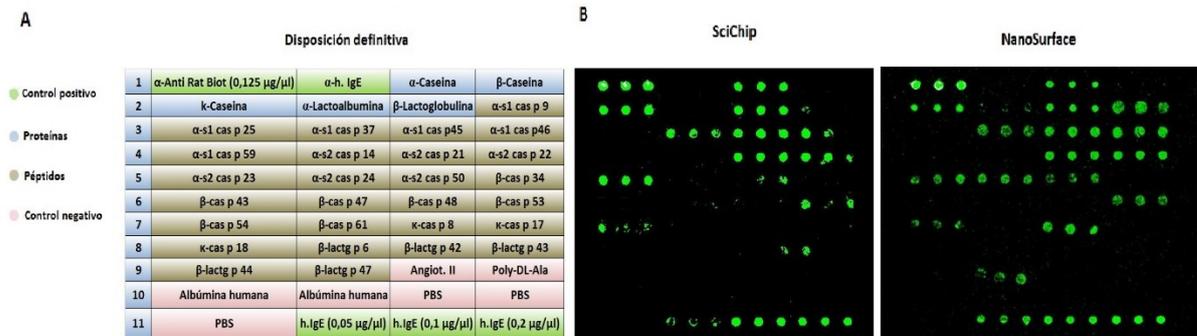


Figura 5. Impresión del conjunto de péptidos biomarcadores anteriormente estudiados en cristal. A) Disposición definitiva para impresiones en cristal. B) Comparativa de la impresión de péptidos en sciCHIP y NanoSurface. Cada punto se imprimió por triplicado. La imagen muestra dos microarrays hibridados con el mismo suero de un paciente alérgico a la leche de vaca, uno en sciCHIP y otro en NanoSurface.

Aunque la impresión de proteínas nos sugería que los sciCHIP eran más adecuados, un péptido es menos voluminoso que una proteína y esto puede variar el resultado al utilizar distintos cristales. Por ello, realizamos impresiones en los dos tipos de cristales. Para la hibridación usamos diferentes sueros de pacientes alérgicos a leche de vaca y se hibridaron 6 microarrays para cada tipo de cristal. La disposición definitiva presentó controles positivos, negativos, las proteínas y el grupo de péptidos biomarcadores (Figura 5A). Los resultados mostraron que, aunque la intensidad de la fluorescencia para las IgE unidas a proteínas era mayor en sciCHIP, en NanoSurface existía un mayor reconocimiento de las IgE unidas a péptidos (Figura 5B).

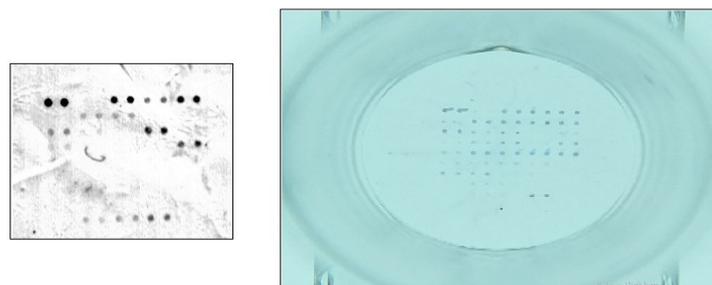


Figura 6. Impresión de un microarray de péptidos en membrana de nitrocelulosa y en placa. La imagen muestra el resultado obtenido al revelar por colorimetría en ambos soportes. Los péptidos, proteínas y controles se imprimieron cada uno por duplicado.

Con objeto de comprobar si los péptidos se reconocían en placa y en membrana se realizaron diferentes impresiones con la misma disposición usada en cristales, con la diferencia de que por falta de espacio se imprimió por duplicado. Se hibridaron 8 pocillos y 3 membranas y se vio el resultado por colorimetría. Los resultados mostraron que en ambos soportes es posible el reconocimiento de péptidos (Figura 6).

### Hibridación de cristales NanoSurface con sueros de pacientes alérgicos persistentes a la leche de vaca que han sido sometidos a inmunoterapia oral

Tras la puesta a punto en los diferentes soportes se inició la parte de corroboración de los resultados obtenidos en el trabajo realizado por la Unidad de Microarrays [7]. Para ello utilizamos el suero de 7 pacientes alérgicos antes de ser sometidos a ITO con leche de vaca y los hibridamos en cristales NanoSurface y en placas multipocillo con la disposición final de proteínas y péptidos utilizada anteriormente en ambos soportes.

Como se observa en la figura 7, el número de péptidos reconocidos mediante fluorescencia es mayor que en colorimetría y se aprecian mejor las diferencias en la intensidad de reconocimiento. Esto es una cuestión inherente al método de detección, la fluorescencia tiene una mayor sensibilidad y un mayor rango dinámico.

Por otra parte, con ambas técnicas se aprecian diferentes patrones de reconocimiento por parte de los pacientes (Figura 7). Actualmente estamos trabajando para correlacionar los resultados obtenidos mediante microarray con su historia clínica y confirmar si aquellos pacientes que reconocen un mayor número de péptidos presentaron una desensibilización más difícil que los que reconocen pocos péptidos.

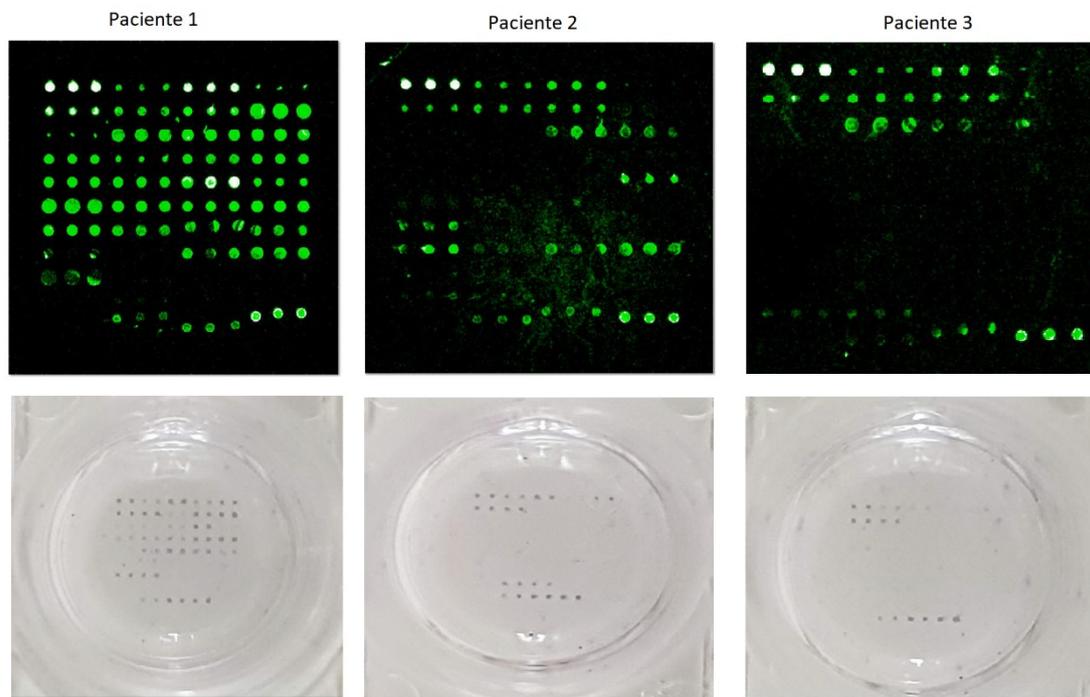


Figura 7. Hibridación con sueros de pacientes sometidos a la inmunoterapia oral. La imagen muestra 3 de los 7 sueros de pacientes hibridados. Se pueden apreciar diferentes patrones de reconocimiento entre los diferentes pacientes y las diferencias en el reconocimiento de péptidos entre un soporte y otro.

## Discusión

En este trabajo hemos puesto a punto el robot sciFlexarrayer S3 (Scienion) para imprimir en diferentes soportes, tanto proteínas como péptidos. También se ha iniciado la fase de corroboración de los resultados obtenidos en el anterior trabajo realizado por la Unidad de Microarrays [7], usando nuevas muestras de pacientes que inician la inmunoterapia oral para la alergia a la leche de vaca.

En primer lugar, se realizaron diferentes pruebas de impresión en cristal, soporte usado con el anterior robot de impresión, con objeto de seleccionar un tampón con el que realizar las siguientes pruebas. Nuestros resultados mostraron que el tampón más adecuado era el Protein Printing Buffer (PPB), puesto que con los tampones D1 y D11 los controles negativos como el PBS y la albúmina humana mostraban señal inespecífica (Figura 2). Una posible explicación sería que estos tampones contienen albúmina sérica bovina (BSA), bloqueante muy común en ensayos donde se utilizan anticuerpos como Western blot o ELISA, pero la cual es frecuentemente reconocida por los pacientes alérgicos a leche de vaca. Por tanto, la presencia de BSA explicaría que al utilizar estos tampones obtenemos señal fluorescente incluso en presencia solo de PBS.

Una vez seleccionado el PPB como mejor tampón a utilizar, comparamos los cristales NanoSurface con los sciCHIP. En cuanto a la impresión de proteínas, vimos que los patrones eran similares en ambos, pero los sciCHIP presentaban mejor morfología y mayor intensidad de fluorescencia que los NanoSurface. Sin embargo, en el caso de la impresión de péptidos, los NanoSurface presentaban mayor intensidad, diferencia que podría deberse a que las proteínas, al ser más voluminosas que los péptidos, se adhieren al grupo reactivo presente en el cristal y quedan mucho más expuestas a los anticuerpos. Los NanoSurface, al presentar las estructuras de cono, permiten una mayor distancia entre péptidos y con ello evitan el impedimento de unión que se pueda generar. También se consigue una mayor distancia entre el vértice y el soporte, evitando que el péptido se pegue a la superficie, lo que haría muy difícil su unión al

anticuerpo. Por ello, pensamos que estos resultados pueden deberse a esta diferencia de estructuras y que, en el caso de la impresión de proteínas, no existe esta diferencia debido a que la proteína queda mucho más expuesta.

Tras la puesta a punto en cristales, se procedió a imprimir los microarrays en placas multipocillo y en membranas de nitrocelulosa. Como se puede ver en las figuras 4 y 6, ambos soportes parecen ser válidos para realizar hibridaciones tanto de proteínas como de péptidos. Por un lado, el uso de la colorimetría en placa simplifica mucho el protocolo y permite un ahorro económico importante, hechos que permitirían que el protocolo se pudiese llevar a cabo en un laboratorio de análisis clínico, con la única necesidad de disponer de las placas con los péptidos biomarcadores ya impresos. Por otro lado, la posibilidad de detectar los péptidos biomarcadores en membrana de nitrocelulosa sirve como prueba de concepto para desarrollar un kit rápido con estos biomarcadores basado en el método de Lateral Flow. Esta técnica, utilizada en la actualidad en ensayos como el test de embarazo basado en la detección de la gonadotropina coriónica humana, permite su uso en la consulta médica sin necesidad de la infraestructura de un laboratorio de ensayos clínicos y por tanto su rápida traslación a la práctica clínica.

En la parte de corroboración de los resultados obtenidos anteriormente [7] obtuvimos diferentes patrones de reconocimiento pertenecientes a los 7 sueros de pacientes utilizados. Como ejemplo se presentan tres pacientes:

El paciente 1, reconoce gran cantidad de péptidos y por tanto, de acuerdo con los resultados obtenidos en el trabajo previo [7], supondría que va a sufrir una gran cantidad de reacciones alérgicas durante la ITO y va a tardar más tiempo en desensibilizarse, por lo que es probable que este paciente necesite medicación previa a cada sesión de ITO con el fin de evitar reacciones severas.

El paciente 2, reconoce una cantidad intermedia de péptidos y por tanto debería presentar un número intermedio de reacciones adversas y requerir un tiempo intermedio para desensibilizarse.

El paciente 3, que apenas reconoce péptidos, no presentaría ninguna reacción adversa y tardaría unas 5 semanas en desensibilizarse.

Sin embargo, para sacar conclusiones, estos datos deben ser cuantificados y una vez obtenida la historia clínica de los pacientes al finalizar el tratamiento deben ser analizados según el modelo propuesto para comprobar si se mantiene la correlación entre el número de péptidos reconocidos en el momento previo al inicio de la ITO y la eficacia (tiempo requerido para la desensibilización) y seguridad (nº de reacciones adversas) del tratamiento.

Por último, aunque hemos encontrado una mejor sensibilidad y rango dinámico en el sistema de microarrays en cristal revelado por fluorescencia frente a los microarrays en placa revelado por colorimetría, no hay que descartar este último sistema, pues lo que a priori podría suponer una desventaja, en realidad podría ser una simplificación del método que facilite su uso en la práctica clínica. En el sistema de microarrays en placa revelado por colorimetría es mucho más sencillo determinar que péptidos son positivos y negativos, incluso a simple vista, sin tener que realizar una cuantificación exhaustiva de los resultados y establecer un punto de corte para lo que se considera positivo o negativo. Este punto queda pendiente de confirmar hasta que se cuente con las historias clínicas de los pacientes analizados.

Por tanto, en este trabajo hemos puesto a punto un sistema de impresión piezoeléctrica de microarrays como paso previo al desarrollo de un kit para pronosticar la eficacia y seguridad del tratamiento de la alergia a las proteínas de leche de vaca mediante inmunoterapia oral.

## Referencias

1. Fiocchi, A., Schünemann, H. J., Brozek, J., Restani, P., Beyer, K., Troncone, R., Lockey, R. F. (2010). Diagnosis and rationale for action against Cow's milk allergy (DRACMA): A summary report. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(6). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.10.011>
2. Steckelbroeck, S., Ballmer-Weber, B. K., & Vieths, S. (2008). Potential, pitfalls, and prospects of food allergy diagnostics with recombinant allergens or synthetic sequential epitopes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(6), 1323–1330. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.04.008>
3. Skripak, J. M., Matsui, E. C., Mudd, K., & Wood, R. A. (2007). The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(5), 1172–1177. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.08.023>
4. Inmunoterapia oral para la alergia a la leche. <http://www.cochrane.org/es/CD009542/inmunoterapia-oral-para-la-alergia-la-leche/11/05/2018>
5. Tomicic, S., Norrman, G., Falth-Magnusson, K., Jenmalm, M. C., Devenney, I., & Bottcher, M. F. (2009). High levels of IgG4 antibodies to foods during infancy are associated with tolerance to corresponding foods later in life. *Pediatric Allergy and Immunology*, 20(1), 35–41. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2008.00738.x>

6. Savilahti, E. M., Rantanen, V., Lin, J. S., Karinen, S., Saarinen, K. M., Goldis, M., Sampson, H. A. (2010). Early recovery from cow's milk allergy is associated with decreasing IgE and increasing IgG4 binding to cow's milk epitopes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(6). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.03.025>
7. Martínez-Botas, J., Rodríguez-Álvarez, M., Cerecedo, I., Vlaicu, C., Diéguez, M. C., Gómez-Coronado, D., de la Hoz, B. (2015). Identification of novel peptide biomarkers to predict safety and efficacy of cow's milk oral immunotherapy by peptide microarray. *Clinical and Experimental Allergy*, 45(6), 1071–1084. <https://doi.org/10.1111/cea.12528>