



Biomédica

ISSN: 0120-4157

biomedica@ins.gov.co

Instituto Nacional de Salud

Colombia

Cantillo, José Fernando; Puerta, Leonardo

Nuevos esquemas de inmunoterapia específicas con alérgenos

Biomédica, vol. 30, núm. 3, septiembre, 2010, pp. 440-453

Instituto Nacional de Salud

Bogotá, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84316250017>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Nuevos esquemas de inmunoterapia específicas con alérgenos

José Fernando Cantillo, Leonardo Puerta

Instituto de Investigaciones Inmunológicas, Universidad de Cartagena,
Cartagena de Indias, Colombia

Las enfermedades alérgicas, como el asma y la rinitis, son un problema de salud de importancia en todos los países y con una tendencia global al aumento en su prevalencia.

La inmunoterapia específica con extractos alergénicos naturales es el único tratamiento con antígenos dirigido a brindar una protección duradera y que beneficia a la mayoría de la población tratada. Sin embargo, este tratamiento presenta inconvenientes porque los extractos son preparaciones de difícil estandarización y gran complejidad en sus componentes, lo que aumenta los riesgos de que se presenten reacciones adversas y nuevas sensibilizaciones a otros antígenos presentes en el extracto. Por lo tanto, se ha planteado la necesidad de desarrollar nuevos esquemas de inmunoterapia específica con el alérgeno en los que se utilicen moléculas bien caracterizadas de fácil estandarización y manejo, con las que se puedan brindar tratamientos más seguros y eficaces.

Con estos nuevos esquemas se han diseñado vacunas basadas en alérgenos recombinantes y variantes o péptidos derivados de éstos, para ser administrados solos o con adyuvantes en preparaciones que favorecen la captación y presentación antigenica por las células dendríticas o tienen como blanco las células efectoras, como mastocitos y basófilos. Los estudios *in vitro*, en modelos animales y algunos en fase clínica en humanos, indican que estas preparaciones pueden brindar protección frente a la exposición alergénica o mejorar la sintomatología, al inducir la producción de anticuerpos bloqueadores de la actividad de la IgE, de células T reguladoras y de citocinas del perfil Th1.

Palabras claves: alergia e inmunología, inmunoterapia, alérgenos, desensibilización, inmunoglobulina E, factores inmunológicos.

New approaches for allergen-specific immunotherapy

Rates of allergic diseases such as asthma and rhinitis are on the rise as important health problems in every country of the world. Allergen specific immunotherapy with natural allergenic extracts is a treatment directed to changing the natural course of these diseases, and is a treatment that has reported beneficial effects in a majority of allergic patients. However, this treatment is difficult because of the complex composition of the extracts. The composition is difficult to standardize and, consequently, the risk of anaphylactic shock is increased; furthermore, sensitization can occur to other antigens present in the extract. Therefore, new allergen specific immunotherapy approaches are needed. Chemically defined and standardized antigens are more easily managed and provide a safer and more efficient treatment. Vaccines for immunotherapy have already been designed, based on recombinant allergens, variants (or peptides derived from them), that can be administered alone or in combination with adjuvants. Some of these preparations are indicated for facilitating the uptake and antigenic presentation by dendritic cells, or by targeting the mast cells and basophiles. Studies *in vitro*, in animal models and clinical trials in allergic patients, indicate that these preparations may provide protection against the allergen exposure and improve the symptoms by inducing the production of blocking antibodies of the IgE mediated response, production of regulator T cells and cytokines of Th1 profile.

Key words: Allergy and immunology, immunotherapy, allergens; desensitization; immunoglobulin E, immunologic factors.

Correspondencia:

Leonardo Puerta, Universidad de Cartagena, Instituto de Investigaciones Inmunológicas, Campus de Zaragocilla, Edificio Biblioteca, piso 1, Cartagena de Indias, Colombia
Telefax: 656 3456
lpuertall@yahoo.com

Recibido: 11/11/09; aceptado:07/04/10

Respuesta alérgica

Cuando un individuo atópico se expone por primera vez a un alérgeno, las células presentadoras de antígeno lo captan, procesan y lo presentan a los linfocitos T CD4⁺ vírgenes (Th0), los cuales se diferencian principalmente hacia el perfil Th2.

Estas células secretan las citocinas IL-4 e IL-13 que inducen el cambio de anticuerpos hacia el isotipo IgE, que se unen a los receptores de alta afinidad (FC ϵ RI) sobre los mastocitos y basófilos, sensibilizándoles. En posterior exposición el alérgeno o sus productos, se unen a la IgE sobre la membrana de estas células y se produce el entrecruzamiento de los FC ϵ RI, lo que provoca su degranulación y la liberación de histamina, prostaglandinas, leucotrienos, quimiocinas y otras citocinas que participan conjuntamente para generar la reacción alérgica de fase inmediata.

Además de las células Th2, en respuesta al alérgeno el individuo atópico genera linfocitos T CD4 $^{+}$ de los subtipos Th1, T reguladores (Treg) y Th17. Los Treg juegan un papel importante como supresores de la respuesta alérgica al inducir tolerancia periférica. Por otra parte, parece que las células Th17 pueden aumentar la respuesta inflamatoria al alérgeno (1).

La IgE también se une al Fc ϵ RI, expresado sobre las células dendríticas y monocitos, y al receptor de baja afinidad Fc ϵ RII (CD23) sobre la superficie de los linfocitos B, lo que permite captar el alérgeno y presentar sus péptidos antigenicos a las células Th2, que pueden mediar la reacción alérgica de fase tardía, caracterizada por la infiltración de linfocitos Th2 y eosinófilos, formación de edema, eritema y otros síntomas. En el pulmón, esta reacción se manifiesta por estrechamiento de las vías aéreas e hipersecreción de moco (2).

Inmunoterapia con extractos alergénicos completos

La inmunoterapia específica con el alérgeno consiste en la administración gradual, generalmente por vía subcutánea, de cantidades cada vez mayores de extracto alergénico a pacientes alérgicos, con el fin de evitar los síntomas asociados con la exposición al alérgeno (3).

En 1911, Noon y Freeman empezaron a usar la inmunoterapia para tratar la rinitis alérgica (4,5) y, desde entonces, se ha utilizado en el tratamiento de las alergias con reconocida eficacia (6). Sin embargo, a pesar del beneficio observado en la mayoría de los pacientes que reciben inmunoterapia, los mecanismos que explican su eficacia se conocen parcialmente; durante el curso de la inmunoterapia se producen eventos inmunológicos que conducen principalmente a la generación de tolerancia a la exposición del alérgeno, al cambio del perfil de la respuesta Th2

hacia el perfil Th1, a la generación de anticuerpos bloqueadores en su mayoría del subtipo IgG $_{4}$ y a la generación de células T reguladoras principalmente del subtipo Tr1 (7,8).

Durante la inmunoterapia aparecen varios subtipos de células T reguladoras con diferentes funciones, las que suprimen la respuesta Th2 y los mecanismos efectores de otras células que participan en la inflamación, como los eosinófilos, basófilos, células presentadoras de antígeno y mastocitos, entre otras (7). Una inmunoterapia exitosa se caracteriza por la disminución de la relación IgE/IgG $_{4}$. El papel de la IgG $_{4}$ se evidencia sólo luego de varios meses de inmunoterapia y es importante porque compite con la IgE por el antígeno y evita el entrecruzamiento del alérgeno con la IgE unida a los mastocitos, lo que evita la degranulación (9). La polarización de la respuesta Th2 hacia el perfil Th1 se manifiesta en una disminución de la producción de IL-4, IL-5 y IL-13, junto a un aumento del interferón gamma (IFN- γ) (10).

La inmunoterapia con extractos alergénicos también presenta inconvenientes y riesgo de anafilaxia. La complejidad de la composición y la dificultad para la estandarización de los extractos alergénicos, son los mayores inconvenientes para su uso; en muchos casos, los alérgenos de interés pueden estar en concentraciones bajas o presentar gran variabilidad en su potencia. Los extractos contienen componentes indefinidos que pueden provocar síntomas alérgicos o nuevas sensibilizaciones y su compleja composición no permite administrar un tratamiento personalizado de acuerdo con el perfil de sensibilización de cada paciente. Se han reportado varios efectos adversos relacionados con la inmunoterapia, los cuales van desde reacciones locales hasta anafilaxia que compromete la vida de los pacientes (11,12). En el cuadro 1 se enumeran algunos de los problemas asociados con el uso de extractos alergénicos naturales (13).

Diagnóstico y tratamiento basado en componentes

Desde 1999, se sugirió que un diagnóstico más apropiado de las alergias sería el que identificara las moléculas comprometidas en la respuesta alérgica y que se podría hacer mediante el uso de alérgenos purificados, nativos o recombinantes, lo que se llamó diagnóstico basado en los componentes (*component-resolved diagnostics*). De esta forma, se permitiría identificar los alérgenos contra los cuales cada paciente presenta una respuesta IgE y definir su perfil de sensibilización (14).

Cuadro 1. Ventajas de los alérgenos recombinantes sobre los extractos alergénicos tradicionales.

Desventajas de los extractos alergénicos completos

- ✓ Contienen numerosos componentes indefinidos, de los cuales algunos pueden promover la respuesta alérgica.
- ✓ Carecen o contienen baja concentración de alérgenos importantes.
- ✓ No pueden adecuarse al perfil de sensibilización de cada paciente.
- ✓ Pueden inducir nuevas sensibilizaciones.
- ✓ Hacen difícil ajustarse a los estándares internacionales de calidad.
- ✓ Dificultan la comparación entre productos de diferentes compañías.
- ✓ No facilitan la vigilancia y la investigación sobre sus mecanismos de acción.

Ventajas de los alérgenos recombinantes

- ✓ Son moléculas con características fisicoquímicas y propiedades inmunológicas bien definidas que pueden modificarse para mejorar la eficacia.
- ✓ Su composición puede controlarse y ajustarse a los estándares de calidad internacionales.
- ✓ Son útiles para el diseño de vacunas adecuadas al perfil de sensibilización de cada paciente.
- ✓ Permiten la comparación entre diferentes fabricantes, ya que se pueden obtener con características consistentes, de alta pureza y reproducibles.
- ✓ Permiten la vigilancia y la investigación de sus mecanismos de acción.

Este tipo de diagnóstico permitiría establecer una inmunoterapia basada en componentes (*component-resolved immunotherapy*), en la cual se administrarían a cada paciente sólo los alérgenos contra los que se encuentra sensibilizado, evitando así el desarrollo de nuevas sensibilizaciones. La gran complejidad y difícil estandarización de los extractos alergénicos no permiten el diagnóstico y el tratamiento basado en los componentes, lo que se ha tratado de superar mediante el uso de moléculas de fácil estandarización, como los alérgenos recombinantes (15).

En nuestra región hemos dado un paso importante en esta vía al disponer de varios alérgenos recombinantes purificados (16,17) y estudiar la prevalencia de sensibilización frente a ellos en sectores de la población alérgica de Colombia (18) y de Cuba (19). Dado que la mayoría de los pacientes alérgicos a los ácaros domésticos muestran respuesta IgE sólo a unos cuantos alérgenos (20,21) y algunos son de reacción cruzada, se ha sugerido que unos pocos alérgenos recombinantes pueden remplazar con éxito a los extractos alergénicos naturales para inmunoterapia. En efecto, nuestros estudios sugieren que tres alérgenos recombinantes pueden identificar a 93% de la población alérgica a los ácaros del género *Dermatophagoides*, lo cual posibilitaría una inmunoterapia eficaz basada en estos pocos alérgenos (18).

Con el fin de superar los inconvenientes mencionados y mejorar la eficacia de la inmunoterapia, se han propuesto nuevos esquemas de inmunoterapia, la mayoría basada en el uso de alérgenos recombinantes o variantes de ellos. En este trabajo

se revisan los progresos recientes en la investigación con estos esquemas de inmunoterapia.

Nuevos esquemas de inmunoterapia específicas con el alérgeno

Inmunoterapia con alérgenos recombinantes

En un estudio reciente en humanos en que se administró el alérgeno recombinante del polen del abedul *Bet v 1* (rBet v 1), se reportó desensibilización en los alérgicos al polen en un grado similar al obtenido por el tratamiento con el extracto alergénico.

Los pacientes mostraron disminución de la rinoconjuntivitis y reacción cutánea, lo que se asoció a un aumento en los niveles de anticuerpos IgG que, posiblemente, actuaron bloqueando la acción de la IgE (22). En los pacientes tratados no se presentaron efectos secundarios asociados a la inmunoterapia, pero sí se presentaron en algunos tratados con el extracto, lo que sugiere que los alérgenos recombinantes pueden utilizarse de manera segura y eficaz en remplazo de los extractos naturales.

La utilidad de los alérgenos recombinantes mezclados también se ha evaluado en humanos; en un estudio doble ciego y controlado con cinco alérgenos recombinantes de la grama timotea (*Phleum pratense*), el tratamiento por 18 meses produjo disminución de la sintomatología y de la necesidad de medicación, y aumento en los niveles de IgG₁ e IgG₄, lo que se asoció con una disminución de la reacción al alérgeno, evaluada por ensayos de provocación conjuntival (8). Con los recombinantes no modificados también existe el riesgo de que

durante la inmunoterapia se presenten reacciones adversas mediadas por los epítopos IgE. Por esta razón, muchos investigadores han enfocado sus esfuerzos en el diseño y la obtención de proteínas hipoalergénicas.

Inmunoterapia con hipoalérgenos

En las personas bajo inmunoterapia es importante la estimulación de los linfocitos T para que se genere una respuesta protectora. Por esta razón, se ha evaluado la posible utilización de hipoalérgenos que contengan los epítopenos T, pero que no reaccionen con la IgE, para evitar la degranulación de mastocitos y basófilos (13).

Se conocen dos vías para generar hipoalérgenos. La primera consiste en generar proteínas con estructura terciaria parecida a la natural, pero que no reaccionen con la IgE, las cuales se pueden obtener por mutagénesis dirigida o clonando isoformas hipoalergénicas existentes en la naturaleza. La segunda consiste en la modificación del plegamiento propio de la estructura del alérgeno, lo que destruye los epítopenos B de tipo de la conformación y se pueden obtener mediante la construcción de proteínas híbridas, alérgenos con estructura primaria invertida y polímeros de alérgenos, entre otras.

Algunos alérgenos se presentan en la naturaleza como una mezcla de varias isoformas con una gran homología estructural pero con reacción IgE diferente, lo cual tiene repercusiones en el diagnóstico y el tratamiento de las alergias (23). Por ejemplo, en la población alérgica colombiana, la isoforma 0102 del alérgeno Blo t 12, presenta menor frecuencia de reacción IgE que la isoforma 0101 (24). Este hecho se ha explorado para utilizar en inmunoterapia aquellas isoformas con poca o ninguna alergenicidad, obtenidas mediante clonación molecular. Las isoformas Bet v 1.0401 y Bet v 1.1001 presentan menor reacción IgE que la isoforma Bet v 1.0101; en alérgicos al abedul, la respuesta contra la isoforma Bet v 1.10401 es, principalmente, de anticuerpos IgG₄ y se produce poca liberación de mediadores proinflamatorios de los basófilos (25). Este estudio sugiere que las isoformas con las características de Bet v 1.0401 pueden ser útiles en inmunoterapia.

Proteínas híbridas

Las proteínas híbridas diseñadas para posible inmunoterapia están compuestas por dos o más alérgenos o porciones de éstos y deben tener poca o ninguna reacción con la IgE. Al fusionar diferentes

cadenas peptídicas en una sola molécula, se generan nuevas interacciones y nuevos puentes disulfuro, lo que altera la estructura y los epítopenos B característicos de los alérgenos nativos. De esta manera, se pierde la capacidad de reaccionar con la IgE y de inducir la degranulación de mastocitos y basófilos. Si estas proteínas conservan los epítopenos T, pueden inducir un efecto inmunomodulador.

King (26) fue pionero en sugerir la utilidad de moléculas híbridas en la inmunoterapia de las alergias, al construir una molécula compuesta por dos alérgenos de insectos y demostrar en estudios *in vitro* y en modelos de ratones sus propiedades antialérgicas. Más recientemente, varios estudios han sugerido la utilidad potencial de las proteínas híbridas para la inmunoterapia de las alergias. Gonzales-Rioja *et al.* (27) construyeron una molécula híbrida compuesta por dos alérgenos del polen de *Parietaria judaica* (Par j 1 y Par j 2) y demostraron, mediante pruebas cutáneas en alérgicos, una disminución importante en la reacción de IgE.

Por otra parte, Linhart *et al.* (28) construyeron, por recombinación basada en PCR, una secuencia de nucleótidos codificadora para una proteína compuesta por los alérgenos principales del polen de la grama timotea, Phl p 6, Phl p 2, Phl p 5 y Phl p 1. La proteína híbrida indujo una proliferación de linfocitos T similar a la inducida por una mezcla equimolar de los alérgenos individuales. La proteína mostró capacidad de inducir la secreción de citocinas reguladoras y del perfil Th1, como la IL-10 e IFN-γ en modelos de ratones alérgicos a pólenes, indujo la producción de anticuerpos IgG, que bloquearon *in vitro* la degranulación de mastocitos incubados con el alérgeno.

Resultados similares se obtuvieron con una molécula híbrida constituida por dos alérgenos principales de la abeja Api m 1 y Api m 2 administrada en modelos animales: capacidad de estimular la proliferación de linfocitos y disminución de la reacción IgE (29). No se conocen estudios en humanos en los que se hayan evaluado la eficacia y la seguridad de esta clase de vacunas.

Proteína mosaico derivada de alérgenos

Las proteínas mosaicos son variantes de las proteínas híbridas obtenidas mediante ingeniería genética, y constituidas por diferentes segmentos de un mismo alérgeno en orden distinto al que presentan en la molécula nativa, lo cual genera nuevas interacciones intramoleculares que alteran

el plegamiento y los epítopos IgE, convirtiéndola en un hipoalérgeno.

Una proteína mosaico derivada del alérgeno Phl p 1 (P1m), conformada por cuatro segmentos de este alérgeno, mostró menor capacidad de unir IgE que el alérgeno original y no indujo la liberación de histamina de basófilos obtenidos de alérgicos a la grama; sin embargo, mantuvo la capacidad de inducir la proliferación de células mononucleares de sangre periférica en niveles comparables a los obtenidos con Phl p 1 recombinante. A pesar de la alteración del plegamiento propio de la estructura nativa, la inmunización de conejos con P1m indujo la producción de anticuerpos IgG, los cuales demostraron en estudios *in vitro* capacidad de bloquear la unión de Phl p 1 con la IgE e inhibir la liberación de histamina de basófilos de pacientes alérgicos a Phl p 1 (30).

En otro estudio, una proteína mosaico constituida por los segmentos amino-terminal y carboxi-terminal del alérgeno de ácaro Der p 1 en orden invertido, mediante ensayos *in vitro* y de reacción cutánea, mostró poca capacidad alérgica, lo cual se asoció a un plegamiento alterado y pérdida de los epítopos IgE. La inmunización de ratones y conejos con esta molécula produjo IgG que bloqueó la unión del alérgeno recombinante con la IgE de pacientes alérgicos (31).

Variantes hipoalergénicas obtenidas mediante mutagénesis dirigida

La disponibilidad de múltiples clonas de alérgenos recombinantes ha facilitado la aplicación de la mutagénesis dirigida con el propósito de investigar la utilidad de variantes modificadas para inmunoterapia.

Una mutante del alérgeno de la grama timotea (*Phleum pratense*), Phl p 7, obtenida mediante sustitución de aminoácidos presentes en sus dos motivos EF-hand que alteró su plegamiento normal, mostró una disminución de 73% en la capacidad de unión a la IgE de pacientes alérgicos a esta grama y 10 veces menor capacidad para inducir la liberación de histamina comparada con el alérgeno recombinante no modificado. También, indujo la producción de anticuerpos IgG que reconocen al alérgeno nativo (32). Este estudio, al igual que uno realizado recientemente con alérgenos mutados del látex (33), muestra que, alterando la estructura terciaria mediante mutagénesis dirigida, se pueden obtener moléculas con capacidad inmunogénica apropiada para inmunoterapia.

Por otra parte, existen estudios que sugieren que los hipoalérgenos obtenidos mediante sustitución de aminoácidos importantes para la unión con la IgE, pero sin modificación de la estructura terciaria característica de los alérgenos nativos, pueden inducir la producción de anticuerpos IgG bloqueadores.

Spangforth *et al.* obtuvieron seis mutantes del alérgeno del polen de abedul Bet v 1, modificando aminoácidos expuestos en una área de unión a IgE (34); la mutante Gln45-Ser, Pro108-Gly mostró disminución significativa en la unión con IgE de pacientes alérgicos. Mediante cristalografía de rayos X, se demostró que su estructura es semejante a la del alérgeno natural, lo cual indica que la disminución de la reacción no fue causada por un plegamiento inadecuado.

Mediante mutación en áreas sobre la superficies de Bet v 1, Holm *et al.* (35) crearon dos mutantes hipoalergénicas, las cuales en ensayos *in vitro* mostraron menor reacción con la IgE de pacientes alérgicos y menor capacidad de inducir liberación de histamina, en comparación con el alérgeno recombinante no modificado; la inmunización de conejos indujo anticuerpos IgG con capacidad de inhibir la unión de la IgE con Bet v 1 nativo.

El grupo de Chew, de la Universidad Nacional de Singapur, mediante sustitución de tres aminoácidos cargados y sobre la superficie de la molécula, logró un hipoalérgeno derivado de Der f 13, un alérgeno del ácaro *Dermatophagoides farinae* (36); la proteína mutada fue capaz de inducir la linfoproliferación de células mononucleares de sangre periférica en pacientes alérgicos con índices similares al obtenido con el alérgeno no mutado y con secreción de citocinas desviada hacia el perfil Th1. Además, el antisuero de ratones inmunizados con esta especie molecular, inhibió la unión de la IgE del suero de alérgicos al alérgeno Der f 13, lo que indica la potencialidad de la mutante de inducir anticuerpos bloqueadores.

Este enfoque de modificar residuos cargados y sobre la superficie, se ha aplicado en la obtención de hipoalérgenos del látex y de la manzana (33,37), con resultados promisorios. Nosotros hemos logrado, mediante sustitución de residuos de lisina mutantes de Blo t 13, alérgeno de *Bloomia tropicalis* homólogo a Der f 13, una de las cuales ha mostrado propiedades hipoalergénicas en ensayos de liberación de histamina y en pruebas cutáneas en alérgicos; también, la reacción con la IgE sérica de alérgicos fue significativamente menor que la

obtenida con el alérgeno recombinante no mutado (L. Puerta, manuscrito en preparación).

Inmunoterapia con péptidos

Los péptidos diseñados para la inmunoterapia de las alergias están constituidos por secuencias cortas de aminoácidos de alérgenos que contienen epítropos B o T, que por su pequeño tamaño tienen poca capacidad de unirse a la IgE. En pacientes alérgicos al gato, el tratamiento con una mezcla de péptidos derivados de Fel d 1, de 16 a 17 aminoácidos de longitud, produjo disminución de la reacción bronquial, de la reacción frente al reto con epitelio de gato, de la proliferación de células mononucleares de sangre periférica y de la producción de citocinas del perfil Th2, IL-4 e IL-13 (38).

En un estudio doble ciego con placebo en un grupo de pacientes alérgicos al gato, la aplicación de esta mezcla de péptidos produjo disminución de la reacción alérgica inducida por el alérgeno completo, y disminución de la linfoproliferación y de la producción de IL-4, IL-13 e IFN- γ (39). En pruebas cutáneas, ELISA y de liberación de histamina, diferentes péptidos de epítropos T del alérgeno de polen Phl p 7 mostraron menor capacidad alérgica que el alérgeno. La inmunización de conejos con estos péptidos produjo anticuerpos IgG que mostraron, en ensayos *in vitro*, capacidad de inhibir la degranulación de basófilos de pacientes alérgicos a Phl p 7 (32). En un modelo animal de alergia por ácaros (40), se demostró que la administración nasal de péptidos de Der f 2 que contenían epítropos T unidos a una secuencia fúngica inmunoestimuladora (FPI-fve) alivió los síntomas de hipersensibilidad inmediata. En ensayos *in vitro* se demostró que estas preparaciones indujeron proliferación de células Treg secretoras de IL-10 y TGF- β con capacidad de bloquear la proliferación de células mononucleares de sangre periférica, lo cual sugiere que de administrarse a pacientes alérgicos aumentarían las Treg capaces de contrarrestar el efecto de células proinflamatorias y mejorarían la sintomatología alérgica.

Una desventaja para la utilización de péptidos en inmunoterapia es su poca capacidad inmunogénica. Una manera de mejorárla consiste en unir los péptidos a la superficie de partículas parecidas a virus (*virus-like particles*, VLP), que son estructuras bastante inmunogénicas capaces de estimular la respuesta inmunitaria humoral y celular, por lo que ofrecen una buena plataforma para favorecer la respuesta inmunitaria frente a diferentes antígenos. El arreglo repetitivo de los péptidos en

la superficie de estas partículas es semejante al que se observa en envolturas virales con gran capacidad inmunogénica (41). La aplicación intramuscular o subcutánea en pacientes alérgicos de partículas parecidas a virus que contienen epítropos T derivados de Der p 1, indujo rápida producción de anticuerpos IgG₁ e IgG₃, mientras que no indujo la producción de IgE; este efecto protector no se observó cuando se aplicaron los péptidos solos (42).

Leb *et al.* (43) construyeron una plataforma de presentación antigenica compuesta por partículas parecidas a virus conjugadas con una molécula HLA DR1 y un péptido que representaba un epítopo T del alérgeno Art v 1, la cual en el contexto de la molécula coestimuladora CD58 indujo expansión de linfocitos T secretores de IL 10/INF- γ con un perfil semejante a los linfocitos reguladores; en cambio, en el contexto de las moléculas CD80 y CD 86, indujo expansión de células secretoras de IL 13 e INF- γ , lo cual sugiere que con este tipo de preparación se puede modular la respuesta inmunitaria de una manera predecible, lo que abre una nueva posibilidad para su uso clínico.

Recientemente, se ha demostrado que una sola dosis de partículas parecidas a virus conjugadas con Fel d 1 era capaz de brindar protección en un modelo animal de alergia al gato, en el cual indujo la producción de anticuerpos bloqueadores tipo IgG y fue bien tolerado. En los ensayos *in vitro* se halló que impidió la degranulación de mastocitos y basófilos de alérgicos al gato (44). Estos resultados sugieren que esta preparación puede ser segura y efectiva para el tratamiento de la alergia al gato.

Varios estudios clínicos indican que los péptidos pueden ser útiles para inducir tolerancia al alérgeno completo (38,39,45-51) (cuadro 2). La aplicación de péptidos de Fel d 1 por vía intradérmica a alérgicos disminuyó la reacción cutánea luego del reto con el alérgeno completo y aumentó la población de células T CD4⁺ secretoras de IFN- γ , lo cual sugiere una desviación de la respuesta Th2 hacia el perfil Th1 (48). La inmunoterapia con péptidos de Fel d 1 también puede disminuir la secreción de IL-13 por las células mononucleares de sangre periférica (49) e inducir la proliferación de células T reguladoras (50).

La administración de péptidos de Fel d 1 en modelos animales produjo disminución de la inflamación alérgica por mecanismos dependientes de IL-10 y reducción de la eosinofilia, la producción de moco y mejoría en la función pulmonar (52). En pacientes alérgicos al veneno de abejas, la aplicación de péptidos del alérgeno Api m 1 no produjo efectos

Cuadro 2. Relación de diferentes estudios de inmunoterapia con péptidos en humanos.

Origen	Número de péptidos y longitud (a.a.)	Vía de administración	Número de individuos	Resultados	Referencia
Fel d 1	2 x 27	Subcutánea	95	Disminución de síntomas luego del reto antigenólico	(47)
Fel d 1	12 x 16/17	Intradérmica	24	Reducción de reacción cutánea de fase tardía	(38)
Fel d 1	12 x 16/17	Intradérmica	24	Reducción de reacción cutánea inmediata y tardía	(39)
Fel d 1	11 x 16/17	Intradérmica	8	Reducción de hiperreacción de la vía aérea y reacción tardía	(48)
Fel d 1	12 x 16/17	Intradérmica	16	Supresión de linfocitos Th2	(49)
Fel d 1	12 x 16/17	Intradérmica	2 y 12	Proliferación de linfocitos T reguladores en alérgicos	(50)
Fel d 1	12 x 16/17	Intradérmica	16	Mejoría en la sintomatología nasal y reacción tardía	(46)
Api m 1	4 x 18	Intradérmica	12	Reducción de reacción cutánea inmediata y tardía, reducción de citocinas Th1/Th2, aumento de IL-10, aumento de IgG ₄ .	(51)
Api m 1	3 x 45, 53, 60	Subcutánea	16	Aumento de IgG4, IFN-γ e IL-10 en PBMC	(45)
Der p 1 + VPL	Varios péptidos de Der p 1	Intramuscular Subcutánea	24	Aumento de la inmunogenicidad del preparado evidenciado en mayores títulos de anticuerpos	(42)

adversos y redujo la proliferación de los linfocitos T luego del reto con el alérgeno; además, se observó disminución en la secreción de IL-13 e IFN-γ, mientras que se aumentó la IL-10. En los pacientes también se observó una disminución significativa de la reacción cutánea y aumento en los niveles de IgG e IgG₄ (51).

En un estudio reciente se usó un mimótopo derivado de Phl p 5 en el contexto de vacunas de ADN. El gen que codifica para el mimótopo fusionado a una molécula del fagopplIII, importante para el plegamiento del péptido expresado, se insertó en un vector de expresión (53). La administración intradérmica de esta preparación en ratones con el objetivo de que el mimótopo fuera captado y expresado por las células presentadoras de antígeno, produjo una respuesta IgG específica que inhibió la reacción del alérgeno completo con la IgE.

Moléculas de fusión que facilitan la presentación antigénica

Se ha sugerido que una forma de aumentar la eficacia y la seguridad de la inmunoterapia consiste en aumentar la eficiencia de la presentación del alérgeno, lo cual resultaría en mayor dosis de alérgeno efectiva disponible para la estimulación de la respuesta inmunitaria protectora, suprimiendo la producción de citocinas y anticuerpos de la respuesta alérgica (54).

Con esta consideración, se ha desarrollado la tecnología de translocación de antígeno modular, que consiste en la construcción de alérgenos fusionados a un dominio N-terminal de la cadena invariable para dirigir la proteína a los compartimientos endosómico-lisosómico y un

péptido que facilita su translocación al citoplasma. Los alérgenos principales Asp f 1, Der p 1, Bet v 1, PLA₂ y Fel d 1 en versión de translocación de antígeno modular, produjeron una proliferación fuerte de células mononucleares de sangre periférica estimulados *ex vivo* con concentraciones bajas de alérgeno. Además, indujeron secreción de IL-10 y citocinas del tipo Th1, paralelo a una disminución en la secreción de citocinas del perfil Th2 (55). Al evaluar la influencia de las modificaciones sobre la respuesta inmunitaria *in vivo*, usando Fel d 1 como alérgeno modelo y administrado directamente sobre los ganglios linfáticos inguinales de ratón, se demostró que los ratones inmunizados con MAT-Fel d 1 presentaron niveles más altos de IFN-γ y más bajos de IL-4, en comparación con los ratones inmunizados con el alérgeno sin modificar. La administración de MAT-Fel d 1 indujo niveles más altos de IgG_{2a} y confirió mejor protección al reto con dosis altas de extracto alergénico de gato. Este estudio también reveló que el alérgeno modificado redujo en 100 veces la degranulación de basófilos y la liberación de leucotrienos, sin inducción de anafilaxia, comparado con Fel d 1 sin modificar (56). El aumento en la seguridad se adujo a una menor reacción del alérgeno modificado con IgE y a la rápida captación de la preparación.

Otro diseño molecular con el propósito de facilitar la presentación antigénica se basa en dirigir el alérgeno al receptor CD64 de las células presentadoras de antígeno (57); una proteína de fusión (H22-Fel d 1) consistente en el alérgeno Fel d 1 unido, por un ligando flexible, a un fragmento de la región variable de un anticuerpo monoclonal “humanizado” anti-CD64, mostró, mediante citometría de flujo, unión al CD64 de las células

presentadoras de antígeno y, mediante pruebas serológicas, la misma reacción IgE e IgG que el alérgeno nativo. En ensayos *in vitro* con células de alérgicos al gato se demostró que esta molécula era capaz de inducir la proliferación de linfocitos T y la secreción de las citocinas IL-5, IL-10 e IFN- γ , lo cual sugiere que puede generar una respuesta protectora (58).

Recientemente, se experimentó una forma de aumentar la inmunogenicidad de vacunas de ADN mediante la captación y expresión selectiva del alérgeno en células dendríticas maduras. El diseño consistió en una proteína de fusión conformada por una porción de la fracción cristalizable de la IgE (Fc ϵ) humana más una cadena de polilisina (" ϵ polilisina", EPL). Esta molécula se diseñó para que se uniera a un plásmido mediante interacciones electrostáticas entre la polilisina cargada positivamente y el vector de ADN cargado negativamente, mientras que la porción Fc ϵ dirige el complejo "plásmido-EPL" hacia el receptor de IgE sobre las células presentadoras de antígeno (59).

Los estudios de captación *in vitro* demostraron que la EPL aumentaba la captación de plásmidos mediante la unión específica con el receptor, favoreciendo el procesamiento y la presentación del alérgeno. Sin embargo, el complejo plásmido-EPL presenta el inconveniente de que puede desencadenar la degranulación de mastocitos y basófilos, que también presenta el Fc ϵ RI. Para evitar este efecto, al plásmido se le introdujo el promotor de la proteína agrupadora de actina ("fascin") que sólo se expresa en células dendríticas maduras (60). La aplicación del complejo que contiene el promotor a ratones transgénicos que expresan Fc ϵ RIa humano, no produjo reacción cutánea, de lo que se pudo inferir que no se expresó en mastocitos y basófilos, y tampoco provocó el entrecruzamiento de los Fc ϵ RI sobre estas células.

Adherencia de alérgenos a micropartículas de quitosán

Las sustancias que mejoran la captación y la presentación antigenica se están explorando como adyuvantes en la preparación de vacunas con alérgenos recombinantes. Entre éstos, el quitosán, un polisacárido catiónico biocompatible de origen natural obtenido de la concha de crustáceos y sin propiedades sensibilizadoras o irritantes (61,62), es una alternativa atractiva debido a dos propiedades: por sus características catiónicas puede unirse a superficies negativas como las mucosas, lo que facilita los mecanismos de transporte y

aumenta el tiempo de exposición con las células presentadoras de antígeno, y tiene la capacidad de formar partículas y encapsular antígenos, lo que facilita la captación por las células presentadoras de antígeno.

Estas propiedades contribuyen a un mayor procesamiento y presentación de los péptidos antigenicos a los linfocitos T.

La inmunización de ratones por vía oral, con nanopartículas de quitosán/plásmido que codifican el alérgeno del maní Ara h 2, usando quitosán de alto peso molecular y características catiónicas a pH gástrico, produjo un aumento en la secreción de IgA e IgG₂ y disminución en los niveles de IgE. Luego del reto antigenico se disminuyó la respuesta alérgica y la liberación de mediadores; una mayor endocitosis del quitosán/plásmido producida por las células del tubo digestivo, y la posterior expresión y presentación del alérgeno por las células presentadoras de antígeno, parecieron sustentar este efecto (63).

La administración intraperitoneal en un modelo de ratones alérgicos a *D. farinae*, de micropartículas de quitosán cargadas con un péptido del alérgeno Der f 2 que contenía un epítopo B, disminuyó la hiperreacción bronquial que se induce por el reto con el alérgeno (64); en los animales tratados con quitosán o con alérgeno solo, no se observó esta disminución. En este modelo, la administración de la formulación produjo disminución en el número de eosinófilos en el lavado broncoalveolar, disminución de la inflamación de las vías aéreas, aumento en la producción de IgG₂ y disminución en los niveles de IgE.

Mediante estudios *in vitro* y en modelos de ratones, se mostró que la ovalbúmina contenida en las partículas de quitosán de alto peso molecular y mayor carga positiva, se captaron, procesaron y presentaron a linfocitos T más eficientemente que las de menor tamaño y carga. Estos resultados se asociaron a un aumento en la secreción de IFN- γ e IL-10, lo que sugiere un efecto regulador (65). De otra parte, en el modelo animal de alergia a ovalbúmina, la inmunoterapia con esta preparación produjo disminución de la hiperreacción bronquial, inflamación perivascular, peribronquial y alveolar, y disminución de eosinófilos en el lavado broncopulmonar luego del reto con ovalbúmina.

En conjunto, los estudios sugieren que las partículas de quitosán de alto peso molecular pueden utilizarse para mejorar la eficacia de vacunas

para inmunoterapia específica con el alérgeno que actúen a nivel de las mucosas, mejorando la captación de antígenos administrados como vacunas de ADN, péptidos o alérgenos completos.

Alérgenos unidos a "partículas a base de carbohidratos"

El uso de partículas de carbohidratos fácilmente fagocitadas por las células presentadoras de antígeno como adyuvante en inmunoterapia, se propuso como reemplazo del hidróxido de aluminio, el cual se utiliza frecuentemente con la administración de los extractos alergénicos naturales. La administración del alérgeno recombinante *Phl p 5b* unido covalentemente a partículas de sefarosa de 2 μm en ratones, indujo la producción de anticuerpos IgG₂ bloqueadores y una fuerte respuesta Th1. Aunque esta preparación también indujo la secreción de citocinas del perfil Th2, no provocó la formación de lesiones en la piel de los animales, como sí lo hizo el alérgeno solo o mezclado con hidróxido de aluminio (66).

Mediante estudios *in vitro* se ha demostrado que el alérgeno recombinante Fel d 1 unido a partículas a base de carbohidratos, se capta bien por las células dendríticas (67) y, en un modelo de ratones alérgicos a Fel d 1, esta preparación redujo la hiperreacción bronquial y el número de eosinófilos en el lavado broncoalveolar luego del reto antigénico, y también, indujo la producción de anticuerpos bloqueadores (68). Estos resultados indicaron que los alérgenos unidos a partículas a base de carbohidratos inducen el desvío de la respuesta Th2 hacia un perfil protector, con menor riesgo de provocar reacciones adversas.

Moléculas de fusión que se unen a Fc_YRIIb/Fc_εRI

Uno de los eventos clave de la respuesta alérgica es la degranulación de los basófilos y mastocitos. Para que esto ocurra, el alérgeno debe reaccionar con la IgE unida a los Fc_εRI sobre esas células y provocar el entrecruzamiento de estos receptores, desencadenando fosforilaciones de los motivos ITAM y proteínas adaptadoras como ERK y Syk, que hacen parte de la cascada de señalización conducente a la hipersensibilidad inmediata. Por otra parte, cuando el receptor Fc_εRI se entrecruza con el receptor Fc_YRIIb, se activan los motivos ITIM que defosforilan los motivos ITAM y se inhibe la cascada, lo cual evita la degranulación (69).

Se ha diseñado una proteína químérica llamada GFD, compuesta por una porción de la región

constante de la cadena pesada de la IgG y el alérgeno Fel d 1 unidos por un *linker* flexible, para acoplar los receptores Fc_YRIIb y Fc_εRI unido a IgE específica del alérgeno lo cual permite la formación del complejo Fc_YR-GFD-IgE-Fc_εRI, que lleve a inducir la activación de los motivos ITIM para impedir la degranulación de mastocitos y basófilos (70,71). En ratones transgénicos que expresaban Fc_YRIIb y Fc_εRI humanas, sensibilizados con altas dosis de IgE específica para Fel d 1 y tratados con varias dosis de GFD, el reto con Fel d 1 no produjo la degranulación de los mastocitos. El esquema de inmunoterapia a dosis altas de GFD y tiempo corto, mostró capacidad de inhibir la respuesta alérgica contra Fel d 1, la inflamación de los pulmones y la reacción cutánea en los animales sensibilizados. También, se indujo la producción del anticuerpo IgG1 bloqueador específico a Fel d 1, pero no de anticuerpos IgE ni de IgG_{2a}. Las pruebas *in vitro* con basófilos de pacientes alérgicos al gato incubados con la proteína GFD, inhibió más de 90% de la liberación de histamina. La inhibición también se observó en mastocitos derivados de cordón umbilical de ratones sensibilizados al gato (69).

De manera similar, el estudio de Terada *et al.* (71) mostró que la preparación GFD, administrada a ratones sensibilizados con Fel d 1 en un esquema de inmunoterapia rápida (*rush immunotherapy*), bloqueó la reacción alérgica sistémica aguda, la degranulación de los mastocitos, la hiperreacción bronquial y la inflamación pulmonar.

Alérgenos conjugados a motivos CpG

Los estudios *in vitro* y en modelos animales han demostrado que los motivos CpG son capaces de inducir una respuesta inmunitaria de perfil Th1 caracterizada por la secreción de IL-6, IL-12 e IFN-γ y anticuerpos IgG₂ (72), lo cual se ha aprovechado para el diseño de vacunas basadas en alérgenos mezclados o conjugados a secuencias inmunoestimuladoras que contienen estos motivos (73-79).

Se conocen tres tipos de oligodesoxirribonucleótidos (ODN) que contienen motivos CpG (CpG-ODN), capaces de estimular células que expresan el TLR9. Los ODN de tipo K (CpG-B) contienen varios motivos CpG en un esqueleto de fosforotioato, promueven la activación y diferenciación de células presentadoras de antígeno, la activación y proliferación de linfocitos B, y son bastante inmunogénicos (80); los ODN de tipo D (CpG-A) contienen en su esqueleto una mezcla de enlaces

fosfodiéster/fosforotioato, tienen una cola poli-G en el extremo 3' e inducen la secreción de interferón a partir de células dendríticas que, a su vez, promueve la activación de las células presentadoras de antígeno (81); los ODN de tipo C combinan las propiedades inmunogénicas de los tipos A y B presentando un esqueleto de fosforotioato, y pueden estimular la secreción de IL-6 por los linfocitos B y la producción de IFN por células dendríticas (81,82).

Debido a la gran capacidad que tiene los ODN de tipo A de estimular las células presentadoras de antígeno e inducir la secreción de interferones, pueden tener ventajas sobre los otros tipos de ODN para su aplicación en inmunoterapia específica para el alérgeno. Sin embargo, como presentan enlaces fosfodiéster en su esqueleto, son fácilmente descompuestos por el ataque enzimático y el tiempo de vida media es reducido, por lo que se necesitarían altas dosis para lograr los efectos deseados (83). Por esta razón, los ODN-CpG más evaluados en ensayos clínicos son los de tipo B y C (84-87). Una forma de obtener preparados basados en ODN de tipo A de mayor estabilidad y potencia, consiste en empacarlos dentro de VLP que, además de estabilizar la cadena, impidirían su degradación enzimática. Las partículas de este tipo pueden aumentar el transporte de moléculas a los ganglios linfáticos, aumentar la fagocitosis y favorecer la liberación de los ODN-CpG directamente a los TLR9 que se encuentran en los endolisosomas (88,89).

Los motivos CpG mezclados con alérgenos recombinantes o nativos pueden crear un ambiente Th1 que previene o modifica la respuesta Th2, lo cual brinda protección frente a posteriores exposiciones al alérgeno. La administración intraperitoneal en ratones del alérgeno del abedul Bet v 1 mezclado con CpG-ODN, indujo una respuesta Th1 caracterizada por altos niveles de IgG2_a, poca inflamación de las vías aéreas, y niveles altos de IFN-γ y bajos de IL-5, lo que no ocurrió cuando se administró el alérgeno con hidróxido de aluminio (74).

El uso de ODN-CpG conjugado a alérgeno presenta ventajas comparado con las mezclas, ya que pueden actuar bloqueando la unión del alérgeno con la IgE y también se facilita la estimulación de una misma célula presentadora de antígeno con el alérgeno y la secuencia inmunoestimuladora, lo cual favorece la respuesta Th1 contra el alérgeno (90). La administración en ratones de Amb a 1 conjugado

a secuencias inmunoestimuladoras que contienen motivos CpG (Amb a 1-ISS) en relación 1:4, produjo la secreción de niveles significativamente más altos de IgG₂ e IFN-γ, niveles más bajos de IgG₁, IgE e IL-5, comparados con los obtenidos con la administración de alérgeno solo (75). Cuando Amb a 1-ISS se aplicó a un modelo de animal alérgico y retado con Amb a 1, se presentaron niveles altos de IFN-γ y niveles bajos de IL-5 y de IgE, comparados con los observados en ratones no tratados, lo cual se acompañó de la presencia de niveles de IgG₂. También, se produjo 30 veces menos liberación de mediadores, comparado con el alérgeno nativo.

La estimulación de células mononucleares de sangre periférica de pacientes alérgicos a la ambrosía con Amb a 1-ISS, produjo un aumento significativo de IFN-γ y disminución de IL-4 e IL-5; este conjugado fue más eficiente que el alérgeno solo para inducir la expansión de linfocitos T y más eficiente que la mezcla no acoplada para inducir un efecto antialérgico (76). En un estudio clínico, doble ciego, controlado y con placebo (86), se halló que el tratamiento durante seis semanas disminuyó significativamente la rinitis alérgica durante las temporadas de polinización y la necesidad de medicación. No se reportaron efectos sistémicos y sólo unas cuantas reacciones locales, también observadas en el grupo placebo. En otro estudio (87), los alérgicos tratados con Amb a 1 acoplado a ODN-CpG presentaron disminución en el número de eosinófilos y de células productoras de IL-4, junto a un aumento de células productoras de IFN-γ en muestras de biopsias nasales, comparado con pacientes tratados con placebo, lo que sugirió que el tratamiento indujo la desviación del perfil Th2 hacia el perfil Th1.

El cuadro 3 muestra algunos estudios realizados con alérgenos mezclados o conjugados a ODN con motivos CpG en diferentes modelos animales, en estudios *in vitro* o en ensayos clínicos en humanos.

Conclusiones

La inmunoterapia específica con el alérgeno actualmente se realiza con extractos alergénicos naturales y es de reconocida utilidad en diferentes poblaciones de alérgicos. Sin embargo, la compleja composición de los extractos que aumenta el riesgo de anafilaxia con su administración y limita la eficacia del tratamiento, ha llevado a buscar alternativas de remplazo por moléculas más definidas, de mejor estandarización y mayor pureza, como los alérgenos recombinantes.

Cuadro 3. Relación de diferentes estudios con alérgenos unidos o mezclados a secuencias inmunoestimuladoras que contienen motivos CpG.

Alérgeno	Secuencias inmunoestimuladoras	In vitro o in vivo	En humanos	Referencia
Amb a 1	TGACTGTGAACGTTCGAGATGA		Estudio clínico al azar controlado por placebo, de fase I	(85)
Amb a 1	TGACTGTGAACGTTCGAGATGA		Ensayo clínico, al azar, doble ciego y controlado por placebo, de fase II	(86)
Amb a 1	TGACTGTGAACGTTCGAGATGA		Ensayo de inmunoterapia de corto plazo	(87)
Cry j 1 y Cry j 2	TGACTCTGAACGTTCGAGATGA	en ratones		(73)
Bet v 1	ATCGACTCTGAGCGTTCTC	en ratones		(74)
Amb a 1	TGACTGTGAACGTTCGAGATGA	en ratones		(75)
Amb a 1	TGACTGTGAACGTTCGAGATGA	<i>in vitro</i> con PBMC		(76)
Amb a 1	TGACTGTGAACGTTCGAGATGA	en ratones, ensayos		
		<i>in vitro</i> con PBMC y suero de alérgicos		
Cacahuate	TCTGACRTTCT-X-TCTTRCAGTCT	en ratones		(77)
OVA	ACTTCGTTTCTGCGTCAA	en ratones		(78)
				(79)

PBMC: *peripheral blood mononuclear cell*

Se han propuesto diferentes esquemas que usan la molécula del alérgeno completa, fragmentos de éstos, moléculas híbridas o variantes mutadas, cuya posible utilidad práctica está en fase de experimentación a nivel de modelos animales, en estudios *in vitro*; también se conocen pocos estudios en humanos. Varios de esos esquemas están diseñados para dirigir el alérgeno o sus péptidos directamente hacia las células presentadoras de antígeno y aumentar su captación para modular la respuesta hacia un perfil Th1 o al de predominio de células y citocinas reguladoras. En humanos se han realizado varios estudios administrando péptidos que contienen epítopos T o alérgenos recombinantes conjugados a motivos CpG, los cuales indican que este tipo de vacunas son bien toleradas y reportan beneficios a los pacientes alérgicos.

Los hallazgos de los ensayos *in vitro* y en modelos animales indican que varios de los novedosos esquemas de inmunoterapia específica para el alérgeno pueden ser una alternativa ventajosa en remplazo de las vacunas basadas en extractos naturales, por lo que se anticipa una amplia fase de investigación con protocolos clínicos en humanos para definir el alcance de su utilidad.

Conflictos de intereses

Los autores no reportan conflicto de interés.

Financiación

Este trabajo fue financiado en parte por la Universidad de Cartagena (contrato 067 de 2009) y por Colciencias (Convenio 175 y 176, diciembre 23/2008).

Referencias

1. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature*. 2008;453:1051-7.
2. Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloko F, Karagiannidis C, Cramer R, et al. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med*. 2004;199:1567-75.
3. Bousquet J, Lockey R, Malling HJ, Álvarez-Cuesta E, Canonica GW, Chapman MD, et al. Allergen immunotherapy: Therapeutic vaccines for allergic diseases. World Health Organization. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1998;81:401-5.
4. Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet*. 1911;1:1572-3.
5. Freeman J. Vaccination against hay fever, report of results during the last years. *Lancet*. 1914;1:1178-80.
6. Compalati E, Penagos M, Tarantini F, Passalacqua G, Canonica GW. Specific immunotherapy for respiratory allergy: state of the art according to current meta-analyses. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2009;102:22-8.
7. Francis JN, Till SJ, Durham SR. Induction of IL-10+CD4+CD25+T cells by grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:1255-61.
8. Jutel M, Jaeger L, Suck R, Meyer H, Fiebig H, Cromwell O. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116:608-13.
9. Strait RT, Morris SC, Finkelman FD. IgG-blocking antibodies inhibit IgE-mediated anaphylaxis *in vivo* through both antigen interception and Fc gamma RIIb cross-linking. *J Clin Invest*. 2006;116:833-41.
10. Shim JY, Kim BS, Cho SH, Min KU, Hong SJ. Allergen-specific conventional immunotherapy decreases immunoglobulin e-mediated basophil histamine releasability. *Clin Exp Allergy*. 2003;33:52-7.

11. Scranton SE, González EG, Waibel KH. Incidence and characteristics of biphasic reactions after allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123:493-8.
12. Bernstein DI, Wanner M, Borish L, Liss GM. Twelve-year survey of fatal reactions to allergen injections and skin testing: 1990-2001. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113:1129-36.
13. Akdis M, Akdis CA. Therapeutic manipulation of immune tolerance in allergic disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8:645-60.
14. Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Gronlund H. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy.* 1999;29:896-904.
15. Ballmer-Weber BK, Wangorsch A, Bohle B, Kaul S, Kundig T, Fotisch K, et al. Component-resolved *in vitro* diagnosis in carrot allergy: Does the use of recombinant carrot allergens improve the reliability of the diagnostic procedure? *Clin Exp Allergy.* 2005;35:970-8.
16. Caraballo L, Mercado D, Jiménez S, Moreno L, Puerta L, Chua KY. Analysis of the cross-reactivity between BltM and Der p 5, two group 5 recombinant allergens from *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Int Arch Allergy Immunol.* 1998;117:38-45.
17. Caraballo L, Puerta L, Jiménez S, Martínez B, Mercado D, Avijouglu A, et al. Cloning and IgE binding of a recombinant allergen from the mite *Blomia tropicalis*, homologous with fatty acid-binding proteins. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997;112:341-7.
18. Jiménez S, Puerta L, Mendoza D, Chua KW, Mercado D, Caraballo L. IgE antibody responses to recombinant allergens of *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus* in a tropical environment. *Allergy Clin Immunol Int: J World Allergy Org.* 2007;19:233-8.
19. Puerta L, Labrada M, Uyema K, Jiménez S, Caraballo L. Blo t 13 allergen 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:S325.
20. Puerta L, Lagares A, Mercado D, Fernández-Caldas E, Caraballo L. Allergenic composition of the mite *Suidasia medanensis* and cross-reactivity with *Blomia tropicalis*. *Allergy.* 2005;60:41-7.
21. Caraballo L, Puerta L, Martínez B, Moreno L. Identification of allergens from the mite *Blomia tropicalis*. *Clin Exp Allergy.* 1994;24:1056-60.
22. Pauli G, Larsen TH, Rak S, Horak F, Pastorello E, Valenta R, et al. Efficacy of recombinant birch pollen vaccine for the treatment of birch-allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122:951-60.
23. Lagares A, Puerta L, Caraballo L. El polimorfismo en los alergenos. *Biomédica.* 2002;22:51-62.
24. Zazkuk J, Jiménez S, Cheong N, Puerta L, Lee BW, Chua KY, et al. Immunological characterization of a Blo t 12 isoallergen: identification of immunoglobulin E epitopes. *Clin Exp Allergy.* 2009;39:608-16.
25. Wagner S, Radauer C, Bublin M, Hoffmann-Sommergruber K, Kopp T, Greisenegger EK, et al. Naturally occurring hypoallergenic Bet v 1 isoforms fail to induce IgE responses in individuals with birch pollen allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:246-52.
26. King TP, Jim SY, Monsalve RI, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Spangfort MD. Recombinant allergens with reduced allergenicity but retaining immunogenicity of the natural allergens: Hybrids of yellow jacket and paper wasp venom allergen antigen 5s. *J Immunol.* 2001;166:6057-65.
27. González-Rioja R, Ibarrola I, Arilla MC, Ferrer A, Mir A, Andreu C, et al. Genetically engineered hybrid proteins from *Parietaria judaica* pollen for allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120:602-9.
28. Linhart B, Hartl A, Jahn-Schmid B, Verdino P, Keller W, Krauth MT, et al. A hybrid molecule resembling the epitope spectrum of grass pollen for allergy vaccination. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115:1010-6.
29. Kussebi F, Karamloo F, Rhyner C, Schmid-Grendelmeier P, Salagianni M, Mannhart C, et al. A major allergen gene-fusion protein for potential usage in allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115:323-9.
30. Ball T, Linhart B, Sonneck K, Blatt K, Herrmann H, Valent P, et al. Reducing allergenicity by altering allergen fold: a mosaic protein of Phl p 1 for allergy vaccination. *Allergy.* 2009;64:569-80.
31. Chen KW, Fuchs G, Sonneck K, Giers A, Swoboda I, Douladiris N, et al. Reduction of the *in vivo* allergenicity of Der p 2, the major house-dust mite allergen, by genetic engineering. *Mol Immunol.* 2008;45:2486-98.
32. Westritschnig K, Focke M, Verdino P, Goessler W, Keller W, Twardosz A, et al. Generation of an allergy vaccine by disruption of the three-dimensional structure of the cross-reactive calcium-binding allergen, Phl p 7. *J Immunol.* 2004;172:5684-92.
33. Karisola P, Mikkola J, Kalkkinen N, Airenne KJ, Laitinen OH, Repo S, et al. Construction of hevein (Hev b 6.02) with reduced allergenicity for immunotherapy of latex allergy by comutation of six amino acid residues on the conformational IgE epitopes. *J Immunol.* 2004;172:2621-8.
34. Mirza O, Henriksen A, Ipsen H, Larsen JN, Wissenbach M, Spangfort MD, et al. Dominant epitopes and allergic cross-reactivity: complex formation between a Fab fragment of a monoclonal murine IgG antibody and the major allergen from birch pollen Bet v 1. *J Immunol.* 2000;165:331-8.
35. Holm J, Gajhede M, Ferreras M, Henriksen A, Ipsen H, Larsen JN, et al. Allergy vaccine engineering: epitope modulation of recombinant Bet v 1 reduces IgE binding but retains protein folding pattern for induction of protective blocking-antibody responses. *J Immunol.* 2004;173:5258-67.
36. Chan SL, Ong ST, Ong SY, Chew FT, Mok YK. Nuclear magnetic resonance structure-based epitope mapping and modulation of dust mite group 13 allergen as a hypoallergen. *J Immunol.* 2006;176:4852-60.
37. Ma Y, Gadermaier G, Bohle B, Bolhaar S, Knulst A, Markovic-Housley Z, et al. Mutational analysis of amino acid positions crucial for IgE-binding epitopes of the major apple (*Malus domestica*) allergen, Mal d 1. *Int Arch Allergy Immunol.* 2006;139:53-62.
38. Oldfield WL, Kay AB, Larche M. Allergen-derived T cell peptide-induced late asthmatic reactions precede the

- induction of antigen-specific hyporesponsiveness in atopic allergic asthmatic subjects. *J Immunol.* 2001;167:1734-9.
39. Oldfield WL, Larche M, Kay AB. Effect of T-cell peptides derived from Fel d 1 on allergic reactions and cytokine production in patients sensitive to cats: a randomized controlled trial. *Lancet.* 2002;360:47-53.
 40. Liu YH, Kao MC, Lai YL, Tsai JJ. Efficacy of local nasal immunotherapy for Dp2-induced airway inflammation in mice: using Dp2 peptide and fungal immunomodulatory peptide. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112:301-10.
 41. Grgacic EV, Anderson DA. Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods.* 2006;40:60-5.
 42. Kundig TM, Senti G, Schnetzler G, Wolf C, Prinz BM, Fulurija A, et al. Der p 1 peptide on virus-like particles is safe and highly immunogenic in healthy adults. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117:1470-6.
 43. Leb VM, Jahn-Schmid B, Kueng HJ, Schmetterer KG, Haiderer D, Neunkirchner A, et al. Modulation of allergen-specific T-lymphocyte function by virus-like particles decorated with HLA class II molecules. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124:121-8.
 44. Schmitz N, Dietmeier K, Bauer M, Maudrich M, Utzinger S, Muntwiler S, et al. Displaying Fel d1 on virus-like particles prevents reactogenicity despite greatly enhanced immunogenicity: a novel therapy for cat allergy. *J Exp Med.* 2009;206:1941-55.
 45. Fellrath JM, Kettner A, Dufour N, Frigerio C, Schneeberger D, Leimgruber A, et al. Allergen-specific T-cell tolerance induction with allergen-derived long synthetic peptides: results of a phase I trial. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:854-61.
 46. Alexander C, Tarzi M, Larche M, Kay AB. The effect of Fel d 1-derived T-cell peptides on upper and lower airway outcome measurements in cat-allergic subjects. *Allergy.* 2005;60:1269-74.
 47. Norman PS, Ohman JL Jr, Long AA, Creticos PS, Gefter MA, Shaked Z, et al. Treatment of cat allergy with T-cell reactive peptides. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154:1623-8.
 48. Alexander C, Ying S, Kay AB, Larché M. Fel d 1-derived t cell peptide therapy induces recruitment of CD4+ CD25+; CD4+ interferon-gamma+ T helper type 1 cells to sites of allergen-induced late-phase skin reactions in cat-allergic subjects. *Clin Exp Allergy.* 2005;35:52-8.
 49. Smith TR, Alexander C, Kay AB, Larche M, Robinson DS. Cat allergen peptide immunotherapy reduces CD4(+) T cell responses to cat allergen but does not alter suppression by CD4(+) CD25(+) T cells: a double-blind placebo-controlled study. *Allergy.* 2004;59:1097-101.
 50. Verhoef A, Alexander C, Kay AB, Larche M. T cell epitope immunotherapy induces a CD4+ T cell population with regulatory activity. *PLoS Med.* 2005;2:e78.
 51. Tarzi M, Klunker S, Texier C, Verhoef A, Stapel SO, Akdis CA, et al. Induction of interleukin-10 and suppressor of cytokine signalling-3 gene expression following peptide immunotherapy. *Clin Exp Allergy.* 2006;36:465-74.
 52. Campbell JD, Buckland KF, McMillan SJ, Kearley J, Oldfield WL, Stern LJ, et al. Peptide immunotherapy in allergic asthma generates IL-10-dependent immunological tolerance associated with linked epitope suppression. *J Exp Med.* 2009;206:1535-47.
 53. Wallmann J, Proell M, Stepanoska T, Hantusch B, Pali-Scholl I, Thalhamer T, et al. A mimotope gene encoding the major IgE epitope of allergen Phl p 5 for epitope-specific immunization. *Immunol Lett.* 2009;122:68-75.
 54. Blaser K. Allergen dose dependent cytokine production regulates specific IgE and IgG antibody production. *Adv Exp Med Biol.* 1996;409:295-303.
 55. Cramer R, Fluckiger S, Daigle I, Kundig T, Rhynier C. Design, engineering and *in vitro* evaluation of MHC class-II targeting allergy vaccines. *Allergy.* 2007;62:197-206.
 56. Martínez-Gómez JM, Johansen P, Rose H, Steiner M, Senti G, Rhynier C, et al. Targeting the MHC class II pathway of antigen presentation enhances immunogenicity and safety of allergen immunotherapy. *Allergy.* 2009;64:172-8.
 57. Vailes LD, Sun AW, Ichikawa K, Wu Z, Sulahian TH, Chapman MD, et al. High-level expression of immunoreactive recombinant cat allergen (Fel d 1): Targeting to antigen-presenting cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;110:757-62.
 58. Hulse KE, Reefer AJ, Engelhard VH, Satinover SM, Patrie JT, Chapman MD, et al. Targeting Fel d 1 to Fc gamma RI induces a novel variation of the T(H)2 response in subjects with cat allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:756-62.
 59. Behnecke A, Li W, Chen L, Saxon A, Zhang K. IgE-mediated allergen gene vaccine platform targeting human antigen-presenting cells through the high-affinity IgE receptor. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124:108-13.
 60. Bros M, Ross XL, Pautz A, Reske-Kunz AB, Ross R. The human fascin gene promoter is highly active in mature dendritic cells due to a stage-specific enhancer. *J Immunol.* 2003;171:1825-34.
 61. van der Lubben IM, Verhoef JC, Borchard G, Junginger HE. Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2001;14:201-7.
 62. Jayakumar R, Nwe N, Tokura S, Tamura H. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *Int J Biol Macromol.* 2007;40:175-81.
 63. Roy K, Mao HQ, Huang SK, Leong KW. Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat Med.* 1999;5:387-91.
 64. Li J, Liu Z, Wu Y, Wu H, Ran P. Chitosan microparticles loaded with mite group 2 allergen Der f 2 alleviate asthma in mice. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2008;18:454-60.
 65. Saint-Lu N, Tourdot S, Razafindrantsita A, Mascarell L, Berjont N, Chabre H, et al. Targeting the allergen to oral dendritic cells with mucoadhesive chitosan particles enhances tolerance induction. *Allergy.* 2009;64:1003-13.
 66. Gronlund H, Vrtala S, Wiedermann U, Dekan G, Kraft D, Valenta R, et al. Carbohydrate-based particles: a new adjuvant for allergen-specific immunotherapy. *Immunology.* 2002;107:523-9.
 67. Andersson TN, Ekman GJ, Gronlund H, Buentke E, Eriksson TL, Scheynius A, et al. A novel adjuvant-allergen complex, CBP-rFel d 1, induces up-regulation of CD86 expression and enhances cytokine release by human dendritic cells *in vitro*. *Immunology.* 2004;113:253-9.

68. Neimert-Andersson T, Thunberg S, Swedin L, Wiedermann U, Jacobsson-Ekman G, Dahlen SE, et al. Carbohydrate-based particles reduce allergic inflammation in a mouse model for cat allergy. *Allergy*. 2008;63:518-26.
69. Ujike A, Ishikawa Y, Ono M, Yuasa T, Yoshino T, Fukumoto M, et al. Modulation of immunoglobulin (Ig)E-mediated systemic anaphylaxis by low-affinity Fc receptors for IgG. *J Exp Med*. 1999;189:1573-9.
70. Zhu D, Kepley CL, Zhang K, Terada T, Yamada T, Saxon A. A chimeric human-cat fusion protein blocks cat-induced allergy. *Nat Med*. 2005;11:446-9.
71. Terada T, Zhang K, Belperio J, Londhe V, Saxon A. A chimeric human-cat Fc γ amma-Fel d1 fusion protein inhibits systemic, pulmonary, and cutaneous allergic reactivity to intratracheal challenge in mice sensitized to Fel d1, the major cat allergen. *Clin Immunol*. 2006;120:45-56.
72. Klinman DM, Yi AK, Beauchage SL, Conover J, Krieg AM. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:2879-83.
73. Kohama Y, Akizuki O, Hagihara K, Yamada E, Yamamoto H. Immunostimulatory oligodeoxynucleotide induces TH1 immune response and inhibition of IgE antibody production to cedar pollen allergens in mice. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104:1231-8.
74. Jahn-Schmid B, Wiedermann U, Bohle B, Repa A, Kraft D, Ebner C. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs modulate the allergic TH2 response of BALB/c mice to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104:1015-23.
75. Tighe H, Takabayashi K, Schwartz D, van Nest G, Tuck S, Eiden JJ, et al. Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen Amb a 1 enhances its immunogenicity and reduces its allergenicity. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106:124-34.
76. Marshall JD, Abtahi S, Eiden JJ, Tuck S, Milley R, Haycock F, et al. Immunostimulatory sequence DNA linked to the Amb a 1 allergen promotes T(H)1 cytokine expression while downregulating T(H)2 cytokine expression in PBMCs from human patients with ragweed allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108:191-7.
77. Higgins D, Rodríguez R, Milley R, Marshall J, Abbate C, de La Cruz T, et al. Modulation of immunogenicity and allergenicity by controlling the number of immunostimulatory oligonucleotides linked to Amb a 1. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118:504-10.
78. Zhu FG, Kandimalla ER, Yu D, Agrawal S. Oral administration of a synthetic agonist of toll-like receptor 9 potently modulates peanut-induced allergy in mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120:631-7.
79. Iliev ID, Tohno M, Kuroasaki D, Shimosato T, He F, Hosoda M, et al. Immunostimulatory oligodeoxynucleotide containing TTTCGTTT motif from *Lactobacillus rhamnosus* GG DNA potentially suppresses ova-specific IgE production in mice. *Scand J Immunol*. 2008;67:370-6.
80. Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK, et al. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2001;31:2154-63.
81. Marshall JD, Fearon K, Abbate C, Subramanian S, Yee P, Gregorio J, et al. Identification of a novel CpG DNA class and motif that optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell functions. *J Leukoc Biol*. 2003;73:781-92.
82. Hartmann G, Battiany J, Poeck H, Wagner M, Kerkemann M, Lubenow N, et al. Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN- α induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2003;33:1633-41.
83. Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:9305-10.
84. Senti G, Johansen P, Haug S, Bull C, Gottschaller C, Muller P, et al. Use of A-type CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant in allergen-specific immunotherapy in humans: a phase I/IIa clinical trial. *Clin Exp Allergy*. 2009;39:562-70.
85. Simons FE, Shikishima Y, van Nest G, Eiden JJ, HayGlass KT. Selective immune redirection in humans with ragweed allergy by injecting Amb a 1 linked to immunostimulatory DNA. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:1144-51.
86. Creticos PS, Schroeder JT, Hamilton RG, Balcer-Whaley SL, Khattignavong AP, Lindblad R, et al. Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N Engl J Med*. 2006;355:1445-55.
87. Tulic MK, Fiset PO, Christodoulopoulos P, Vaillancourt P, Desrosiers M, Lavigne F, et al. Amb a 1-immunostimulatory oligodeoxynucleotide conjugate immunotherapy decreases the nasal inflammatory response. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:235-41.
88. Manolova V, Flace A, Bauer M, Schwarz K, Saudan P, Bachmann MF. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur J Immunol*. 2008;38:1404-13.
89. Storni T, Ruedl C, Schwarz K, Schwendener RA, Renner WA, Bachmann MF. Nonmethylated CG motifs packaged into virus-like particles induce protective cytotoxic T cell responses in the absence of systemic side effects. *J Immunol*. 2004;172:1777-85.
90. Shirota H, Sano K, Kikuchi T, Tamura G, Shirato K. Regulation of murine airway eosinophilia and Th2 cells by antigen-conjugated CpG oligodeoxynucleotides as a novel antigen-specific immunomodulator. *J Immunol*. 2000;164:5575-82.