



Biomédica

ISSN: 0120-4157

biomedica@ins.gov.co

Instituto Nacional de Salud

Colombia

Lagares, Alfredo; Puerta, Leonardo; Caraballo, Luis
El polimorfismo en los alergenos
Biomédica, vol. 22, núm. 1, marzo, 2002, pp. 51-62
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84322109>

- 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

REVISIÓN DE TEMA

El polimorfismo en los alérgenos

Alfredo Lagares^{1,2}, Leonardo Puerta¹, Luis Caraballo¹

¹Instituto de Investigaciones Inmunológicas, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia.

²Universidad del Atlántico, Barranquilla, Colombia.

Los alérgenos son antígenos que inducen una respuesta inmunológica mediada por anticuerpos tipo IgE. Estos pueden provenir de diferentes fuentes como pólenes, ácaros, mohos, animales, insectos y alimentos. Una molécula alérgica consiste en un número determinado de epítopes o determinantes antigénicos. Algunos alérgenos están constituidos por varias moléculas similares, las cuales presentan variaciones menores en la secuencia de aminoácidos, es decir, presentan polimorfismo y de acuerdo con el grado de similitud que presenten, se denominan isoalérgenos o variantes. El polimorfismo puede ser el resultado de la presencia de varios alelos, como también de la presencia de familias de genes relacionados. Este fenómeno se ha detectado en alérgenos de diferentes fuentes como los ácaros, los pólenes y las cucarachas, entre otros. El polimorfismo puede tener un efecto importante sobre los epítopes reconocidos por los linfocitos T, por los anticuerpos monoclonales y por la IgE de pacientes alérgicos, lo cual afecta la capacidad alérgica o el grado de reactividad cruzada con alérgenos de otras especies. La existencia de isoformas con una capacidad nula o disminuida de unirse a la IgE, pero con capacidad de estimular los linfocitos T, se ha planteado como una alternativa atractiva en la inmunoterapia de las alergias. La estandarización de extractos alérgicos puede verse afectada por la presencia de isoformas en diferentes proporciones en fuentes alérgicas de diferentes regiones geográficas.

Palabras clave: alérgenos recombinantes, polimorfismo, isoalérgenos, epítopes, IgE.

Polymorphism in allergens

Allergens are antigens that elicit an IgE-mediated immune response; they originate from diverse sources such as pollens, mites, molds, mammal exudates, insects and food. Allergenic molecules can contain several antigenic determinants, termed epitopes. Allergenic proteins have been discovered with polymorphisms, i.e., a mixture of similar molecules with minor variations in their amino acid sequences. These are called isoallergens or allergenic variants depending on the degree of similarity. Polymorphism may be defined by the presence of several alleles of the same gene or as families of related genes. Polymorphisms can have an important effect on the epitopes recognized by T lymphocytes, monoclonal antibodies and IgE of allergic patients. Individual polymorphisms can affect the basal level of allergenicity as well as the cross-reactivity with other allergens. The use of isoforms with low or total absence of IgE binding capacity but with high capacity to stimulate T cell response has been suggested as an alternative to the conventional immunotherapy for allergic diseases. Standardization of allergenic compounds can be affected by the differing proportions of isoforms in allergenic sources from different regions.

Key words: recombinant allergens, polymorphisms, isoallergens, epitopes, IgE.

En una fuente de alérgenos, como los ácaros del polvo de habitación, se encuentran diversas

Correspondencia:

Leonardo Puerta

Apartado aéreo 4610, Cartagena, Colombia.

lpuerta@red.net.co

Recibido: 24/05/01; aceptado: 18/12/01

proteínas con capacidad de unirse a la IgE. Los alérgenos se caracterizan y diferencian básicamente por el tamaño molecular, el punto isoeléctrico y la frecuencia de unión a la IgE en una población alérgica. La capacidad de unión a la IgE es específica y supone la presencia de uno o más puntos de unión (epítopes) sobre la

molécula del alérgeno. La caracterización de un alérgeno requiere de la identificación de una molécula con características fisicoquímicas únicas que permiten diferenciarlos de otros alérgenos. Sin embargo, algunos alérgenos, al ser aislados de su fuente natural, están constituidos por una mezcla de proteínas con composición de aminoácidos muy similar y con propiedades biológicas comunes, denominados isoalérgenos. Se conocen determinantes antigénicos constituidos por grupos de azúcares, que, a diferencia de los epítopes peptídicos, no son directamente codificados genéticamente y están determinados por la actividad de diferentes enzimas. Estos epítopes median la reactividad cruzada entre alérgenos de plantas de diferentes especies, lo cual tiene importancia clínica en personas con anticuerpos tipo IgE dirigidos contra estas estructuras (1). Recientemente, se ha descrito un alérgeno en la planta *Parietaria judaica* definido como un pigmento flavonoide cuya especificidad antigénica recae sobre grupos de azúcares y sulfatos (2). El polimorfismo ha sido demostrado en alérgenos de naturaleza proteica, premisa bajo la cual se desarrolla la presente revisión. Los adelantos en bioquímica y en biología molecular han permitido identificar un número cada vez mayor de isoalérgenos, lo cual ha planteado nuevos retos e interrogantes en la alergología experimental y clínica.

Según el Comité de Nomenclatura de Alérgenos de la Organización Mundial de la Salud (3), se considera que dos moléculas son isoalérgenos cuando comparten las siguientes propiedades: similar tamaño molecular; idéntica función biológica, si ésta es conocida, e identidad en la secuencia de aminoácidos igual o mayor al 67%, aunque este porcentaje puede ser menor en ciertos casos. A su vez, un isoalérgeno puede presentar múltiples formas con secuencias muy similares denominadas variantes o isoformas.

El polimorfismo en los alérgenos puede originarse por la presencia de varios alelos, como ha sido descrito en los alérgenos de los ácaros (4,5) o por la presencia de familias de genes relacionados, los cuales codifican para diferentes isoalérgenos, como se ha descrito en los alérgenos de los pólenes (6-8).

Identificación del polimorfismo

La electroforesis en dos dimensiones ha sido bastante utilizada para la identificación del polimorfismo de proteínas (9,10). Esta técnica es capaz de separar dos isoformas con diferencias hasta de un aminoácido y que presenten carga diferente. Para lograrlo se separan las proteínas de acuerdo con su tamaño y su carga, posteriormente se transfieren a una membrana donde se identifican usando anticuerpos monoclonales o IgE específica. Sin embargo, es posible que existan isoformas que no alcanzan a ser separadas debido a que sus diferencias en la secuencia de aminoácidos no cambian su masa molecular ni su carga (11). Por otro lado, hay alérgenos que presentan diferentes grados de glicosilación que mediante la electroforesis en dos dimensiones podrían dar la apariencia de ser isoformas o isoalérgenos. En estos casos, se necesita la aplicación de otras técnicas para confirmar el polimorfismo.

Para conocer con precisión el grado de polimorfismo de un alérgeno, es necesario determinar la secuencia de aminoácidos de sus diferentes isoformas. Empleando técnicas de biología molecular es posible determinar la secuencia de nucleótidos y, de allí, deducir la secuencia de aminoácidos de diferentes isoalérgenos y variantes. Igualmente, se han obtenido varias isoformas e isoalérgenos en cantidades apreciables por medio de las técnicas de ADN recombinante, lo cual ha permitido evaluar los efectos que tienen las variaciones en la secuencia de aminoácidos sobre la unión a la IgE, la respuesta de los linfocitos T y su alergenicidad (11-15).

Se puede saber si el polimorfismo de un alérgeno es producido por la presencia de familia de genes relacionados o por diferentes alelos. Para este propósito, el ADN se corta con una enzima de restricción en fragmentos bien definidos que luego son separados mediante electroforesis y transferidos a una membrana de nylon; los fragmentos de ADN se visualizan mediante hibridación con una sonda marcada. La presencia de un número de bandas mayor a las esperadas es un indicativo de la presencia de familia de

genes relacionados (4,5,16). Por análisis de *Southern blot* y RT-PCR se determinó que los alergenos Der p 1, Der p 3 del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* y Der f 1 del *Dermatophagoides farinae* están codificados cada uno por un solo gen y que sus isoformas son producto de sus respectivas variantes alélicas, por lo que el polimorfismo en estos alergenos se debe a la presencia de varios alelos (4,17,18).

Obtención de isoalergenos y sus isoformas

Los isoalergenos y las isoformas se pueden obtener en forma nativa directamente de la fuente de origen y en forma recombinante mediante aplicación de la biología molecular. A partir del extracto natural se pueden obtener alergenos nativos usando cromatografía de afinidad con anticuerpos monoclonales. Por esta vía se obtienen como una mezcla de diferentes isoformas, las cuales son separadas mediante cromatografía de intercambio iónico o cromatografía líquida de alta resolución (9,19,20). También pueden ser purificados por combinación de diferentes métodos como la filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y la electroforesis en dos dimensiones (21,22). Los isoalergenos recombinantes se obtienen a partir de una biblioteca de ADNc por clonación del gen o alelo correspondiente o por amplificación del ADN genómico con posterior clonación. Una vez clonado el gen correspondiente, estos alergenos se pueden expresar en un vector de expresión adecuado (11-16,23). Esta vía es la más práctica, ya que permite la obtención de grandes cantidades

de isoalergenos con alta pureza. De hecho, la mayoría de los isoalergenos se han obtenidos por esta vía.

Alergenos polimórficos

Polimorfismo en los alergenos de ácaros domésticos. Se ha encontrado polimorfismo en un gran número de alergenos de ácaros (cuadro 1). Podemos destacar el polimorfismo del Der p 1, un alergeno del ácaro *D. pteronyssinus*. Los isoalergenos de este alergeno presentan diferencias geográficas en su distribución. Thomas y col. (16) encontraron que las isoformas del Der p 1 obtenidas de ácaros provenientes de Wagga, Australia, presentaron sustituciones de aminoácidos diferentes a las encontradas en el Der p 1 de ácaros obtenidos en Sydney y en Perth, Australia. De igual manera, algunas sustituciones de aminoácidos encontradas en Der p 1 de ácaros provenientes de Inglaterra no se encontraron en los de Australia (24). En otro estudio, Chua y col. (25) encontraron sustituciones de aminoácidos en isoformas obtenidas a partir de ácaros comerciales mantenidos en cultivo por 20 años, aislados en Melbourne, Australia, que no están presentes en las isoformas halladas por Thomas en ácaros recogidos en las casas (16,24).

En el alergeno Der f 1 del ácaro *D. farinae* se han identificado, por lo menos, 10 isoformas (21), al igual que en el Der p 2 (9). En el alergeno Der p 5 se han identificado dos isoformas, una de ellas con la sustitución del aminoácido alanina en vez de glutamina en la posición 61, el cual produce un cambio en el perfil hidrofílico de la molécula

Cuadro 1. Polimorfismo en los alergenos de los ácaros.

Alergenos polimórficos	Fuente	No. de isoformas	Técnicas de identificación	Referencias
Der p 1	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	6	ADNc	16, 24, 25
Der f 1	<i>Dermatophagoides farinae</i>	10	2D-PAGE	22
Der p 2	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	3	ADNc	9
Der f 2	<i>Dermatophagoides farinae</i>	4	ADNc, 2D-PAGE*	4, 12
Der p 3	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	4	ADNc	5
Der f 3	<i>Dermatophagoides farinae</i>	5	ADNc, 2D-PAGE	16, 21, 60
Der p 5	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	2	ADNc	26
Lep d 2	<i>Lepidoglyphus destructor</i>	3	IEF**, ADNc	29, 30
Df 642	<i>Dermatophagoides farinae</i>	4	2D-PAGE	19
Der p 7	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	6	2D-PAGE	61

* Electroforesis en dos dimensiones en gel de poliacrilamida ** Isoelectroenfoque

(26). En el extracto alergénico natural del extracto del ácaro *L. destructor* se han identificado varias isoformas (27-29). Dos de estas isoformas se han obtenido en forma recombinante con igual alergenicidad que las equivalentes nativas (30).

Polimorfismo en los alérgenos de los pólenes. En los alérgenos de los pólenes se ha identificado un mayor grado de polimorfismo que el descrito en los alérgenos de los ácaros (cuadro 2), lo cual es consistente con la presencia de las familias de genes relacionados que se han identificado en algunas plantas. El polimorfismo en los alérgenos de los pólenes también está determinado por la presencia de variantes alélicas. Como ejemplo se puede mencionar el polimorfismo de dos de los alérgenos de la ambrosia común, *Ambrosia artemisiifolia*, Amb a 1 y Amb a 2. El Amb a 1 está constituido por cuatro isoalérgenos que son producto de una familia de genes relacionados; en cada isoalérgeno hay variantes con sustituciones de aminoácidos que sustentan la presencia de varios alelos (15,31). Al Amb a 2 se le han identificado tres isoformas, una de éstas presenta una identidad de secuencia del 65% con el Amb a 1,01 (32).

El alérgeno Lol p 5 del pasto *Lolium perenne* presenta dos isoalérgenos que son codificados por una familia de genes; éstos tienen una identidad del 66,4% en sus secuencias de aminoácidos (8). En el Bet v 1 del árbol abedul, *Betula verrucosa*, se han identificado 24 isoformas (33-

37), no todas ellas producidas por un mismo árbol, aunque hasta diez isoformas se han identificado en un mismo árbol (7,35). Se han identificado dos isoalérgenos en el Car b 1 del árbol *Carpinus betulus*: el Car b 1,01 con 13 variantes y el Car b 1,02 con 4 variantes. Car b 1,02 tiene una alta identidad con el Bet v 1 en la secuencia de aminoácidos (7,35,38).

La profilina, un alérgeno presente en muchas plantas, también presenta polimorfismo; el Phl p 11, la profilina de la grama, *Phleum pratense*, tiene 5 isoformas que presentan entre sí dos sustituciones de aminoácidos (39); en la profilina de la grama *Mercurialis annua* (Mer a 1) se han identificado 4 isoformas (40); en la profilina del germen de trigo, *Triticum aestivum*, se han identificado tres isoformas (41); en la profilina del maíz se han detectado tres isoformas que son producto de múltiples genes (42).

Polimorfismo en alérgenos de otras fuentes. El alérgeno Bos d 2, presente en la caspa del ganado (*Bos domésticus*), es una lipocalina que tiene alérgenos homólogos en el ratón, la rata, el caballo y el perro. Está constituido por 3 isoformas, las cuales han sido purificadas del extracto natural (20). En el alérgeno Per a 3 de la cucaracha, *Periplaneta americana*, se han identificado dos isoalérgenos, el Per a 3,01 y el Per a 3,02 con una identidad del 69% en sus secuencias de aminoácidos; a su vez en el Per a 3,02 se identificaron tres variantes que presentan entre sí una identidad

Cuadro 2. Polimorfismo en los alérgenos de los pólenes.

Alérgenos polimórficos	Fuente	No. de isoformas	Técnicas de Identificación	Referencias
Bet v 1	<i>Betula verrucosa</i>	24	2D-PAGE *, ADNc	35,37
Phl p 5	<i>Phleum pratense</i>	8	2D-PAGE, ADNc	10,23
Phl p 11	<i>Phleum pratense</i>	5	2D-PAGE	39
Cor a 1	<i>Corylus avellana</i>	4	2D-PAGE, ADNc	14,33
Amb a I	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	4	ADNc	15,31
Amb a II	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	3	ADNc, 2D-PAGE	32
Hol I 5	<i>Holcus lanatus</i>	2	ADNc	46
Car b 1	<i>Carpinus betulus</i>	17	ADNc	7,35,38
Mer a 1	<i>Mercurialis annua</i>	4	IEF **, ADNc	40
Amb p 5	<i>Ambrosia psilostachya</i>	2	ADNc	62
Lol p 1	<i>Lolium perenne</i>	2	ADNc	63
Lol p 5	<i>Lolium perenne</i>	2	ADNc	8
Ole e 1	<i>Olea europea</i>	?	—	64,65

*Electroforesis en dos dimensiones en gel de poliacrilamida, ** Isoelectroenfoque

Cuadro 3. Polimorfismo en otros alergenicos.

Alergenos polimórficos	Fuente	No. de isoformas	Técnicas de identificación	Referencia
Bos d 2	<i>Bos domesticus</i>	3	2D-PAG	18
Per a 3	<i>Periplaneta americana</i>	4	ADNc	41
Cr-PII	<i>Periplaneta americana</i>	2	ADNc	42
Ric c1 y Ric c 3	<i>Ricinus comunis</i>	2	HPLC	20
TaPRO	<i>Triticum aestivum</i>	3	ADNc	39
ZmPRO	<i>Zea mays</i>	3	ADNc	40

del 95% en la secuencia de aminoácidos (43,44)(cuadro 3). Bashir y col. (22) consideran que los alergenicos Ric c1 y Ric c3 del *Ricinus comunis*, por presentar función biológica similar e igual tamaño molecular, cumplen dos de los criterios para ser considerados como isoalergenicos, aunque presentan 33% de homología y una similitud del 62%.

Respuesta inmune y polimorfismo

En las alergias se presenta una desviación de la respuesta inmune normal; los pacientes alérgicos responden mediante una respuesta inmune tipo Th2 frente a proteínas inocuas para las personas no alérgicas que la toleran y montan una respuesta fundamentalmente del tipo Th1. El balance relativo entre las respuestas Th1 y Th2 determina los síntomas alérgicos; en la respuesta Th2 se producen y liberan las citocinas IL-4, que estimula la conversión de los LB en células plasmáticas y el *switching* a IgE; IL-5, que regula el crecimiento y diferenciación de eosinófilos; IL-9, que induce la proliferación de mastocitos; y la IL-10, que contrarresta la respuesta Th1. En personas atópicas, la vía Th2 predomina, lo cual conduce a prolongar la respuesta tipo IgE frente a alergenicos.

En la manifestación del tipo de respuesta Th1 o Th2 en una persona determinada intervienen factores genéticos. Sin embargo, la tolerancia frente a un alergenico también se puede inducir mediante la exposición repetida al alergenico por mecanismos que no están suficientemente claros. Tres mecanismos se han señalado en la tolerancia inmunológica: delección clonal, anergia clonal y supresión inducida por el antígeno que, probablemente, no son mutuamente excluyentes; el

mecanismo que predomina puede depender de las condiciones de la exposición al antígeno, de la dosis y la frecuencia de la administración. La vía de entrada del alergenico al organismo es importante en el proceso de sensibilización. En circunstancias normales, las proteínas solubles que llegan al pulmón son procesadas por las células dendríticas y producen una tolerancia específica al antígeno. Sin embargo, en asmáticos alérgicos el procesamiento de los antígenos induce una respuesta tipo Th2 que conduce al asma alérgica. Las células dendríticas, especializadas en la presentación de antígenos, parecen tener un papel importante en este proceso, ya que se ha demostrado que la tolerancia a alergenicos administrados por las vías respiratorias en ratones está mediada por IL-10 producida por las células dendríticas pulmonares (45). De otra parte, trabajos recientes muestran que los linfocitos T citotóxicos promueven una inmunidad tipo Th1 e inhiben la respuesta IgE a ovalbúmina administrada a ratones por un proceso que parece ser independiente del interferón gamma derivado de linfocitos T CD 8+ (46).

La tolerancia oral es una forma de tolerancia periférica, en la cual el linfocito maduro en el tejido linfoide periférico se convierte en no funcional o hiporreactivo. Se ha señalado la anergia clonal como el principal mecanismo en la inducción de tolerancia oral a los alergenicos (47). En ratones sensibilizados con aeroalergenicos del abedul, se indujo tolerancia al alergenico Bet v 1 administrado por vía oral, solo o conjugado con la subunidad B de la toxina del cólera. El mecanismo supresor parece estar relacionado con la producción del factor de crecimiento transformador beta (TGF-β), citocina que tiene un papel en la regulación de la tolerancia oral (48).

El polimorfismo en los alérgenos puede tener efectos importantes en el proceso de sensibilización. Por una parte, el polimorfismo produce un mayor número de péptidos alérgenos similares, lo cual aumenta la probabilidad de que un mayor número de estructuras antigénicas provoquen una respuesta alérgica en personas genéticamente predispuestas a padecerla. Según Thomas (6), este hecho podría explicar por qué alérgenos como el Der p 5, el cual presenta poco polimorfismo, tiene una frecuencia de reactividad sólo del 50%, aunque la intensidad de la respuesta alérgica producida por este alérgeno sea tan alta como la del Der p 1 o la del Der p 2, los cuales presentan una frecuencia de reactividad mayor del 80%. Por otra parte, algunos de los cambios de aminoácidos producto del polimorfismo pueden afectar la actividad antigénica de los epítopes T y B. Thomas y col. (16) determinaron que varios péptidos derivados de isoformas del alérgeno Der p 1, presentan una marcada diferencia en la frecuencia de estimulación de los linfocitos T. Por ejemplo, de ocho muestras de LT de pacientes que respondieron al péptido con la región 45-63 del Der p 1, siete respondieron cuando el péptido contenía el aminoácido tirosina en la posición 50, y solamente una muestra proliferó frente al péptido con la sustitución de histidina en la posición 50. Esta sustitución ha sido demostrada en uno de los isoalérgenos presentes en ácaros usados para la preparación de extractos alérgenos comerciales. Dado que es posible que en algunos extractos alérgenos comerciales no estén presentes todas las isoformas, la eficacia clínica y el valor diagnóstico puede ser diferente según la preparación comercial que se utilice.

El polimorfismo en el Der p 2 se encuentra en regiones que contienen epítopes T (49). Sin embargo, no se conocen estudios que hayan evaluado el efecto del polimorfismo sobre dichos epítopes. Las isoformas del alérgeno Der f 2 presentan diferencias en la frecuencia de unión a la IgE de pacientes alérgicos a los ácaros (12).

Las isoformas del alérgeno mayor del abedul, Bet v 1, presentan diferencias importantes en los patrones de unión a diferentes anticuerpos monoclonales y frente a la IgE de pacientes alérgicos

(13,35,50). Algunas isoformas del Bet v1 no tienen la capacidad de unirse a la IgE pero mantienen la capacidad de estimular los linfocitos T de pacientes alérgicos al abedul (cuadro 4). El efecto del polimorfismo sobre los epítopes T también se ha demostrado usando péptidos con modificación en un aminoácido. Por ejemplo, clones de linfocitos T reactivos al péptido 19-33 del Bet v 1 pierden la capacidad de reaccionar contra la isoforma, que en la posición 25 presenta la sustitución Gly→Asp (7).

Tres isoformas de uno de los alérgenos de la cucaracha americana muestran diferentes frecuencias de unión a la IgE en asmáticos alérgicos, Per a 3,0201 (47%), Per a 3,0202 (26,3%) y Per a 3,0203 (94,7%). El cambio del aminoácido serina por prolina en el epítipo de la isoforma Per a 3,0202 podría ser la causa de la menor reactividad de este isoalérgeno, ya que dicho cambio parece alterar la estructura tri-dimensional disminuyendo su alergenidad (43). Una minoría de los pacientes alérgicos al alérgeno Am b a 1 presentan IgE específica casi exclusivamente hacia la isoforma Amb a 1.1 (15). Igualmente, algunos alérgicos al *Lolium perenne* presentan mayor reactividad al isoalérgeno Lol p VA que al Lol p VB (8). Clones de linfocitos T de diferentes pacientes, específicas para Phl p 5 presentan diferentes grados de reactividad frente a las isoformas de este alérgeno; mientras que unos clones reaccionan contra la isoforma a, otros reaccionan contra la isoforma b y hay unos que no reaccionan frente a ninguna de las dos isoformas (51). La heterogeneidad en la respuesta de los LT frente a las diferentes isoformas ha planteado la hipótesis de que probablemente sería necesario la utilización de una mezcla de diferentes isoformas de alérgenos recombinantes, en vez de una sola, para poder reemplazar ventajosamente, en la inmunoterapia, los extractos alérgenos naturales por los alérgenos recombinantes.

El polimorfismo y la reactividad cruzada

La reactividad cruzada (RC) entre los alérgenos se presenta cuando éstos contienen epítopes idénticos o similares. La RC entre alérgenos tiene algunas consecuencias desde el punto de vista

Cuadro 4. Isoformas del alérgeno Bet v 1*.

Isoformas	Unión a la IgE	Estimulación de los LT	Prueba cutánea
A	Alta	Intermedia	Alta
B	Intermedia	Alta	Alta
C	Intermedia	NR	NR
D	Baja	Alta	Baja
E	Alta	Intermedia	NR
F	Intermedia	NR	Alta
G	Baja	NR	NR
J	Alta	NR	NR
L	Baja	Alta	Baja

NR: no realizado

*Datos tomados de las referencias 13 y 45

clínico, por ejemplo; muchos pacientes presentan sensibilización a determinada clase de alérgeno sin haber estado en contacto previo con él. Por otro lado, la RC en algunos casos es la causa de sensibilización a múltiples alérgenos; en estos casos, el polimorfismo puede estar jugando un papel; algunas isoformas contribuyen en alto grado con la reactividad cruzada entre alérgenos de diferentes orígenes mientras que, otras isoformas intervienen en grado despreciable o muy bajo (7,52). La reactividad cruzada entre los polenes del *Carpinus betulus* y del abedul parece estar dada fundamentalmente por las isoformas Car b 1.0201 y Car b 1.0204 sin contribución de las isoformas Car b 1.01 (7). De igual forma, la reactividad cruzada entre los polenes del *Holcus lanatus* y el *Phleum pratense* parece estar dada fundamentalmente por ciertas isoformas como lo sugieren los resultados con un anticuerpo monoclonal producido contra el alérgeno Phl p Vb que reacciona sólo con la isoforma rHol I 5.01 y no reacciona con la rHol I 5.02 obtenidas mediante clonaje molecular del heno *Holcus lanatus* (52). El papel del polimorfismo en la RC, así como las implicaciones que pueda tener en el diagnóstico y tratamiento de las alergias no está completamente establecido.

Uso potencial de los isoalérgenos en la inmunoterapia

En la respuesta alérgica, el alérgeno se une a los anticuerpos IgE que se encuentran anclados sobre los mastocitos y basófilos a través de los receptores de alta afinidad para la IgE. Esta unión provoca liberación de sustancias mediadoras de

la inflamación tales como histamina, leucotrienos y prostaglandinas. El balance Th 1/Th 2 es determinante en esta respuesta, los pacientes alérgicos desarrollan el perfil específico de citocinas tipo Th 2. Por esta razón, los linfocitos T son un blanco para la intervención de las enfermedades alérgicas. La caracterización detallada de los epítopes T presentes en los alérgenos contribuiría a evaluar preparaciones nuevas de alérgenos de potencial uso en inmunoterapia tales como péptidos sintéticos, alérgenos recombinantes o alérgenos recombinantes modificados.

Un alérgeno contiene epítopes B y epítopes T, los cuales constituyen generalmente estructuras o regiones diferentes sobre la molécula del alérgeno que determinan su capacidad de unión a la IgE circulante y la anclada sobre un linfocito B, o la capacidad de ser reconocido por los linfocitos T a través de su receptor de antígenos, respectivamente. En la inmunoterapia actual se aplican dosis repetidas del alérgeno, cada vez mayores, hasta lograr un estado de tolerancia (53), dicho esquema presenta el riesgo de anafilaxia que se desencadenaría por la degranulación de los mastocitos al unirse los epítopes B del alérgeno a la IgE anclada sobre su membrana. El hecho de que algunas isoformas de alérgenos presentes en la naturaleza mostraran nula capacidad de unión a la IgE pero buena capacidad inmunorreguladora de los linfocitos T (13), ha sido aprovechado y, mediante ingeniería genética, se han obtenido variantes hipoalérgicas, las cuales no tienen la capacidad de unirse a la IgE pero reconocen los epítopes T.

Las personas en inmunoterapia presentan una disminución de las citocinas correspondientes al perfil Th 2 y aumento de IL 2 e interferón gamma características del perfil Th1, también se presenta un aumento en los niveles de anticuerpos protectores tipo IgG. Se cree que los beneficios de la inmunoterapia en el tratamiento de las alergias involucra una modulación de la respuesta inmunológica, en la cual entre otros factores, las dosis aplicadas son importantes (53). Sin embargo, al aumentar la dosis del alérgeno también se aumenta el riesgo de anafilaxia con el tratamiento. En ese sentido, hay resultados promisorios *in vitro* e *in vivo* con las isoformas hipoalérgicas del Bet v 1 que muestran una baja unión a la IgE pero una alta capacidad para estimular los linfocitos T (13,50). La utilización de esas isoformas puede ofrecer un tratamiento más seguro de las alergias. Estas isoformas pueden ser aplicadas en mayor dosis con menor o ningún riesgo de anafilaxia pero conservando la capacidad inmunomoduladora que genera protección. Ferreira y col. (54) estudiaron, mediante mutagénesis dirigida, la contribución de algunos aminoácidos en el alérgeno Bet v 1, sobre la unión a la IgE. Las sustituciones introducidas disminuyeron la unión a la IgE de pacientes alérgicos al Bet v 1, de igual forma se obtuvo una disminución en la reactividad mediante la prueba cutánea. Al mismo tiempo, los ensayos de linfoproliferación demostraron que esas sustituciones no afectaron la respuesta de los linfocitos T. Igualmente, péptidos sintéticos entre 28 y 32 aminoácidos de largo, derivados de los epítopes B del Ph I 1, no tienen la capacidad de unión a IgE debido a la pérdida de la estructura secundaria y terciaria, los péptidos individuales o la mezcla de ellos no mostraron alergenidad en pruebas cutáneas y prueba de liberación de histamina en pacientes alérgicos al polen del abedul. Igualmente, en ratones y conejos, los péptidos indujeron una respuesta protectora tipo IgG (55).

Fragmentos recombinantes de alérgenos que contienen epítopes T pero sin epítopes B pueden inducir anticuerpos *in vivo* que previenen la unión de la IgE, de pacientes alérgicos, a la molécula completa del alérgeno. Los estudios *in vitro* e *in*

vivo mostraron que fragmentos recombinantes de Bet v 1 representando los aminoácidos 1 a 74 y 75 a 160 de la molécula, perdieron la capacidad de unión a IgE y mostraron, mediante pruebas cutáneas en alérgicos, cien veces menor alergenidad que el alérgeno completo. Sin embargo, los fragmentos conservaron la capacidad de inducir la proliferación de LT de pacientes alérgicos al abedul. Estos fragmentos administrados en ratones y conejos indujeron anticuerpos que inhibieron la unión de la IgE de pacientes alérgicos a la molécula recombinante completa (56). Comparado con el recombinante completo, estos fragmentos tienen significativamente menor capacidad de activación de los eosinófilos y de liberar mediadores pro-inflamatorios (eotaxina, histamina, proteína catiónica de los eosinófilos y GM-CSF) y citocinas tipo Th 2 (IL4, interferón gamma) (57). Estos resultados sugieren que estos fragmentos pueden ser buenos candidatos para la inmunoterapia de alergia al abedul.

En modelos de ratones con asma alérgica, se ha experimentado la utilidad de la inducción de tolerancia usando la mucosa oral o nasal como vía de aplicación de los alérgenos y péptidos hipoalérgicos con resultados alentadores: Weidemann *et al.* (58) hallaron que el tratamiento intranasal con los fragmentos hipoalérgicos del Bet v1 previno la respuesta alérgica y la inflamación de las vías respiratorias a la sensibilización con la molécula completa del alérgeno. Las mucosas ofrecen una vía importante para la inducción de tolerancia a alérgenos (47), la modulación de la respuesta inmunológica favoreciendo la expresión del perfil Th1 mediante la administración oral y bronquial de los alérgenos nativos o recombinantes ha sido reportado en modelos animales en otros estudios (45,48). Péptidos o isoformas completas hipoalérgicos administrados por estas vías parecen ofrecer una estrategia segura y conveniente para el tratamiento de las alergias. No se conocen ensayos clínicos con estos péptidos o isoformas hipoalérgicas, pero los resultados *in vitro* e *in vivo* en modelos animales y pruebas cutáneas en humanos indican que esta fase de los estudios puede estar muy próxima.

También se ha ensayado en animales vacunas de ADN usando isoalergenos; plásmidos de ADN con la secuencia de la isoforma Bet v 1a en combinación con secuencias CpG se ha ensayado en modelos animales como un tipo novedoso de inmunoterapia antígeno específica basada en inmunización con ADN, los resultados fueron alentadores ya que este esquema favoreció el desarrollo de la deseada respuesta Th1 (59).

La composición alérgica de un extracto natural destinado al diagnóstico debe reflejar, en gran medida, la composición antigénica del material que sensibilizó al paciente. Por tanto, se espera que el extracto contenga todos los alérgenos o epítopes que participaron como sensibilizantes primarios. Los extractos alérgicos naturales se preparan con fuentes alérgicas, provenientes de regiones determinadas, que pueden contener formas polimórficas diferentes a las presentes en fuentes alérgicas similares pero obtenidas en regiones geográficas distintas y también usadas para la preparación de extractos alérgicos. Por tanto, la definición de un estándar o patrón internacional, que sirva de referencia para la equipotencia alérgica de los extractos, puede verse afectada si no se tiene en consideración este hecho dado por las diferencias regionales en el polimorfismo. Los efectos que estas variaciones pueden tener en la preparación de extractos para uso en el diagnóstico y en el tratamiento no han sido evaluados suficientemente. Sin embargo, si un extracto no presenta las isoformas presentes en el material sensibilizante o si una de ellas está en baja representación, la capacidad diagnóstica del extracto podría ser afectada desfavorablemente.

Los anticuerpos monoclonales que actualmente se utilizan en la estandarización de extractos alérgicos pueden ser de limitada utilidad en la cuantificación de alérgenos polimórficos. Si los monoclonales reconocen epítopes comunes en las diferentes isoformas no podrían diferenciar entre las isoformas que están en baja concentración de las que se encuentran en mayor concentración. Por otro lado, si los anticuerpos monoclonales son específicos para determinadas isoformas su utilidad también sería limitada si no se cuentan con otros anticuerpos monoclonales específicos para las diferentes isoformas. Por

tanto, es importante realizar estudios que permitan identificar las diferentes isoformas presentes en los alérgenos y las posibles diferencias regionales en la distribución del polimorfismo.

Conclusiones

Los alérgenos son moléculas que tienen la particularidad de unirse a la IgE y provocar alergia. Una molécula alérgica contiene determinantes antigénicos, los cuales son estructuras involucradas directamente en la unión a los linfocitos B a la IgE circulante y a los linfocitos T. Los epítopes de naturaleza no proteica como los grupos de azúcares no son muy frecuentes pero adquieren importancia cuando median la reactividad cruzada entre diferentes alérgenos. La mayoría de alérgenos son de naturaleza polipeptídica y pueden estar afectados por el fenómeno del polimorfismo, lo cual puede reflejarse en que inducen una respuesta inmune con diferentes características.

Debido a los progresos en la tecnología del ADN recombinante, particularmente en el clonaje de genes y la expresión de proteínas, muchos genes de alérgenos se han clonado y la correspondiente proteína obtenida en forma recombinante. Esto ha permitido caracterizar muchos alérgenos y conocer en detalle el fenómeno del polimorfismo que presentan. El polimorfismo es común en los alérgenos de los ácaros, pólenes, cucarachas y otras fuentes. Debido a la presencia de diferentes alelos o a familia de genes relacionados, un alérgeno puede presentarse en varias formas con pequeñas diferencias a nivel de uno o muy pocos aminoácidos. Las pequeñas diferencias en la secuencia de aminoácidos pueden afectar la conformación de los epítopes. Por ejemplo: algunas de las sustituciones de aminoácidos tienen efecto sobre epítopes reconocidos por los linfocitos T, por los anticuerpos monoclonales o por la IgE de pacientes alérgicos; estas sustituciones afectan, en algunos casos, la actividad alérgica de las isoformas; también pueden afectar el grado de reactividad cruzada con otros alérgenos.

Varias isoformas y péptidos hipoalérgicos, producidas mediante clonaje molecular y mutagénesis dirigida, se han investigado mediante

pruebas de RAST, pruebas cutáneas en humanos y la inducción de tolerancia en modelos de animales. Los resultados obtenidos sugieren un potencial uso favorable en la inmunoterapia para el tratamiento de las alergias. La inmunoterapia con estas formas hipoalérgicas ofrece un enfoque más seguro ya que elimina el riesgo de la anafilaxia existente con el uso de los extractos alérgicos naturales; se esperan los primeros ensayos clínicos que confirmen estos resultados.

La materia prima usada para la preparación de extractos alérgicos puede reflejar la distribución geográfica del polimorfismo que se expresa en la fuente natural del alérgeno. Así, alérgenos de una misma fuente pero originaria de diferentes regiones pueden estar constituidos por diferentes proporciones de isoalérgenos. Este hecho puede dificultar la estandarización de extractos alérgicos destinados al diagnóstico, como también la definición de un estándar internacional, lo cual no se ha evaluado suficientemente. Los anticuerpos monoclonales que se utilizan en la estandarización de extractos alérgicos pueden ser de utilidad limitada si no se conoce su perfil de reactividad frente a las diferentes isoformas que pudieran constituir el alérgeno de interés.

Agradecimientos

Al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología Francisco José de Caldas, Colciencias, código 1107-12-050-99.

Referencias

1. **Paterson A, Vieths S, Aulepp H, Schlaak M, Becker WM.** Ubiquitous structure responsible for IgE cross-reactivity between tomato fruit and grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:805-15.
2. **Sallusto F, Poupot R, Clergue M, DePalma R, Fournie JJ.** A flavonoid sulfate antigen human alpha CD8+ Th2 lymphocytes in pollen allergy. *Eur J Immunol* 2000; 30:964-8.
3. **World Organization/IIUIS.** Allergen nomenclature. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:5-14.
4. **Yuuki T, Okumura Y, Okudaira H.** Genomic organization and polymorphism of the major house dust mite allergen Der f 2. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;112: 44-8.
5. **Smith W, Thomas WR.** Sequence polymorphism of the Der p 3 house dust mite allergen. *Clin Exp Allergy* 1996; 26:571-9.
6. **Thomas WR, Smith WA, Hales BJ.** Allergens sequence diversity and T-cell recognition. *ACI News* 1998;10:16-22.
7. **Larsen JN.** Isoallergens significance in allergen exposure and response. *ACI News* 1995;7:141-6.
8. **Ong E, Irwin J, Griffith R, Knox B, Singh B.** Cloning of a cDNA encoding a group V (group IX) allergenic isoform from Rye grass pollen that demonstrates specific antigenic immunoreactivity. *Gene* 1993;134:235-40.
9. **Chua KY, Huang CH, Shen HD, Thomas WR.** Analysis of sequence polymorphism of a major mite allergen Der p 2. *Clin Exp Allergy* 1996;26:829-37.
10. **Petersen A, Becker WM, Schlaak M.** Characterization of isoforms of the major allergen Phl p V by two-dimensional immunoblotting and microsequencing. *Int Arch Allergy Immunol* 1992;98:105-9.
11. **Spangfort MD, Ipsen H, Sparholt SH, Aasmul-Olsen S, Osmark P, Poulsen FM, et al.** Characterization of recombinant isoforms of birch pollen allergen Bet v 1. *Adv Exp Med Biol* 1996;409:251-4.
12. **Nishiyama C, Yuuki T, Usui Y, Iwamoto N, Okumura Y, Okudaira H.** Effects of amino acid variations in recombinant Der f II on its human IgE and mouse IgG recognition. *Int Arch Allergy Immunol* 1994;105:62-9.
13. **Ferreira F, Hirtenlehner K, Jilek A, Godnik-Cvar J, Breiteneder H, Grimm R, et al.** Dissection of immunoglobulin E and T lymphocyte of isoforms of the major birch pollen allergen Bet v 1: potential use of hypoallergenic isoforms for immunotherapy. *J Exp Med* 1996;183:599-609.
14. **Breiteneder H, Ferreira F, Hoffman-Sommer-gruber K, Ebner C, Breitenbach M, Rumpold H, et al.** Four recombinant isoforms of Cor a I, the major allergen of hazel pollen, show different IgE-binding properties. *Eur J Biochem* 1993;212:355-62.
15. **Bond JP, Garman RD, Keating KM, Briner TJ, Rafnar T, Klapper DG, et al.** Multiple Amb a I allergens demonstrate specific reactivity with IgE and T cell from ragweed-allergic patients. *J Immunol* 1991;146:3380-5.
16. **Thomas WR, Smith W, Hales BJ, Carter MD.** Functional effects of polymorphism's of house dust mite allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;113:96-8.
17. **Chua KY, Stewart GA, Thomas WR, Simpson RJ, Dilworth RJ, Plozza TM, et al.** Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. Homology with cysteine proteases. *J Exp Med* 1988; 167:175-82.
18. **Smith WA, Thomas WR.** Comparative analysis of the genes encoding group 3 allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae*. *Int Arch Allergy Immunol* 1996;109:133-40.
19. **Tsai, Chao PL, Shen HD, Tang RB, Chang TC, Chang ZN, et al.** Isolation and characterization of a novel 98-Kd

- Dermatophagoides farinae* mite allergen. J Allergy Clin Immunol 1998;102:295-303.
20. Rautiainen J, Auriola S, Rouvinen J, Kauppinen J, Zeiler T, Novikov D, *et al.* Molecular and crystal properties of Bos d 2, an allergenic protein of the lipocalin family. Biochem Biophys Res Comm 1998;247:746-50.
 21. Mao JL, Mayer CE, Peltre G, Desvaux FX, David B, Weyer A, *et al.* Mapping of *Dermatophagoides farinae* mite allergens by two-dimensional immunoblotting. J Allergy Clin Immunol 1998;102:631-6.
 22. Bashir ME, Hubatsch I, Leinenbach HP, Zeppezauer M, Panzani R, Hussein I. Ric c 1 and Ric c 3, the allergenic 2S albumin storage proteins of Ricinus communis: complete primary structures and phylogenetic relationships. Int Arch Allergy Immunol 1998;115:73-82.
 23. Gehlhar K, Petersen A, Schramm G, Becker WM, Schlaak M, Bufe A. Investigation of different recombinant isoforms of grass group-V allergens (timothy grass pollen) isolated by low-stringency cDNA hybridization-antibody binding capacity and allergenic activity. Eur J Biochem 1997;247:217-23.
 24. Kent N, Hill MR, Keen JN, Holland PWH, Hart BJ. Molecular characterisation of group I allergen *Eur m 1* from house dust mite *Euroglypus maynei*. Int Arch Allergy Immunol 1992;99:150-2.
 25. Chua KY, Kehal PK, Thomas WR. Sequence polymorphisms of cDNA clones encoding the mite allergen Der p 1. Int Arch Allergy Immunol 1993;101:364-8.
 26. Lin KL, Hsieh KH, Thomas WR, Chiang BL, Chua KY. Characterization of *Der p V* allergen, cDNA analysis, and IgE-mediated reactivity to the recombinant protein. J Allergy Clin Immunol 1994;94:989-96.
 27. Ventas P, Carreira J, Polo F. Purification and characterization of *Lep d 1*, a major allergen from the mite *Lepidoglyphus destructor*. Clin Exp Allergy 1992;22:454-60.
 28. Varela J, Ventas P, Carreira J, Barbas J, Gimenez-Gallego G, Polo F. Primary structure of *Lep d 1*, the main *Lepidoglyphus destructor* allergen. Eur J Biochem 1994;225:93.
 29. Schmidt M, Olsson S, Van der Ploeg I, Van Hage-Hamsten M. cDNA analysis of the mite allergen *Lep d 1* identifies two different isoallergens and variants. FEEBS Letters 1995;370:11-4.
 30. Olsson S, Van Hage-Hamsten M, Whitley P, Johansson E, Hoffman DR, Schmidt M. Expression of two isoforms of *Lep d 2*, the major allergen of *Lepidoglyphus destructor*, in both prokaryotic and eukaryotic systems. Clin Exp Allergy 1998;984-91.
 31. Griffith IJ, Pollock, Klapper DG, Rogers BL, Nault AK. Sequence polymorphism of Amb a I and Amb a II, the major allergens in *Ambrosia artemisiifolia* (short ragweed). Int Arch Allergy Immunol 1991;96:296:304.
 32. Kuo MC, Zhu XJ, Koury R, Griffith I, Klapper D, Bond J, *et al.* Purification and immunochemical characterization of recombinant and native ragweed allergen Amb a II. Mol Immunol 1993;30:1077-87.
 33. Rohac M, Birkner T, Reimitzer I, Bohle B, Steiner R, Breitenbach M, *et al.* The immunological relationship of epitopes on major tree pollen allergens. Mol Immunol 1991;28:897-906.
 34. Breitenbach M, Ferrreira F, Jilek A, Swoboda I, Ebner C, Hoffman-Sommergruber K, *et al.* Biological and immunological importance of Bet v 1 isoforms. Adv Exp Med Biol 1996;409:117-26.
 35. Löwenstein H, Sparholt S, Hlynsner S, Ipsen H, Larsen J. The significance of isoallergenic variations in present and future specific immunotherapy. Int Arch Allergy Immunol 1995;107:285-9.
 36. Breiteneder H, Pettenburger K, Bito A, Valenta R, Kraft D, Rumpold H, *et al.* The gene coding for the major birch pollen allergen Bet v I, is highly homologous to a pea disease resistance gene. EMBO J 1989;8:1935-8.
 37. Swoboda I, Jilek A, Ferreira F, Engel E, Hoffman-Sommergruber K, *et al.* Isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen, analyzed by liquid chromatography, mass spectrometry, and cDNA cloning. J Biol Chem 1995;270:2607-13.
 38. Larsen JN, Stroman P, Ipsen H. PCR based cloning and sequencing of isoforms encoding the tree pollen major allergen Car b I from *Carpinus betulus*, hornbeam. Mol Immunol 1992;29:703-11.
 39. Asturias JA, Arilla MC, Bartolome B, Martinez J, Martinez A, Palacios R. Sequence polymorphism and structural analysis of timothy grass pollen profilin allergen (Phl p 11). Biochim Biophys Acta 1997;1352:253-7.
 40. Vallerdú A, Asturias J, Arilla C, Gómez-Bayón N, Martínez A, Martínez J. Characterization of recombinant *Mercurialis annua* major allergen Mer a 1 (profilin). J Allergy Clin Immunol 1998;101:363-70.
 41. Rihs HP, Rozynek P, May-Taube K, Welticke B, Baur X. Polymerase chain reaction based cDNA cloning of wheat profilin: a potential plant allergen. Int Arch Allergy Immunol 1994;105:190-4.
 42. Staiger CJ, Goodbody KC, Hussey PJ, Valenta R, Droback BK, Lloyd CW. The profilin multigene family of maize: differential expression of three isoforms. Plant J 1993;4:631-41.
 43. Wu CH, Lee MF, Wang NM, Luo SF. Sequencing and immunochemical characterization of the american cockroach Per a 3 (Cr-pl) isoallergenic variants. Mol Immunol 1997;34:1-8.
 44. Wu CH, Wang NM, Lee MF, Kao CY, Luo SF. Cloning of the American cockroach Cr-P11 allergens: evidence for the existence of cross-reactive allergens between species. J Allergy Clin Immunol 1998;101:832-40.

45. **Akbari O, Dekruyff RH, Umetsu DT.** Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2001;2: 725-31.
46. **Thomas MJ, MacAry PA, Noble A, Askenase PW, Kemeny DM.** T cytotoxic 1 and T cytotoxic 2 CD8 T cells both inhibit IgE responses. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;124:187-9.
47. **Strobel S, Mowat A.** Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunology Today* 1998;19:173-81.
48. **Wiedermann U, Jahn-Schmid B, Repa A, Kraft D, Ebner C.** Modulation of an allergen immune response via the mucosal route in a murine model of inhalative type-I allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118:129-32.
49. **O'Hehir RE, Verhoef A, Panagiotopoulou E, Keswani S, Hayball J, Thomas WR, Lamb JR.** Analysis of human T cell response to the group II allergen of *Dermatophagoides* species: localization of major antigenic sites. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:105-13.
50. **Ferreira F, Hirthenlehner K, Briza P, Breiteneder H, Cheiner O, Kraft D, et al.** Isoforms of atopic allergens with reduced allergenicity but conserved T cell antigenicity: possible use for specific immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;113:125-7.
51. **Würtzen P, Wissenbach M, Ipsen H, Bufe A, Amved J, Joost van Neerven R.** Highly heterogeneous Phl p 5-specific T cells from patients with allergic rhinitis differentially recognize recombinant Phl p 5 isoallergens. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:115-22.
52. **Shramm G, Bufe A, Petersen A, Schlaak M, Becker WM.** Molecular and immunological characterization of group V allergen isoforms from velvet grass pollen (*Holcus lanatus*). *Eur J Biochem* 1998;252:200-6.
53. **Lord CJM, Lamb JR.** Th2 cells in allergic inflammation: a target of immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 1996;26:756-65.
54. **Ferreira F, Ebner C, Kramer B, Casari G, Briza P, Kungl AJ, et al.** Modulation of IgE reactivity of allergens by site-directed mutagenesis: potential use of hypoallergenic variants for immunotherapy. *FASEB J* 1998; 12:231-42.
55. **Focke M, Mahler V, Ball T, Sperr WR, Majlesi Y, Valenta P, et al.** Nonanaphylactic synthetic peptides derived from B cell epitopes of the major grass pollen allergen, Phl p 1, for allergy vaccination. *FASEB* 2001;15: 2042-4.
56. **Vrtala S, Akdis C, Budak F, Akdis M, Blaser K, Kraft D, Valenta R.** T cell epitopes-containing hypoallergenic recombinant fragments of the major birch pollen allergen, Bet v 1, induce blocking antibodies. *J Immunol* 2000;165: 6653-9.
57. **Nopp A, Hallden G, Lunn Dahl J, Johansson E, Vitala S, Valenta R, et al.** Comparison of inflammatory responses to genetically engineered hypoallergenic derivatives of the major birch pollen allergen Bet v 1 and to recombinant Bet v 1 wild type in skin chamber fluids collected from birch pollen-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:101-9.
58. **Wiedermann U, Herz U, Vrtala S, Neuhaus-Steinmetz U, Renz H, Ebner C, et al.** Mucosal tolerance induction with hypoallergenic molecules in a murine model of allergic asthma. *Int Arch Allergy Clin Immunol* 2001;124: 391-4.
59. **Hartl A, Kiesslich J, Weiss R, Bernhaupt A, Mostböck S, Scheiblhofer S, et al.** Isoforms of the major allergen of birch pollen induce different immune response after genetic immunization. *Int Arch Allergy Clin Immunol* 1999;102:17-29.
60. **Schenk S, Hoffman-Sommergruber K, Breiteneder H, Ferreira F, Fischer G, Scheiner O, et al.** Four recombinant isoforms of Cor a 1, the major allergen of hazel pollen, show different reactivities with allergen-specific T-lymphocyte clones. *Eur J Biochem* 1994;224: 717-22.
61. **Shen HD, Chua KY, Lin WI, Hsieh KH, Thomas W.** Characterization of the house dust mite allergen Der p 7 by monoclonal antibodies. *Clin Exp Allergy* 1995;25:416-22.
62. **Ghosh B, Rafnar T, Perry M, Bassolino-Klimas D, Metzler W, Klapper D, Marsh D.** Immunologic and molecular characterization of Amb p V allergens from *Ambrosia psilostachya* (western ragweed) pollen. *J Immunol* 1994;152:2882-9.
63. **Perez M, Ishioka G, Walker L, Chesnut R.** cDNA cloning and immunological characterization of the Rye grass allergen Lol p I. *J Biol Chem* 1990;265:16210-5.
64. **Lombardero M, Barbas JA, Moscoso J, Carreira J.** CDNA sequence analysis of the main olive allergen, Ole e I. *Clin Exp Allergy* 1994;24:765-70.
65. **Villalba M, Batanero E, Monsalve RI, González de la Peña M, La Hoz C, Rodríguez R.** Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen. Polymorphism analysis and tissue specificity. *J Biol Chem* 1994;269:15217-22.