

ENFERMEDADES ALÉRGICAS Y ALERGIA ALIMENTARIA A LECHE DE VACA: potenciales soluciones para un problema en constante crecimiento

Palabras clave: alergia, alergia alimentaria, leche, soja, inmunoterapia
Key words: allergy, food allergy, cow's milk, soy, immunotherapy

La etiología de la respuesta inmune alérgica es muy compleja y diversos factores han sido descriptos como involucrados en la inducción de las alergias. En las últimas décadas se ha observado un marcado incremento en su prevalencia y actualmente constituyen las inmunopatologías que con mayor prevalencia se presentan en el mundo. La misma tendencia se observa en las alergias alimentarias por lo cual se están realizando nuevos estudios y esfuerzos para comprender su fisiopatología y desarrollar terapias que permitan controlar la

patología. Actualmente el principal tratamiento consiste en evitar la exposición al alérgeno. Sin embargo, existen fuertes evidencias experimentales que demuestran que las inmunoterapias constituyen tratamientos promisorios para corregir el defecto que se presenta en la regulación del sistema inmune en estos desórdenes. La leche de vaca constituye el principal alérgeno alimentario en numerosas regiones del mundo. Frecuentemente se utilizan fórmulas a base de proteínas de soja como sustituto lácteo en el tratamiento de la alergia a la leche de vaca y en algunos pacientes se observa la inducción de una intolerancia sin sensibilización previa a la soja. Esta observación nos llevó a estudiar la reactividad cruzada entre ambos sistemas y, a partir de la identificación de varias proteínas de la semilla de soja de reactividad cruzada con las caseínas bovinas y de la caracterización *in vitro* e *in vivo* de este fenómeno, proponemos el empleo de componentes de soja en el desarrollo de inmunoterapias tolerogénicas e inmunomoduladoras para el tratamiento de las alergias alimentarias.

The etiology of allergies is very complex and several factors have been associated with the induction of these diseases. A rising prevalence of allergy was observed in the last decades and this immunopathology constitutes the most common disease worldwide. A similar trend has been described for food allergies and, hence, efforts should be focused on studies aimed at understanding its physiopathogeny and to develop novel therapies for the treatment of this disease. The most efficient treatment is the strict avoidance of the allergen. However, there are strong evidences that indicate that immunotherapies constitute corrective treatments for the impaired regulation of the immune system in allergic patients.

Milk allergy is the main food allergen in many regions. Soy-based formulae are frequently used as dairy substitutes in the treatment of milk allergic patients. However, some patients develop a clinical intolerance even being not sensitized to soy. This evidence encouraged us to study the cross-reactivity between both systems. We have identified several seed proteins that cross-react with bovine caseins. The *in vitro* and *in vivo* characterization of this phenomom led us to propose the use of soy components in the development of tolerogenic and immunomodulatory therapies for the treatment of food allergies.

■ ENFERMEDADES ALÉRGICAS. DEFINICIONES Y CONCEPTOS GENERALES

El hombre vive en un medio ambiente rodeado de sustancias

antigénicas, muchas de las cuales son patogénicas, por lo cual le resultaría imposible sobrevivir sin los mecanismos de defensa. A lo largo de la escala evolutiva los microorganismos han sido la presión selectiva

ejercida por el medio que ha moldeado el sistema inmune de los distintos organismos. De esta manera los mecanismos de defensa no son similares en un pez que vive en el agua, una planta que vive en una

■ Guillermo Horacio Docena

Laboratorio de Investigación en el Sistema Inmune-LISIN. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. La Plata. Argentina.
guidoc@biol.unlp.edu.ar

zona desértica o en una zona tropical, un invertebrado o un vertebrado. Sin embargo, existen diferentes grados de evolución del sistema inmune en los seres vivos y la máxima expresión en complejidad la podemos encontrar actualmente en los mamíferos. La inmunidad innata y la adaptativa funcionan a través de una compleja red de células y moléculas dirigidas a detectar y clasificar a los antígenos para luego controlarlos o eliminarlos. Sin embargo, existe un grado aún mayor de complejidad que consiste en la posibilidad de coexistir con microorganismos en el propio organismo y ésta es la situación que se presenta con la microbiota en el intestino.

La inmunidad innata, a través de distintos receptores (receptores tipo Toll, receptor de manosa, receptores scavengers, etc), es la encargada de la detección y clasificación de los antígenos procarióticos (a través de la identificación de los MAMPs o patrones moleculares asociados a microorganismos) o de componentes derivados del daño celular (detección de DAMPs o patrones moleculares asociados a daño) e inducir los mecanismos específicos de defensa. Sin embargo, en el universo de antígenos también hay que incluir antígenos del medio ambiente y antígenos de la dieta, dado que a pesar de ser inocuos constituyen sustancias extrañas para el sistema inmune. Por lo tanto, un organismo que se desarrolle en un determinado medio ambiente va a contactar antígenos de diferente tipo y contará con un sistema inmune con cierto grado de complejidad adaptado a funcionar en el medio en el cual se desarrolla.

Frente a esta variedad de antígenos el sistema inmune tiene la capacidad de montar mecanismos activos de *tolerancia* frente a antígenos dietarios y microorganismos presentes en la microbiota (que necesita preservar) y al mismo tiempo

activar mecanismos capaces de eliminar microorganismos patógenos. Estos mecanismos se inducen en las mucosas.

La mucosa gastrointestinal es la mucosa más compleja y desarrolla donde el sistema inmune aprende contra qué antígenos inducir tolerancia o "no respuesta" y contra qué antígenos inducir mecanismos activos que los controlen y, en el mejor de los casos, los eliminen. Los componentes propios pueden en ciertas circunstancias comportarse como antígenos, llamados *autoantígenos*, y desencadenar fenómenos o enfermedades autoinmunes. Para evitar estas situaciones patológicas el sistema inmune induce, desde el mismo inicio en que se generan sus células en el organismo, un conjunto de mecanismos de tolerancia para evitar respuestas activas que terminen dañando los tejidos y órganos propios. Mecanismos similares son los que operan frente a antígenos inocuos del medio ambiente.

Para el caso en particular de los *alergenos*, antígenos que generan respuestas alérgicas, éstos son antígenos presentes en el medio ambiente y en la dieta y en su gran mayoría son sustancias inocuas. Un alérgeno es una sustancia capaz de inducir la activación del sistema inmune (inmunógeno) y luego reaccionar con los elementos generados. Los alergenos más importantes son proteínas, glicoproteínas e hidratos de carbono. Sustancias como el aire, agua, humedad o irritantes químicos que frecuentemente se los suele confundir con sustancias que inducen reacciones alérgicas, no son alergenos. Sin embargo, pueden generar reacciones similares a las alergias, de hecho se las denomina alergias físicas, aunque los mecanismos involucrados son diferentes.

En un individuo normal la respuesta inmune frente a los alergenos es la tolerancia específica que evita la inducción de procesos inflama-

torios frente a estos antígenos. Este fenómeno es muy importante para preservar el proceso de absorción de nutrientes ya que es necesario que los antígenos de la dieta puedan alcanzar el intestino y sean absorbidos. Pero al mismo tiempo resulta un mecanismo necesario para conservar los microorganismos vivos presentes en el lumen intestinal (microbiota) aunque en este caso no se trata de alergenos. Esto refleja que los mecanismos de tolerancia no se han generado en la escala evolutiva para evitar las reacciones alérgicas (que seguramente no existían hace miles o cientos de miles de años) sino que constituyen un aspecto evolutivo de la relación organismos-microorganismos que además es parte del reconocimiento y preservación de lo propio. Así como se ha demostrado que muchos patógenos son capaces de evolucionar a partir de microorganismos comensales, actualmente, se postula que bacterias presentes en la microbiota se han desarrollado a partir de bacterias patógenas del tracto gastrointestinal (por ejemplo Salmonella), lo que les ha permitido adaptarse y sobrevivir en dicho medio sin que sean eliminadas. Para poder establecer este equilibrio y convivir en simbiosis, el sistema inmune asociado a la mucosa gastrointestinal requiere de diversos mecanismos para poder detectar microorganismos no patógenos y no eliminarlos. Por el contrario, frente a un microorganismo patogénico el sistema inmune se activa y genera un foco inflamatorio que, además de favorecer el desarrollo de la inmunidad innata y adaptativa, posibilita la eliminación del antígeno. Esto no ocurre con un antígeno no procariótico e inocuo (sustancia del medio ambiente, de la dieta o un componente propio) dado que a través de los mecanismos de tolerancia evita que se genere un proceso inflamatorio. Sin embargo, existen situaciones en las que el sistema inmune no fun-

ciona de esta manera y se activa en forma inadecuada: son las *reacciones de hipersensibilidad o alergias*.

Se ha definido el término *alergia* como "respuesta alterada o excesiva". Este tipo de enfermedades se conoce desde la época de los egipcios (3000 años A.C con la muerte de un faraón por una anafilaxia causada por una picadura de avispa) también se han encontrado reportes muy antiguos en Grecia y China sobre afectaciones del árbol respiratorio y de la piel, inclusive remarcando asociaciones familiares, pero recién a inicios del siglo XX se caracterizó clínicamente estas afecciones con mayor precisión. Posteriormente, en la década del 60, Gell y Coombs sistematizaron y clasificaron estas reacciones en 5 tipos de reacciones de hipersensibilidad (Gell & Coombs 1963) en base al tiempo que demoraba la aparición de los síntomas y las dosis necesarias para inducirlas. Actualmente, y sobre la base del conocimiento de los mecanismos moleculares y celulares involucrados, los mecanismos de hipersensibilidad se clasifican en 4 tipos (que se corresponden con los de Gell y Coombs):

Tipo I: hipersensibilidad inmediata o mediada por IgE

Tipo II: hipersensibilidad citotóxica o dependiente de anticuerpos (IgG e IgM)

Tipo III: hipersensibilidad mediada por complejos inmunes

Tipo IV: hipersensibilidad retardada o mediada por células

Si bien estas reacciones también pueden ser clasificadas según sean originadas por anticuerpos (Tipo I a III) o células (tipo IV) en todas participan células y en todas el mecanismo de daño es la inflamación. Otro aspecto muy importante que reúnen las reacciones de hipersensibilidad es que requieren contactos previos repetitivos con el antígeno para que

se manifiesten. Esto llevó a definir el término *sensibilización* que se refiere al mecanismo inducido por el primer contacto con el antígeno en el cual se generan los elementos efectores. Por lo tanto, las reacciones de hipersensibilidad requieren que el individuo haya sido previamente sensibilizado o que haya sido expuesto al menos una vez al antígeno desencadenante.

Las *enfermedades alérgicas* son por lo tanto manifestaciones clínicas producto de una falla en los mecanismos de activación o regulación de la respuesta inmune frente a antígenos inocuos, ampliamente distribuidos en el medio ambiente y están mediadas por los mecanismos de hipersensibilidad. Una reacción alérgica puede ser causada por cualquiera de los 4 mecanismos de hipersensibilidad descriptos e inclusive es común que varios mecanismos se presenten en forma simultánea o secuencial en el tiempo en un mismo paciente. Esto determina que en numerosas ocasiones se identifiquen más de un elemento inmunopatogénico (células y/o moléculas) y que se trate de patologías complejas y heterogéneas.

El término *atopia* (del griego *atopos*, o "fuera de lugar"), originalmente propuesto por Coca (1923), se refiere al estado de hipersensibilidad que presentan ciertos individuos (individuos susceptibles) ante la presencia de sustancias o condiciones que para el resto de la población son inocuas y que además presentan una predisposición genética para producir anticuerpos IgE (Kay y col. 2001). Por lo tanto en muchas ocasiones un individuo alérgico es atópico. Un 65-80% de los enfermos con asma bronquial alérgica y rinitis alérgica presentan antecedentes familiares de atopia y, por otro lado, los miembros de una familia de atópicos pueden presentar distintos cuadros clínicos. El modo de herencia de esta condición es poli-

génica multifactorial.

En particular nos interesa describir las reacciones de hipersensibilidad tipo I o inmediatas o atópicas dado que son las más frecuentes y pueden ser las más graves. Se caracterizan, como dijimos anteriormente, por la producción exacerbada de *inmunoglobulinas IgE* para lo cual se requiere la activación de linfocitos B (LB) a células plasmáticas productoras de anticuerpos con la participación de los linfocitos T (LT) *CD4+* o *helper* o *colaboradores* de fenotipo Th2 (LT Th2). La IgE producida y secretada por las células plasmáticas pasa a circulación sistémica y se une a los receptores de alta afinidad presentes en mastocitos (en tejidos), basófilos (en circulación) y eosinófilos (en tejidos y circulación). Esta fase de la respuesta alérgica se denomina *fase de sensibilización* y ocurre con el primer contacto con el alérgeno. Cuando esto se produce en forma repetitiva en individuos atópicos o alérgicos resulta en una exagerada producción y secreción de anticuerpos IgE, situación que caracteriza a esta condición. En individuos no alérgicos la IgE se produce en cantidades mucho menores aún frente a exposiciones repetitivas a los alérgenos. Sólo se encuentran niveles elevados de IgE en infecciones con determinados parásitos.

En individuos alérgicos, exposiciones posteriores al alérgeno determinan su unión a la IgE que se encuentra en la membrana plasmática de las células sensibilizadas (unida a los receptores de alta afinidad) y el entrecruzamiento de al menos dos moléculas de IgE por el alérgeno dispara la activación celular con la consiguiente degranulación y liberación al medio extracelular del contenido de sus gránulos citosólicos en forma inmediata. Aquí se encuentran sustancias con una intensa actividad inflamatoria tales como la histamina. Pero además se induce la síntesis de sustancias pro-inflamato-

rias tales como leucotrienos, prostaglandinas, citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Sin embargo, los gránulos citoplasmáticos de los mastocitos, basófilos y eosinófilos contienen también numerosas enzimas, citoquinas y quimiocinas. Por lo tanto, la activación celular genera la rápida liberación de sustancias con actividad farmacológica pro-inflamatoria que origina un foco inflamatorio inmediato, mientras que la inducción de la síntesis de otras sustancias pro-inflamatorias en forma más tardía perpetúa el proceso inflamatorio en el tiempo. Esta segunda etapa de la reacción alérgica se denomina *fase efectora*. En conjunto estos mecanismos determinan que exista una reacción inflamatoria inmediata, y otra tardía en el órgano o tejido (órgano de choque u órgano blanco) donde el alérgeno activa al sistema inmune.

Cuando el alérgeno alcanza la circulación y se une a las IgE de los

basófilos el proceso inflamatorio se denomina *anafilaxia* y constituye la reacción alérgica que más graves consecuencias puede tener en la salud del paciente. Cuando el proceso de activación celular se produce en forma repetitiva sobre un órgano blanco es posible que se genere un infiltrado celular cuyas características dependerán del tejido y tipo de células que se hayan activado. Si persiste la activación celular (inclusive de las células atraídas) se produce el remodelamiento tisular con la posible pérdida de la función del órgano. Esto ocurre por ejemplo en la insuficiencia respiratoria en el paciente con asma alérgico, debido a la acumulación y activación de neutrófilos, eosinófilos y linfocitos. En general para llegar a un cuadro de este tipo se requieren años de propagación del foco inflamatorio y sus características, como así también su respuesta al tratamiento, dependerán del tipo de proceso inflamatorio

instaurado. En estos casos estamos ante una inflamación crónica

Por lo tanto una reacción alérgica requiere de una fase de sensibilización inicial y una fase efectora posterior y puede dar origen a una reacción inmediata (en minutos) y luego una reacción tardía (en horas o días); a su vez la inflamación puede ser aguda o crónica. Por lo tanto, las enfermedades alérgicas son patologías muy complejas y heterogéneas donde no existe un único mecanismo inmunopatogénico. Esto se refleja en la clínica de los pacientes dado que se pueden observar desde reacciones leves (tos, picazón, malestar abdominal, etc) hasta graves (asma, anafilaxia, etc), que afectan a distintos órganos (piel, pulmón, intestino, etc), y pueden manifestarse a distintas edades. Esto implica que cuando se habla de una alergia no nos referimos a una única patología sino que constituye un síndrome con manifestaciones muy heterogéneas

y variables, aún en un mismo individuo, lo cual dificulta en muchos casos el diagnóstico. Los aspectos moleculares y celulares de estas enfermedades no se comprenden aún en su totalidad.

Para el caso en particular de las llamadas alergias físicas, el mecanismo involucrado es diferente dado que no se activan los linfocitos B y no se generan anticuerpos IgE (ni otros isotipos) específicos. El irritante directamente activa a los mastocitos y basófilos induciendo la liberación de las sustancias pro-inflamatorias. Esto ocurre en las "alergias" por calor, por frío o por ejercicio.

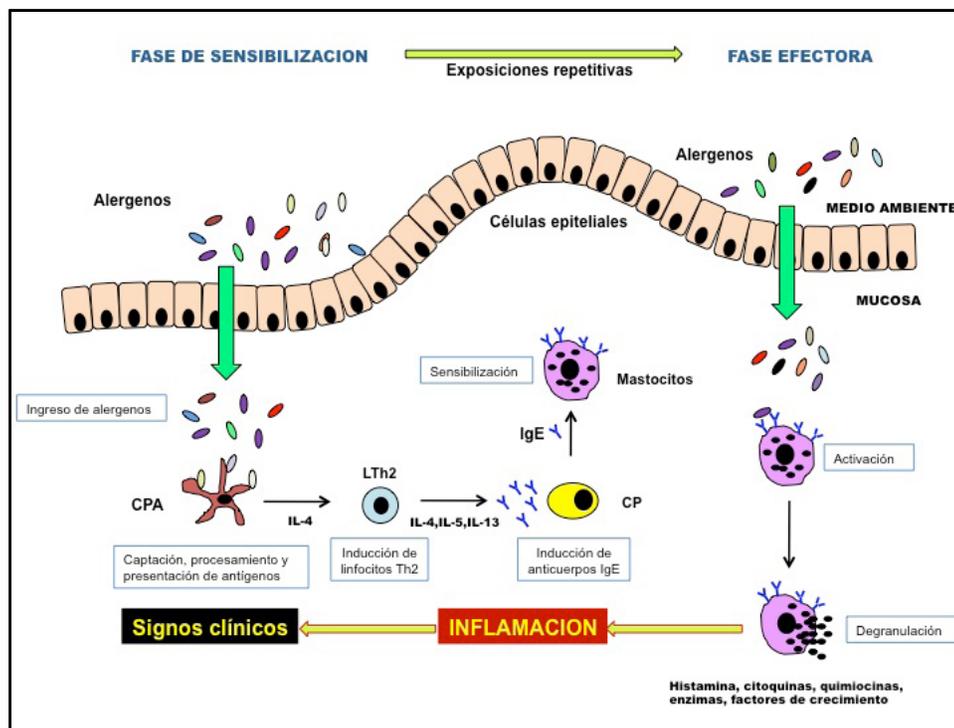


Figura 1: Etapas de una reacción alérgica. Esquema de la fase de sensibilización y de la fase efectora.

CPA: células presentadoras de antígenos, CP: células plasmáticas, LTh2: linfocitos T Th2.

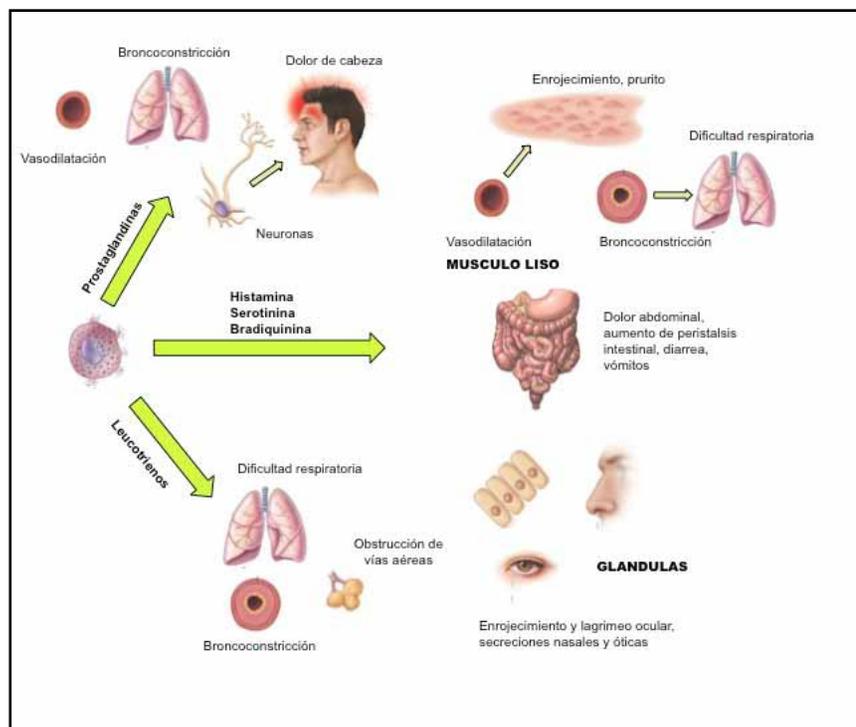


Figura 2: Signos clínicos inducidos por la activación de mastocitos en diferentes órganos y tejidos.

■ ALERGIAS ALIMENTARIAS

Se definen las *alergias alimentarias* como las reacciones de hipersensibilidad desencadenadas por alérgenos alimentarios. Es importante definir correctamente qué son las alergias alimentarias dado que suelen confundirse con una reacción adversa a alimentos. La alergia alimentaria es una reacción adversa originada por la ingesta de alimentos o aditivos alimentarios en la que participa el sistema inmune. Comprenden una amplia variedad de trastornos que pueden ser mediados o no por anticuerpos IgE (Wang y col. 2011). Por lo tanto las alergias alimentarias no constituyen una única patología, sino que involucran diferentes enfermedades o patologías tales como la anafilaxia, el síndrome de alergia oral, la enterocolitis, la esofagitis eosinofílica, la proctocolitis, la gastroenteropatía eosinofílica, la dermatitis atópica, el eccema y otras. En cambio se define una *reac-*

ción adversa a los alimentos en su concepción más amplia como una reacción anómala, desencadenada por alimentos, que puede o no estar mediada por el sistema inmune. Se clasifican en *tóxicas* (que dependen de la toxicidad del alimento tal como pescado en mal estado, chocolate, banana y palta que contienen histamina, alimentos contaminados con microorganismos, etc) y *no tóxicas* (que dependen de la susceptibilidad individual). Entre éstas se encuentran las no mediadas por el sistema inmune o intolerancias (alteraciones anatómicas del tracto gastrointestinal, deficiencias enzimáticas, alteraciones sicosomáticas, etc) y las mediadas por el sistema inmune o reacciones alérgicas (originadas por mecanismos de hipersensibilidad). Por lo tanto una *alergia alimentaria* es un tipo de reacción adversa originada por alimentos en la que el sistema inmune se encuentra involucrado. Se estima que sólo el 15-20% de las reacciones adversas alimenta-

rias son realmente alergias alimentarias, por lo cual resulta sumamente importante definir correctamente los diferentes términos y contar con métodos diagnósticos precisos dado que el tratamiento y el pronóstico son muy diferentes según la patología. Por lo tanto, el diagnóstico de una alergia alimentaria requiere relacionar la sintomatología presente en un paciente con un alimento desencadenante o nocivo y establecer la participación del sistema inmune.

■ INCREMENTO EN LA PREVALENCIA DE LAS ENFERMEDADES ALÉRGICAS, EN PARTICULAR EN LA ALERGIA ALIMENTARIA A LA LECHE DE VACA

Es ampliamente conocido que las alergias tienen una base poligénica de predisposición (se han mapeado diferentes genes en distintos cromosomas) junto a una serie de factores ambientales disparadores (partículas diesel y demás contaminantes ambientales, efecto pro-inflamatorio de distintos pólenes, etc) lo que determina que la herencia sea *poligénica multifactorial*. Desde hace varias décadas se han estudiado e identificado numerosos genes polimórficos en pacientes alérgicos que afectan la predisposición individual al desarrollo de las alergias (atopía). Sin embargo, la predisposición genética por sí sola no puede explicar el marcado aumento en la prevalencia de estas enfermedades observado en las últimas 3 décadas (se ha duplicado por cada década transcurrida). Se ha propuesto que la influencia de factores ambientales disparadores que actúan sobre esta base genética de susceptibilidad serían los responsables de los cambios registrados en determinadas regiones del mundo. Estudios epidemiológicos han revelado que más del 25 % de la población general se encuentra sensibilizada, particularmente en países industrializados, lo

cual representa una cifra alarmante (Sicherer y col.2010).

Aunque estas enfermedades no están directamente relacionadas con la presencia de microorganismos, éstos están íntimamente involucrados en la inducción y regulación de los mecanismos inmunológicos específicos contra los alérgenos. La *hipótesis de la higiene*, luego de casi 30 años de debate, pretende fundamentar el marcado incremento en la incidencia de las alergias en las últimas décadas en determinadas regiones del mundo (Strachan y col. 1989). Esta hipótesis postula que una menor exposición a microorganismos intracelulares patógenos ha sido determinante en la mayor instauración de mecanismos Th2-dependientes frente a la exposición a alérgenos (Okada y col. 2010). Los hábitos de vida en ambientes más limpios, mejores planes de vacunación, mejores antibióticos, alimentos menos contaminados, menor contacto con mascotas, etc. han determinado que el sistema inmune reciba una menor carga de información del medio ambiente relacionada con microorganismos, junto a un mayor contacto con alérgenos debido a hábitos de vida más intra-domiciliarios, ambientes más amoblados, con sistemas centralizados de circulación de aire, etc. Esto implica que el sistema inmune reciba una menor carga de desafíos antigénicos pro-Th1 y más estímulos pro-Th2. Por lo tanto, el sistema inmune en individuos con una susceptibilidad genética tiende a reaccionar de forma Th2-dependiente frente a antígenos inocuos que contacta repetidamente y desencadenar reacciones inflamatorias. En conclusión, la hipótesis de la higiene postula que los cambios producidos en el medio ambiente y en los hábitos de vida en los últimos tiempos en países occidentales o desarrollados impactan en la regulación del sistema inmune. De esta manera los mecanismos IgE-dependientes,

que en la escala evolutiva se han generado como mecanismo de defensa frente a determinados parásitos (macroparásitos que habitan en órganos huecos) se están activando frente a antígenos inocuos del medio ambiente.

Además, es importante considerar que los microorganismos comensales cumplen un papel esencial en el desarrollo y correcto funcionamiento del sistema inmune asociado a las mucosas, principalmente a través del estímulo de la producción de citoquinas inmunosupresoras como IL-10 o TGF- β (Wills-Karp y col. 2001). Es decir que la presencia de microorganismos procarióticos contribuyen al desarrollo de los mecanismos de tolerancia que operan frente a los antígenos inocuos (antígenos de la microbiota, del medio ambiente y de la dieta) (Sudo y col. 1997; Wannemuehler y col. 1982). Por ejemplo, se ha observado que la composición de la microbiota en niños con alergia alimentaria difiere de la de un individuo no alérgico (Ouwehand y col. 2001) lo cual probablemente impacte en un funcionamiento anómalo de los mecanismos de tolerancia. Esta hipótesis es muy difícil de probar aunque ha sido estudiada en modelos animales y se ha demostrado que es posible desencadenar cuadros de alergia simplemente alterando la flora intestinal mediante la administración de antibióticos (Bashir y col. 2004).

En conjunto estos cambios, junto a la globalización (migración de individuos, incorporación de dietas nuevas y a veces exóticas o la modificación de dietas pre-existentes por acceso a nuevos alimentos) han determinado que actualmente las alergias sean las inmunopatologías de mayor prevalencia en el mundo. Un claro ejemplo de cómo un nuevo alimento incorporado en una dieta de una población puede impactar en una enfermedad de este tipo es el caso del kiwi. En países como Esta-

dos Unidos o inclusive en Argentina no existía la alergia al kiwi. Sin embargo actualmente la alergia al kiwi es un problema importante. Asimismo podemos mencionar el caso de aquellas poblaciones que han incluido en la dieta la manteca de maní (Australia, Inglaterra, Canadá, etc). En estos países se está observando un aumento en la incidencia de la alergia al maní en forma similar a lo que ha ocurrido en los Estados Unidos, donde el maní es el alérgeno alimentario más inmunogénico. Esto indica que los hábitos dietarios son un factor central en la instauración de las alergias alimentarias.

Como se mencionó anteriormente, en las últimas décadas se ha observado un incremento muy marcado en la incidencia de las alergias y en determinadas regiones del mundo afectan al 10-30% de la población, lo cual significa que afecta a cientos de millones de individuos (Sicherer y col. 2003, Devereux y col. 2006, Sicherer y col. 2010). La misma tendencia se ha observado en las alergias alimentarias. Actualmente constituyen un problema sanitario preocupante en muchos países (Gupta y col. 2007), incluyendo el nuestro, a tal punto que en ciertas regiones y para ciertos alérgenos se puede hablar de epidemia

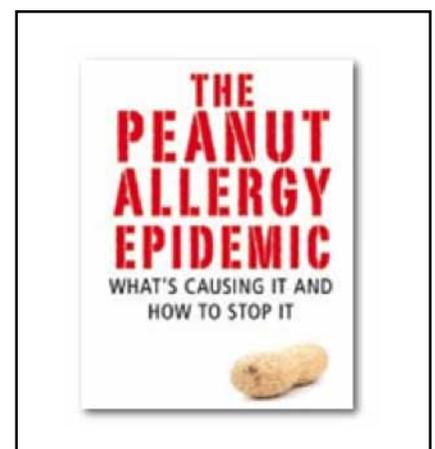


Figura 3: La alergia al maní como ejemplo de enfermedad alérgica epidémica.

de alergias (Sicherer y col. 2010). Tal es el caso de la alergia al maní o la alergia al látex. Esto significa que lo que para la mayoría es un elemento esencial de la vida para otros individuos (y cada vez son más) significa un elemento que les altera completamente los hábitos de vida e incluso puede ser mortal

Los estudios que se deben realizar para establecer valores de incidencia para las alergias alimentarias no son tarea sencilla. Implican en primera instancia una correcta definición de la patología y de criterios claros de diagnóstico. Se han realizado estudios multicéntricos y multidisciplinarios de gran envergadura en Estados Unidos y en Europa que han arrojado la información antes mencionada sobre un rápido e importante incremento en la incidencia de las alergias alimentarias. Además, estos trabajos han estudiado el impacto que diferentes factores tienen sobre la incidencia de esta patología (Pereira y col. 2001, McBride y col. 2012) información que resulta muy importante para comprender su bases moleculares e implementar políticas sanitarias y de control de alimentos, adecuadas. El etiquetado de los alimentos constituye un problema muy serio para los pacientes alérgicos y la legislación vigente en todo el mundo, aunque varía en cada país, dista de proteger al paciente. Frecuentemente se emplean términos que no son familiares para la población en general (por ejemplo "caseinatos" para indicar la presencia de proteínas de la leche) o directamente se omite la presencia de una sustancia alergénica en la composición del alimento. En el mismo sentido, la situación se ha agravado por el hecho que cada vez es mayor el número de alimentos alergénicos. En el pasado era común observar niños alérgicos a 1 ó 2 alimentos mientras que actualmente es común que sean alérgicos a 2 ó 3 alimentos (Høst y col. 2002;

Saarinen y col. 2005). Asimismo, la intensidad con que se presentan las alergias también parece estar modificándose. Un ejemplo que resume lo mencionado lo constituye la leche de vaca: la alergia a la leche de vaca es la alergia alimentaria de mayor prevalencia en el mundo, afecta aproximadamente un 2.5% de la población pediátrica (Rona y col. 2007) y su incidencia se ha incrementado en la última década (Branum y col. 2009). Además es una de las principales causas de reacciones de anafilaxia (Rona y col. 2007) siendo el tercer alimento que produce la mayor cantidad de reacciones anafilácticas fatales en el mundo (Cianferoni y col. 2012). Estos datos deben analizarse en el contexto de las alergias alimentarias en su conjunto cuya prevalencia alcanza cifras de 5-6% de la población general durante el primer año de vida, cifra que cae a los 6 años a un 2.5% y a un 2% a los 15 años de edad (Rona y col. 2007, Branum y col. 2009). En general todas las alergias alimentarias se manifiestan durante la infancia etapa en la cual no se ha desarrollado completamente el sistema inmune. En adultos, las prevalencias son menores aunque para ciertos alergenos la sensibilización persiste en el tiempo (soja, maní, pescados, frutos secos, etc) con el agravante que pueden originar reacciones sistémicas graves (anafilaxia).

Pero no sólo la edad y la dieta impactan en la manifestación de las alergias alimentarias. La forma de consumo de los alimentos o los cambios en las formas de preparación son factores que se deben considerar. El maní es un ejemplo de ello: como ya mencionamos en EEUU el maní es un alergeno alimentario muy importante principalmente por la cantidad de anafilaxias y reacciones fatales que provoca. De los aproximadamente 30.000 casos por año de anafilaxia causada por alimentos, el 80% es causado por

maní con 200 casos fatales por año. Sin embargo, en China se consumen cantidades similares de maní y no se observan los mismos problemas de alergenidad. Esto puede atribuirse a que en China se consume principalmente hervido o frito mientras que en EEUU, el Reino Unido o Australia se consume tostado (Sampson y col. 2004). Se ha demostrado que esta forma de procesamiento incrementa notablemente la alergenidad de este alergeno por la interacción entre las proteínas e hidratos de carbono (Beyer y col. 2001).

Pero la incidencia de las alergias alimentarias depende no sólo del individuo, cómo y cuándo se expone a los alimentos, sino también del alimento, de su inmunogenicidad y características conformacionales. Incluso el pronóstico de una alergia alimentaria y la edad de instauración de la tolerancia también dependen de la conformación de los alergenos. El reconocimiento de epitopes conformacionales en alergenos de la leche determina que se adquiera tolerancia a edades tempranas, mientras una respuesta inmune humoral dirigida a epitopes secuenciales en las caseínas bovinas determina la persistencia de la alergia a leche de vaca (Chatchatee y col. 2001, Wang y col. 2011).

Por lo tanto, existen numerosos factores que deben considerarse al momento de establecer o analizar los datos de incidencia, al mismo tiempo que se intente comprender la historia natural de la patología.

■ TRATAMIENTOS CONVENCIONALES

El hecho que a una cierta edad se instauren los mecanismos de tolerancia en la mucosa gastrointestinal en forma espontánea no significa que la patología se haya curado. Esta condición puede manifestarse en otras mucosas como es el caso de la afectación bronquial. Es común ob-

servar que la alergia a leche o huevo en la primera infancia luego se asocia con la sensibilización a alérgenos ambientales y el desarrollo de asma (Cianferoni y col. 2009). Es decir, que una temprana sensibilización a través del tracto gastrointestinal pone en evidencia la condición de alérgico de un individuo que podrá manifestarse de distinta manera a lo largo de la vida de no mediar un correcto manejo terapéutico.

Existen actualmente diversos tratamientos para las enfermedades alérgicas, sin embargo, muy pocos resultan efectivos como terapias correctivas. El principal inconveniente para el desarrollo de este tipo de terapias es el desconocimiento de los mecanismos inmunopatogénicos e inmunorregulatorios subyacentes en esta patología. Sin embargo, los avances producidos en la caracterización del sistema inmune de mucosas y de los mecanismos de tolerancia e inflamación han impactado marcadamente en este campo y han posibilitado el desarrollo de nuevas inmunoterapias como único procedimiento que hasta el momento ha logrado modificar el curso de las alergias. A pesar de que estas terapias se aplican a las alergias desde hace más de 100 años, actualmente existen numerosas preguntas y situaciones relacionadas con su implementación y seguridad que aún permanecen sin resolver. Remitiéndonos a la historia, Leonard Noon y John Freeman son considerados los pioneros en esta especialidad. A comienzos del siglo XX reportaron los primeros resultados sobre tratamientos con vacunas hiposensibilizantes en pacientes con rinitis alérgica estacional (Noon 1911). Posteriormente, la introducción del primer antihistamínico (Daniel Bovet en 1937, le valió el Premio Nobel en 1957) permitió controlar de mejor manera a los pacientes alérgicos, aunque mediante tratamientos sintomáticos. Recién en 1948 se introdujeron los

corticosteroides a la práctica médica (Hench y Kendall, 1948, les valió el Premio Nobel en 1950). La era del tratamiento farmacológico se expandió marcadamente con los descubrimientos concernientes a las "prostaglandinas y sustancias relacionadas biológicamente activas" que culminaron en 1990 con el desarrollo de medicamentos que bloquean el metabolismo de los leucotrienos o anti-leucotrienos (Samuelsson, Bergström y Vane, Premio Nobel 1982). Finalmente el descubrimiento de las investigaciones de Jerne, Köhler y Milstein (Premio Nobel en 1984) relacionado con las teorías sobre el sistema inmune y el desarrollo de los principios de producción de anticuerpos monoclonales también ha impactado positivamente en la especialidad. El empleo de anticuerpos anti-IgE ha resultado exitoso como terapia en pacientes con asma severa, rinitis y alergia alimentaria (Maurer y col. 2013, Zhu y col. 2013, Lieberman y col. 2013). En el año 2003 se realizó el primer ensayo en pacientes con alergia al maní, con placebo y al azar, empleando el anticuerpo humanizado Hu-901 durante 4 meses (Leung y col. 2003). Los resultados altamente satisfactorios logrados impulsaron la continuidad en el uso de este anticuerpo, inclusive en ensayos clínicos combinado con inmunoterapia, en los que ha resultado efectivo en pacientes con anafilaxia (Lieberman y col. 2013). El principal mecanismo de acción de este anticuerpo es el bloqueo de los anticuerpos IgE circulantes. Sin embargo, se ha observado que también controla la expresión de los receptores específicos de IgE en mastocitos y basófilos, lo que permite reducir la hiperreactividad frente a la exposición al alérgeno.

También se han empleado, como terapias no antígeno-específicas, citoquinas y anticuerpos anti-citoquinas en pacientes con asma, rinitis y dermatitis atópica aunque

el resultado de estos protocolos ha sido muy poco satisfactorio. Se ha estudiado en humanos el uso de receptores solubles de interleuquina (IL)-4, anti-IL-5, anti-IL-9, anti-IL-13, anti-eotaxina, interferón- γ recombinante (rIFN- γ), IL-12 recombinante (rIL-12); mientras que en modelos animales también se ha estudiado el efecto de citoquinas recombinantes tales como IL-10, IFN- γ ., IL-12 e IL-18 y anticuerpos monoclonales contra el receptor de IL-13 (IL-13R α) o IL-4 (IL-4R α), moléculas accesorias de superficie tales como CD80, CD86, CD28 y CD23 y citoquinas tales como IL4, IL-13 y otras.

Con respecto a las *inmunoterapias*, a pesar de haber tenido un comienzo promisorio hubo un período oscuro hasta la década de los 80 en el que el balance beneficio-riesgo fue netamente desfavorable para el paciente, básicamente por las innumerables reacciones adversas (muchas fatales) de los tratamientos subcutáneos. Esto llevó a iniciar una etapa de exploración de nuevas preparaciones antigénicas (extractos estandarizados) y procedimientos. El empleo de rutas alternativas de administración, un mejor conocimiento del sistema inmune, la inclusión de placebos en ensayos clínicos y la elaboración de guías internacionales para los tratamientos (EAACI guidelines 1997, WHO guidelines 1998, ARIA 2001 y actualizaciones 2008 y 2010, WAO 2009, EMA 2009) (Mailing y col. 1997, Bousquet y col. 1998, Bousquet y col. 2001, Bousquet y col. 2008, Brozek y col. 2010) llevó a una visión más optimista sobre este tipo de terapias recién en los inicios del siglo XXI.

Por otro lado, el conocimiento sobre el genoma humano junto con el creciente desarrollo de la industria biotecnológica, determinó un importante impulso al diseño de nuevos fármacos con el potencial desarrollo de novedosas terapias correctivas del sistema inmune. Sin

embargo, el principal reto sigue siendo el control de la patología y de su creciente prevalencia en determinadas regiones del mundo como se desarrolló previamente.

Para el caso de las alergias alimentarias, actualmente el tratamiento más efectivo consiste en la **eliminación estricta del alérgeno ofensivo de la dieta** antes de los 2 años de edad o hasta la instauración de los mecanismos de tolerancia. Sin embargo, algo que parece simple presenta múltiples complicaciones: desde la necesidad de identificar al alimento alérgico hasta la educación del paciente y de su entorno familiar sobre la posibilidad de ocurrencia de reacciones accidentales por la presencia de alérgenos ocultos en los alimentos o las reactividades cruzadas entre diferentes sistemas proteicos. En el recuadro 1 se resumen distintos aspectos relacionados al tratamiento de las alergias a leche de vaca.

Se debe diferenciar la *dieta de restricción* (antes de los 2 años de edad), que requiere el reemplazo de la leche por un sustituto lácteo, de la *dieta de eliminación* (luego de los 2 años de edad) cuando el paciente puede ingerir una mayor variedad de alimentos. En todos los casos la dieta debe adaptarse a las necesidades nutricionales de cada paciente. En referencia a los posibles sustitutos lácteos a emplear, los hidrolizados extensivos de proteínas de leche son la primera opción excepto en pacientes con anafilaxia. Si no son tolerados puede recurrirse a hidrolizados de proteínas de arroz y en última instancia a fórmulas a base de aminoácidos. Existen diversos trabajos que han fijado posición con respecto

al diagnóstico y tratamiento de las alergias alimentarias. En particular el DRACMA o Diagnosis and Rationale for Action Against Cow's Milk Allergy ha desestimado completamente el empleo de fórmulas de soja en niños menores a los 6 meses de edad por problemas nutricionales y para evitar reacciones de hipersensibilidad a edades tempranas (Fiocchi y col. 2010).

Al mismo tiempo, los avances logrados en el desarrollo y optimización de las inmunoterapias correctivas constituyen una opción complementaria al tratamiento restrictivo de esta patología. Estos tratamientos se basan en la inducción de mecanismos de tolerancia específica a través de la estimulación antigénica en forma controlada del sistema inmune asociado a las mucosas (Weiner y col. 1994, Faria y col. 2005). En este sentido el término *tolerancia inmune* se define como la falta de respuesta de la inmunidad adaptativa a un antígeno y puede ser mediado por algunos de los siguientes

mecanismos: delección, inactivación de los LT específicos del antígeno, o inmunomodulación de los LT específicos con la inducción de LTreg. Esta tolerancia inmune es la base de la falta de respuesta del sistema inmune frente a antígenos propios, antígenos no propios inocuos y de la microbiota y en este proceso es central la participación de los linfocitos T regulatorios (LTreg). Estas células pueden generarse durante la ontogenia T en el timo (LTreg naturales) o inducirse a partir de LT específicos de antígeno en la periferia (LTreg inducibles) lo que constituye un mecanismo clave del proceso de tolerancia periférica o extra-tímica. Ambas poblaciones regulatorias se caracterizan por la expresión del factor de transcripción FoxP3. Se ha demostrado en modelos animales y en patologías en humanos que mutaciones en moléculas involucradas en la tolerancia central (mutaciones en el factor de transcripción AIRE o en FoxP3) generan patologías autoinmunes muy graves con manifes-

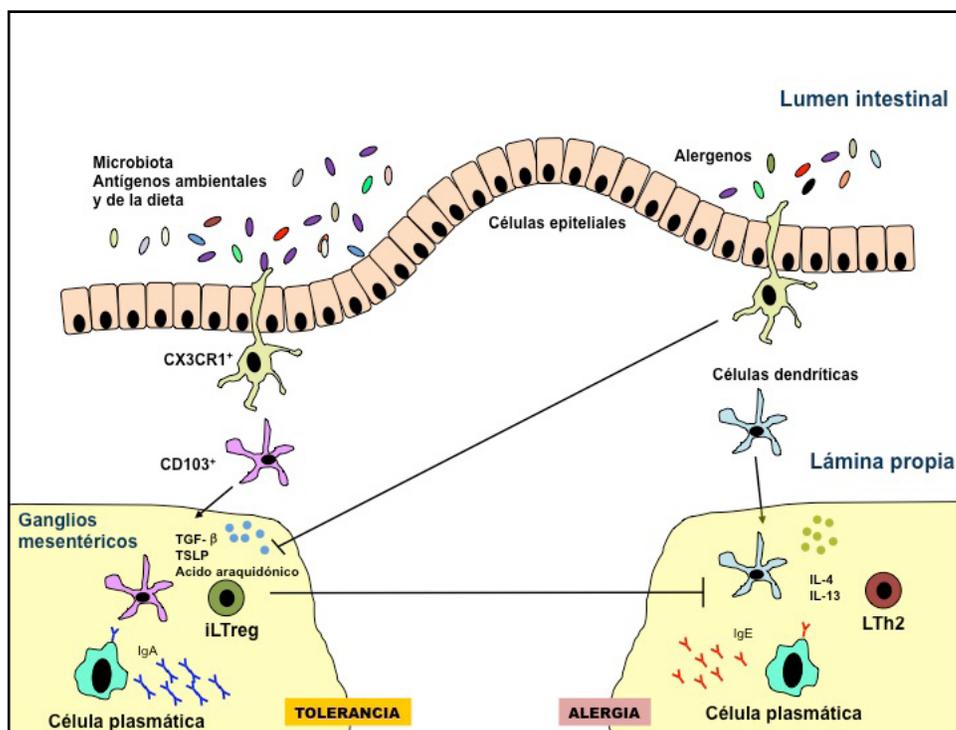


Figura 4: Esquema de los mecanismos de tolerancia y sensibilización en el tracto gastrointestinal.

i iTreg: linfocitos T regulatorios inducibles, LTh2: linfocitos T Th2.

taciones alérgicas (*APECED*-distrofia ectodérmica con candidiasis y poliendocrinopatía e *IPEX*-síndrome de enteropatía, poliendocrinopatía e inmunodesregulación ligado al X, respectivamente) lo cual demuestra la importancia de la expresión de FoxP3 en estas células y de la participación de las mismas en los mecanismos de tolerancia. Es sabido que la inducción de LTreg es altamente dependiente de las células presentadoras de antígeno y del tejido donde se produce este proceso. Esto ha determinado que las nuevas terapias para enfermedades autoinmunes y alérgicas exploten estos conceptos para inducir tolerancia específica. El sitio preferencial para la inducción de LTreg es la mucosa gastrointestinal e incluye la participación de subpoblaciones muy particulares de células dendríticas que presentan los antígenos a los LT bajo condiciones homeostáticas muy particulares (factores específicos producidos por el estroma). Se han caracterizado 2 subpoblaciones de células dendríticas que participan en este mecanismo: las que expresan el receptor CX3CR1 encargadas del muestreo de antígenos del lumen intestinal mediante la emisión de dendritas a través de la barrera epitelial, y las que expresan el marcador CD103, que reciben el antígeno de las células dendríticas antes mencionadas y migran a los ganglios mesentéricos para activar a los LT en el área T. Sin embargo, se ha demostrado que no sólo las células dendríticas intestinales inducen LTreg sino que también pueden inducirse en piel y bronquios. Estos LTreg son los encargados de controlar a las células dendríticas, linfocitos Th2 y linfocitos B (Rescigno y col. 2009).

Es ampliamente conocido que en pacientes con alergia alimentaria la respuesta inmune adaptativa a antígenos dietarios se caracteriza por la producción exacerbada de anticuerpos IgE y la presencia de LT Th2 es-

pecíficos que dirigen la diferenciación de los LB a células plasmáticas productoras de IgE. Esto constituye una evidencia que fallas a nivel de regulación podrían ser las responsables de una inmunidad adaptativa descontrolada. A pesar de que es muy difícil estudiar la respuesta celular asociada a los mecanismos regulatorios en la mucosa intestinal de pacientes con alergia alimentaria se han hallado deficiencias funcionales en los LTreg (menor producción de IL-10 y TGF- β junto a una menor expresión de FoxP3) que permiten sostener esta hipótesis (Shreffler y col. 2009, Nguyen y col. 2009, Krogulska y col. 2011). También se ha demostrado en pacientes alérgicos que existen factores asociados al órgano blanco que se encuentran alterados en comparación con un individuo normal. La linfopoyetina asociada al estroma tímico (TSLP) es el factor más ampliamente asociado a fallas a nivel de tolerancia en diferentes mucosas. Esta quimiocina, inicialmente asociada al desarrollo tímico y a la tolerancia central, actualmente se la ha descrito como un factor soluble que interviene en los mecanismos de tolerancia periférica (Pabst y col. 2012). En pacientes con asma, dermatitis atópica y alergia alimentaria se ha hallado que se encuentra excesivamente expresada y secretada en bronquios, piel e intestino, respectivamente. Se ha demostrado que TSLP induce la diferenciación a células dendríticas con capacidad de generar linfocitos LTh2 (Soumelis y col. 2002, Liu y col. 2006).

Por lo tanto, en individuos alérgicos la inmunidad adaptativa funciona inadecuadamente en las mucosas posiblemente por fallas a nivel de regulación. Por ello, las terapias que posibiliten desviar la activación del sistema inmune parecen ser los procedimientos más promisorios para el control de esta patología.

■ VIEJAS, PERO PROMETEDORAS TERAPIAS

Dado que los tratamientos farmacológicos no corrigen el defecto inmunológico ni aseguran una remisión a largo plazo, es indispensable diseñar nuevas terapias correctivas y definir guías que reduzcan el riesgo de reacciones accidentales. Como mencionamos anteriormente, actualmente se considera que los mecanismos de tolerancia no funcionan adecuadamente en pacientes alérgicos y por lo tanto es lógico considerar a los LTreg como un blanco terapéutico potencial con el objetivo de re-instaurar los mecanismos inmunorregulatorios que permitan controlar la inmunidad adaptativa. Se han realizado esfuerzos en los últimos años dirigidos a optimizar o modificar protocolos pre-existentes y se han obtenido resultados dispares. Es importante resaltar que en estos pacientes, aunque a los 5-7 años de edad la mucosa gastrointestinal normalice la inmunidad y el control de los antígenos dietarios en forma espontánea, esto no significa que el paciente se haya curado o que la patología se haya autolimitado naturalmente. Puede manifestarse en otras mucosas con un cuadro clínico diferente (asma, bronco-constricción, dermatitis, etc).

Las inmunoterapias más modernas se basan en la expansión *in vivo* de los LTreg o en la inducción de LTreg inducibles a través de la administración mucosal de antígenos dietarios en forma controlada. Dado que el principal marcador de los LTreg es el factor de transcripción FoxP3 (los marcadores de membrana son compartidos con otras subpoblaciones celulares) es muy dificultoso su aislamiento. Se están realizando esfuerzos para mejorar su caracterización fenotípica (Hoffmann y col. 2009) y su amplificación *ex vivo* (expansión clonal) de manera de poder desarrollar terapias celulares que permitan reinstaurar la

tolerancia inmune. Esta estrategia ha sido posible en modelos animales y demuestra que la hipótesis planteada puede ser un sólido argumento que aliente a profundizar los estudios de este tipo de terapias. Los trabajos de Ganeshan y col. han demostrado que ratones alérgicos presentan niveles reducidos de TGF- β y FoxP3 (Ganeshan y col. 2009) o que el bloqueo de CTLA-4 incrementa la sensibilización y los síntomas alérgicos frente al desafío antigénico (van Wijk y col. 2005, Kumar y col. 2013). Además, la delección de células que expresan FoxP3 en ratones genera una inflamación intestinal que puede ser revertida mediante la transferencia adoptiva de LTreg FoxP3⁺ (Boehm y col. 2012). Por lo tanto, a partir de estas evidencias experimentales obtenidas en modelos animales es importante establecer si en todos los pacientes las alergias alimentarias están asociadas a defectos en los LTreg.

Las primeras inmunoterapias desarrolladas se basaron en la administración subcutánea del alérgeno en cantidades crecientes (Oppenheimer y col. 1992). Aunque resultaron efectivas para picaduras de insectos y pólenes, para maní y otros alérgenos alimentarios resultaban riesgosas por la frecuente aparición de reacciones anafilácticas al enfrentar los pacientes sensibilizados con el alérgeno nocivo (Casale y col. 2011). Sin embargo, este tipo de procedimientos significó un importante avance en el tratamiento de las alergias constituyendo la base para el posterior desarrollo de la inmunoterapia oral y, más recientemente, de la inmunoterapia sublingual en la década del '80 (para huevo, leche y

maní). Estos protocolos han logrado incrementar el umbral de tolerancia para la exposición al alérgeno o al alimento alérgico en el 80% de los pacientes tratados, disminuir los niveles de IgE específica e incrementar los niveles de IgG1 e IgG4 específicos (anticuerpos bloqueantes), negativizar las pruebas cutáneas, inducir LT con fenotipos regulatorios (junto a un descenso de IL-4 y aumento de IL-10 y TGF- β) y mantener al paciente en un estado de no respuesta frente a exposiciones naturales al alérgeno durante tiempos variables una vez finalizada la inmunoterapia (Buchanan y col. 2007, Jones y col. 2009). Sin embargo, en todos los ensayos clínicos se han observado reacciones adversas, en su gran mayoría leves pero ocasionalmente severas (Staden y col. 2007). La inmunoterapia nasal ha probado ser un método efectivo, seguro y una alternativa no invasiva a la inmunoterapia subcutánea propuesta por la

Organización Mundial de la Salud (Bousquet y col. 1998). Sin embargo, es poco lo que se conoce sobre su mecanismo de acción y dosis de antígenos a emplear. Esto determina la necesidad de continuar con los estudios y establecer si el resultado alcanzado luego de la terapia es un estado de desensibilización o de tolerancia. Para lograr este fin se requieren estudios prospectivos. En este sentido definimos *desensibilización* como la no respuesta durante el tratamiento mientras que la inducción de *tolerancia* se define como la no respuesta una vez finalizado el mismo.

Posteriormente, se introdujo la inmunoterapia oral y los primeros ensayos clínicos con leche de vaca se realizaron en la década del '80 (Patriarca y col. 1984, Poisson y col. 1988). El primer ensayo al azar y con placebo se realizó recién en el 2008 en 20 pacientes con alergia a leche de vaca mediada por IgE (Skripak y

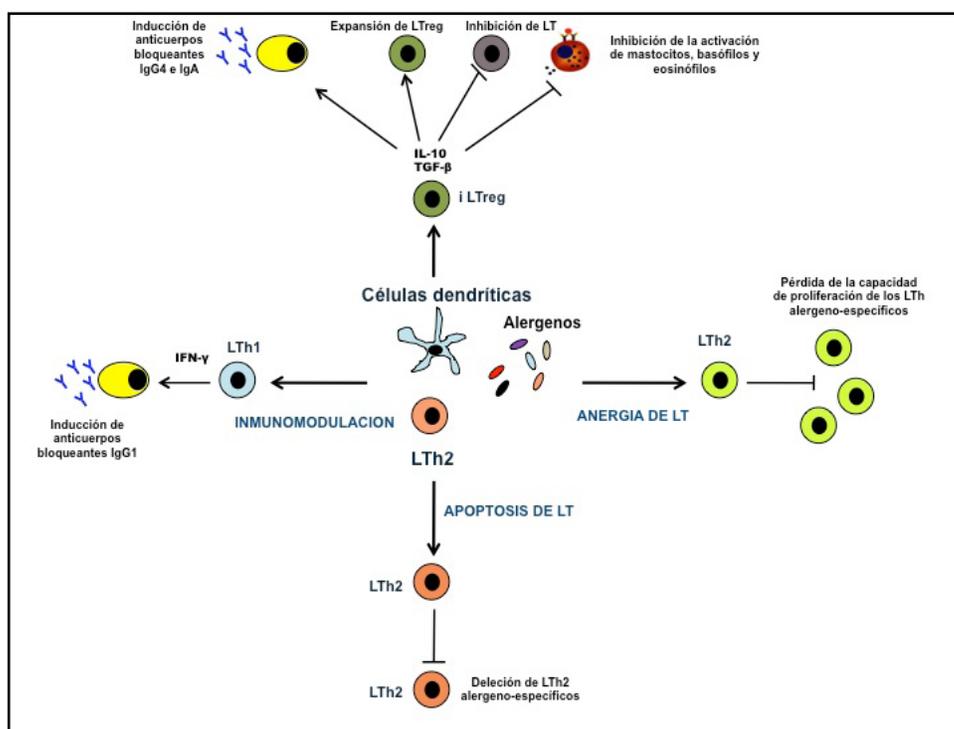


Figura 5: Mecanismos inmunológicos involucrados en las inmunoterapias alérgico-específicas.

LTh1: linfocitos T Th1, *LTh2*: linfocitos T Th2, *iLTreg*: linfocitos T regulatorios inducibles.

col. 2008). A pesar que aproximadamente un 20% de los pacientes debieron suspender el tratamiento por las reacciones adversas inducidas se alcanzó un incremento en el umbral de tolerancia 50-100 veces superior en el grupo tratado con respecto al grupo control (Staden y col. 2007).

Actualmente esta terapia constituye la mejor opción para el manejo de pacientes con alergia alimentaria. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de estudios que se están realizando, no se ha alcanzado un consenso internacional y no existe en la práctica clínica una inmunoterapia estandarizada y aprobada para su uso rutinario en pacientes (Passalacqua y col. 2012, Sheikh y col. 2012). Esto se debe a que hasta el momento los resultados conseguidos son muy dispares. Podemos destacar como el principal logro de los protocolos aplicados el incremento en el umbral de concentración del alérgeno para la inducción de reacciones de hipersensibilidad. Sin embargo, siguen existiendo limitaciones concernientes a la seguridad de los pacientes y su efectividad a largo plazo. Estas dificultades plantean que probablemente, y a diferencia de lo que se observa en los estudios realizados en modelos animales, se requieran factores adicionales (adyuvantes pro-tolerogénicos) que permitan utilizar dosis menores de antígeno y que favorezcan una expansión de LTreg más vigorosa y duradera para controlar y revertir la respuesta Th2 instaurada. En la figura 5 se muestran los diferentes mecanismos que pueden estar involucrados en una inmunoterapia de este tipo.

Los estudios más recientes han determinado que la inmunoterapia sublingual sea el tratamiento más eficaz principalmente en alergia a diversos pólenes (Canonica y col. 2009). En alergia alimentaria existen escasos estudios clínicos y se han realizado en pacientes con alergia

a avellana, kiwi, pera, maní (Kerzl y col. 2007, Fernandez Rivas y col. 2009) y leche de vaca (de Boissieu y col. 2006, Patriarca y col. 2007). Existe un único estudio que compara la inmunoterapia oral con la sublingual (Keet y col. 2011) y concluye que la principal ventaja de la inmunoterapia sublingual es la menor cantidad de alérgeno que se requiere administrar (100-400 veces) dado que es posible inducir los mecanismos de tolerancia en la mucosa oral sin la necesidad que el alérgeno alcance el intestino y sea absorbido. Esto se refleja en la menor cantidad de reacciones adversas que se observan (1/10 pacientes para inmunoterapia sublingual, respecto de 14/20 para inmunoterapia oral) por lo que se considera que esta terapia constituye un tratamiento más seguro y una opción a considerar en aquellos pacientes en los que la inmunoterapia oral desencadena reacciones adversas. Sin embargo, tampoco existe al momento un consenso internacional sobre las condiciones para su aplicación (duración, frecuencia de administración, cantidades y tipos de alérgenos, vías de administración, edad de inicio, etc). Inclusive existe la controversia sobre si es posible diseñar guías terapéuticas consensuadas o en realidad habría que definir terapias adaptadas a cada paciente para garantizar eficiencia y seguridad.

Consecuentemente, se podrían proponer las siguientes modificaciones o alternativas a introducir en las inmunoterapias tolerogénicas con el objeto de mejorar su calidad y efectividad:

-empleo de adyuvantes pro-tolerogénicos: se ha demostrado la capacidad de proteínas secretadas por microorganismos de interferir la respuesta inmune a diferentes niveles como estrategia de evasión de la respuesta inmune. En particular el grupo de Sun y col. ha logrado inducir células CD4⁺ CD25⁺ con

propiedades regulatorias empleando una proteína de *Schistosoma japonicum* que interactúa con células dendríticas (Sun y col. 2012). También se ha demostrado la capacidad de proteínas de choque térmico de origen bacteriano (homólogas a HSP 60 humana) de prevenir o atenuar el daño por procesos inflamatorios a través de la inducción de células regulatorias (Hauet Broere y col. 2006). El empleo de estos componentes como adyuvantes pro-LTreg podría ser una herramienta a considerar en inmunoterapias tolerogénicas que además permitirían reducir la dosis de antígeno.

-empleo de adyuvantes para el direccionamiento de un alérgeno a las células presentadoras de antígenos mucosales: se ha explotado esta propiedad adyuvante mediante el empleo de nanopartículas poliméricas (De Souza Rebouças y col. 2012). Esta tecnología permite además proteger al antígeno de la degradación enzimática, degradación por cambios de pH y por la acción de la bilis, su dosificación y direccionar el antígeno al sitio de procesamiento adecuado, ya que se ha demostrado que células presentadoras de antígenos intestinales fagocitan estas partículas. Se han estudiado vacunas mucosales empleando partículas de diferente tamaño (subcelular, 10-1000nm), polímeros (sintéticos y naturales), diferentes cubiertas (hidrofílicas, hidrofóbicas, con carga, etc), partículas biodegradables y no biodegradables y formas de preparación (nanoencapsuladas y nanoesferas). Estas vacunas han resultado eficientes con proteínas, péptidos y ácidos nucleicos (Csaba y col. 2009). El polímero natural más ampliamente estudiado para vacunas mucosales es el quitosano. Este polisacárido puede ser fácilmente derivatizado, es biodegradable, biocompatible y tiene la propiedad de atravesar la barrera epitelial de la mucosa intestinal y nasal. Estas pro-

iedades han determinado que se lo haya incorporado en numerosas vacunas mucosales, en particular como vacuna nasal u oral en modelos animales de alergia (Liu y col. 2009, Islam y col. 2012,). Además se ha demostrado que presenta una particular tendencia a ser captada por células dendríticas de la cavidad oral e inducir tolerancia, por lo cual representan una formulación válida para ser empleada en vacunas sublinguales (Saint-Lu y col. 2009).

-diseño de quimeras o proteínas de fusión con capacidad incrementada de inducir LTreg: el empleo de proteínas alimentarias en forma recombinante ha resultado un tratamiento muy satisfactorio en modelos animales de alergia alimentaria (Li y col. 2003). El mapeo de epitopes B y T en la mayoría de los alérgenos principales de distintos sistemas alimentarios ha posibilitado que se obtengan alérgenos recombinantes modificados con reducida capacidad de unión e IgE (epitopes IgE mutagenizados), pero que al mismo tiempo puedan estimular linfocitos T específicos. La administración de estos péptidos por vías mucosales plantea una novedosa oportunidad para inducir mecanismos de tolerancia con reducida toxicidad. La tecnología del DNA recombinante junto a la exploración de nuevos sistemas de producción de proteínas (células vegetales y plantas, células de mamíferos, etc) han posibilitado superar obstáculos y limitaciones de los sistemas convencionales de producción que ha impactado notablemente en el campo de la vacunología. La posibilidad de construir proteínas quiméricas combinando epitopes T con *linkers* en una misma molécula (Meyer y col. 2002) o fusionar epitopes T a una proteína carrier como la elastine-like protein (Soria-Guerra y col. 2011) abre nuevas perspectivas en el diseño de vacunas mucosales. Un ejemplo en este sentido lo constituye la expresión constitutiva

o transiente de péptidos tolerogénicos (contienen epitopes T) en semillas de arroz y su administración por vía oral en ratones alérgicos al polen durante 4 semanas. Se observó una reducción del score clínico frente al desafío con el alérgeno y un control de la respuesta inmune mediada por células Th2 (Takagi y col. 2005).

-combinación de terapias: a partir de los buenos resultados alcanzados mediante la combinación de inmunoterapia subcutánea con aeroalérgenos junto a una terapia a-IgE (Omalizumab) en pacientes asmáticos (Massanari y col. 2010) se ha iniciado un ensayo clínico de inmunoterapia sublingual con proteínas de maní con un pre-tratamiento con a-IgE. El argumento de esta estrategia terapéutica se centra en que el pre-tratamiento de los pacientes con Omalizumab disminuye las reacciones adversas, lo cual permite llegar a la dosis de mantenimiento en forma más rápida e inducir los mecanismos de tolerancia en forma más eficiente (Peanut Oral Immunotherapy and Anti-Immunoglobulin E for Peanut Allergy, 2009, W Burks actualmente en fase 2).

El desarrollo de nuevas terapias y la combinación de las mismas probablemente resulte satisfactorio en el control de esta patología en un futuro próximo.

■ APORTES REALIZADOS AL TEMA

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo de alergia alimentaria a leche de vaca mediado por IgE en ratones. Mediante la administración del alérgeno por vía oral junto a toxina colérica inducimos la instauración de una respuesta inmune Th2 en la mucosa intestinal, con una producción exacerbada de las citoquinas Th2 IL-5 e IL-13 a nivel local y sistémico. Al desafiar los animales con el antígeno por vía oral se observa la inducción de reacciones de hipersensibilidad que

se correlacionan con un incremento en los niveles plasmáticos de histamina y niveles elevados de IgE sérica. Por lo tanto, consideramos que este modelo reproduce la fase efectora de la alergia alimentaria que se observa en pacientes (Smaldini y col. 2012). Contar con este tipo de modelos nos permite realizar estudios que en pacientes, por cuestiones éticas, no son posibles. Por un lado nos permite estudiar aspectos moleculares y celulares de la fisiopatología de la enfermedad y por el otro nos sirve como herramienta *in vivo* para investigar nuevas terapias en desarrollo. Si bien no siempre es posible la extrapolación de los resultados obtenidos en modelos animales de experimentación al humano, constituye un paso fundamental en la investigación pre-clínica.

Hemos aplicado este modelo murino al desarrollo de diferentes *terapias tolerogénicas e inmunomodulatorias* basadas en la administración por distintas mucosas de los alérgenos o fragmentos de los mismos para revertir el cuadro alérgico. En el caso en particular de los tratamientos tolerogénicos, la administración del alérgeno por vía oral (intra-gástrica o sublingual) induce un incremento en los linfocitos LTreg FoxP3⁺ secretores de IL-10 en la lámina propia del duodeno y postulamos que serían los responsables de la notable mejoría clínica observada en los animales tratados. Estas células se encuentran disminuidas en ratones alérgicos y su inducción suprime la producción de IgE sérica, IL-5 e IL-13 y la consiguiente negativización de la prueba cutánea (Smaldini y col. 2012 y resultados aún no publicados). La aplicación de este protocolo nos permite instaurar los mecanismos de tolerancia que en esta condición se encuentran deprimidos y son los responsables de que en un individuo no alérgico no se generen mecanismos de hipersensibilidad frente a antígenos inocuos

(en este caso leche o soja) que ingresan por la vía oral. Por otro lado, en las terapias inmunomoduladoras, el empleo de componentes de membrana de bacterias que actúan como adyuvantes junto a proteínas de leche bovina permite revertir el cuadro alérgico en modelos de alergia alimentaria y de asma. En los animales tratados observamos niveles de IgE similares a los animales control, un incremento en los niveles séricos de IgG2a específicos y un descenso en los niveles de IL-5 e IL-13, con un incremento de IFN- γ a partir de la expansión *in vitro* de esplenocitos y de linfocitos T de lamina propia. Estos resultados se correlacionaron con la negativización de las pruebas cutáneas y la supresión de los niveles plasmáticos de histamina, aunque el resultado más destacable fue la disminución en el score clínico de los animales sensibilizados, tratados y desafiados oralmente con el antígeno. El mecanismo inmunorregulatorio inducido mediante este protocolo es una respuesta Th1 específica del antígeno que logra controlar la respuesta Th2 alérgica (resultados aún no publicados). Actualmente, estamos estudiando procedimientos de este tipo empleando distintos componentes inmunomoduladores (bacterias vivas, bacterias muertas, componentes de bacterias y péptidos vegetales).

Por lo tanto, el desarrollo de un modelo en ratón de alergia alimentaria a leche de vaca mediado por IgE constituye una herramienta valiosa para el estudio y validación de inmunoterapias que permiten controlar y corregir los mecanismos inmunológicos que se encuentran alterados en las alergias. Este tipo de estudios permite plantear el desarrollo de nuevas terapias a aplicar en pacientes con alergia alimentaria.

■ ALERGI A LECHE DE VACA Y SOJA

Con respecto a la historia natural de la alergia a la leche de vaca podemos resaltar que se manifiesta principalmente en la primera infancia, afectando a un 2-3% de los niños durante el primer año de vida con alrededor de un 80% de los pacientes que desarrollan una tolerancia clínica a los 5 años de edad (Sampson y col. 1999). Alrededor del 60% de los niños con alergia a leche de vaca experimentan reacciones mediadas por IgE, aproximadamente 25% de estos niños conservan dicha sensibilidad en la segunda década de la vida y un 35% pasan a tener otro tipo de alergia alimentaria (Schraner y col. 1993, Sampson y col. 1999). Esta patología refleja lo que se ha observado en otras enfermedades alérgicas con una creciente incidencia (Rona 2007) e intensidad en su manifestación (10-19% de los casos de anafilaxia inducida por alimentos) (Järvinen y col. 2008) en los últimos años.

Con respecto a la alergia a la soja se presenta con prevalencias inferiores a la alergia a leche bovina, incluso en niños atópicos (Kattan y col. 2011), en contra de lo que se esperaba en la última década en función de la gran exposición a la que se encuentra expuesta la población general. Si bien se consume soja bajo distintas formas desde hace más de 100 años, se sabe que es más importante como aeroalergeno (alergenos de la cáscara) que como alergeno alimentario (Codina y col. 2000). La sensibilización oral a los alergenos de la semilla de soja parece no ser un problema relevante, inclusive en la población pediátrica (inferior al 1.5%) por causas que se desconocen (Bruno y col. 1997, Osterballe y col. 2009). Sin embargo, en poblaciones orientales estos valores pueden llegar a un 5% que luego disminuye con la edad (Ahn y col. 2003). La alergia a la soja parece ser un pro-

blema más relevante como alergeno de sensibilización secundaria siendo la alergia a la leche de vaca uno de los alergenos involucrados (Zeiger y col. 1999, Bhatia y col. 2008). De todos modos estos trabajos deben analizarse cuidadosamente y considerar la forma en que se consume la leche y la soja, en cuanto a cantidad y formas de cocción, dado que existe una sensibilidad diferencial de los alergenos a los procesos térmicos o enzimáticos (Mittag y col. 2004). Existen trabajos que no reflejan esta situación en pacientes alérgicos a la leche dado que toleran la soja sin inconvenientes (Katz y col. 2010). El maní y el polen de abedul han sido descritos como alergenos de reactividad cruzada con la soja, aunque sólo se ha demostrado clínicamente la alergenicidad cruzada con el alergeno principal del abedul (Bet v 1) en niños y adultos (Kleine-Tebbe y col. 2002). Con respecto al desarrollo natural de la alergia a la soja, los mecanismos de tolerancia suelen instaurarse más rápidamente que en pacientes con alergia a leche. Sin embargo, en un determinado porcentaje de pacientes suele manifestarse a edades más tardías que la alergia a leche y persistir en la adultez (Savage y col. 2010).

Con respecto al tratamiento, la dieta de restricción es el procedimiento inicial e indicado para ambas alergias, sin embargo es un problema de difícil resolución principalmente en pacientes lactantes. A los inconvenientes de disponibilidad de sustitutos lácteos en nuestro medio y de composición y etiquetado de los alimentos (se emplean frecuentemente componentes de soja como suplementos, contaminantes o adulterantes de distintos alimentos y suelen no estar indicados) debemos adicionar el problema de la reactividad cruzada entre proteínas de la leche y la soja. En EEUU las fórmulas a base de soja constituyen aproximadamente el 25% del mer-

cado de fórmulas para tratamiento (Bhatia y col. 2008) y en nuestro país son una alternativa de uso frecuente principalmente por el elevado costo de los hidrolizados extensivos de leche de vaca o de las fórmulas a base de aminoácidos. Frente a todos estos inconvenientes, la inmunoterapia oral se ha transformado en una opción terapéutica de creciente interés. Existen suficientes evidencias clínicas para sostener su eficiencia en el desarrollo de tolerancia específica y en el manejo clínico del paciente. Sin embargo, se requiere continuar y profundizar los estudios para minimizar las reacciones adversas y fortalecer la instauración de los mecanismos inmunorregulatorios subyacentes.

■ REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE LECHE Y SOJA Y SU APLICACIÓN EN LAS INMUNOTERAPIAS

A partir de la nueva clasificación de los alérgenos en superfamilias de proteínas en función de su estructura y función (Breiteneder y col. 2004) se ha facilitado enormemente la comprensión de las reactividades cruzadas mediadas por IgE. Se considera que éstas básicamente se producen entre proteínas con características comunes a nivel de estructura primaria y terciaria. Se emplea el término *reactividad cruzada alérgica* para describir las situaciones clínicas que muestran una reactividad a una fuente claramente definida sin exposición previa.

Se han identificado diversos alérgenos en la leche bovina, siendo las caseínas (80% de las proteínas totales) el principal alérgeno (Wal y col. 2004, Docena y col. 1996). Esta fracción está constituida por diferentes proteínas (α S1-, α S2-, β - y κ -caseínas o Bos d 8) comprenden el 32%, 10%, 28% y 10% respectivamente del total de las proteínas. En α S1-caseína se han mapeado epítopes B prácticamente en toda

su secuencia aminoacídica lo que determina su elevada alergenicidad (Chatchatee y col. 2001, Cerecedo y col. 2008).

Entre las proteínas de soja se han reconocido 28 componentes que pueden ser reconocidos por la IgE presente en el suero de pacientes alérgicos a soja (Shibasaki y col. 1980, Awazuhara y col. 1997). Sin embargo, sólo han sido reconocidas como alérgenos por el Comité de Alérgenos de la IUIS las siguientes proteínas: proteínas hidrofóbicas de la cáscara Gly m 1 y Gly m 2 (Cordina y col. 2000) y las proteínas de semilla Gly m 3 (profilina) (Rihs y col. 1999), Gly m 4 (proteína de defensa o PR-10) (Berkner y col. 2009), Gly m 5 (β -conglícinina 11S) (Mittag y col. 2004), Gly m 6 (glicinina 7S) (Mittag y col. 2004) y Gly m Bd 30K (proteasa cisteínica) (Herman y col. 2003).

Para el caso de la alergia a la leche bovina se ha descrito ampliamente la reactividad cruzada con leches de otras especies, originada por la alta homología de secuencia que existe entre las caseínas de los mamíferos (Rozenfeld y col. 2002, Järvinen y col. 2009); mientras que para los alérgenos de la soja ya hemos mencionado al polen de abedul y proteínas del maní como los principales alérgenos de reactividad cruzada. Sobre la base de estos hallazgos ha sido posible desarrollar una inmunoterapia desensibilizante empleando un extracto de soja en un modelo de alergia alimentaria al maní (Pons y col. 2004). Con respecto a la reactividad cruzada entre alérgenos de soja y abedul existe actualmente en desarrollo un ensayo clínico de inmunoterapia subcutánea con Bet v 1 recombinante (alérgeno principal del abedul) en pacientes con alergia a soja (BASALIT-A multicentre randomised placebo-controlled double-blind clinical trial for the evaluation of efficacy of specific immunotherapy with an

aluminium hydroxide-adsorbed recombinant hypoallergenic derivative of the major birch pollen allergen r Bet v1-FV on Bet v 1 associated soy allergy, iniciado en el 2009) cuyos resultados parciales aún no han sido divulgados.

Nuestro grupo ha trabajado en el estudio de la reactividad cruzada entre alérgenos de la soja y de la leche bovina, situación que no ha sido descrita previamente. A partir de las observaciones clínicas en nuestro medio que describen que un cierto porcentaje de pacientes alérgicos a la leche desarrollan una intolerancia inmediata al recibir fórmulas a base de proteínas o hidrolizados de soja como sustitutos lácteos, como se mencionó anteriormente, decidimos estudiar sus posibles causas. Descartada la contaminación con proteínas de leche confirmamos mediante el empleo de diferentes anticuerpos específicos de proteínas de leche de vaca que existe una reactividad cruzada entre soja y las caseínas bovinas. Obtuvimos distintos alérgenos de la soja en forma recombinante y estudios inmunoquímicos nos permitieron identificar a la glicinina G4 o A5A4B3, Gly m 6.0401 (glicinina perteneciente a la superfamilia de las cupinas), Gly m 5.0101 (subunidad α de la β conglícinina) y Gly m Bd 30K/P34 (alérgeno principal de la soja) como los alérgenos de reactividad cruzada. Hemos mapeado epítopes B y T y el uso del modelo murino de alergia a leche de vaca nos permitió confirmar la relevancia clínica de esta reactividad cruzada. Animales exclusivamente alérgicos a la leche de vaca manifiestan reacciones de hipersensibilidad al exponerlos oralmente a extractos de soja o proteínas recombinantes de la soja. Estos resultados nos llevaron a desarrollar distintos protocolos experimentales para inducir tolerancia cruzada. Empleando proteínas de soja logramos disminuir el score clínico de los animales alérgicos a

leche bovina al ser expuestos a este alérgeno, inhibir la secreción de IgE, negativizar las pruebas cutáneas e inducir linfocitos T con actividad reguladora (productores de IL-10) que serían los responsables de la supresión del cuadro alérgico (Smailini y col. 2012). Inclusive hemos alcanzado resultados satisfactorios mediante la administración sublingual de Gly m Bd 30K/P34 (aún no publicado). Consideramos estos trabajos altamente promisorios para el desarrollo de una vacuna mucosal que permita controlar o prevenir la alergia a leche de vaca y soja.

Además estos resultados nos han permitido comprender porqué pacientes alérgicos a leche desarrollan una intolerancia al ser expuestos a fórmulas a base de soja y tomar las medidas preventivas necesarias (Zeiger y col. 1999, Zoppi y col. 1999, Rozenfeld y col. 2002, Docena y col. 2002, Ahn y col. 2003, Agostoni y col. 2006, Curciarello y col. 2008, Bhatia y col. 2008, Orsi y col. 2009).

■ CONCLUSIONES

Las enfermedades alérgicas son las inmunopatologías que con mayor prevalencia se presentan en el mundo. En las últimas décadas se ha producido un marcado incremento en su incidencia a tal punto que se las considera epidemias en ciertas poblaciones. Esta misma tendencia se ha observado en las alergias alimentarias y sólo puede atribuirse a cambios producidos en los factores ambientales disparadores y a modificaciones en los hábitos de vida que impactan directamente sobre la regulación del sistema inmune. Fallas detectadas a nivel de LTreg en pacientes alérgicos permiten suponer que ésta sería una de las causas de la inmunopatogenia y determinan que las actuales terapias estén dirigidas a corregir el defecto en la regulación del sistema inmune. Por lo

tanto los LTreg se han transformado en un blanco terapéutico atractivo y las inmunoterapias tolerogénicas o inmunomodulatorias constituyen actualmente terapias correctivas promisorias. En particular la alergia a leche de vaca es la principal alergia alimentaria en nuestro país y en el mundo y el control de la misma significa un desafío importante para distintas disciplinas relacionadas con la biomedicina. La exploración de la reactividad cruzada entre alérgenos de la leche y de la soja aplicada al diseño de nuevas inmunoterapias podría significar un aporte potencial que permita controlar la incidencia creciente de esta patología.

■ BIBLIOGRAFÍA

- Agostoni C., Axelsson I., Goulet O., Koletzko B., Michaelsen K., Puntis J., Rieu D., Rigo J., Shamir R., Szajewska H., et al. (2006) Soy protein infant formulae and follow-on formulae: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 42, 352–361.
- Ahn K.M., Han Y.S., Nam S.Y., Park H.Y., Shin M.Y., Lee S.I. (2003) Prevalence of soy protein hypersensitivity in cow's milk protein-sensitive children in Korea. *J Korean Med Sci*. 18, 473-7.
- Awazuhara H., Kawai H., Maruchi N. (1997) Major allergens in soybean and clinical significance of IgG4 antibodies investigated by IgE- and IgG4-immunoblotting with sera from soybean-sensitive patients. *Clin Exp Allergy* 27, 325–332.
- Bashir ME, Louie S, Shi HN, Nagler-Anderson C. (2004) Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. *J Immunol* 1, 6978-87.
- Berkner H., Neudecker P., Mittag D., Ballmer-Weber B.K., Schwei-

mer K., Vieths S., Rösch P. (2009) Cross-reactivity of pollen and food allergens: soybean Gly m 4 is a member of the Bet v 1 superfamily and closely resembles yellow lupine proteins. *Biosci Rep*. 29, 183–192.

- Beyer K., Morrow E., Li X.M., Bardina L., Bannon G.A., Burks A.W., Sampson H.A. (2001) Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *J Allergy Clin Immunol* 107, 1077-81.
- Beyer K., Castro R., Birnbaum A., Benkov K., Pittman N., and Sampson H.A. (2002) Human milk-specific mucosal lymphocytes of the gastrointestinal tract display a TH2 cytokine profile. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109, 707–713.
- Bhatia J., Greer F.; American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition. (2008) Use of soy protein-based formulas in infant feeding. *Pediatrics*. 121, 1062-8.
- Boehm F., Martin M., Kesselring R., Schiechl G., Geissler E.K., Schlitt H.J., Fichtner-Feigl S. (2012) Deletion of Foxp3+ regulatory T cells in genetically targeted mice supports development of intestinal inflammation. *BMC Gastroenterol*. 31, 12:97.
- Bousquet J., Khaltaev N., Cruz A.A., Denburg J., Fokkens W.J., Togias A., World Health Organization; GA(2)LEN; AllerGen et al. (2008) Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy* 63 Suppl 86, 8-160.
- Bousquet J., Lockey R., Malling H.J. (1998) Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J Allergy Clin Immunol*. 102, 558-62.
- Bousquet J., Van Cauwenberge P., Khaltaev N., Aria Workshop Group; World Health Organization. (2001) Allergic rhinitis and its

- impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 108, S147-334.
- Branum A.M., Lukacs S.L. (2009) Food allergy among children in the United States. *Pediatrics.* 2009 124,1549-55.
 - Breiteneder H., Radauer C. (2004) A classification of plant food allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113,821-30.
 - Brozek J.L., Bousquet J., Baena-Cagnani C.E., Bonini S., Canonica G.W., Casale T.B., Global Allergy and Asthma European Network; Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation Working Group et al. (2010) Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 revision. *J Allergy Clin Immunol.* 126, 466-76.
 - Bruno G., Giampietro P.G., Del Guercio M.J., Gallia P., Giovannini L., Lovati C., Paolucci P., Quaglio L., Zoratto E., Businco L. (1997) Soy allergy is not common in atopic children: a multicenter study. *Pediatr Allergy Immunol.* 8, 190-3.
 - Buchanan A.D., Green T.D., Jones S.M., Scurlock A.M., Christie L., Althage K.A., Steele P.H., Pons L., Helm R.M., Lee L.A., Burks A.W. (2007) Egg oral immunotherapy in nonanaphylactic children with egg allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 119, 199-205.
 - Canonica G.W., Bousquet J., Casale T., Lockey R.F., Baena-Cagnani C.E., Pawankar R. et al. (2009) Sublingual immunotherapy: World Allergy Organization Position Paper. *Allergy* 64, 1-59.
 - Casale T.B., Stokes J.R. (2011) Future forms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 127, 8-15
 - Cerededo I., Zamora J., Shreffler W.G., Lin J., Bardina L., Dieguez M.C., Wang J., Muriel A., de la Hoz B., Sampson H.A. (2008) Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay. *J Allergy Clin Immunol.* 122, 589-94.
 - Chatchatee P., Järvinen K.M., Bardina L., Vila L., Beyer K., Sampson H.A. (2001) Identification of IgE and IgG binding epitopes on beta and kappa-casein in cow's milk allergic patients. *Clin Exp Allergy.* 2001 31, 1256-62.
 - Cianferoni A., Muraro A. (2012) Food-induced anaphylaxis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 32, 165-95.
 - Cianferoni A., Spergel J.M. (2009) Food allergy: review, classification and diagnosis. *Allergol Int.* 58, 457-66.
 - Codina R., Arduoso L., Lockey R.F., Crisci C., and Bertoya, N. (2000) Sensitization to soybean hull allergens in subjects exposed to different levels of soybean dust inhalation in Argentina. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105, 570-576.
 - Csaba N., Garcia-Fuentes M., Alonso M.J.. (2009) Nanoparticles for nasal vaccination. *Adv Drug Deliv Rev.* 27, 140-57
 - Curciarello R, Lareu JF, Fossati CA, Docena GH, Petruccioli S. (2008) Immunochemical characterization of Glycine max L. Merr. var Raiden, as a possible hypoallergenic substitute for cow's milk-allergic patients. *Clin Exp Allergy.* 38, 1559-65.
 - de Boissieu D., Dupont C. (2006) Sublingual immunotherapy for cow's milk protein allergy: a preliminary report. *Allergy.* 61, 1238-9.
 - De Souza Rebouças J., Esparza I., Ferrer M., Sanz M.L, Irache J.M., Gamazo C. (2012) Nanoparticulate adjuvants and delivery systems for allergen immunotherapy. *J Biomed Biotechnol.* 2012, 474605.
 - Devereux G. (2006) The increase in the prevalence of asthma and allergy: food for thought. *Nat Rev Immunol.* 6, 869-74.
 - Docena G., Rozenfeld P., Fernández R., Fossati C.A. (2002) Evaluation of the residual antigenicity and allergenicity of cow's milk substitutes by in vitro tests. *Allergy.* 57, 83-91.
 - Docena G.H., Fernandez R., Chirido F.G., Fossati C.A. (1996) Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy.* 51, 412-6.
 - Faria A.M., Weiner H.L. (2005) Oral tolerance. *Immunol Rev.* 206, 232-59.
 - Fernández-Rivas M., Garrido Fernández S., Nadal J.A., Díaz de Durana M.D.A., García B.E., González-Mancebo E., Martín S., Barber D., Rico P., and Tabar A.I. (2009) Randomized double-blind, placebo-controlled trial of sublingual immunotherapy with a Pru p 3 quantified peach extract. *Allergy* 64, 876-883.
 - Fiocchi A., Schünemann H.J., Brozek J., Restani P., Beyer K., Troncone R., Martelli A., Terracciano L., Bahna S.L., Rancé F., Ebisawa M., Heine R.G., Assa'ad A., Sampson H., Verduci E., Bouygue G.R., Baena-Cagnani C., Canonica W., Lockey R.F.. (2010) Diagnosis and Rationale for Action Against Cow's Milk Allergy (DRACMA): a summary report. *J Allergy Clin Immunol.* 126, 1119-28.
 - Ganeshan K., Neilsen C.V., Hadsaitong A., Schleimer R.P., Luo X., Bryce P.J. (2009) Impairing oral tolerance promotes allergy and anaphylaxis: a new murine food allergy model. *J Allergy Clin Immunol.* 123, 231-238.
 - Gell P.G.H., Coombs R.R.A., eds. (1963) *Clinical Aspects of Immunology.* 1st ed. Oxford, England: Blackwell.
 - Gupta R., Sheikh A., Strachan D.P., Anderson H.R. (2007) Time trends in allergic disorders in the UK. *Thorax* 62, 91-6.
 - Hauet-Broere F., Wieten L., Guichelaar T., Berlo S., van der Zee R., Van Eden W. (2006) Heat shock proteins induce T cell regulation of chronic inflammation. *Ann Rheum Dis.* 65, 65-8.

- Herman E.M., Helm R.M., Jung R., and Kinney A.J. (2003) Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. *Plant Physiol.* 132, 36–43.
- Hoffmann P., Boeld T.J., Eder R., Huehn J., Floess S., Wiczorek G., Olek S., Dietmaier W., Andreesen R., Edinger M. (2009) Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. *Eur J Immunol.* 39, 1088–97.
- Høst A., Halken S., Jacobsen H.P., Christensen A.E., Herskind A.M., Plesner K. (2002) Clinical course of cow's milk protein allergy/intolerance and atopic diseases in childhood. *Pediatr Allergy Immunol* 13, 23–28.
- Islam M.A., Firdous J., Choi Y.J., Yun C.H., Cho C.S. (2012) Design and application of chitosan microspheres as oral and nasal vaccine carriers: an updated review. *Int J Nanomedicine* 7, 6077–93.
- Järvinen K.M., Chatchatee P. (2009) Mammalian milk allergy: clinical suspicion, cross-reactivities and diagnosis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 9, 251–8.
- Järvinen K.M., Sicherer S.H., Sampson H.A., Nowak-Węgrzyn A. (2008) Use of multiple doses of epinephrine in food-induced anaphylaxis in children. *J Allergy Clin Immunol.* 122, 133–8.
- Jones S.M., Pons L., Roberts J.L., Scurlock A.M., Perry T.T., Kulis M., Shreffler W.G., Steele P., Henry K.A., Adair M., Francis J.M., Durham S., Vickery B.P., Zhong X., Burks A.W. (2007) Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 124, 292–300.
- Kattan J.D., Cocco R.R., Järvinen K.M. (2011) Milk and soy allergy. *Pediatr Clin North Am.* 58, 407–26.
- Katz Y., Rajuan N., Goldberg M.R., Eisenberg E., Heyman E., Cohen A., Leshno M. (2010) Early exposure to cow's milk protein is protective against IgE-mediated cow's milk protein allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 126, 77–82.
- Kay A.B. (2001). Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 344, 30–37.
- Keet C.A., Frischmeyer-Guerrero P.A., Thyagarajan A., Schroeder J.T., Hamilton R.G., Boden S., Steele P., Driggers S., Burks A.W., Wood R.A. (2012) The safety and efficacy of sublingual and oral immunotherapy for milk allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 129, 448–55.
- Kerzl R., Simonowa A., Ring J., Ollert M., Mempel M. (2007) Life-threatening anaphylaxis to kiwi fruit: protective sublingual allergen immunotherapy effect persists even after discontinuation. *J Allergy Clin Immunol.* 119, 507–8.
- Kleine-Tebbe J., Vogel L., Crowell D. N., Hausteiner U. F. and Vieths, S. (2002) Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a bet v 1-related PR-10 protein in soybean, SAM22. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110, 797–804.
- Krogulska A., Borowiec M., Polakowska E., Dynowski J., Młynarski W., Wasowska-Królikowska K. (2011) FOXP3, IL-10, and TGF- β genes expression in children with IgE-dependent food allergy. *J Clin Immunol.* 31, 205–15.
- Kumar S., Verma A.K., Das M., Dwivedi P.D. (2013) A molecular insight of CTLA-4 in food allergy. *Immunol Lett.* 149, 101–9.
- Leung, D.Y.M., Sampson, H.A., Yunginger, J.W., Burks, A.W., Jr, Schneider, L.C., Wortel, C.H., Davis, F.M., Hyun, J.D., and Shanhahan, W.R., Jr (2003). Effect of anti-IgE therapy in patients with peanut allergy. *N. Engl. J. Med.* 348, 986–993.
- Li X.M., Srivastava K., Grishin A., Huang C.K., Schofield B., Burks W., Sampson H.A. (2003) Persistent protective effect of heat-killed *Escherichia coli* producing "engineered," recombinant peanut proteins in a murine model of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 112, 159–67.
- Lieberman J.A., Chehade M. (2013) Use of omalizumab in the treatment of food allergy and anaphylaxis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 13, 78–84.
- Liu, Yong-Jun (2006) Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. *J Exp Med.* 203, 269–273.
- Malling H.J. (1997) The position of immunotherapy in the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 7, 356–7.
- Massanari M., Nelson H., Casale T., Busse W., Kianifard F., Geba G.P., Zeldin R.K. (2010) Effect of pretreatment with omalizumab on the tolerability of specific immunotherapy in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 125, 383–9.
- Maurer M., Rosén K., Hsieh H.J., Saini S., Grattan C., Giménez-Arnau A., Agarwal S., Doyle R., Canvin J., Kaplan A., Casale T. (2013) Omalizumab for the Treatment of Chronic Idiopathic or Spontaneous Urticaria. *N Engl J Med.* 368, 924–935.
- McBride D., Keil T., Grabenhenrich L., Dubakiene R., Drasutiene G., Fiocchi A., Dahdah L., et al. (2012) WP 1.1 Birth Cohort Update, The EuroPrevall birth cohort study on food allergy: baseline characteristics of 12,000 newborns and their families from nine European countries. *Pediatr Allergy Immunol.* 23, 230–9.
- Meyer D.E., Chilkoti A. (2002) Genetically encoded synthesis of protein-based polymers with precisely specified molecular weight and sequence by recursive direc-

- tional ligation: examples from the elastin-like polypeptide system. *Biomacromolecules* 3, 357-67.
- Mittag D., Vieths S., Vogel L., Becker W., Rihs H., Helbling A., Wüthrich B., and Ballmer-Weber B.K. (2004) Soybean allergy in patients allergic to birch pollen: clinical investigation and molecular characterization of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 148-154.
 - Nguyen K.D., Vanichsarn C., Fohner A., Nadeau K.C.. (2009) Selective deregulation in chemokine signaling pathways of CD4+CD25(hi)CD127(lo)/(-) regulatory T cells in human allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 123, 933-9.
 - Noon L.. Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet* 1911, i: 1572-1573.
 - Okada H, Kuhn C., Feillet H., Bach J-F. (2010) The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol.* 160, 1-9.
 - Oppenheimer J.J., Nelson H.S., Bock S.A., Christensen F., Leung D.Y.. (1992) Treatment of peanut allergy with rush immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 90, 256-62.
 - Orsi M., Fernández A., Follett F.R., Marchisone S., Saieg G., Busoni V.B., Tabacco O., Toca C. (2009) Cow's milk protein allergy: proposed guidelines for the management of children with cow's milk protein allergy. *Arch Argent Pediatr.* 107, 459-67).
 - Osterballe M., Mortz C.G., Hansen T.K., Andersen K.E., Bindslev-Jensen C. (2009) The prevalence of food hypersensitivity in young adults. *Pediatr Allergy Immunol.* 20, 686-92
 - Ouwehand A.C., Isolauri E., He F., Hashimoto H., Benno Y., Salminen S. Differences in Bifidobacterium flora composition in allergic and healthy infants. *J Allergy Clin Immunol.* 108, 144-5.
 - Pabst O, Mowat A. (2012) Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol.* 5, 232-239.
 - Passalacqua G., Landi M., Pajno G.B. (2012) Oral immunotherapy for cow's milk allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 12, 271-7.
 - Patriarca C., Romano A., Venuti A., Schiavino D., Di Rienzo V., Nucera E., Pellegrino S. (1984) Oral specific hyposensitization in the management of patients allergic to food. *Allergol Immunopathol* 12, 275-81.
 - Patriarca G., Nucera E., Pollastrini E., Roncallo C., De Pasquale T., Lombardo C., Pedone C., Gasbarrini G., Buonomo A., Schiavino D. (2007) Oral specific desensitization in food-allergic children. *Dig Dis Sci.* 52, 1662-72.
 - Pereira B., Venter C., Grundy J., Clayton C.B., Arshad S.H, Dean T. (2001). Prevalence of sensitization to food allergens, reported adverse reaction to foods, food avoidance, and food hypersensitivity among teenagers. *Eur J Clin Nutr.* 55, 298-304.
 - Poisson A., Thomas G., Jean-Landais N., Giaufre E. (1988) Rapid acquired tolerance to cow's milk by oral route in a case of severe childhood food allergy. *Allerg Immunol* 20, 67-8.
 - Pons L., Ponnappan U., Hall R.A., Simpson P., Cockrell G., West C.M., Sampson H.A, Helm R.M, Burks A.W. (2004) Soy immunotherapy for peanut-allergic mice: modulation of the peanut-allergic response. *J Allergy Clin Immunol.* 114, 915-21.
 - Rescigno M. Di Sabatino A. (2009) Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *J Clin Invest.* 119, 2441-50.
 - Rihs H.P., Chen Z., Ruëff F., Petersen A., Rozynek P., Heimann H., and Baur X. (1999). IgE binding of the recombinant allergen soybean profilin (rGly m 3) is mediated by conformational epitopes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104, 1293-1301.
 - Rona R.J, Keil T., Summers C., Gislason D., Zuidmeer L., Sodergren E., Sigurdardottir S.T, Lindner T., Goldhahn K., Dahlstrom J., McBride D., Madsen C. (2007) The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 120, 638-46.
 - Rozenfeld P., Docena G.H., Añón M.C., Fossati C.A. (2002) Detection and identification of a soy protein component that cross-reacts with caseins from cow's milk. *Clin Exp Immunol.* 130, 49-58.
 - Saarinen K.M., Pelkonen A.S., Mäkelä M.J. and Savilahti, E. (2005) Clinical course and prognosis of cow's milk allergy are dependent on milk-specific IgE status. *J. Allergy Clin. Immunol* 116, 869-875.
 - Saint-Lu N., Tourdot S., Razafindratsita A., Mascarell L., Berjont N., Chabre H., Louise A., Van Overtvelt L., Moingeon P. (2009) Targeting the allergen to oral dendritic cells with mucoadhesive chitosan particles enhances tolerance induction. *Allergy.* 64, 1003-13.
 - Sampson H.A. (2004) Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 113, 805-19.
 - Sampson H.A. (1999) Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol.* 103, 717-28.
 - Savage J.H, Kaeding A.J, Matsui E.C, Wood R.A. (2010) The natural history of soy allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 125, 683-6.
 - Schrandt J.J., van den Bogart J.P., Forget P.P., Schrandt-Stumpel C.T., Kuijten R.H., Kester A.D. (1993) Cow's milk protein intolerance in infants under 1 year of age: a prospective epidemiological study. *Eur J Pediatr.* 152, 640-4.
 - Sheikh A., Nurmatov U., Venderbosch I., Bischoff E. (2012) Oral immunotherapy for the treatment of peanut allergy: systematic review of six case series studies.

- Prim Care Respir J. 21, 41-9.
- Shibasaki M., Suzuki S., Tajima S., Nemoto H., and Kuroume T. (1980) Allergenicity of major component proteins of soybean. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 61, 441-448.
 - Shreffler W.G., Wanich N., Moloney M., Nowak-Wegrzyn A., and Sampson H.A. (2009) Association of allergen-specific regulatory T cells with the onset of clinical tolerance to milk protein. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 43-52.e7.
 - Sicherer S.H., Muñoz-Furlong A., Godbold J.H., Sampson H.A. (2010) US prevalence of self-reported peanut, tree nut, and sesame allergy: 11-year follow-up. *J Allergy Clin Immunol.* 125, 1322-6.
 - Sicherer S.H., Muñoz-Furlong A., Sampson H.A. (2003) Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: a 5-year follow-up study. *J Allergy Clin Immunol.* 112, 1203-7.
 - Skripak J.M., Nash S.D., Rowley H., Brereton N.H., Oh S., Hamilton R.G., Matsui E.C., Burks A.W., Wood R.A. (2008) A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 122, 1154-60.
 - Smaldini P., Curciarello R., Candrea A., Rey M.A., Fossati C.A., Petruccelli S., Docena G.H. (2012) In vivo evidence of cross-reactivity between cow's milk and soybean proteins in a mouse model of food allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 158, 335-46.
 - Soria-Guerra R.E., Rosales-Mendoza S., Moreno-Fierros L., López-Revilla R., Alpuche-Solís A.G. (2011) Oral immunogenicity of tomato-derived sDPT polypeptide containing *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis* and *Clostridium tetani* exotoxin epitopes. *Plant Cell Rep.* 30, 417-24.
 - Soumelis V., Reche P.A., Kanzler H., Yuan W., Edward G., Homey B., Gilliet M., Ho S., Antonenko S., Lauerma A., Smith K., Gorman D., Zurawski S, Abrams J., Menon S., McClanahan T., de Waal-Malefyt R, Bazan F., Kastelein R., Liu YJ. (2002) Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol.* 3, 673-80.
 - Staden U., Rolinck-Werninghaus C., Brewe F., Wahn U., Niggemann B., Beyer K. (2007) Specific oral tolerance induction in food allergy in children: efficacy and clinical patterns of reaction. *Allergy.* 62, 1261-9.
 - Strachan D.P. (1989) Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299, 1259-1260.
 - Sudo N., Sawamura S., Tanaka K., Aiba Y., Kubo C., Koga Y. (1997) The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *Journal of Immunology* 159, 1739-45.
 - Sun X.J., Li R., Sun X., Zhou Y., Wang Y., Liu X.J., Lu Q., Zhou C.L, Wu Z.D. (2012) Unique roles of *Schistosoma japonicum* protein Sj16 to induce IFN- γ and IL-10 producing CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in vitro and in vivo. *Parasite Immunol.* 34, 430-9.
 - Takagi H., Hiroi T., Yang L., Tada Y., Yuki Y., Takamura K., Ishimitsu R., Kawachi H., Kiyono H., Takaiwa F. (2005) A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induces oral tolerance for inhibition of Th2-mediated IgE responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17525-30.
 - van Wijk F., Hoeks S., Nierkens S., Koppelman S.J, van Kooten P., Boon L., Knippels L.M, Pieters R. (2005) CTLA-4 signaling regulates the intensity of hypersensitivity responses to food antigens, but is not decisive in the induction of sensitization. *J Immunol.* 1, 174-9.
 - Wal J.M. (2004) Bovine milk allergenicity. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 93, S2-11.
 - Wang J., and Sampson H.A. (2011) Food allergy. *J. Clin. Invest.* 121, 827-835.
 - Wannemuehler M.J., Kiyono H., Babb J.L., Michalek S.M., McGhee J.R. (1982) Lipopolysaccharide (LPS) regulation of the immune response: LPS converts germfree mice to sensitivity to oral tolerance induction. *J Immunol.* 129, 959-65.
 - Weiner H.L., Friedman A., Miller A., Khoury S.J., al-Sabbagh A., Santos L., Sayegh M., Nussenblatt R.B., Trentham D.E., Hafler D.A. (1994) Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol.* 12, 809-37.
 - Wills-Karp M., Santeliz J., Karp C.L. (2001) The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol.* 1, 69-75
 - Zeiger R.S., Sampson H.A, Bock S.A, Burks A.W. Jr, Harden K., Noone S., Martin D., Leung S., Wilson G. (1999) Soy allergy in infants and children with IgE-associated cow's milk allergy. *J Pediatr.* 134, 614-22.
 - Zhu R., Zheng Y., Putnam W.S., Visich J., Eisner M.D., Matthews J.G., Rosen K.E., D'Argenio D.Z. (2013) Population-Based Efficacy Modeling of Omalizumab in Patients with Severe Allergic Asthma Inadequately Controlled with Standard Therapy. *AAPS J.* 2013 Feb 15.
 - Zoppi G., Guandalini S. (1999) The story of soy formula feeding in infants: a road paved with good intentions. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 28, 541-3.