

Alérgenos recombinantes na prática da imunoterapia*

Recombinant allergens in immunotherapy practice

Marcos Geraldini¹, Nelson A. Rosário Filho²,
Fabio Fernandes Morato Castro³, José Seba⁴, Norma P M Rubini⁵

Resumo

Tradicionalmente, extratos alérgênicos obtidos de fontes naturais têm sido utilizados para diagnóstico e tratamento. Apesar dos avanços nas técnicas de purificação e padronização de alérgenos, estes extratos permanecem produtos heterogêneos, contaminantes não alérgênicos e muitas vezes, quantidades indefinidas e até mesmo ausentes dos alérgenos relevantes. Com o uso da tecnologia de DNA recombinante, tornou-se possível caracterizar de forma precisa a natureza molecular dos alérgenos e, pela técnica de clonagem, produzir vacinas altamente purificadas. Com essas novas técnicas laboratoriais, é possível manter as mesmas características imunológicas dos alérgenos naturais ou até modificar algumas de suas propriedades, com a finalidade de reduzir a alergenicidade e aumentar a imunogenicidade. Da mesma forma, moléculas híbridas contendo epítopos de diferentes alérgenos podem ser criadas, adaptando-se ao perfil de sensibilização de cada paciente. A produção de moléculas com características imunológicas, biológicas e moleculares bem conhecidas, torna possível considerar o uso de vacinas para profilaxia. Alérgenos recombinantes são então, uma alternativa promissora no diagnóstico e tratamento das doenças com a participação de IgE.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2008; 31(3):92-97 alérgenos, imunoterapia, extratos alérgênicos, alérgenos recombinantes

Abstract

Traditionally, allergenic extracts obtained from natural sources have been used for diagnosis and therapeutics. Despite progresses on allergen purification and standardization techniques by immunochemical methods, natural extracts remain heterogeneous products, containing non-allergenic proteins, macromolecules and undefined or lacking amounts of relevant allergens. With recombinant DNA technology, it is possible to characterize the precise molecular nature and, with cloning techniques to produce highly purified vaccines keeping the natural allergen's immunologic characteristics or modifying them to reduce allergenic activity and increase immunogenicity. It is also possible to manufacture hybrid molecules containing different epitopes to suit the individual patient's sensitization profile. With production of well established immunological, biological and molecular characteristics it is possible to consider the prophylactic treatment. Research with recombinant allergens may significantly improve allergic diseases diagnosis and therapeutic.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2008; 31(3):92-97 allergens, immunotherapy, allergenic extracts, recombinant allergens

1. Mestrando em Saúde da Criança e do Adolescente, Universidade Federal do Paraná (UFPR);
2. Professor Titular do Departamento de Pediatria, UFPR;
3. Professor Livre-docente Associado da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Supervisor do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas de São Paulo;
4. Professor de Farmacologia da Universidade Federal Fluminense. Titular da Academia Fluminense de Medicina
5. Profa. Associada e Livre Docente em Alergia e Imunologia Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UniRio, Chefe do Serviço de Alergia e Imunologia do Hospital Universitário Gafarré e Guinle - UniRio

*Artigo elaborado pela Comissão de Imunomodulação da ASBAI, submetido em 02.03.2008, aceito em 15.04.2008

Introdução

O racional científico para a imunoterapia nunca foi tão forte. Contudo, a extensão do uso da imunoterapia para vários pacientes com indicação é dificultada por dois inconvenientes: preocupação com a segurança e a inconveniência dos esquemas utilizados. Em resposta a estas desvantagens, estão sendo desenvolvidos modos mais convenientes e seguros de administrar os alérgenos disponíveis ou modificações nos extratos alérgênicos¹. A indicação da imunoterapia é dificultada por dois aspectos: sua segurança e a inconveniência dos esquemas utilizados. Para contornar estas desvantagens, estão sendo desenvolvidos modos mais convenientes e seguros de administrar os

alérgenos disponíveis ou extratos alérgênicos modificados e hipoalérgênicos².

Grande preocupação existe com relação aos efeitos adversos induzidos pela imunoterapia, especialmente envolvendo os venenos de *Hymenoptera*. Diversos métodos foram desenvolvidos na tentativa de tornarem os extratos hipoalérgênicos como, por exemplo: modificações químicas do alérgeno (alergóides); adsorção do extrato em adjuvantes para prolongamento do tempo de absorção sistêmica; e, mais recentemente, a utilização de engenharia genética para modificação de propriedades antigênicas dos alérgenos (vacinas recombinantes). Estes métodos têm como objetivo principal reduzir a capacidade de ligação do material com anticorpos IgE pré-formados e manter a habilidade de interagir com linfócitos T.

Nas últimas décadas grande progresso na caracterização molecular dos alérgenos foi alcançado e os determinantes maiores mais importantes foram clonados. A estrutura tridimensional de muitos alérgenos foi determinada por técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN), cristalografia e modelos computacionais. Para muitos alérgenos a localização do resíduo aminoácido envolvido na ligação com o anticorpo e o epítipo responsável pela ativação da célula T foram elucidados. Centenas de proteínas e seqüências de nucleotídeos alérgênicos estão disponíveis no *GenBank* e outras bases de dados. Os alérgenos se tornaram uma das mais amplamente conhecidas famílias de proteínas e cada vez mais alérgenos recombinantes estão sendo produzidos para diagnóstico e tratamento de doenças alérgicas. Esta

revisão discute os principais aspectos envolvidos na utilização de vacinas recombinantes para tratamento das doenças alérgicas.

Extratos alergênicos naturais

Extratos alergênicos obtidos de fontes naturais têm sido utilizados há quase cem anos no diagnóstico e tratamento das doenças alérgicas. Durante o processo de fabricação, além dos determinantes maiores, outras proteínas alergênicas, substâncias não alergênicas e macromoléculas freqüentemente contaminam estes produtos. Os diferentes métodos de produção, aplicados por diferentes fabricantes, os tornam heterogêneos e contendo quantidades variáveis e até mesmo ausentes dos alérgenos relevantes³.

Métodos internacionais de padronização foram criados para garantir a qualidade, segurança e eficácia dos extratos alergênicos e, conseqüentemente, permitiram a redução da freqüência e gravidade das reações sistêmicas secundárias à imunoterapia. A padronização baseia-se na determinação da potência biológica *in vivo* através de testes cutâneos de hipersensibilidade imediata, e *in vitro*, através de ensaios de inibição da determinação sérica de IgE específica (RAST ou ELISA). Em ambos os casos realiza-se a comparação entre o extrato testado e um extrato considerado de referência pela Organização Mundial de Saúde⁴.

Apesar dos esforços, extratos alergênicos naturais têm grande variabilidade em suas composições, mesmo as quantidades dos componentes maiores variam consideravelmente entre produtos de diferentes empresas e entre lotes de uma mesma empresa⁵.

Oito extratos alergênicos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) foram avaliados quanto aos níveis de *Der p 1* e *Der p 2* e mostraram, em sua maioria, quantidades insignificantes destes alérgenos⁶.

Contaminações de extratos com outros alérgenos também já foram relatados e podem induzir novas sensibilizações durante a imunoterapia^{7,8}. Produtos naturais muitas vezes contêm proteases que degradam e causam perda de potência dos alérgenos maiores^{9,10}.

Variações nas respostas dos anticorpos IgG e IgE, indução de hipersensibilidade a outros alérgenos em pacientes previamente não sensibilizados assim como reações anafiláticas já foram observados^{11,12}.

As mesmas desvantagens relatadas com extratos naturais podem ser observadas com os alergóides, pois estes são obtidos dos primeiros, pelas modificações químicas difíceis de serem controladas¹³.

A ampla diversidade e heterogeneidade dos produtos naturais trazem grandes preocupações com relação à segurança e eficácia da imunoterapia.

Importância da estrutura do alérgeno para imunoterapia e indução de tolerância imunológica.

Os mecanismos envolvidos na SIT incluem modulação na resposta dos linfócitos T e B, seus anticorpos relacionados e também nas células efectoras da inflamação alérgica como eosinófilos, basófilos e mastócitos. Um dos mecanismos principais para o sucesso da SIT é a alteração da função da célula T com redução da produção das citocinas Th2 e/ou pela indução do "desvio imune" de um padrão de citocina Th2 para um Th1¹⁴.

A indução de tolerância imunológica nas células T periféricas é outro passo fundamental. Esta tolerância caracteriza-se principalmente pela produção de linfócitos T reguladores (Treg) alérgeno-específicos e pela supressão da resposta Th2 induzida pelo alérgeno. O balanço entre Th2 e Treg pode levar ao desenvolvimento ou não de alergia¹⁵.

Indivíduos saudáveis e alérgicos exibem as três populações de linfócitos (Th1, Th2 e Treg), porém em diferentes proporções. As células Treg suprimem a atividade indesejável do Th2 pela produção de IL-10 e TGF- β . Estas citocinas

inibem a produção de IgE e induzem a formação de IgG4 e IgA responsáveis por reduzir a atividade inflamatória alérgica dos mastócitos, basófilos e eosinófilos. Os níveis de linfocinas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13) que auxiliam na diferenciação, sobrevivência e atividade de células produtoras de muco, células endoteliais, plasmócitos, mastócitos, basófilos e eosinófilos, também estão reduzidos (figura 1)¹⁵⁻¹⁷.

Durante a imunoterapia com extratos convencionais, o antígeno injetado (alérgeno) é apresentado ao linfócito T, que reconhece uma seqüência de aminoácidos dispostos linearmente (epítomos de células T). Para uma vacina atingir sucesso sem risco de anafilaxia é importante expressar os epítomos de células T que induzem tolerância, porém sem apresentar sítios de ligação com anticorpos IgE.

Quando um alérgeno é administrado, ele é reconhecido tanto pelas células T (com auxílio da célula apresentadora de antígeno) como pelas células B (através de ligações com IgE). A dependência conformacional dos epítomos de células B e a linearidade dos epítomos de células T induzem diferentes respostas ao alérgeno. Alérgenos nativos utilizam apresentação de antígenos facilitada pela IgE pelas células dendríticas e células B, as quais ativam a célula T a produzir citocinas tipo Th2 que induzirão os linfócitos B a produzir mais IgE. Os alérgenos modificados, com deleção dos epítomos de células B, não se ligam à IgE. Eles são captados pelas células dendríticas, macrófagos e células B por fagocitose ou pinocitose. Desta forma, os linfócitos T são induzidos a produzir linfocinas do tipo Th1 em baixas quantidades e também induzem o desenvolvimento de células Treg. Alérgenos recombinantes podem ser reconhecidos por células T sem utilizar mecanismos IgE envolvidos. Esta estratégia permite utilizar doses maiores de alérgenos e induzir tolerância imunológica pelas células T sem risco de anafilaxia (figura 2)¹⁹.

Questões importantes no desenvolvimento das vacinas recombinantes

O primeiro passo importante no desenvolvimento das vacinas recombinantes é a seleção das fontes predominantes de alérgenos. Os critérios para esta seleção devem levar em consideração a freqüência de sensibilização, a relevância clínica, o grau de resposta à IgE e a extensão aos quais os epítomos para IgE são representados em um alérgeno. Para identificar o DNA circular (cDNA) que codifica as isoformas biologicamente ativas dos alérgenos, protocolos de seleção, utilizando anticorpos IgE obtidos de pacientes alérgicos são preferíveis, pois métodos como a PCR (*polymerase chain reaction*) podem identificar cDNAs que codificam isoformas com baixa atividade biológica. Outra questão importante é determinar se um painel de alérgenos recombinantes representa de fato a complexidade dos epítomos aos quais o paciente foi exposto e sensibilizado. Os testes de competição pela IgE, utilizando alérgenos obtidos de fontes naturais, para esclarecer esta questão podem ser realizados somente para alguns tipos de alérgenos. No caso dos ácaros, fungos e alimentos, por exemplo, é praticamente impossível obter preparações confiáveis de fontes naturais que permitam comparações acuradas entre alérgenos recombinantes e naturais. Freqüentemente novos importantes alérgenos são descobertos por técnicas de clonagem que não foram antes caracterizados por métodos proteoquímicos por não estarem contidos nos extratos alergênicos naturais. Nestes casos é importante obter um painel de alérgenos recombinantes o mais completo possível através de seleções para detecção de anticorpos IgE, e avaliar a relevância individual de cada componente¹³.

A avaliação individual das moléculas deve ser realizada em grande número de pacientes não só por métodos de detecção de IgE, mas também por provas de provocação para determinar sua relevância clínica. Estes testes preci-

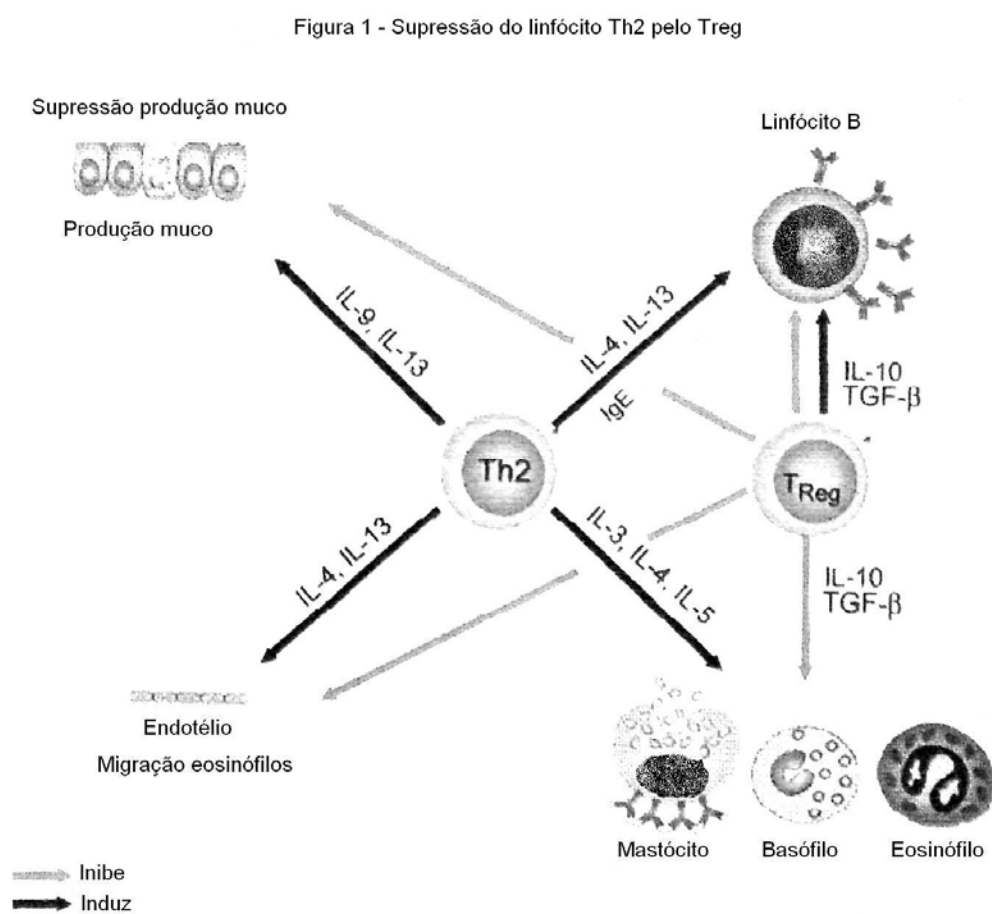
sam ser realizados em grande número de pacientes de diferentes populações. Finalmente, são necessários grandes estudos clínicos, duplo-cegos e placebo-controlados para provar a eficácia e segurança das vacinas recombinantes.

Alérgenos recombinantes

Embora grande parte dos alérgenos tenha sido caracterizada por técnicas proteoquímicas e imunoquímicas, sua natureza molecular precisa, somente foi esclarecida após

aplicação da tecnologia DNA recombinante. Alérgenos recombinantes são produzidos pela expressão do DNA circular (cDNA) que codifica o alérgeno em células procarióticas (principalmente em *Escherichia coli*). Após, sua capacidade de ligação à IgE e sua habilidade de induzir ativação específica de linfócitos T e basófilos são testadas¹⁹. Os primeiros alérgenos recombinantes foram usados com sucesso em 1994, para diagnóstico *in vivo* de alergia IgE mediada. Os testes cutâneos mostraram que eles possuem reatividade específica *in vivo* comparável aos alérgenos naturais^{20,21}.

Figura 1 – Supressão do linfócito Th2 pelo Treg

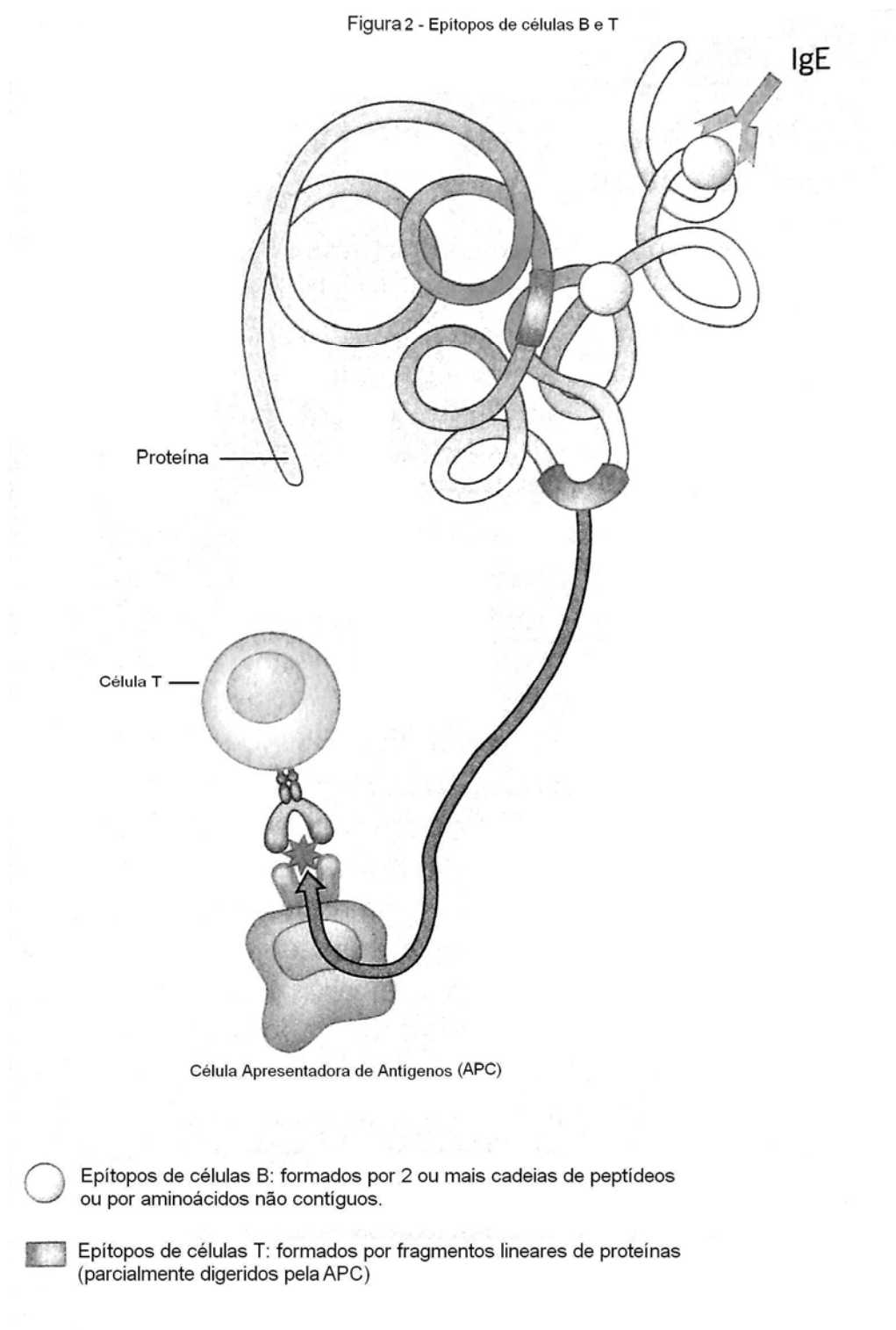


Adaptado de Akdis M *et al*, J Allergy Clin Immunol 2007;119:78

Muitos dos problemas relacionados à imunoterapia com alérgenos convencionais podem ser superados com uso de alérgenos recombinantes. Estes produtos podem ser produzidos em grande escala, com custos acessíveis e são altamente purificados. A engenharia genética permite controlar as características biológicas, imunológicas e moleculares do alérgeno tornando possível manter suas propriedades naturais ou modificá-las para diminuir sua alergeni-

cidade e aumentar sua imunogenicidade. Moléculas híbridas, com diferentes epítopos relevantes, podem também ser produzidas, adaptando-se ao perfil de sensibilização do paciente. Estas vacinas são livres de compostos irrelevantes ou desconhecidos como acontece com extratos naturais^{13,22,23}. A tabela 1 sumariza os principais métodos utilizados na modificação dos alérgenos.

Figura 2 – Epítopos de células B e T



Adaptado de Frew AJ *et al.* Immunotherapy. In Allergy. 3rd ed. Philadelphia: Mosby Elsevier;2006:179-87.

O primeiro estudo clínico usando alérgenos recombinantes para imunoterapia utilizou material hipoaerígeno modificado do pólen de bétula, Bet v 1. Neste estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego e placebo-controlado, 124 pacientes alérgicos ao pólen da bétula, receberam um único curso de tratamento imunoterápico injetável pré-sa-

zonal, utilizando uma mistura de dois fragmentos de Bet v 1 ou um *trimer* recombinante de Bet v 1 adsorvido em hidróxido de alumínio. Os estudos pré-clínicos mostraram que os fragmentos de Bet v1 recombinante (rBet v 1) e o *trimer* recombinante apresentaram atividade alérgica cem vezes menor comparada à Bet v 1 natural (nBet v 1).

Devido à natureza hipoalergênica destes derivados, os pacientes toleraram doses de manutenção de 80 mcg do ingrediente ativo e doses cumulativas de até 150 mcg. Apesar do curto período de tratamento, os pacientes exibiram resposta pronunciada de anticorpos da classe IgG (IgG₁, IgG₂, IgG₄) no soro e secreção nasal contra Bet v 1 e contra alérgenos que apresentam sensibilização cruzada a Bet v 1 como os alérgenos de maçã, cenoura, aipo e outros dois tipos de betuláceas. Não foi observado aumento significativo de anticorpos da classe IgE contra estes alérgenos. Estes achados foram associados à redução da sensibilidade cutânea e nasal a Bet v 1^{24,25}.

O uso de fragmentos peptídicos, correspondentes aos epítomos de células T para imunoterapia foram estudados na alergia ao epitélio de gato (Fel d 1) e na alergia à *Hy-*

menóptera (Api m 1) e demonstraram indução de tolerância de células T e aumento dos níveis de IL-10, contudo, ainda é preciso determinar a estabilidade dos peptídeos e o número de epítomos necessários. Outra questão importante é com relação à dose a ser administrada, pois baixas doses são insuficientes para estimular o linfócito T e altas doses podem induzir respostas inflamatórias pronunciadas²⁶.

As novas estratégias para imunoterapia específica como uso de proteínas recombinantes, peptídeos, moléculas híbridas e fragmentos são promissores, porém estão em estágio inicial de estudo em seres humanos. Além do benefício em termos de marcadores biológicos, a segurança e eficácia clínica do uso destas vacinas em longo prazo, precisam ser demonstradas.

Tabela 1 – Métodos de modificação de alérgenos

Método	Descrição
Fusão de alérgenos maiores	Alérgenos maiores (Api m 1; Api m 2) são fundidos em uma única proteína. Ligação com IgE atenuada. Reatividade de células T preservadas. Estudos em modelo animal preveniram produção de IgE.
Alérgenos quiméricos	Fragmentos dos alérgenos maiores (Api m 1,2 e 3) são fundidos e expressados como proteína única. Ligação com IgE atenuada. Reatividade de células T preservadas. Estudos em modelo animal preveniram produção de IgE.
Fragmentos de alérgenos	Alérgeno maior (Bet v 1) é dividido em fragmentos que não se ligam à IgE. Reatividade à célula T preservada. Eficácia em estudo multicêntrico randomizado.
Peptídeos de alérgenos	Epítomos peptídicos de células T que não se ligam à IgE (Fel d 1; Api m 1) usados em alergia ao epitélio de gato e veneno de abelha.
Polímeros de alérgenos	Alérgeno maior (Bet v 1) é trimerizado. Desgranulação de basófilos e mastócitos é atenuada e reatividade à célula T preservada reportados em estudo multicêntrico
Alérgenos não reestruturados	Alérgenos maiores (Bet v 1 Api m 1) não são reestruturados à conformação tridimensional nativa, preservando reatividade à célula T e diminuindo capacidade de ligação com IgE.
Mistura de alérgenos maiores	Mistura de 5 alérgenos recombinantes (Phl p 1,2,5a,5b e 6) demonstrou eficácia clínica na redução de sintomas e necessidade de medicação de alívio em pacientes sensibilizados a esta graminácea.
Alérgenos conjugados a oligonucleotídeos CpG	Nesta forma o alérgeno maior (Amb a 1) conjugado à CpG estimula o sistema imune inato através do TLR9 controlando a superexpressão Th2.
Alérgenos ligados a partículas virais	Peptídeos de Der p 1 são ligados a partículas recombinantes virais semelhante a capsídeos induzindo a produção de altos níveis de IgG.

Adaptado de Akdis M *et al*, J Allergy Clin Immunol 2007;119:780-9.

Testes diagnósticos com alérgenos recombinantes e sua contribuição para melhora na indicação e monitorização da imunoterapia

O diagnóstico de alergia com extratos alergênicos permite identificar de modo grosseiro a fonte responsável pela hipersensibilidade. É impossível distinguir qual alérgeno do ácaro *Dermatophagoides pteronissynus* é responsável por causar a hipersensibilidade em um paciente que reage ao extrato deste ácaro. Por outro lado, alérgenos recombinantes permitem identificar exatamente a molécula responsável pela hipersensibilidade. As vantagens são: a grande precisão diagnóstica e a possibilidade de discriminar co-sensibilização de sensibilização cruzada. Usando alérgenos recombinantes marcados, é possível diagnosticar sensibilização genuína contra um alérgeno, o que pode ser, em adição aos parâmetros clínicos, um importante critério para a correta indicação da imunoterapia específica. Diversos alérgenos marcados foram definidos e podem ser utilizados como marcadores diagnósticos de sensibilização aos polens, ácaros, gato e peixe. O uso destas estratégias deve facilitar a correta prescrição da imunoterapia específica. Alérgenos marcados podem também ser usados para medir a resposta à imunoterapia em termos de IgG. Os anticorpos IgG, especialmente IgG₄ demonstraram bloquear a liberação de histamina pelos basófilos mediada por IgE e

inibem a apresentação de antígenos dependente do CD23 (receptor de baixa afinidade para IgE)^{19,27}.

Alérgenos recombinantes em imunoterapia sublingual

A necessidade de múltiplas aplicações por longos períodos de tempo e a possibilidade de reações sistêmicas aos extratos alergênicos constituem os principais inconvenientes da imunoterapia subcutânea (SLIT). Embora as doses, frequência das aplicações e tempo de tratamento da SLIT serem motivo de discussão, metanálises mostram que esta é eficaz no tratamento da asma e rinite alérgica, incluindo pacientes pediátricos. As maiores vantagens oferecidas em relação à terapia subcutânea são a segurança e a conveniência para aplicação das doses, embora o tratamento por via subcutânea pareça ser mais eficiente, ao menos em curto prazo²⁸.

O valor das vacinas recombinantes para imunoterapia sublingual é incerto. As células de Langherans orais expressam ambos receptores de alta e baixa afinidade para IgE, FcεRI e FcεRII (CD 23). A estrutura e conformação dos alérgenos facilita a captura pelas células de Langherans através dos seus receptores de alta e baixa afinidade, estimulando a produção de IL-10 e TGF-β. Sendo assim, alérgenos recombinantes nativos (não modificados) são

teoricamente mais apropriados para uso na SLIT. Estudos clínicos com alérgenos recombinantes por via sublingual precisam ser conduzidos para definir o papel destas vacinas na SLIT²⁹.

Alérgenos alimentares recombinantes

Devido à degradação enzimática, alérgenos de frutas, vegetais e outros alimentos mostram atividade biológica insuficiente para serem utilizados na SIT. Procedimentos de extração especiais são necessários para obter extratos que possam ser usados para diagnóstico *in vitro* e *in vivo*. Dois estudos clínicos placebo controlados com pequeno número de pacientes alérgicos ao amendoim utilizaram extratos naturais deste alimento para dessensibilização. Estes estudos demonstraram eficácia da SIT comprovada por testes de provocação, no entanto, os efeitos colaterais foram freqüentes incluindo um caso de anafilaxia fatal. Os autores concluíram que extratos modificados com baixa alergenicidade são necessários para sua aplicação clínica. Estudo clínico em modelo murino utilizando alérgeno recombinante modificados do amendoim (Ara h 2) intranasal mostrou redução da síntese de IgE anti Ara h 2 e redução de sintomas à provocação. Bactérias são potentes estimulantes da resposta Th1 e aumentam a produção de interferon gama (IFN- γ). Ratos alérgicos a amendoim foram utilizados para comparar imunoterapia utilizando três alérgenos do amendoim (Ara h 1, Ara h 2 e Ara h 3) com três alérgenos modificados (rAra h 1, rAra h 2 e rAra h 3) e misturados a *Lysteria monocytogenes* morta por aquecimento (heat-killed *Lysteria monocytogenes* - HKLM). Aumento dos níveis de IFN- γ e redução nos níveis de IL-5 e IL-13 foram observados, assim como menor número de reações anafiláticas foram observados no grupo com alérgenos misturados à HKLM. A utilização de adjuvantes bacterianos, no entanto, pode representar um risco para uso em seres humanos e deve ser avaliada com cautela³⁰.

Conclusões

Diversos avanços foram conquistados nos últimos anos no desenvolvimento das vacinas recombinantes. As possibilidades de modificações de alérgenos para diferentes aplicações clínicas são inúmeras e a quantidade de publicações utilizando recombinantes é crescente. Estudos clínicos em grandes centros, incluindo diferentes populações ainda são necessários para confirmar a superioridade na segurança, melhor conveniência, menores custos e maior eficácia destas vacinas sobre os extratos atualmente utilizados.

Referências

- Nelson HS. Allergen immunotherapy: where is it now?. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:769-77.
- Cox L, Li JT, Nelson H, Lockett R. Allergen immunotherapy: A practice parameter second update. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120(suppl):S25-85.
- Esch R. Evaluation of allergen vaccine potency. *Curr Allergy Asthma Rep* 2006;6:402-6.
- Bousquet J, Lockett RF, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. WHO Position Paper. *Allergy* 1998;53(suppl 44):1-42.
- Niederberger V, Valenta R. Recombinant allergens for immunotherapy. Where do we stand? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004;4:549-54.
- Zavadniak AF, Rosário NA, Arruda K, Castro FFM, Solé D, Aun WT, et al. Verificação da potência de extratos alérgênicos comerciais de *Dermatophagoides pteronyssinus* para imunoterapia. *Rev bras. alerg. imunopatol.* 2004;27:46-54.
- Eng PA, Reinhold M, Gnehm HE. Long-term efficacy of pre-seasonal grass-pollen immunotherapy in children. *Allergy* 2002;57:306-11.
- Durham SR, Walker SM, Varga EM, Jacobson MR, O'Brien F, Noble W, et al. Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N Engl J Med* 1999;341:468-75.
- Esch RE. Role of proteases on the stability of allergenic extracts. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impstoffe Frankf A M* 1992;85:171-7.
- Nelson HS, Ikle D, Buchmeier A. Studies of allergen extract stability: the effects of dilution and mixing. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:382-8.
- Movérare R, Elfman L, Vesterinen E, Metso T, Haahtela T. Development of new IgE specificities to allergenic components in birch pollen extract during specific immunotherapy studied with immunoblotting and Pharmacia CAP system. *Allergy* 2002;57:423-430.
- van Hage-Hamsten M, Valenta R. Specific immunotherapy: the induction of new IgE specificities? *Allergy* 2002;57:375-378.
- Valenta R, Niederberger V. Recombinant allergens for immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:826-30.
- Frew AJ, Krishna MT, Golden DBK, Casale TB. Immunotherapy. In *Allergy*. 3rd ed. Philadelphia: Mosby Elsevier;2006:179-87.
- Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:780-9.
- Jutel M, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszczyk M, Blaser K, et al. IL-10 and TGF- β cooperate in regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol* 2003;33:1205-14.
- Akdis M, Blaser K, Akdis CA. T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:961-8.
- Kinaciyan T, Jahn-Schmid B, Radakovics A, Zwolfer B, Schreiber C, Francis JN, et al. Successful sublingual immunotherapy with birch pollen has limited effects on concomitant food allergy to apple and the immune response to the Bet v 1 homolog Mal d 1. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:937-43.
- Valenta R, Kraft D. From allergen structure to new forms of allergen-specific immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2002;14:718-27.
- Menz G, Dolecek C, Schönheit-Kenn U, Ferreira F, Moser M, Schneider T, et al. Serological and skin-test diagnosis of birch pollen allergy with recombinant Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Clin Exp Allergy* 1996;26:50-60.
- Heiss S, Mahler V, Steiner R, Spitzauer S, Schweiger C, Kraft D, Valenta R. Component-resolved diagnosis (CRD) of type I allergy with recombinant grass and tree pollen allergens by skin testing. *J Invest Dermatol* 1999;113:830-837.
- Chapman MD, Smith AM, Vailes LD, Arruda K, Dhanaraj V, Pomés A. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:409-18.
- Becker WM, Vogel L, Vieths S. Standardization of allergen extracts for Immunotherapy: Where do we stand? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006;6:470-5.
- Niederberger V, Horak F, Vrtala S, Spitzauer S, Krauth MT, Valent P, et al. Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:14677-82.
- van Hage-Hamsten M, Kronqvist M, Zetterstrom O, Johansson E, Niederberger V, Vrtala S, et al. Skin test evaluation of genetically engineered hypoallergenic derivatives of the major birch pollen allergen, Bet v 1: results obtained with a mix of two recombinant Bet v 1 fragments and recombinant Bet v 1 trimer in a Swedish population before the birch pollen season. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:969-77.
- Larché M. Update on the current status of peptide immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:906-9.
- Viets S, Scheurer S, Reindl J, Lüttkopf D, Wangorsch A, Kästner M, et al. Optimized allergen extracts and recombinant allergens in diagnostic applications. *Allergy* 2001;56:78-82.
- Nelson HS. Allergen immunotherapy: where is it now? *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:769-77.
- Moingeon P. Sublingual immunotherapy: from biological extracts to recombinant allergens. *Allergy* 2006;61:15-9.
- Nowak-Węgrzyn A. New perspectives for use of native and recombinant food proteins in treatment of food allergy. *Immunol Clin N Am* 2007;27:105-27.

Correspondência:
Marcos Geraldini
Rua Guilherme Pugsley, 1140 ap 24
80620-000 - Curitiba - PR.
Fones 0XX-41-3016.9415 e 9929.4621.
E-mail: markosgeraldini@hotmail.com