



Alérgenos recombinantes: papel no diagnóstico e na imunoterapia alérgeno-específica

Recombinant allergens: role in diagnosis and in allergen-specific immunotherapy

L. Karla Arruda, MD, PhD¹; Michelle C. R. Barbosa, PhD¹; Gil Bardini, MD, MSc¹; Ariana Campos Yang, MD, PhD²; Isabel Ruguê Genov, MD, PhD³; Adriana Santos Moreno, PhD¹

RESUMO

Nos últimos 30 anos tem havido um avanço notável na identificação, purificação e expressão recombinante de alérgenos relevantes das mais variadas fontes, incluindo ácaros, insetos, mamíferos, polens, alimentos, fungos, látex e outras fontes. Estes avanços resultaram na utilização crescente de alérgenos purificados, naturais ou recombinantes, para melhorar o diagnóstico de alergia pelos métodos que dispomos, incluindo os testes cutâneos de hipersensibilidade imediata, e os métodos *in vitro* para medida de anticorpos IgE específicos, como ImmunoCAP, ImmunoCAP-ISAC, ELISA e MARIA. Mais recentemente, o uso de alérgenos recombinantes de pólen de bétula (rBet v 1) e de gramas (coquetel de 5 alérgenos) em imunoterapia foi relatado como seguro e eficaz, com resultados comparáveis aos obtidos usando extratos naturais, em pacientes com rinoconjuntivite alérgica a polens. No presente artigo, apresentamos revisão atualizada do uso de alérgenos recombinantes em diagnóstico de alergia e em imunoterapia alérgeno-específica, incluindo novas estratégias de imunoterapia. Focalizamos na avaliação crítica de estudos que investigaram sensibilidade, especificidade, reatividade cruzada e valor prognóstico de métodos diagnósticos com uso de alérgenos recombinantes *versus* extratos naturais; nas recomendações atuais para o uso destes novos métodos na prática clínica; e na revisão de estudos clínicos com imunoterapia usando alérgenos recombinantes realizados até o momento.

Descritores: Alérgenos, dessensibilização imunológica, imunoterapia alérgeno-específica, alérgenos recombinantes.

ABSTRACT

Over the past 30 years, a great deal of progress has been made in the identification, purification, and recombinant expression of relevant allergens from various sources, including mites, insects, mammals, pollens, foods, fungi, latex, and other sources. These new developments have resulted in an increasing use of purified allergens, either natural or recombinant, to improve the diagnosis of allergy via the methods currently available, including skin tests and *in vitro* tests for measuring specific IgE antibodies, e.g., ImmunoCAP, ImmunoCAP-ISAC, ELISA, and MARIA. More recently, the use of recombinant allergens from birch pollen (rBet v 1) and from grass pollen (a cocktail of five allergens) in immunotherapy has been reported to be safe and effective, with results comparable to those obtained with natural extracts in patients with rhino-conjunctivitis due to pollen allergy. In the present article, we present an up-to-date review on the use of recombinant allergens in the diagnosis of allergy and in allergen-specific immunotherapy, including new strategies for immunotherapy. We focus on the critical analysis of studies that have investigated sensitivity, specificity, cross-reactivity, and the prognostic value of diagnostic methods that include recombinant allergens versus natural extracts; on current recommendations for the use of these new methods in clinical practice; and on the review of clinical studies using immunotherapy with recombinant allergens performed to date.

Keywords: Allergens, immunologic desensitization, allergen-specific immunotherapy, recombinant allergens.

¹ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

² Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

³ Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Correspondência para:
L. Karla Arruda
E-mail: karla@fmrp.usp.br

Não foram declarados conflitos de interesse associados à publicação deste artigo.

Submetido em 7/11/2013,
aceito em 26/11/2013.

INTRODUÇÃO

Até recentemente, os métodos para diagnóstico de alergia e tratamento de doenças alérgicas se baseavam no uso de extratos alergênicos naturais. Essas misturas heterogêneas, contendo componentes não-alergênicos, além dos alérgenos, são suscetíveis à contaminação com alérgenos de outras fontes, e podem conter enzimas proteolíticas com capacidade de reduzir a concentração de alérgeno no extrato. Os problemas associados ao uso de extratos naturais incluem dificuldades com a avaliação da potência e inconsistências inerentes à produção de extratos com conteúdo equivalente de alérgeno. Quase todas as fontes alergênicas contêm múltiplos alérgenos maiores e menores e, mesmo com o uso de técnicas modernas, é difícil padronizar essas misturas de diferentes proteínas¹.

Podemos aprimorar os produtos alergênicos naturais mediante o uso de alérgenos recombinantes, que podem proporcionar produtos alergênicos definidos com precisão para diagnóstico e tratamento de pacientes alérgicos². Alérgenos recombinantes têm sido produzidos com alto grau de pureza, em grandes quantidades, com capacidade similar de ligação à IgE quando comparados aos seus homólogos naturais, ou com modificações de modo a reduzir a reatividade à IgE (hipoalérgenos)³. Além das aplicações clínicas, o advento da clonagem molecular e da expressão de alérgenos recombinantes tem permitido uma compreensão melhor da função e estrutura dos alérgenos, e da contribuição dessas propriedades intrínsecas ao desenvolvimento de doença. A estrutura dos complexos alérgeno-anticorpo resolvida por cristalografia de raios-X revelou função de alérgenos e mecanismos de reconhecimento pelo anticorpo para o delineamento de hipoalérgenos terapêuticos^{4,5}. Assim, o conhecimento das propriedades intrínsecas dos alérgenos e dos mecanismos patológicos permitirá o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

ALÉRGENOS RECOMBINANTES PARA DIAGNÓSTICO

São várias as vantagens dos alérgenos recombinantes para finalidades diagnósticas. Esses reagentes podem ser produzidos de forma consistente com elevado grau de pureza. São reagentes específicos e mais acessíveis à padronização em unidades de massa. Ao contrário dos produtos alergênicos naturais, que possuem conteúdo variável de alérgenos específicos (mesmo os produtos padronizados), alérgenos recombinantes podem ser produzidos em concentrações definidas e com um conteúdo proteico verificável^{1,2}. Para as principais fontes de alérgenos (ácaros, polens, epitélio de animais, baratas e alimentos), é possível identificar alérgenos recombinantes que podem ser utilizados isoladamente ou em coquetéis para finalidades diagnósticas (Tabe-

la 1). Estudos realizados com alérgenos recombinantes para testes cutâneos revelaram que o uso de alérgenos recombinantes é seguro, e demonstraram eficácia variável em comparação a extratos naturais para finalidades diagnósticas, com boa eficácia diagnóstica em concentrações de 5 a 20 µg/mL em testes cutâneos de puntura².

Em estudo recentemente publicado, nós utilizamos alérgenos recombinantes de barata para definir os perfis de reatividade de IgE de pacientes alérgicos a barata no Brasil⁶. Nossos resultados demonstraram que o alérgeno dominante foi a tropomiosina de barata (alérgeno Per a 7). O teste cutâneo, com uso de um painel de 5 alérgenos recombinantes, foi realizado em 57 pacientes alérgicos a barata, e 24 pacientes (42%) tiveram resposta positiva a rPer a 7. Os resultados dos testes cutâneos acompanharam os resultados dos testes *in vitro* para IgE anti-Per a 7, com boa taxa de concordância. A frequência de sensibilização a Per a 7, de 43% a 54%, sendo considerados os testes *in vivo* e *in vitro*, respectivamente, demonstrou concordância com estudos anteriores de nosso grupo^{7,8}. Por outro lado, a reatividade aos outros alérgenos de barata testados foi notavelmente baixa. Apenas 3 (5,3%), 4 (7%), 3 (5,3%) e 4 (7%) pacientes demonstraram testes cutâneos de puntura positivos para Per a 1, Bla g 2, Bla g 4 e Bla g 5, respectivamente. No total, 28/57 (49,1%) dos participantes tiveram testes cutâneos positivos para pelo menos um alérgeno recombinante⁶. Surpreendentemente, nossos resultados foram muito diferentes daqueles obtidos entre pacientes alérgicos a barata nos Estados Unidos⁹. Utilizando ImunoCAP streptavidin® e análise multiplex por citometria de fluxo, foi demonstrado que um painel de 5 alérgenos recombinantes purificados (rBla g 1, rBla g 2, rBla g 4, rBla g 5 e rPer a 7) pôde identificar 62% dos pacientes norte-americanos alérgicos a barata. A prevalência de anticorpos da classe IgE foi mais elevada para rBla g 2 (54,4%) e rBla g 5 (37,4%), e Per a 7 foi um alérgeno menos importante, com apenas 12,7% de reatividade IgE entre os 118 soros analisados (Tabela 2)⁹. Esses resultados enfatizam a importância da identificação de diferenças regionais nos perfis de reatividade a alérgenos individuais¹⁰.

A disponibilidade de alérgenos recombinantes ampliou as possibilidades do diagnóstico resolvido por componentes (*Component Resolved Diagnosis*, CRD), empregando métodos como a tecnologia com microchips e imunoensaios. Tem se tornado evidente que CRD pode melhorar o manejo do paciente alérgico, pois essa ferramenta permite, até certo ponto, discriminar entre resultados específicos para IgE clinicamente significantes daqueles resultados clinicamente irrelevantes, e estabelecer padrões de sensibilização associados a desfechos prognósticos particulares^{11,12}. Nos últimos anos, um crescente número de alérgenos, especial-

Tabela 1 - Uso potencial de alérgenos recombinantes no diagnóstico de alergia por testes cutâneos de hipersensibilidade imediata e/ou testes sorológicos para medida de anticorpos IgE específicos

Fonte de alérgenos	Seleção de alérgeno(s) recombinante(s)*	Reatividade IgE (testes cutâneos e/ou testes <i>in vitro</i>)
Ácaro <i>D. pteronyssinus</i>	Der p 1 + Der p 2 Der p 10: para identificar sensibilização à tropomiosina	> 95% 6% a 55%
Barata	Bla g 1 + Bla g 2 + Bla g 4 + Bla g 5 + Per a 7	49% a 64%
Cachorro	Can f 1 + Can f 2	52%
Gato	Fel d 1	95%
Pólen de bétula	Bet v 1 + Bet v 2	> 95%
Pólen de grama	Phl p 1+ Phl p 5 + Phl p 2+ nPhl p 4 + Phl p 6+ +Phl p 7+ Phl p 11+Phl p 12	> 90% 95%
<i>Ragweed</i>	Amb a 1	> 90%
<i>Alternaria alternata</i>	Alt a 1	90%
Amendoim	Ara h 1 + Ara h 2 + Ara h 3	100%
Cereja	Pru av 1 + Pru av 3 + Pru av 4	95%
Látex	Hev b 5 + Hev b 6 + Hev b 7	93%
Veneno de abelha	Api m 1+ Api m 2+ Api m 3	87%

* Para algumas fontes alergênicas como gato, pólen de bétula, ácaro, *ragweed*, *Alternaria*, um ou poucos alérgenos recombinantes podem ser suficientes para uso diagnóstico. Por outro lado, para barata ou cachorro, não há alérgenos dominantes, e painel de alérgenos testado até o momento foi suficiente para identificar parte dos pacientes sensibilizados.

Tabela 2 - Reatividade IgE a alérgenos recombinantes de barata entre populações de pacientes com asma alérgicos a barata dos Estados Unidos e de Ribeirão Preto, SP, Brasil

Alérgeno	U.S. inner city ^a (n = 118)	Ribeirão Preto, SP TC ^b / ELISA (n = 57)
<i>Blattella germanica</i>		
Bla g 1	26,1%	nr
Bla g 2	54,4%	7%
Bla g 4	17,4%	5,3%
Bla g 5	37,4%	7%
<i>Periplaneta americana</i>		
Per a 1	nr	5,3% / 9%
Per a 7 (tropomiosina)	12,7%	42% / 54%
Reatividade IgE a pelo menos um alérgeno recombinante	62%	54%

^a Reatividade IgE avaliada por Streptavidin-ImmunoCAP e ensaio multiplex. Satinover et al.⁹.

^b TC, teste cutâneo de hipersensibilidade imediata (*prick test*). Barbosa et al.⁶.

nr = não realizado.

mente de plantas (polens e alimentos), estabeleceu seu papel no diagnóstico de rotina, e perfis individuais de alérgenos com reatividade IgE permitem exame mais detalhados das reações cruzadas, moléculas de risco e sensibilizações com prognóstico significativo, implicando em necessidade de aprofundamento do conhecimento por parte do alergista.

A seguir, alguns exemplos:

1. Nas alergias a pólen, a determinação de IgE para os alérgenos principais (i.e. Bet v 1: bétula; Phl p 1/5: grama) pode diferenciar clinicamente sensibilizações relevantes daquelas ocorrentes a pan-alérgenos de reação cruzada, clinicamente menos relevantes, como as profilinas (i.e. Bet v 2 e Phl p 12)¹¹.
2. Na alergia alimentar, sensibilização a proteínas de armazenamento (i.e. Ara h 2 e 3/amendoim) ou de proteínas de transferência de lipídios (i.e. Pru p 3/pêssego) indica elevado risco de anafilaxia, enquanto que sensibilização a homólogos de Bet v 1 (p.ex., Ara h 8/amendoim) está habitualmente associada a sintomas mais leves¹³.
3. Em pacientes com alergia a ovo, a presença de IgE contra ovomucoide (Gal d 1), que é estável ao calor e à digestão, foi associada a maior risco de reações graves e persistentes. Níveis de IgE para Gal d 1 > 11 kUA/L estão associados com risco alto de desenvolver reações clínicas tanto a ovo aquecido como cru, com especificidade de 95%. Por outro lado, sensibilização a ovalbumina e possivelmente a ovotransferrina e lisozima é considerada menos séria, porque essas proteínas são termolábeis e sensíveis à digestão, e pacientes podem tolerar ovos aquecidos. Em crianças com suspeita de alergia a leite de vaca ou a ovo, IgE contra Bos d 8 (caseína) do leite de vaca, e contra Gal d 1 e Gal d 2 de ovo foram os alérgenos mais frequentemente identificados, com boa capacidade de prever os resultados de testes de provocação oral com o alimento¹⁴⁻¹⁶.
4. Níveis elevados de IgE contra tropomiosina foram relacionados à gravidade dos sintomas em pacientes com alergia a camarão¹⁷⁻¹⁹. Yang et al. demonstraram que a especificidade da IgE contra tropomiosina de camarão (92,8%) foi maior do que a de IgE contra camarão (75%) em pacientes com teste de provocação oral positivo para camarão (Figura 1)¹⁷.
5. A determinação de IgE contra os alérgenos maiores Api m 1 (abelha) e Ves v 1 e Ves v 5 (vespa), possibilitou que duplas sensibilizações pudessem ser diferenciadas de reatividade cruzada nas alergias a veneno de himenópteros^{11,12}.

Além da determinação de anticorpos IgE contra alérgenos individuais purificados, atualmente é possível determinar simultaneamente IgE contra mais de 100 componentes alergênicos pelo uso da moderna

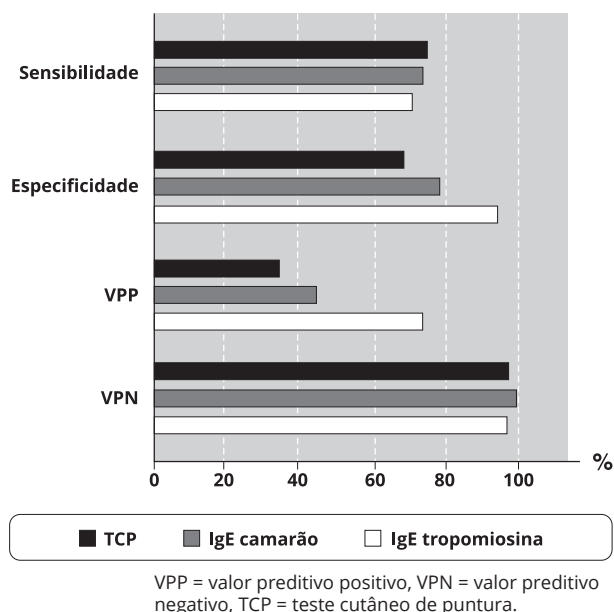


Figura 1 - Capacidade preditiva de testes cutâneos de punção com camarão, IgE para camarão e IgE para tropomiosina de camarão em relação ao teste de provocação oral com camarão. O uso de IgE para tropomiosina de camarão foi associado à especificidade diagnóstica aumentada e maior valor preditivo positivo, quando comparado ao uso de testes cutâneos com camarão e IgE para camarão por ImmunoCAP. Além disso, *positive likelihood ratios*, com respectivos 95% intervalos de confiança, foram 2 (1,01 - 3,95); 2,85 (1,29 - 6,32); e 10 (2,42 - 41,17), para testes cutâneos com camarão, IgE para camarão e IgE para tropomiosina de camarão, respectivamente, indicando um excelente valor preditivo de IgE para tropomiosina de camarão em relação ao teste de provocação oral positivo com camarão. Dados de Yang et al.¹⁷

tecnologia de biochips, utilizando apenas um volume muito pequeno de soro (30 µL). Este ensaio em fase sólida fornece resultados semiquantitativos (unidades padronizadas ISAC/ISU)^{12,20,21}.

IMUNOTERAPIA COM ALÉRGENOS RECOMBINANTES

A imunoterapia alérgeno-específica também se fundamenta no uso de produtos alergênicos naturais de alta qualidade. Diversos estudos definiram dosagens ideais para a terapia de manutenção com extratos naturais (aproximadamente 5-20 µg de alérgeno principal por dose de manutenção), mas desde o tempo de Noon o tratamento permanece essencialmente inalterado. É possível que os produtos de alérgenos naturais ofereçam vantagens para a imunoterapia, pois podem conter substâncias que conferem um efeito adjuvante para *downregulation* das respostas IgE, ou por conterem peptídeos derivados de alérgenos naturalmente digeridos.

dos que exercem efeitos nos linfócitos T. Entretanto, há pouca evidência em apoio a essas possibilidades.

Alérgenos recombinantes podem ser manipulados para a produção de hipoalérgenos que exibem reduzida capacidade de ligação a anticorpos da classe IgE, mas preservam os epitopos de linfócitos T^{22,23}. A justificativa para o uso dos hipoalérgenos é que podem ser utilizadas doses terapêuticas maiores do alérgeno, com risco reduzido de reações adversas. Apesar das numerosas vantagens potenciais do uso de alérgenos recombinantes para a imunoterapia, na última década foi pequeno o número de estudos clínicos com vacinas contendo tanto alérgenos do tipo selvagem como derivados hipoalergênicos de alérgenos recombinantes. As rigorosas exigências de produção dos alérgenos recombinantes para uso terapêutico – inclusive a preparação em condições de boas práticas de manufatura – representam um problema fundamental, que leva a programas de desenvolvimento muito dispendiosos, o que pode limitar o potencial de comercialização.

Estudos clínicos bem-sucedidos com alérgenos recombinantes, particularmente os que se concentraram em alérgenos inalantes incluindo os derivados de gato, grama, bétula e *ragweed*, e na alergia a veneno de inseto (alérgenos de abelha), demonstraram alta eficácia e bom perfil de segurança, além de forte modulação das respostas de linfócitos T e B a alérgenos específicos^{22,23}.

Estudos que avaliaram a eficácia, segurança e/ou efeitos na resposta imune de peptídeos de linfócitos T contra Fed d 1 administrados por via subcutânea ou intradérmica chegaram a resultados clínicos variáveis. Grande número de eventos adversos foi associado ao uso dessas preparações. A imunoterapia recombinante para alergia a veneno de abelha também se concentrou no uso da imunoterapia com peptídeos, que parece ser opção segura e com boa tolerância, embora estudos tenham chegado a resultados clínicos variáveis^{22,23}.

Em um estudo clínico de fase II, ficou demonstrada a eficácia de uma mistura de cinco alérgenos de pólen de grama (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5a, Phl p 5b, Phl p 6) administrados por via subcutânea, pela ocorrência de melhora significativa nos escores combinados de sintomas e diminuição do uso de medicação, e melhora na qualidade de vida, em pacientes com alergia a pólen de grama. A melhora clínica foi acompanhada por um aumento de 4.000 vezes nas concentrações de IgG4 e pela ausência de novas sensibilizações ao final do tratamento. Entretanto, foram observadas reações adversas sistêmicas em 24% dos pacientes tratados, sugerindo que os alérgenos recombinantes do tipo selvagem são tão alergênicos como os alérgenos naturais correspondentes, podendo induzir efeitos colaterais mediados por IgE durante a imunoterapia. A elevada frequência de efeitos colaterais sistêmicos também pode ter sido associada à

dose bastante elevada dos alérgenos injetados (40 µg de rPhl p)²⁴. Um estudo recente randomizado, duplo-cego e controlado com placebo, para determinação de faixa de dosagem, utilizando os mesmos alérgenos de pólen de grama (Phl p 1, 2, 5a, 5b, 6) nas doses de 20, 40, 80 ou 120 µg de proteína recombinante total de pólen grama ou placebo, demonstrou que não ocorreram efeitos adversos importantes (graus III/IV) com esse coquetel de alérgenos recombinantes principais de grama, mesmo em doses elevadas de até 120 µg²⁵.

Um estudo de fase II duplo-cego e controlado com placebo (DBPC) comparou o alérgeno recombinante de pólen de bétula rBet v 1a com extrato de pólen de bétula, alérgeno natural purificado de pólen de bétula nBet v 1 e placebo na imunoterapia subcutânea para adultos alérgicos a pólen de bétula²⁶. Em comparação com placebo, todas as preparações ativas induziram redução significativa nos escores combinados de sintomas e uso de medicação, tendo ocorrido aumento de IgG1, IgG2 e IgG4 específicos para Bet v 1 em todos os grupos. Esse estudo confirmou a prova de conceito de “não inferioridade” das vacinas recombinantes com Bet v1 do tipo selvagem em termos de eficácia clínica e de respostas imunológicas. No estudo, foi utilizada uma baixa dose de manutenção de Bet v 1 (15 µg), e isso pode explicar a baixa frequência de reações sistêmicas graves²⁶.

Outra estratégia para imunoterapia para pacientes alérgicos a pólen de bétula foi o desenvolvimento de derivados hipoalergênicos da principal isoforma de Bet v 1, mediante a expressão de três cópias do gene em sequência para a produção de um trímico, ou pela clivagem do gene, com o fim de criar dois peptídeos (fragmentos) recombinantes que, em conjunto, representam a sequência completa de Bet v 1. Estudos demonstraram melhora significativa nos escores de sintomas, escores de medicação, parâmetros de qualidade de vida e respostas imunológicas específicas para alérgenos *versus* placebo. Esses achados foram associados a um bom perfil de segurança. Um estudo DBPC recentemente publicado investigou a eficácia clínica e a dose ideal de uma nova *folded* variante recombinante hipoalergênica de Bet v 1 (rBet v 1-FV)²⁷. Antes da imunoterapia, os pacientes foram expostos ao pólen de bétula durante 8 horas em uma câmara de exposição ambiental (CEE) e em seguida randomizados para quatro doses de manutenção de rBet v 1-FV (20 µg, 80 µg, 160 µg, 320 µg) e placebo. Os pacientes foram tratados durante 10 semanas com injeções subcutâneas semanais e, depois, novamente expostos na CEE. Houve diminuição significativa no escore total dos sintomas e aumento significativo de IgG1 em todos os grupos ativos *versus* placebo. Todas as quatro doses ativas foram bem toleradas, não tendo ocorrido qualquer efeito adverso grave. Os autores concluíram

que a dose de manutenção de 80 µg de rBet v 1-FV seria a escolha ideal para a imunoterapia²⁷.

Também foi desenvolvida uma vacina de Bet v 1 recombinante, formulada como comprimido solúvel (*tablet*) para imunoterapia sublingual, para tratar pacientes adultos com rinoconjuntivite alérgica causada por pólen de bétula. Os resultados de um estudo de fase II multicêntrico, randomizado DBPC, utilizando doses diárias de 50 µg, 25 µg, 12,5 µg ou placebo durante 4 meses antes e ao longo de toda a estação do pólen de bétula, revelou eficácia clínica em todos os grupos ativos, sem que fossem notadas diferenças entre as três doses. O efeito médio nos sintomas e na medicação de resgate foi estimado em 20% a 33%, respectivamente²⁸.

O uso de um regime de imunoterapia de curta duração (6 semanas) utilizando o alérgeno Amb a 1 acoplado a conjugados imunoestimulatórios de oligonucleotídeos fosforotiolatos (AIC) tem sido o foco na alergia a *ragweed*. Dois estudos envolvendo pacientes com rinite alérgica demonstraram inicialmente que *ragweed*-AIC foi seguro e bem tolerado; entretanto, um estudo de fase II/III subsequente demonstrou que houve apenas melhora modesta e não significativa nos desfechos clínicos, tendo resultado na descontinuação da investigação clínica com esta estratégia²⁹.

Estudo recentemente publicado investigou a eficácia da administração intralinfática de alérgeno (*intralymphatic immunotherapy*, ILIT) para a alergia a gato³⁰. O principal alérgeno recombinante de gato, Fel d 1, foi modificado por fusão a peptídeos com ação de aumentar a captação citoplasmática da molécula e diminuir a degradação por fagossomos. Essas modificações de rFel d 1 resultaram em uma vacina denominada MAT-Fel d 1. Um estudo-piloto de fase I/IIa randomizado DBPC utilizando ILIT com MAT-Fel d 1 demonstrou que não ocorreram eventos adversos; houve aumento de 74 vezes da tolerância à provocação nasal; houve estimulação das respostas de células T regulatórias; e ocorreu aumento dos níveis de IgG4 específicos para epitélio de gato, depois de apenas 3 injeções intralinfáticas ao longo de um período de 2 meses³⁰.

No desenvolvimento subsequente de alérgenos recombinantes para imunoterapia, é preciso que o enfoque recaia em alérgenos importantes, como os ácaros da poeira domiciliar (*House Dust Mites*, HDM), que têm, globalmente, um papel causal bem estabelecido em doenças respiratórias alérgicas crônicas³¹. Embora tenham sido caracterizados 23 alérgenos diferentes de HDM, existem evidências consistentes de que os alérgenos dos grupos 1 e 2 representam os alérgenos de HDM clinicamente mais importantes (Figura 2). Uma combinação dos alérgenos Der p 1 e Der p 2 de *Dermatophagoides pteronyssinus* permite o diagnóstico de mais de 95% dos pacientes com alergia a HDM.

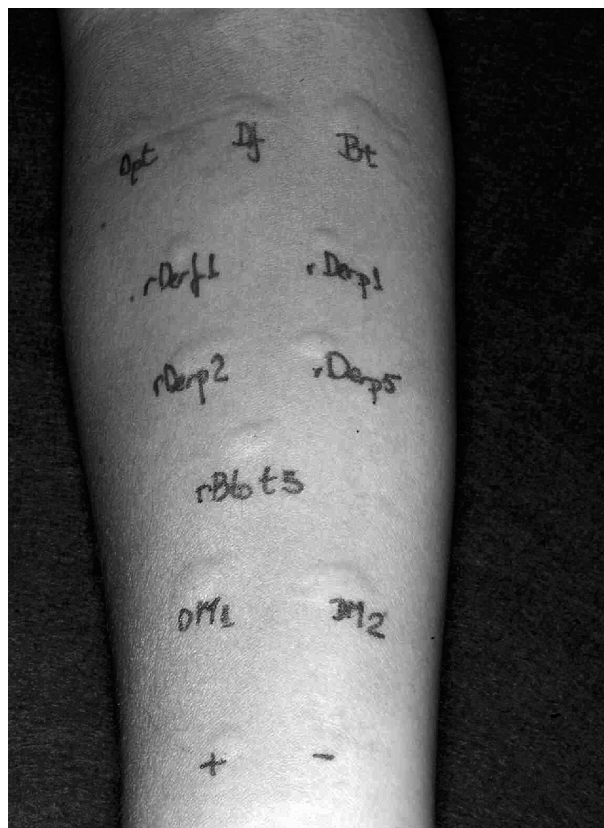


Figura 2 - Testes cutâneos positivos com extratos comerciais e alérgenos recombinantes de ácaros em paciente com rinoconjuntivite. Testes cutâneos de puntura foram realizados com extratos comerciais de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt), *D. farinae* (Df) e *Blomia tropicalis* (Bt), e com alérgenos recombinantes Der f 1 de *D. farinae*; Der p1, Der p 2 e Der p 5 de *D. pteronyssinus*; e Blo t5 de *B. tropicalis*, em concentração de 10 µg/mL cada um. DM1 foi uma mistura de alérgenos recombinantes Der f 1, Der p 1 e Der p 2, e DM2 foi uma mistura dos 5 alérgenos recombinantes. Controles positivo histamina (+) e negativo salina (-) foram incluídos. Alérgenos recombinantes de ácaros induziram fortes reações nos testes cutâneos de hipersensibilidade imediata, comparáveis àquelas causadas por extratos comerciais de ácaros

Portanto, Der p 1 e Der p 2 representam importantes candidatos à vacina.

Um estudo recente relatou o desenvolvimento de duas proteínas hipoalergênicas recombinantes, consistindo de fragmentos reconstruídos de Der p 1 e Der p 2: rDer p 2/1C (com resíduos cisteína) e rDer p 2/1S (sem resíduos cisteína)³². Em particular, rDer p 2/1S, uma molécula híbrida com ausência de todos os resíduos cisteína de ocorrência natural em Der p 1 e Der p 2, pôde ser expressa em grandes quantidades como monômero em *Escherichia coli*, e não demonstrou reatividade IgE nem atividade alérgica em pacientes com alergia a HDM; em imunização de animais, demonstrou pouca

alergenicidade e induziu anticorpos IgG que bloquearam a ligação de IgE a Der p 1 e Der p 2 em pacientes alérgicos. Assim, a vacina recombinante de combinação hipoalergênica rDer p 2/1S pode ser considerada como molécula candidata extremamente promissora para estudos clínicos de imunoterapia em pacientes com alergia a HDM³².

Algumas outras condições alérgicas, como a alergia alimentar, poderão ser consideradas no desenvolvimento futuro da imunoterapia com alérgenos recombinantes. Foram desenvolvidas vacinas contendo proteínas recombinantes modificadas de amendoim, com mutações pontuais ou polimerização proteica que modificam os epitopos antigênicos. Foi desenvolvida uma vacina contendo três proteínas recombinantes modificadas de amendoim (Ara h 1, 2 e 3) encapsuladas no interior de *E. coli* inativada por calor ou fenol (EMP-123) para administração retal em humanos; atualmente, esse produto se encontra sob investigação em um estudo clínico de fase I. A capacidade de produzir quantidades essencialmente ilimitadas de alérgenos recombinantes também nos permite considerar a investigação do uso da vacinação profilática em doenças alérgicas^{33,34}.

CONCLUSÕES

Ao longo dos próximos anos, é possível antecipar um uso cada vez maior dos alérgenos recombinantes em estudos clínicos. Essa nova situação exigirá a produção de alérgenos em condições de boas práticas de fabricação, e a aprovação dos órgãos reguladores, permitindo o uso de alérgenos recombinantes tanto para aplicações diagnósticas como terapêuticas. Já foram publicados estudos clínicos de vacinas de peptídeos derivados de alérgenos, conjugados de alérgeno-oligonucleotídeo, moléculas recombinantes do tipo selvagem e hipoalergênicas, alérgenos recombinantes modificados para administração intralinfática, etc., demonstrando eficácia clínica e bom perfil de segurança. Portanto, é possível prever a ocorrência de uma contínua incorporação de alérgenos recombinantes aos estudos de imunoterapia, que deverão resultar em vacinas mais eficazes para doenças alérgicas estabelecidas e, a longo prazo, com a perspectiva da imunização profilática.

REFERÊNCIAS

1. Chapman MD, Smith AM, Vailes LD, Arruda LK, Dhanaraj V, Pomés A. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106:409-18.
2. Jutel M, Solarewicz-Madejek K, Smolinska S. Recombinant allergens: the present and the future. *Hum Vaccin Immunother.* 2012;8(10):1534-43.
3. Linhart B & Valenta R. Mechanisms underlying allergy vaccination with recombinant hypoallergenic allergen derivatives. *Vaccine.* 2012;30:4328-35.
4. Chruszcz M, Pomés A, Glesner J, Vailes LD, Osinski T, Porebski PJ, et al. Molecular determinants for antibody binding on group 1 house dust mite allergens. *J Biol Chem.* 2012;287(10):7388-98.
5. Mueller GA, Pedersen LC, Lih FB, Glesner J, Moon AF, Chapman MD, et al. The novel structure of the cockroach allergen Bla g 1 has implications for allergenicity and exposure assessment. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Jul 31. pii: S0091-6749(13)00982-2. doi: 10.1016/j.jaci.2013.06.014. [Epub ahead of print]
6. Barbosa MC, Santos AB, Ferriani VP, Pomés A, Chapman MD, Arruda LK. Efficacy of Recombinant Allergens for Diagnosis of Cockroach Allergy in Patients with Asthma and/or Rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;161:213-9.
7. Santos AB, Chapman MD, Aalberse RC, Vailes LD, Ferriani VP, Oliver C, et al. Cockroach allergens and asthma in Brazil: identification of tropomyosin as a major allergen with potential cross-reactivity with mite and shrimp allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999;104:329-37.
8. Santos AB, Rocha GM, Oliver C, Ferriani VP, Lima RC, Palma MS, et al. Cross-reactive IgE antibody responses to tropomyosins from *Ascaris lumbricoides* and cockroach. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008;121:1040-6.
9. Satinover SM, Reefer AJ, Pomes A, Chapman MD, Platts-Mills TAE, Woodfolk AJ. Specific IgE and IgG antibody-binding patterns to recombinant cockroach allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115:803-9.
10. Pomés A, Arruda LK. Investigating cockroach allergens: Aiming to improve diagnosis and treatment of cockroach allergic patients. *Methods.* 2013 Aug 2. pii: S1046-2023(13)00285-5. doi: 10.1016/j.ymeth.2013.07.036. [Epub ahead of print]
11. Canonica GW, Ansotegui IJ, Pawankar R, Schmid-Grendelmeier P, van Hage M, Baena-Cagnani CE, et al. A WAO - ARIA - GA²LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. *World Allergy Organ J.* 2013;6(1):17. doi: 10.1186/1939-4551-6-17.
12. Treudler R & Simon JC. Overview of Component Resolved Diagnostics. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2013;13:110-7.
13. Burks AW, Tang M, Sicherer S, Muraro A, Eigenmann PA, Ebisawa M, et al. ICON: food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(4):906-20.
14. Alessandri C, Zennaro D, Scala E, Ferrara R, Bernardi ML, Santoro M, et al. Ovomucoid (Gal d 1) specific IgE detected by microarray system predict tolerability to boiled hen's egg and an increased risk to progress to multiple environmental allergen sensitisation. *Clin Exp Allergy.* 2012;42(3):441-50.
15. Caubet JC, Kondo Y, Urisu A, Nowak-Wegrzyn A. Molecular diagnosis of egg allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2011;11:210-15.
16. D'Urbano LE, Pellegrino K, Artesani MC, Donnanno S, Luciano R, Riccardi C, et al. Performance of a component-based allergen-microarray in the diagnosis of cow's milk and hen's egg allergy. *Clin Exp Allergy.* 2010;40(10):1561-70.
17. Yang AC, Arruda LK, Santos AB, Barbosa MC, Chapman MD, Galvão CE, Kalil J, Morato-Castro FF. Measurement of IgE antibodies to shrimp tropomyosin is superior to skin prick testing with commercial extract and measurement of IgE to shrimp for predicting clinically relevant allergic reactions after shrimp ingestion. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(4):872-8.
18. Gámez C, Sánchez-García S, Ibáñez MD, López R, Aguado E, López E et al. Tropomyosin IgE-positive results are a good predictor of shrimp allergy. *Allergy.* 2011;66:1375-83.
19. Arruda LK. The right timing for shrimp tropomyosins. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;160(4):331-3.
20. King EM, Filep S, Smith B, Platts-Mills T, Hamilton RG, Schmechel D, et al. A multicenter ring trial of allergen analysis using fluorescent multiplex array technology. *J Immunol Methods.* 2013;387(1-2):89-95.
21. Scala E, Alessandri C, Bernardi ML, Ferrara R, Palazzo P, Pomponi D, et al. Cross-sectional survey on immunoglobulin E reactivity in 23,077 subjects using an allergenic molecule-based microarray detection system. *Clin Exp Allergy.* 2010;40(6):911-21.

22. Makatsori M, Pfaar O, Leonart R, Calderon MA. Recombinant allergen immunotherapy: clinical evidence of efficacy - a review. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2013;13(4):371-80.
23. Valenta R, Campana R, Marth K, van Hage M. Allergen-specific immunotherapy: from therapeutic vaccines to prophylactic approaches. *J Int Med;*2012;272:144-57.
24. Jutel M, Jaeger L, Suck R, Meyer H, Fiebig H, Cromwell O. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116(3):608-13.
25. Klimek L, Schendzielorz P, Pinol R, Pfaar O. Specific subcutaneous immunotherapy with recombinant grass pollen allergens: first randomized dose-ranging safety study. *Clin Exp Allergy.* 2012;42:936-45.
26. Pauli G, Larsen TH, Rak S, Horak F, Pastorello E, Valenta R, et al. Efficacy of recombinant birch pollen vaccine for the treatment of birch-allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122(5):951-60.
27. Meyer W, Narkus A, Salapatek AM, Häfner D. Double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study of new recombinant hypoallergenic Bet v 1 in an environmental exposure chamber. *Allergy.* 2013;68:724-31.
28. Grönlund H, Gafvelin G. Recombinant Bet v 1 vaccine for treatment of allergy to birch pollen. *Hum Vaccin.* 2010 6(12):970-7.
29. Creticos PS, Schroeder JT, Hamilton RG, Balcer-Whaley SL, Khattignavong AP, Lindblad R, et al. Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N Engl J Med.* 2006;355(14):1445-55.
30. Senti G, Cramer R, Kuster D, Johansen P, Martinez-Gomez JM, Graf N, et al. Intralymphatic immunotherapy for cat allergy induces tolerance after only 3 injections. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129:1290-6.
31. Vrtala S, Huber H, Thomas WR. Recombinant house dust mite allergens. *Methods.* 2013 Jul 31. pii: S1046-2023(13)00283-1. doi: 10.1016/j.ymeth.2013.07.034. [Epub ahead of print]
32. Chen K-W, Blatt K, Thomas WR, Swoboda I, Valent P, Valenta R, Vrtala S. Hypoallergenic Der p 1/Der p 2 combination vaccines for immunotherapy of house dust mite allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130:435-43.
33. Henson M & Burks AW. The future of food allergy therapeutics. *Semin Immunopathol.* 2012;34:703-14.
34. Burks AW, Calderon MA, Casale T, Cox L, Demoly P, Jutel M, et al. Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/European Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRACTALL consensus report. *Allergy Clin Immunol.* 2013;131:1288-96.