

El **Tratado de Alergología** nació como una iniciativa de la Junta Directiva de la Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica, con la intención de agrupar y reflejar, en una única obra de dos tomos, el conocimiento actual sobre enfermedades alérgicas en español. La obra, editada por los Drs. Antonio Peláez e Ignacio J. Dávila, ha sido patrocinada por Glaxo-SmithKline y publicada por la editorial Ergon. A modo de introducción al Tratado de Alergología, y con el permiso de la SEAIC, GSK y Ergon, presentamos el primer capítulo sobre Alérgenos.

Para cualquier pregunta por favor contacten:

Dr. Anna Pomés,
INDOOR Biotechnologies, Inc.
1216 Harris Street
Charlottesville, VA 22903
Correo electrónico: apomes@inbio.com
Teléfono: 434 984 2304; Fax: 434 984 2709

Alérgenos

capítulo 1

A. Pomés, M. Villalba

ALÉRGENOS: ASPECTOS AERODINÁMICOS

Los alérgenos son proteínas o glicoproteínas capaces de inducir la producción de anticuerpos IgE específicos en individuos susceptibles de desarrollar enfermedades alérgicas. Este proceso, llamado sensibilización, tiene lugar tras la exposición al alérgeno, ya sea por inhalación (aeroalérgenos), ingestión (alérgenos de alimentos) o por inyección (alérgenos de picaduras de insectos). Las características moleculares que hacen de una molécula un alérgeno no están muy definidas, pero aspectos como el tamaño, la solubilidad, la compactación molecular y la estabilidad contribuyen notablemente a su potencia alérgica. El tamaño y la solubilidad son factores importantes, especialmente para los aeroalérgenos que acceden al organismo a través de las vías respiratorias transportados por partículas volátiles. Los aeroalérgenos son, en general, proteínas pequeñas (10-60 kDa), cuya solubilidad en medios acuosos facilita su liberación desde las partículas inhaladas al llegar al sistema respiratorio⁽¹⁾. Estas partículas volátiles pueden ser de origen diverso (heces, polen, esporas) y su tamaño determina el tiempo de permanencia en el aire y, por lo tanto, el grado de exposición al alérgeno. Las partículas de menor tamaño (~5-10 μm de diámetro) permanecen en suspensión por periodos de tiempo más prolongados que las partículas mayores (~10-40 μm), las cuales sedimentan por gravedad poco después de ser dispersadas⁽²⁾. Algunos alérgenos de los epitelios del gato y del perro se han asociado mayoritariamente a partículas pequeñas, en contraste con los alérgenos de la cucaracha y los ácaros del polvo, que son transportados por partículas fecales de mayor tamaño. En ambos casos, la exposición al alérgeno es crónica durante todo el año y tiene lugar en el interior de viviendas infestadas por cucarachas o que contienen gatos, perros o ácaros del polvo. Una exposición crónica a cantidades de estos alérgenos de entre 1-10 $\mu\text{g/g}$ de polvo al año se ha asociado con sensibilización y posible desarrollo posterior de asma⁽²⁻⁶⁾. En cambio, la exposición a alérgenos de exterior, transportados por pólenes de origen diverso, tiene lugar de modo estacional, preferentemente en primavera u otoño, dependiendo de la época de polinización de la planta que los origina. En este caso, su exposición se ha asociado al desarrollo de rinitis y conjuntivitis y, en muchos casos, también de asma⁽⁷⁾.

A diferencia de los aeroalérgenos, los alérgenos de los alimentos pueden llegar a sufrir importantes modificaciones antes de alcanzar el sistema inmunitario, debido a procesos de manufacturación o preparación del alimento y a la exposición a sistemas enzimáticos hidrolíticos en el aparato digestivo antes de ser absorbidos por el intestino. En general, los alérgenos de los alimentos son abundantes en las fuentes alimenticias que los contienen y los síntomas solamente se manifiestan en el momento de la ingestión. Los epítopos reconocidos por los anticuerpos IgE de los pacientes alérgicos tienden a ser resistentes a la acidez y a las proteasas del estómago, bien porque la proteína en la que se encuentran posee una conformación muy compacta y difícilmente accesible a las enzimas proteolíticas, o bien porque dichos epítopos son lineales y permanecen intactos, independientemente de la desnaturalización de la molécula. Aunque algunos de los alérgenos de los alimentos, especialmente los de vegetales como frutas y semillas, presentan reactividad cruzada con pólenes, la cual será descrita al final del capítulo, los alérgenos de alimentos serán objeto de un tratamiento especial en otro capítulo de este *Tratado*.

Por último, algunos alérgenos son causa de alergias ocupacionales que se desarrollan debido a una elevada exposición, generalmente por inhalación, a un determinado alérgeno durante el trabajo. En algunos casos, como la alergia al polen del azafrán, la exposición tiene lugar en el interior, a pesar del origen exterior de la fuente alérgica. Una situación similar ocurre con el látex, que es una fuente alérgica vegetal, aunque, en este caso, las manifestaciones alérgicas se originan por contacto. En otros casos, el alérgeno es inyectado por la picadura de un insecto, como en el caso de la alergia a la abeja, que también puede ser ocupacional. En este capítulo nos centraremos en los aeroalérgenos de interior y de exterior, sin incluir alérgenos de alimentos, ocupacionales, fármacos (en general, haptenos), o de picaduras de insecto, que serán analizados en otros capítulos.

AEROALÉRGENOS DE INTERIOR Y EXTERIOR

Los alérgenos pueden ser clasificados atendiendo a múltiples criterios: la vía de acceso al individuo alérgico, la capacidad de producir síntomas de forma crónica o estacional, su origen

animal o vegetal, o el lugar prioritario de exposición. Este último criterio se ha seguido en este capítulo para presentar las distintas fuentes de los principales aeroalérgenos existentes en la naturaleza. Así, se hablará de alérgenos de interior, que originan síntomas de carácter crónico y entre los que destacan los alérgenos de ácaros, cucarachas y epitelios de animales, y de alérgenos de exterior, fundamentalmente de origen vegetal, como los pólenes de gramíneas, árboles y malezas.

En los últimos diez años, con el desarrollo de la biología molecular, muchos de los alérgenos han sido clonados, producidos como proteínas recombinantes, y su estructura molecular y/o su función han sido identificadas. De la búsqueda inicial de características estructurales y funcionales comunes que confieren alergenidad a las proteínas, se ha pasado a admitir que existe una gran variedad funcional de alérgenos, reflejo de su amplia variedad estructural, y que sólo algunos de ellos se pueden agrupar bajo un perfil definido por ciertas características comunes. En esta sección daremos una visión general de los aeroalérgenos de interior y exterior, clasificados por su función. Especial énfasis se pondrá en los aspectos funcionales y estructurales que, en algunos casos, pueden influir en su alergenidad.

Alérgenos de interior

Los alérgenos de interior más importantes son de origen animal, incluyendo cucarachas, ácaros de polvo y animales domésticos, comúnmente el perro y el gato. También son producidos por animales como el caballo, la vaca, los roedores y otros insectos además de las cucarachas⁽⁸⁾. Tal como su nombre indica, están ampliamente distribuidos por todo el mundo dentro de espacios cerrados, aislados del exterior, donde son liberados junto con heces y restos de animales muertos (de cucarachas y ácaros), o secretados por tejidos epiteliales (piel, saliva) o en la orina en el caso de los vertebrados. Las cucarachas y los ácaros, al contrario de los animales domésticos que están representados por una sola especie cada uno, comprenden en conjunto miles de especies, de las cuales las productoras más importantes de alérgenos conocidos se muestran en la Tabla I. Las dos especies de cucaracha más comunes son la germánica (*Blattella germanica*) y la americana (*Periplaneta americana*)^(8,9). La primera es la más abundante en áreas como América del Norte y Europa, y la segunda se encuentra preferentemente en América del Sur y el sureste asiático. Los ácaros también están distribuidos por todo el mundo, preferentemente en zonas húmedas, y el hábitat de sus especies se superpone a pesar de las preferencias climáticas de cada una de ellas⁽¹⁰⁻¹²⁾. Así, por ejemplo, *Blomia tropicalis* es un ácaro muy común en los ambientes tropicales. En estas áreas no se pueden extrapolar las concentraciones de alérgenos tradicionalmente asociados con los síntomas y la gravedad del asma^(13,14). Algunos hongos que crecen en las zonas húmedas de las viviendas, como *Aspergillus fumigatus* y *Alternaria alternata*, también son importantes fuentes de alérgenos de interior, pero no hablaremos de ellos en este capítulo.

La reducción de los niveles de alérgenos de interior en casas de pacientes asmáticos sensibilizados, necesaria para evitar la exposición a ellos, no es fácil⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. En el caso de las cucarachas,

comprende medidas físicas, como la reducción de su acceso a comida y agua, y químicas mediante la aplicación de insecticidas, como el ácido bórico⁽⁸⁾. La exposición a alérgenos de ácaros puede ser reducida por el uso conjunto de varios métodos: el lavado semanal de sábanas a más de 55 °C, el uso de coberturas especiales para colchones y almohadas, la aplicación de acaricidas y la reducción de la humedad relativa o el filtrado del aire. Este último proceso es, sin embargo, más efectivo para capturar alérgenos que permanecen en el aire durante más tiempo que los alérgenos de ácaros⁽¹⁷⁾. El uso de bolsas de microfiltración en las aspiradoras también se recomienda para reducir los niveles de aeroalérgenos en el interior de las casas⁽¹⁶⁾.

Funciones bioquímicas de los alérgenos de interior Proteasas

Der p 1, el primer alérgeno clonado, es una cisteín-proteasa del ácaro del polvo *Dermatophagoides pteronyssinus*^(18,19) (Figura 1). Más del 80% de las personas con alergia a los ácaros poseen IgE contra el grupo 1 y más del 90%, contra el grupo 2⁽²⁰⁾. Los alérgenos de ácaros Der p 3, Der p 6 y Der p 9, identificados posteriormente, resultaron ser serín-proteasas⁽²¹⁾ (Tabla I). Recientemente, la controversia existente sobre la posibilidad de que Der p 1 tuviera una doble actividad cisteín- y serín-proteasa ha sido resuelta. La actividad serín-proteasa en las preparaciones de Der p 1 y Der f 1, purificados de extractos de ácaro es debida a la presencia contaminante de pequeñas cantidades de alérgeno del grupo 3^(22,23).

Puesto que los primeros alérgenos identificados fueron proteasas, una de las hipótesis más atractivas que se planteó para explicar la alergenidad de ciertas proteínas fue la "hipótesis enzimática" según la cual la actividad enzimática de los alérgenos, especialmente la proteolítica, es un contribuyente importante a su alergenidad. Der p 1 es el alérgeno más estudiado en el contexto de esta hipótesis, y varios mecanismos han sido propuestos para validarla: a) un incremento de la síntesis de IgE por escisión de los receptores CD23 y CD25 en las células B y T, respectivamente; b) una inducción de la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de células epiteliales bronquiales, mastocitos y basófilos a través, en parte, del receptor activado por proteasas del tipo PAR-2; c) una promoción de la inflamación de las vías respiratorias por la inactivación del inhibidor de proteasas endógeno α 1-antitripsina, y d) un inicio de la apoptosis de células epiteliales, disrupción de las uniones de oclusión intercelulares en el epitelio pulmonar e incremento de la permeabilidad bronquial. Este último efecto podría facilitar la penetración de otros alérgenos a través del epitelio pulmonar. Der p 1 también favorece una respuesta Th2, actuando sobre las células dendríticas para que produzcan menos IL-12 tras la escisión del CD40, sobre las células T para que produzcan más IL-4 y menos IFN-gamma, y sobre las células B para que produzcan más IgE⁽²⁴⁻²⁹⁾. Efectos similares a los anteriores se han descrito para las serín-proteasas de ácaros.

Hasta la fecha, unos 20 alérgenos han sido descritos, y la mayoría de ellos no son proteasas. De hecho, la mayoría de los aeroalérgenos conocidos carecen de esta actividad enzimática

TABLA I. Clasificación y funciones de los alérgenos de interior**Ácaros**

<i>Acarus siro</i> (13)	
<i>Blomia tropicalis</i> (1,3-6,10-13, 19)	
<i>Dermatophagoides farinae</i> (1-3,7,10,11,14-18)	
<i>Dermatophagoides microceras</i> (1)	
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (1-11,14,20)	
<i>Euroglyphus maynei</i> (2,14)	
<i>Glycyphagus domesticus</i> (2)	
<i>Lepidoglyphus destructor</i> (1-2,5,7,10,13)	
<i>Tyrophagus putrescentiae</i> (2,13)	
Grupo 1	Cisteín-proteasa
Grupo 2	Unión de colesterol
Grupo 3	Serín-proteasa triptica
Grupo 4	Alfa amilasa
Grupo 5	Desconocida
Grupo 6	Serín-proteasa quimotriptica
Grupo 7	Desconocida
Grupo 8	Glutación S-transferasa
Grupo 9	Serín-proteasa colagenolítica
Grupo 10	Tropomiosina
Grupo 11	Paramiosina
Grupo 12	Posible quitinasa
Grupo 13	Unión de ácidos grasos
Grupo 14	Apolipoforina
Grupo 15	Quitinasa
Grupo 16	Gelsolina/villina
Grupo 17	Unión de calcio (EF)
Grupo 18	Quitinasa
Grupo 19	Homólogo pép. antimicrobiano
Grupo 20	Arginina quinasa

Vaca

<i>Bos domesticus</i>	
• Bos d 2	Lipocalina
• Bos d 3	Unión de calcio (homólogo S-100)
• Bos d 4	α -lactoalbúmina
• Bos d 5	β -lactoglobulina
• Bos d 6	Albúmina
• Bos d 7	Inmunoglobulina
• Bos d 8	Caseína

Cobayo o conejillo de indias

<i>Cavia porcellus</i>	
• Cav p 1	Lipocalina
• Cav p 2	Lipocalina

Cucarachas

<i>Blattella germanica</i>	
• Bla g 1	Desconocida
• Bla g 2	Aspartato proteasa inactiva
• Bla g 4	Lipocalina
• Bla g 5	Glutación S-transferasa
• Bla g 6	Troponina
• Bla g 7	Tropomiosina
• Bla g 8	Cadena ligera de miosina

Periplaneta americana

• Per a 1	Desconocida
• Per a 3	Arilforina/hemocianina
• Per a 7	Tropomiosina

Gato

<i>Felis domesticus</i>	
• Fel d 1	Unión ligando desconocido
• Fel d 2	Albúmina
• Fel d 3	Cistatina
• Fel d 4	Lipocalina
• Fel d 5	Inmunoglobulina A
• Fel d 6	Inmunoglobulina M
• Fel d 7	Inmunoglobulina G

Perro

<i>Canis familiaris</i>	
• Can f 1	Lipocalina
• Can f 2	Lipocalina
• Can f 3	Albúmina
• Can f 4	Desconocida

Caballo

<i>Equus caballus</i>	
• Equ c 1	Lipocalina
• Equ c 2	Lipocalina
• Equ c 3	Albúmina - Ag3
• Equ c 4	Desconocida
• Equ c 5	AgX

Ratón

<i>Mus musculus</i>	
• Mus m 1	Lipocalina

Rata

<i>Rattus norvegicus</i>	
• Rat n 1	Lipocalina

Los números en paréntesis indican los grupos de alérgenos que han sido descritos para cada especie de ácaro. Los alérgenos con función proteolítica están indicados en **negrita cursiva**.

(Tablas I y II). Por lo tanto, aunque la actividad proteolítica del alérgeno puede contribuir al desarrollo de alergias a través de los mecanismos mencionados, no es imprescindible para su capacidad alérgica.

Otras enzimas

El grupo 4 de alérgenos de ácaros está constituido por α -amilasas, enzimas que catalizan la hidrólisis del almidón y dex-

trinas relacionadas^(30,31). En los sueros del 25% de los niños y del 46% de los adultos alérgicos a los ácaros se han detectado niveles significativos de IgE específica frente a la amilasa⁽³⁰⁾. Los cereales y hongos también producen α -amilasas asociadas al desarrollo de asma ocupacional y dermatitis, especialmente entre panaderos.

La glutación S-transferasa es otra enzima presente en los ácaros (grupo 8) y cucarachas (Bla g 5). La función de esta enzima

TABLA II. Funciones de los alérgenos de exterior

Gramíneas			
• Grupo 1	Cisteín-proteasa/ β -expansina		
• Grupo 2/3	β -expansina		
• Grupo 4	Posible flavoenzima		
• Grupo 5	Posible ribonucleasa		
• Grupo 7	Polcalcina (2EF)		
• Grupo 10	Citocromo c		
• Grupo 11	Reguladora (Ole e 1-like)		
• Grupo 12	Profilina		
• Grupo 13	Posible poligalacturonidasa		
• Grupo 15	Desconocida		
• Grupo 22	Enolasa		
Malezas			
<i>Asteraceae</i>			
• Grupo 1	Pectato liasa		
• Grupo 2	Pectato liasa		
• Grupo 3	Plastocianina		
• Grupo 5	Desconocida		
• Grupo 6	nsLTP		
• Grupo 7	Plastocianina		
• Grupo 8	Profilina		
• Grupo 9 /10	Polcalcina (2EF)		
<i>Amaranthaceae</i>			
• Che a 1	Reguladora (Ole e 1-like)		
• Che a 2	Profilina		
• Che a 3	Polcalcina (2EF)		
• Sal k 1	Pectín esterasa		
<i>Urticaceae</i>			
• Par j 1	nsLTP		
• Par j 2	nsLTP		
• Par j 3	Profilina		
<i>Euphorbiaceae</i>			
• Mer a 1	Unión actina (profilina)		
<i>Plantagineaceae</i>			
• Pla l 1	Reguladora (Ole e 1-like)		
Árboles			
<i>Betulaceae/Corylaceae</i>			
• Bet v 1/Cor a 1	Unión lípidos/ribonucleasa		
• Bet v 2	Unión actina (Profilina)		
• Bet v 3	Unión de calcio (3 EF)		
• Bet v 4	Polcalcina		
• Bet v 6	Isoflavona reductasa		
• Bet v 7	Ciclofilina		
• Bet v 8	Pectín esterasa		
<i>Fagaceae</i>			
• Que a 1/Cas s 1	Unión lípidos (Bet v 1-like)		
• Cas s 5	Quitinasa		
• Cas s 8	nsLTP		
<i>Oleaceae</i>			
• Ole e 1	Reguladora		
• Ole e 2	Profilina		
• Ole e 3	Polcalcina (2EF)		
• Ole e 4	Desconocida		
• Ole e 5	Superóxido dismutasa		
• Ole e 6	Desconocida		
• Ole e 7	nsLTP		
• Ole e 8	Unión de calcio (4 EF)		
• Ole e 9	β -1,3-glucanasa		
• Ole e 10	Unión a carbohidratos		
<i>Cupressaceae</i>			
• Jun a 1	Pectato liasa		
• Jun a 2	Polimetilgalacturonidasa		
• Jun a 3	Taumatina		
• Jun o 4	Unión de calcio (4 EF)		
• Cry j 1	Pectato liasa		
• Cry j 2	Polimetilgalacturonidasa		
• Cup s 1/Cup a 1	Posible pectato liasa		
<i>Platanaceae</i>			
• Pla a 1	Inhibidor de invertasa		
• Pla a 2	Polimetilgalacturonidasa		

es la metabolización de compuestos tóxicos, aunque se desconoce si ésta es la función de dicha enzima en la cucaracha⁽³²⁾. Un estudio reciente mostró la importancia relativa de varios alérgenos de cucaracha (rBla g 1, rBla g 2, rBla g 4, rBla g 5 y rPer a 7) en 118 sueros de individuos sensibilizados a ella. Aunque los patrones de la respuesta IgE eran únicos para cada individuo, existía una clara predominancia de sensibilización a los alérgenos Bla g 2 y Bla g 5, que mostraron los mayores valores de prevalencia (54-71% a Bla g 2 y 37-58% a Bla g 5)⁽³³⁾. La incidencia en la sensibilización a la glutatión S-transferasa de ácaro es del 40% (n = 193 sueros)⁽³⁴⁾.

Las quitinasas de los ácaros son enzimas que degradan la quitina y muestran propiedades alergénicas para el hombre y el perro⁽³⁵⁾. La quitina es un componente del exoesqueleto de los insectos y la pared celular de la mayoría de los hongos. Dos alérgenos de 98 kDa y 60 kDa son quitinasas de los grupos 15 y 18, respectivamente, mientras que un alérgeno del grupo 12 podría

ser también una quitinasa, dado un cierto grado de homología con Der f 15. Se han descrito otras quitinasas que son alérgenos de origen vegetal (látex, castaña, aguacate, banana), donde podrían funcionar como un sistema de defensa contra patógenos⁽³⁶⁾.

Inhibidores enzimáticos

Algunos alérgenos tienen una estructura molecular comparable a la de los inhibidores enzimáticos. Éste es el caso de Fel d 3, una cistatina de gato de 98 aminoácidos que es reconocida, mediante inmunoanálisis en placa, por el 60-90% de los sueros de pacientes alérgicos al gato. Su modelo molecular, basado en la estructura tridimensional de las cistatinas humanas, muestra que Fel d 3 consta de una hélice α corta y cinco hojas β plegadas interconectadas por bucles (Figura 1)⁽³⁷⁾. El primero de ellos contiene un "motivo" característico de los inhibidores de cisteín-proteasas, que incluye la secuencia QVWAG, esencial para su función. Este "motivo" también se ha encontrado de manera

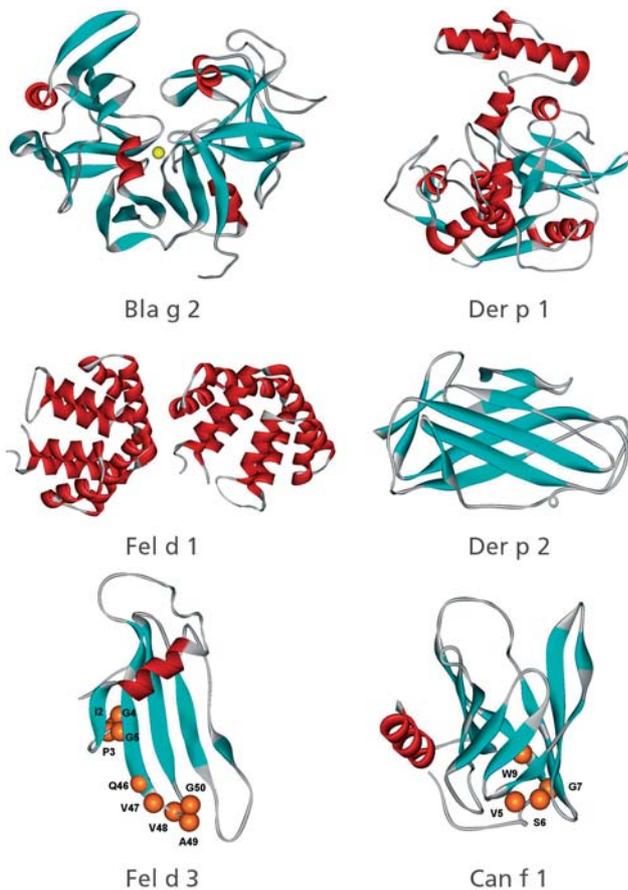


FIGURA 1. Representación de las estructuras cristalográficas de Bla g 2, Fel d 1, proDer p 1 y Der p 2, y los modelos moleculares de Can f 1 y Fel d 3. La esfera amarilla representa el átomo de cinc unido a Bla g 2. Las esferas naranja en Can f 1 y Fel d 3 muestran los carbonos alfa de los aminoácidos que podrían estar involucrados en la inhibición de cisteín-proteasas. Los códigos de acceso a las coordenadas en el Protein Data Bank son 1yg9, 1puo, 1xkg y 1ktj para Bla g 2, Fel d 1, Der p 1 y Der p 2, respectivamente.

parcial en las lipocalinas del perro Can f 1 y Can f 2, aunque la actividad inhibitoria de estos tres alérgenos no ha sido demostrada todavía (Figura 1).

Proteínas que unen ligandos y/o iones

En los últimos años, se ha incrementado el número de alérgenos descritos con capacidad intrínseca de unir ligandos, bien por la forma de la molécula o por la existencia de una hendidura específica para un determinado ligando. Algunos alérgenos son capaces de unir iones a través de aminoácidos específicos, aparte de poseer o no la capacidad de unir ligandos. Seguidamente, se describirán varios alérgenos pertenecientes a este grupo funcional.

Lipocalinas

Muchos de los alérgenos de los mamíferos pertenecen a una gran familia de proteínas de transporte secretadas por epitelio o glándulas salivales, o en la orina: las lipocalinas. Estos alérge-

nos son moléculas pequeñas, estructuralmente similares, que constan de una hélice α en el extremo C-terminal de la proteína, y un barril de láminas β plegadas que forma una cavidad hidrofóbica capaz de unir ligandos lipídicos. La resolución de la estructura cristalográfica de las lipocalinas de rata y ratón (Rat n 1 y Mus m 1) reveló que el ligando transportado por estos alérgenos era una feromona⁽³⁸⁾. Otras lipocalinas de mamíferos descritas hasta ahora son Bos d 2, de la vaca, Equ c 1, del caballo, Can f 1 y Can f 2, del perro, y Fel d 4, del gato^(24,39) (Figura 1). La cucaracha *Blattella germanica* también produce una lipocalina, Bla g 4, y la leche de vaca contiene Bos d 5 (β -lactoglobulina), que es un alérgeno alimentario perteneciente a esta familia de proteínas.

Otros alérgenos que unen lípidos comprenden el grupo 13 de ácaros cuyos miembros unen ácidos grasos y tienen una estructura similar a la de una proteína homóloga humana, y Der p 2, que une colesterol (Figura 1)^(40,41).

Fel d 1

Fel d 1 es el alérgeno más importante de gato, con una prevalencia del 90-95% en los pacientes alérgicos a este mamífero. Su estructura molecular consiste en un tetrámero de dos heterodímeros idénticos (Figura 1). Cada uno de ellos consta de dos cadenas que, a pesar de ser distintas en su secuencia de aminoácidos, se pliegan de manera similar, formando cuatro hélices α cada una⁽⁴²⁾. Fel d 1 muestra un 20% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la uteroglobina, una proteína con propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras similar a las citocinas. A pesar de la baja homología entre ambas proteínas, su estructura tridimensional es muy parecida, y conservan tres grupos de aminoácidos idénticos en la superficie molecular. La uteroglobina posee una cavidad interna simétrica e hidrofóbica, capaz de unir pequeños ligandos, como fosfatidilinositol, fosfatidilcolina, retinol, progesterona y los derivados del bifenol policlorado. La cavidad en Fel d 1 es algo distinta, asimétrica y posiblemente con capacidad de unir ligandos anfipáticos⁽⁴²⁾. Sin embargo, la naturaleza de los ligandos que se unen a Fel d 1 no ha sido identificada todavía.

Alérgenos que unen calcio

Varios alérgenos de origen animal y vegetal tienen motivos de unión a calcio llamados *EF-hand*. La falta de reactividad cruzada entre este tipo de alérgenos de origen diverso, como los de polen o ciertas especies de peces, sugiere que los epítopos reconocidos por los anticuerpos IgE no residen, al menos en su totalidad, en los aminoácidos que unen calcio, sino en regiones menos conservadas del alérgeno⁽⁴³⁾. La unión del calcio induce cambios conformacionales en la molécula y le confiere estabilidad. Los anticuerpos IgE reconocen preferentemente al alérgeno unido al calcio. La troponina C, como el alérgeno Bla g 6 de la cucaracha germánica, une calcio para ejercer su función en la contracción muscular⁽⁴⁴⁾. El grupo 17 de los alérgenos de ácaros también une calcio a través de "motivos" *EF-hand*. Las α -amilasas unen uno o más iones calcio por molécula, y se cree que la función del calcio es preservar la integridad estructural del

centro catalítico de la enzima, creando un puente iónico entre dos estructuras β ⁽⁴⁵⁾.

Alérgenos que unen cinc: Bla g 2, una aspartato proteasa poco común

Bla g 2 es un alérgeno potente de cucaracha que pertenece a la familia de las aspartato proteasas, unas proteínas con una estructura bilobulada y una hendidura capaz de unir tanto sustratos como inhibidores^(6,33,46,47). Recientemente, la determinación de la estructura molecular de Bla g 2 a alta resolución (1,3 Å), ha puesto de manifiesto que este alérgeno une cinc a través de dos residuos de ácido aspártico y dos de histidina⁽⁴⁶⁾ (Figura 1). La función del cinc en Bla g 2 parece ser meramente estructural, incrementando, mediante su unión, la estabilidad de la proteína. Cinco puentes disulfuro (en lugar de los dos o tres presentes en el resto de los miembros de esta familia de enzimas) contribuyen de manera adicional a la estabilidad de la molécula y, de este modo, a su persistencia en el ambiente. La estabilidad de Bla g 2 podría influir en su capacidad de inducir la sensibilización en pacientes con niveles de exposición 10 y 100 veces menores que los de los alérgenos de gato y ácaro, respectivamente⁽⁴⁾. La exposición crónica a dosis bajas (1-10 $\mu\text{g}/\text{año}$) de este alérgeno tan estable podría explicar por qué la sensibilización y exposición a Bla g 2 están asociadas al desarrollo de asma⁽⁵⁾.

La potencia de Bla g 2 como alérgeno no parece estar relacionada con una actividad proteolítica propia, ya que este alérgeno resulta inactivo en ensayos enzimáticos estándar para esta familia de enzimas^(47,48). Ciertas características estructurales, reveladas por los estudios cristalográficos, explican la ausencia de actividad. Una de ellas es la presencia de importantes sustituciones de los aminoácidos esenciales para la catálisis, que provocan distorsiones en el centro activo de la enzima. Además, a diferencia de las aspartato proteasas típicas, Bla g 2 posee una inserción única (la Phe^{75a}) que bloquea parte del espacio de unión del sustrato y proporciona un mecanismo de autoinhibición enzimática⁽⁴⁶⁾. A pesar de la falta de actividad proteolítica significativa, Bla g 2 conserva la estructura general de las aspartato proteasas, y es posible que mantenga la capacidad de unir ligandos a través de su hendidura central.

Proteínas estructurales

Varios alérgenos de ácaros e insectos son proteínas estructurales involucradas en los procesos de contracción muscular y de formación del citoesqueleto: la troponina (Bla g 6 de cucaracha), la tropomiosina (grupo 10 de ácaros, Bla g 7 y Per a 7 de cucaracha), la paramiosina (grupo 11 de ácaros) y la gelsolina/villina (grupo 16 de ácaros)^(9,24,44,49-51). La estructura molecular de la tropomiosina es lineal y consiste en dos hélices α paralelas entrelazadas entre sí. La elevada similitud estructural entre las tropomiosinas de diferentes especies de artrópodos es la base de la reactividad cruzada observada⁽⁵²⁾. La tropomiosina es uno de los alérgenos estructurales más estudiados debido a su impacto, no sólo como aeroalérgeno de ácaros y cucarachas, sino como alérgeno de alimentos (moluscos y crustáceos).

Proteínas de reserva

Varios alérgenos son proteínas de reserva. Las albúminas, por ejemplo, son proteínas comunes en mamíferos y en plantas. En el caso del gato (Fel d 2) y del perro (Can f 3), las albúminas son alérgenos minoritarios que muestran reactividad cruzada. La albúmina humana comparte un 82,6% de identidad con la de perro, por lo cual, la falta de reactividad cruzada entre ambas proteínas indica que los epítomos de IgE se encuentran en zonas de la molécula que no son homólogas a la zonas equivalentes en la albúmina humana⁽²⁴⁾. Otras albúminas han sido descritas como alérgenos de alimentos, y entre ellas se encuentran la ovoalbúmina (Gal d 2) y la conalbúmina (Gal d 3) en el pollo, y la albúmina en el suero de pollo (Gal d 5) y en la leche de vaca (Bos d 6). Las albúminas están también presentes en las semillas de angiospermas (Sin a 1 es una albúmina 2S de la mostaza amarilla). Otros alérgenos de reserva de las semillas de plantas son las vicilinas (Ara h 1 de cacahuete) y las leguminas (Ara h 3)⁽³⁶⁾.

Proteínas de función desconocida

Finalmente, la función de varios alérgenos de interior (grupos 5 y 7 de ácaro, Can f 4) es desconocida. En bastantes casos, se conoce su actividad bioquímica, como la de unir un determinado ligando (Fel d 1, Bla g 2), pero se ignora su función en la fuente natural.

Un caso interesante de alérgenos de función desconocida es el grupo 1 de las cucarachas. Sus alérgenos (Bla g 1 y Per a 1) están formados por secuencias repetidas de unos 100 aminoácidos de longitud, originadas durante la evolución por duplicación de un dominio que contiene un "motivo" de transferencia de energía mitocondrial⁽⁵³⁻⁵⁷⁾. Curiosamente, las formas moleculares de rBla g 1 resultantes de una proteólisis, con diferente número de secuencias repetidas, unen IgE, al contrario que muchos alérgenos que requieren la integridad de la proteína para mantener sus epítomos de IgE⁽⁵⁷⁾.

Alérgenos de exterior

Los pólenes, junto con los ácaros, las cucarachas y los epitelios de animales, constituyen las principales fuentes de alérgenos capaces de provocar hipersensibilidad del tipo I. Desde que, en 1873, Charles Blackley demostró que el polen de las gramíneas era el causante de la "fiebre del heno", muchos pólenes han sido asociados al desarrollo de alergias, y un gran número de ellos pertenecientes a especies distintas, son conocidos hoy en día⁽⁵⁸⁾. A ellos precisamente se dedicará esta parte del capítulo.

El polen como transportador de alérgenos

El grano de polen es el vehículo de aeroalérgenos de exterior más importante, y debe reunir ciertos requisitos para llevar a cabo un transporte eficaz: a) tener un diámetro comprendido entre 15 y 60 μm , b) proceder de plantas anemófilas, es decir, polinizadas por el viento, que incluyen árboles, malezas y gramíneas (hierbas), y c) liberar fácilmente los alérgenos al llegar a las mucosas del individuo alérgico. El polen, al igual que las semillas, está sometido a la deshidratación una vez secretado. Si bien este proceso resultaría letal para otras partes de la planta,

ciertos mecanismos moleculares protegen el citoplasma y las membranas de las células y permiten su rehidratación una vez alcanzado el estigma de la flor que polinizan o las mucosas del individuo. Con la rehidratación del polen se desencadenan una serie de procesos celulares que conducen a la profusión del tubo polínico en el estigma o a la liberación de los alérgenos en el interior del individuo.

Los granos de polen están formados por dos o tres células derivadas de la división en la antera que, después de la mitosis, se encapsulan en una coraza llamada exina, resistente a agresiones externas, químicas y mecánicas. Muchos alérgenos están localizados en la exina⁽⁵⁹⁾. Los niveles de expresión de los alérgenos en el grano de polen pueden verse influidos por factores ambientales como su grado de maduración, el clima y características intrínsecas de ciertas especies como la resistencia a la sequía⁽⁶⁰⁾. Sin embargo, el grano de polen intacto no es el único vehículo de alérgenos, sino que otras partículas influyen de manera clara y directa en la sensibilización y pueden llegar a transportar alérgenos de forma más eficaz. Las partículas de Ubisch, por ejemplo, procedentes de restos de las anteras de la planta o del interior de los granos de polen que se han fragmentado por la hidratación, son partículas mucho menores (< 10 µm) que el grano de polen intacto, y pueden transportar alérgenos⁽⁶¹⁾. Estas partículas, detectadas en el polen de abedul, protegen a los alérgenos de la exposición a las agresiones del medio ambiente, y pueden penetrar más profundamente que el polen en las vías respiratorias antes de liberar los alérgenos que transportan.

El empaquetamiento de los alérgenos con gránulos de almidón en amiloplastos presentes en el citosol celular y la asociación de los pólenes o las moléculas alergénicas con materiales externos no proteicos, como las partículas derivadas de la combustión de los motores diésel, pueden facilitar el acceso de las moléculas alergénicas a las vías respiratorias y su permanencia en el aire⁽⁶²⁻⁶⁴⁾. Dichos complejos tendrían una función adicional a la de mero transportador de alérgenos, pudiendo actuar como adyuvantes que se unirían a los macrófagos alveolares a través de integrinas o de receptores de lectinas, permitiendo su fagocitosis⁽⁶⁵⁾.

La cuantificación de los granos de polen es importante para prevenir a los pacientes de exposiciones elevadas a los alérgenos. Se hace pública en el llamado "recuento de polen", disponible y documentado en la mayoría de las ciudades, que expresa el número de granos de polen por metro cúbico de aire y la cantidad y naturaleza de los diferentes pólenes a lo largo del año⁽⁶⁶⁾. Estos datos son especialmente importantes para evitar la exposición a alérgenos muy agresivos en la producción de síntomas, incluso a niveles bajos de polen. En Japón, por ejemplo, la intensidad de las reacciones alérgicas a la conífera *Cryptomeria japonica* (cedro japonés) obliga al uso de mascarillas por las calles en la época de la floración.

Clasificación botánica y distribución geográfica de los pólenes alergénicos

Gracias a los avances en la caracterización molecular de alérgenos, se conoce mejor la relación entre la clasificación filoge-

nética de las especies vegetales y los patrones alergénicos presentes en los pólenes de una cierta zona geográfica. Esta información ha conducido al establecimiento de asociaciones entre las características relacionadas con la distribución geográfica, la floración y el impacto ambiental de las distintas especies y la distribución de alérgenos en los extractos polínicos.

Las especies vegetales cuyos pólenes son alergénicos son las gramíneas, los árboles y las malezas (Tabla III). Las gramíneas son las más abundantemente representadas en los extractos utilizados para el diagnóstico de la alergia, e incluyen una gran diversidad de especies distribuidas por todo el mundo, siendo causantes de alergia en toda la población. En cambio, las especies pertenecientes a las malezas y a los árboles están localizadas de forma discreta y, por tanto, la distribución de los pacientes alérgicos depende del ámbito geográfico en el que se encuentren estas plantas. Así, por ejemplo, en los países del norte y centro de Europa predomina la alergia al abedul, en Norteamérica, a la ambrosía, en las costas mediterráneas al olivo y en Europa del Este y en la India, a la *Artemisia* y al *Tanacetum parthenium*. Los síntomas originados por la alergia a pólenes son de carácter estacional. En general, los síntomas derivados de la sensibilización a los pólenes de los árboles aparecen durante el invierno y a principios de la primavera, a los pólenes de las gramíneas durante la primavera y verano y a los de las malezas en verano y otoño.

Pólenes de gramíneas

Entre la amplia variedad de pólenes que desencadenan respuestas alérgicas, quizás sean las gramíneas, la familia Poaceae, las que contribuyen con más especies a la alergia. Es una extensa familia con más de 650 géneros y alrededor de 12.000 especies repartidas por el mundo, que se distribuyen, tanto en zonas de climas tórridos, como muy fríos. Globalmente son la causa más importante de polinosis en Europa, debido a la alergenicidad de sus pólenes, a la abundancia de los mismos (alrededor del 50% del polen ambiental es de gramíneas) y a su extensa distribución vegetal (las gramíneas ocupan el 20% de la superficie vegetal del mundo)^(67,68). Se cultivan para mantener la vegetación en todo tipo de terrenos rurales, en jardines, con fines ornamentales, y para prevenir la erosión. Son, además, alimento esencial para muchas especies animales, incluido el hombre. Sus pólenes son anemófilos y se liberan durante un corto periodo de tiempo pero, de forma abundante, en la época estival. Los géneros que se consideran más importantes desde un punto de vista alergénico pertenecen a la subfamilia *Pooideae*: *Phleum* (fleo o hierba timotea), *Dactylis* (dáctilo o grama), *Lolium* (ballico), *Poa* (poa o espiguilla), *Holcus* (heno blanco u holco) y *Festuca* (cañuelas). En cambio, los géneros más restringidos a determinadas áreas geográficas pertenecen a las subfamilias *Chloridoideae* (cuyo miembro más importante desde un punto de vista alergénico es el *Cynodon* o grama mayor), *Panicoideae*, *Arundinoideae* y *Bambusoideae*. Todos estos géneros incluyen un gran número de especies, con múltiples isoalérgenos distinguibles por su tamaño, carga o estructura primaria. El grado de identidad de sus secuencias y la reactividad cruzada son tan importantes entre las distintas molé-

TABLA III. Relaciones filogenético-moleculares de los alérgenos de exterior

Planta	Familia	Nombre común	Nombre científico	Alérgeno	
Gramíneas	<i>Pooideae</i>	Cañuelas	<i>Festuca pratensis</i>	Fes p 4	
		Ballico	<i>Lolium perenne</i>	Lol p 1-5, 10, 11	
		Hierba timotea	<i>Phleum pratense</i>	Phl p 1-7, 11, 12, 13	
		Dáctilo o grama	<i>Dactylis glomerata</i>	Dac g 1-5	
		Heno blanco/holco	<i>Holcus lanatus</i>	Hol l 1, 2, 5	
		Poa/espiguilla	<i>Poa pratensis</i>	Poa p 1, 2, 5, 10	
		Arroz	<i>Oryza sativa</i>	Ory s 1, 12	
		Maíz	<i>Zea mays</i>	Zea m 1, 12	
		Trigo	<i>Triticum sativum</i>	Tri a 2	
			<i>Chloridoideae</i>	Gramma mayor	<i>Cynodon dactylon</i>
Árboles	<i>Cupressaceae/Taxodiaceae</i>	Cedro de la montaña	<i>Juniperus ashei</i>	Jun a 1-3	
		Enebro	<i>Juniperus oxycedrus</i>	Jun o 2, 4	
		Cedro japonés	<i>Cryptomeria japonica</i>	Cry j 1, 2	
		Ciprés	<i>Cupressus sempervirens</i>	Cup s 1	
		Arizónica	<i>Cupressus arizonica</i>	Cup a 1, 3	
	<i>Betulaceae</i>	Abedul	<i>Betula verrucosa</i>	Bet v 1-4, 6-8	
		Aliso	<i>Alnus glutinosa</i>	Aln g 2, 4	
	<i>Corylaceae</i>	Avellano	<i>Corylus avellana</i>	Cor a 1, 2, 8, 10	
		Carpe	<i>Carpinus betulus</i>	Car b 1	
	<i>Fagaceae</i>	Roble	<i>Quercus alba</i>	Que a 1	
		Castaño	<i>Castanea sativa</i>	Cas s 1, 5, 8	
	<i>Platanaceae</i>	Platanero	<i>Platanus acerifolia</i>	Pla a 1, 2	
	<i>Oleaceae</i>	Olivo	<i>Olea europaea</i>	Ole e 1-10	
		Fresno	<i>Fraxinus excelsior</i>	Fra e 1	
		Aligustre	<i>Ligustrum vulgare</i>	Lig v 1	
		Lilo	<i>Syringa vulgaris</i>	Syr v 1, 3	
	Malezas	<i>Asteraceae</i>	Ambrosia	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Amb a 1-3, 5-10
				<i>Ambrosia psilostachya</i>	Amb p 5
			<i>Ambrosia trifida</i>	Amb t 5	
Artemisia			<i>Artemisia vulgaris</i>	Art v 1-6	
Girasol			<i>Helianthus annuus</i>	Hel a 1, 2	
<i>Urticaceae</i>		Parietaria	<i>Parietaria judaica</i>	Par j 1-3	
<i>Amaranthaceae</i>		Quenopodio	<i>Chenopodium album</i>	Che a 1-3	
<i>Euphorbiaceae</i>		Mercuriales	<i>Mercuriales annua</i>	Mer a 1	
<i>Plantaginaceae</i>		Llantén	<i>Plantago lanceolata</i>	Plan l 1	

culas homólogas de los miembros de estas familias, que una de ellas es suficiente para diagnosticar al resto⁽⁶⁹⁾. La subfamilia *Chloridoideae*, que tiene gran importancia en EE.UU. presenta, por el contrario, una baja reactividad cruzada con las *Pooideae*. Al ser diferentes sus moléculas integrantes, éstas deben incluirse en los protocolos clínicos en el caso de ser relevantes para una determinada población⁽⁷⁰⁾. La alergenidad a las gramíneas se puede asignar a un número limitado de proteínas distribuidas en doce grupos de alérgenos⁽⁷⁰⁻⁷²⁾.

El **grupo 1**, uno de los más relevantes, posee una alta identidad de secuencia con las β -expansinas (60-70%). Estas proteínas tienen dominios catalíticos homólogos a los de las cisteinoproteasas y están implicadas en el debilitamiento y expansión de la pared celular del grano de polen. Poseen una homología inter-

especie del 91%, siendo menor (50%) con Cyn d 1. El **grupo 2/3** son proteínas pequeñas de entre 10 y 12 kDa, homólogas en secuencia y de tamaño similar al extremo C-terminal de los alérgenos del grupo 1 y con un grado de identidad entre sí del 40% y una similitud del 60-70%. Los alérgenos Dac g 2, Lol p 2 y Phl p 2 han sido producidos en *E. coli* y su estructura ha sido resuelta (Figura 2). Los alérgenos de mayor tamaño aislado hasta la fecha constituyen el **grupo 4**, cuyos isoalérgenos en diferentes especies poseen masas moleculares comprendidas entre 55 y 67 kDa. Su función biológica es desconocida aunque se les ha relacionado, por homología, con flavoenzimas implicadas en la biosíntesis de alcaloides. El **grupo 5** de alérgenos es exclusivo de las *Pooideae*, no habiéndose detectado miembros de este grupo en otras subfamilias. Poseen una masa molecular de 28

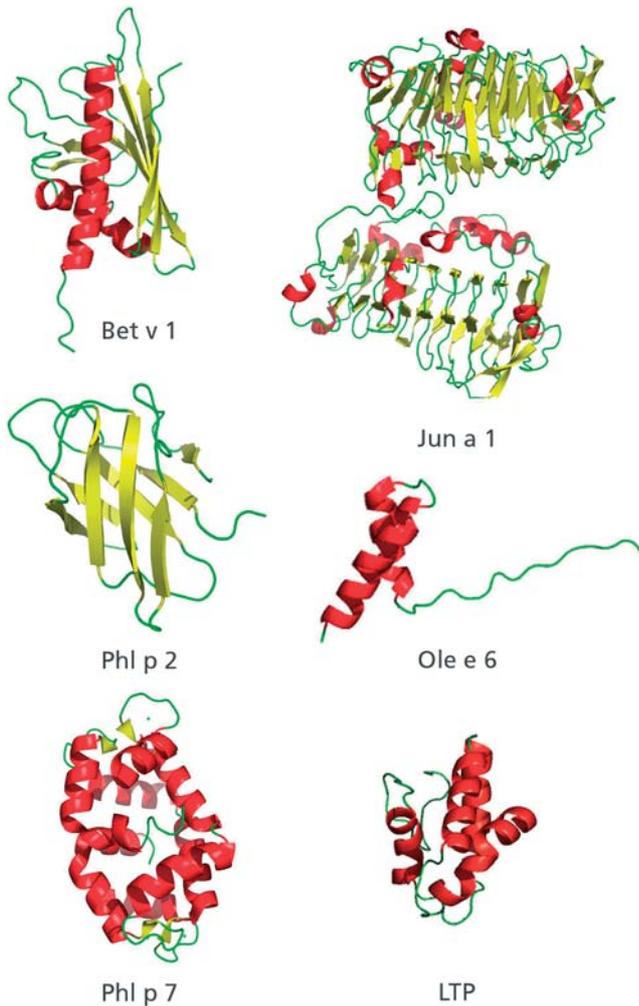


FIGURA 2. Estructuras tridimensionales de los alérgenos de pólenes Bet v 1, Jun a 1, Phl p 2 (profilina), Ole e 6, Phl p 7 y de la LTP de trigo como representante de esta familia de alérgenos. Los códigos de acceso a las coordenadas en el *Protein Data Bank* son 1bv1, 1pxz, 1who, 1ss3, 1k9u, 1bwo, respectivamente.

a 40 kDa, ligeramente superior a la del grupo 1 (27-35 kDa) y exhiben actividad ribonucleolítica. Este grupo está formado por varios isoalérgenos (algunos muy relevantes, como Phl p 5a y Phl p 5b), que han mostrado diferencias significativas en cuanto a su reconocimiento por las células T. El **grupo 6** está restringido a las especies del género *Poa* y sus miembros comparten 60% de identidad con parte de la secuencia C-terminal de Phl p 5.

Los **grupos 7 y 12** están formados por panalérgenos, policalcinas y profilinas, respectivamente, localizados en una gran variedad de pólenes. Las profilinas, además, están presentes en otras especies vegetales y no vegetales. Por último, tres grupos con menor relevancia son el **grupo 10**, citocromos c, el **grupo 11**, que pertenece a la familia de proteínas homólogas a Ole e 1, aunque con un grado de identidad con las oleáceas lo suficientemente bajo (~30%) como para no ser responsable de la reactividad cruzada detectada, en algunas ocasiones, entre olivo

y gramíneas y, por último, los **grupos 13 y 22**, con actividad enzimática de poligalacturonidasa y enolasa.

Pólenes de árboles

Existe un número relativamente pequeño de familias de árboles anemófilos con una abundante producción de polen asociado a alergias. Entre sus especies hay una clara relación filogenia-reactividad cruzada debido a la presencia de alérgenos homólogos^(73,74). Cuanto más estrecha es la relación filogenética mayor suele ser la similitud entre dichas moléculas⁽⁷⁵⁾.

Entre las angiospermas (plantas con floración) existe un grupo de familias muy relacionadas pertenecientes al orden Fagales: las *Betulaceae*, *Corylaceae* y *Fagaceae*, que poseen una distribución común en el Norte y Centro de Europa, Noroeste de África, ciertas zonas de Australia, Oeste de Asia y desde Norteamérica a los Andes. La especie más alergénica es el abedul, siguiéndole en importancia el aliso, el avellano, el castaño y el roble. Las especies de la familia *Oleaceae*, pertenecientes al orden Scrophulariales, constituyen un segundo grupo importante. Esta familia incluye entre sus miembros el olivo, el fresno, el aligustre y el lilo⁽⁷⁶⁾. El polen del olivo es abundante en el área mediterránea, en Norteamérica y Suramérica, en Sudáfrica y en Australia, mientras que el del fresno es abundante y una fuente alergénica importante en Centroeuropa. Otras especies de importancia más restringida a determinadas áreas son el arce de la familia *Aceraceae* en Norteamérica y el platanero de la *Platanaceae* en el Sur de Europa.

Entre las escasas familias de especies gimnospermas (plantas sin flores) que producen alérgenos, cabe destacar el grupo de las *Cupressaceae/Taxodiaceae*⁽⁷⁷⁾ y las *Pinaceae*, pertenecientes al orden Coniferales. Estos árboles crecen en el área mediterránea, Australia, Nueva Zelanda y Suramérica. Otra cupresácea, el cedro japonés, es típico de Japón.

Varios grupos de alérgenos principales de estas familias han sido seleccionados como marcadores específicos de sensibilización a estos pólenes y considerados óptimos candidatos para su inclusión en protocolos de inmunoterapia.

El primero es la familia de **homólogos a Bet v 1**, principal alérgeno de abedul que posee sus homólogos en *Betulaceae* (*Aln g 1*), *Corylaceae* (*Cor a 1* y *Car b 1*) y *Fagaceae* (*Cas s 1* y *Que a 1*) (Figura 2). Es interesante destacar que en familias no relacionadas filogenéticamente, como las *Rosaceae*, y no en el polen sino en el fruto, han sido localizados alérgenos homólogos a Bet v 1 que dan cuenta de parte de la reactividad cruzada entre pólenes y alimentos^(78,79). Un segundo grupo es el de los alérgenos **homólogos a Ole e 1**, alérgeno principal del polen de olivo de la familia *Oleaceae* (*Fra e 1*, *Lig v 1* y *Syr v 1*)⁽⁸⁰⁻⁸²⁾. Otro grupo comprende las **profilinas**, proteínas de secuencia altamente conservada, independientemente de la especie, y que unen actina. Los alérgenos Bet v 2, *Cor a 2* y *Ole e 2* son profilinas⁽⁸³⁻⁸⁵⁾. Finalmente, tres grupos más incluyen la familia de las **proteínas ligantes de calcio** representadas por Bet v 3, Bet v 4, *Ole e 3*, *Ole e 8*, *Jun o 4*⁽⁴³⁾, las **proteínas transferidoras de lípidos** (nsLTP) con *Ole e 7*, *Cor a 8* y *Cas a 8*⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾, y las **pectato liasas** con *Cry j 1* y 2, y *Jun a 1* del cedro japonés y del enebro,

respectivamente, pertenecientes a las Cupressaceae/Taxodiaceae⁽⁸⁹⁻⁹¹⁾. Es interesante señalar que algunos de los alérgenos mencionados, como los homólogos a Bet v 1, poseen isoalérgenos en alimentos. Así, por ejemplo, Cor a 1 comprende Cor a 1.01 presente en el polen, y Cor a 1.02, Cor a 1.03 y Cor a 1.04, en la avellana.

Pólenes de malezas

Las malezas constituyen un grupo muy heterogéneo de plantas, generalmente definido por su escaso valor estético o comercial, que crecen en los sitios más variopintos, ya sea en campos secos y pastos como la ambrosía, o en los bordes de las carreteras, jardines o basureros, como la Salsola. El empleo de algunas especies con fines ornamentales ha ido aumentando en los últimos años, lo cual ha originado, a su vez, un mayor número de sensibilizaciones frente a estos pólenes. Éste es el caso de algunas variedades de la familia *Amaranthaceae*⁽⁹²⁾. Algunas de estas especies son autóctonas de climas semidesérticos (el Norte de África y los países árabes) y tienen una especial resistencia a la sequía⁽⁹³⁾. Por ejemplo, en Kuwait, el quenopodio es la principal fuente alérgica y sensibiliza a más del 70% de la población alérgica. El hecho de que parte del Sur de Europa se esté desertizando y deforestando hace que la relevancia alérgica de estos pólenes se haya acentuado en los últimos años. Es importante resaltar el aumento en la prevalencia de sensibilización a los pólenes de malezas en los últimos años, destacando, como ejemplo, el incremento significativo de la alergia a la ambrosía en Italia desde un 20% hasta un 60% en los últimos cinco años⁽⁹⁴⁾.

Las malezas más importantes, desde un punto de vista alérgico, pertenecen a las familias: a) *Asteraceae*, una de las más amplias, con más de 20.000 especies distintas entre las que cabe destacar la ambrosía, la artemisia y el girasol; b) *Amaranthaceae*, que incluye el cenizo blanco o quenopodio y la Salsola; c) *Urticaceae*, cuyo miembro alérgico más importante es la parietaria; d) *Euphorbiaceae* con mercurialis y e) *Plantaginaceae* con el plantago.

La mayoría de estas plantas, como las *Asteraceae* y las *Amaranthaceae*, requieren climas cálidos y suelos secos, aunque la ambrosía puede encontrarse en la Europa del Este, en el Norte de Italia, Francia, etc. Su época de polinización es variada, pero centrada en los meses de agosto y septiembre. Sin embargo, ciertas especies, como la parietaria y el quenopodio tienen dos picos de polinización, uno en la primavera y otro en el verano y otoño. Los síntomas son principalmente rinitis y conjuntivitis⁽⁹⁵⁾. alguna de estas especies como la ambrosía, puede originar dermatitis de contacto por la presencia de compuestos no proteicos del tipo de los sesquiterpenos, existentes en la superficie de las plantas. En los pacientes alérgicos a ambrosía también se ha encontrado un porcentaje anormalmente alto de asma, superior al 40%.

Cuatro familias de proteínas son las principales fuentes de sensibilizaciones en los pacientes alérgicos a las malezas. La primera es la familia de las **pectato liasas** (38 kDa), cuyos principales representantes son los alérgenos Amb a 1 y Amb a 2 (Figura 2). Ambos son alérgenos polimórficos mayoritarios, con una prevalencia del 50-95%, de carácter ácido, no glucosilados y muy

abundantes en el polen (1,2-6%). Se han descrito alérgenos homólogos en el enebro y el cedro de la montaña (Jun a 1) (Figura 2)⁽⁹⁶⁾. Otros dos grupos de alérgenos están incluidos dentro de la superfamilia de proteínas de defensa (*pathogenesis-related proteins*, PR): la familia de las **defensinas** (PR-12), a las que pertenece Art v 1⁽⁹⁷⁾, y la de las proteínas transferidoras de lípidos no específicos o **nsLTP** (PR-14) con Par j 1, 2 y Amb a 6. La cuarta familia incluye a las proteínas **homólogas a Ole e 1**, a la que pertenece Che a 1 y Pla I 1^(98,99).

Además de estos alérgenos principales, se han identificado los panalérgenos *profilinas* y *polcalcinas* en diversas malezas como quenopodio, girasol, ambrosía, parietaria y mercurialis, cuya prevalencia de IgE suele ser del 20%⁽¹⁰⁰⁻¹⁰²⁾. En casos como la profilina de quenopodio y la de mercurialis, la frecuencia de reconocimiento llega hasta el punto de ser considerados como alérgenos principales (> 50%).

Funciones bioquímicas de los alérgenos de exterior

Los pólenes han de mantenerse en el ambiente durante largos periodos de tiempo y son capaces de desencadenar reacciones alérgicas en segundos a través del contacto con las mucosas del individuo alérgico. Por lo tanto, los alérgenos inhalados del polen pueden encuadrarse en un patrón molecular común, muy general, similar al que poseen otros aeroalérgenos: son moléculas muy solubles en medios acuosos y fácilmente extraíbles de la fuente natural⁽¹⁰³⁾, con tamaños relativamente pequeños, entre 5 y 90 kDa. Sin embargo, sus actividades bioquímicas son muy diversas (enzimática, de defensa, estructural, transportadora, reguladora, etc.).

En la última década, con la implementación del uso de técnicas de biología molecular para la caracterización de alérgenos, se ha conseguido determinar la secuencia de aminoácidos y la estructura tridimensional de una gran parte de los alérgenos de exterior más relevantes⁽¹⁰⁴⁾ (Figura 2). Esta información ha contribuido en gran medida al conocimiento de las funciones de los alérgenos en sus fuentes de origen. Los alérgenos de exterior se pueden agrupar atendiendo a la función bioquímica, y ciertos alérgenos pueden asignarse a dos o más de estos grupos (Tabla II):

Proteínas de defensa (*pathogenesis-related proteins* o proteínas PR)

El sistema de defensa de las plantas hace uso de un amplio espectro de compuestos y proteínas resistentes al estrés biótico y abiótico. La superfamilia de proteínas PR constituye una colección de numerosas moléculas diferentes, clasificadas en 14 grupos, y que tienen como característica común el que su inducción se produce, en primera instancia, como respuesta a la infección por patógenos, hongos, virus o bacterias, pero también a situaciones de estrés, como congelación, sequía y cambios de temperatura. Aunque *a priori* se han considerado proteínas inducibles, también existen proteínas PR con expresión constitutiva. Estas proteínas poseen ciertas propiedades que las predisponen a ser alérgicas, como su pequeño tamaño, su elevada solubilidad, su estabilidad a bajo pH y la resistencia a la digestión⁽¹⁰⁵⁾. Entre los alérgenos que pertenecen a esta superfamilia,

cabe destacar: las β -1,3-glucanasas, como Ole e 9 del olivo⁽¹⁰⁶⁾, del grupo **PR-2**; las taumatinas, como Jun a 3 (*Juniperus ashei*), que constituyen el grupo **PR-5**, y los alérgenos homólogos a ribonucleasas, como Bet v 1 en el abedul y sus homólogos en el avellano (Cor a 1), la manzana (Mal d 1) y la zanahoria (Dau c 1), que son miembros de la familia **PR-10**⁽¹⁰⁷⁻¹⁰⁹⁾. En cuanto a la función bioquímica de este último grupo, existen datos que apuntan a una capacidad de interactuar con ligandos del tipo de fitoesteroles y otros pigmentos, y un posible efecto insecticida frente al ataque de insectos⁽¹⁰⁷⁾. Otro alérgeno, Art v 1, posee dos dominios, de los cuales el N-terminal, rico en cisteínas, es homólogo a las defensinas, constituyentes del grupo **PR-12**⁽⁹⁷⁾.

Por último, las proteínas transferidoras de lípidos (nsLTP) constituyen una amplia familia de moléculas de entre 7 y 9 kDa, el grupo **PR-14**, que posee miembros en gran diversidad de especies vegetales, hasta tal punto que han sido consideradas como verdaderos panalérgenos. Las nsLTP fueron primero descritas en frutas de la familia *Rosaceae* (Pru p 3, Mal d 3, Pru ar 3), siendo consideradas como los alérgenos más relevantes en estas plantas. Posteriormente, también se han encontrado miembros de esta familia en pólenes de árboles como el olivo (Ole e 7, *Olea europaea*)⁽¹¹⁰⁾, y el platanero (*Platanus orientalis*)⁽¹¹¹⁾, en malezas como la artemisia (Art v 3, *Artemisia vulgaris*)⁽⁸⁸⁾, la ambrosia (Amb a 6, *Ambrosia artemisiifolia*)⁽¹¹²⁾, y la parietaria (Par j 1 y Par j 2, *Parietaria judaica*)⁽¹¹³⁾. Las proteínas de esta familia presentan una gran variabilidad en la secuencia de aminoácidos, exhibiendo porcentajes de identidad desde el 20 al 90%. Es por esto que la ausencia de reactividad cruzada, en términos de unión a anticuerpos, es muy frecuente en la alergia a las nsLTP. Algunos pacientes sólo reconocen una LTP mientras que otros reaccionan frente a muchas de ellas⁽¹¹⁴⁾.

Las nsLTPs poseen una estructura tridimensional muy compacta, formada fundamentalmente por cuatro hélices α y un extremo C-terminal desestructurado (Figura 2). La estructura está mantenida por cuatro puentes disulfuro que confieren a estas proteínas una gran estabilidad térmica y enzimática (pepsina y tripsina)⁽¹¹⁵⁾. Esta característica las hace sólidos candidatos a alérgenos de alimentos, con el agravante que supone su existencia en cantidades significativas en alimentos y bebidas procesados. También tienen un papel en la reactividad cruzada entre pólenes y alimentos, lo cual incrementa su relevancia alérgica. Estas proteínas están localizadas en asociación con polímeros de naturaleza lipofílica, fundamentalmente lipídicos, en tejidos extracelulares de la planta, como la piel de la fruta⁽¹¹⁶⁾. Además de su papel como proteínas de defensa y, al igual que las proteínas de la familia homóloga a Bet v 1, las nsLTP también poseen propiedades antifúngicas y han sido por ello incluidas en programas de investigación enfocados al diseño de plantas transgénicas.

Enzimas

Es interesante resaltar que la mayor parte de las actividades enzimáticas que han sido descritas en los alérgenos del polen están implicadas en el metabolismo de los carbohidratos. Éstos son el componente relevante de la pared celular que ha de sufrir importantes modificaciones durante la maduración del grano de

polen y el crecimiento del tubo polínico que tiene lugar cuando el polen germina. *Pectato liasas*, como Jun a 1, Cry j 1, Amb a 1 (95% de prevalencia entre los pacientes alérgicos a ambrosia), β -1,3-glucanasas como Ole e 9 y *poligalacturonidasas* como Phl p 13, Cry j 2 y Jun a 2 pertenecen a esta gran familia de enzimas.

La asignación de una actividad bioquímica a un alérgeno debido a su homología con una proteína de función conocida no siempre es correcta. Al grupo 1 de las gramíneas, por ejemplo, se le ha asignado un papel de *cisteín-proteasa* por la homología con la papaína en sus regiones implicadas en catálisis. Sin embargo, no se ha conseguido demostrar dicha actividad enzimática y, en cambio, se ha encontrado homología con el extremo aminoterminal de la familia 45 de las endoglucanasas que parecen participar en el crecimiento de la pared celular de la planta durante el crecimiento del tubo polínico⁽¹¹⁷⁾. Otras actividades enzimáticas atribuidas a alérgenos son *isoflavona reductasa* (en Bet v 6) y *flavoenzimas* y *ribonucleasas* (en los grupos 4 y 5 de gramíneas, respectivamente)^(118,119). No se ha demostrado todavía la existencia clara de alérgenos con función inhibidora de actividades enzimáticas, aunque la secuencia de Pla a 1 comparte cierta homología con el inhibidor de la invertasa⁽¹²⁰⁾.

Proteínas que unen ligandos y/o iones

Proteínas que unen ligandos

Entre las proteínas que unen ligandos no iónicos existe un importante grupo representado por el alérgeno del polen de olivo, Ole e 10, homólogo al dominio C-terminal de la glucanasa del mismo polen, Ole e 9, y que une de forma específica carbohidratos del tipo laminarina y laminarinhexosa⁽¹²¹⁾.

Aparte de los carbohidratos, otros alérgenos unen lípidos o proteínas. El análisis estructural de Bet v 1 reveló una asociación de este alérgeno y sus homólogos con el transporte lipídico⁽¹⁰⁷⁾ (Figura 2). Por otro lado, Ole e 1 parece unirse a proteínasas para ejercer una función reguladora. Un análisis más detallado de Ole e 1 y Ole e 9 se llevará a cabo en secciones posteriores de este capítulo.

Alérgenos que unen calcio

Las proteínas ligantes de calcio constituyen una superfamilia de proteínas que están presentes en especies vegetales y animales. Se caracterizan por poseer entre dos y ocho "motivos" específicos de unión de calcio *EF-hand*, con estructura conservada. La función de estas proteínas debe ser de gran relevancia para la planta debido al papel esencial del calcio en la germinación del polen. Este ion posee una gran capacidad quimiotáctica, y atrae a proteínas hacia la zona apical del tubo polínico en el proceso de su crecimiento.

Tres subfamilias de proteínas ligantes de calcio poseen miembros que son alérgenos de pólenes en muchas especies de plantas, tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas. Estos alérgenos pueden contener dos (Ole e 3, Che a 3, Phl p 7, Bet v 4) (Figura 2), tres (Bet v 3) y cuatro (Jun o 4) "motivos" *EF-hand*⁽¹²²⁻¹²⁷⁾.

Las proteínas con dos sitios de unión de calcio se agrupan bajo la denominación de polcalcinas, debido a su presencia exclu-

siva en el tejido polínico y a su actividad bioquímica. Constituyen una familia de proteínas con estructura primaria muy conservada, con un grado de identidad medio superior al 75%. Su incidencia en la población es del 10 al 30%, aunque puede ser mayor en algunas regiones y para ciertos alérgenos, como en el caso de Che a 3 de quenopodio, cuya prevalencia alcanza casi un 50%⁽¹²⁸⁾.

Alérgenos que unen cobre

Otros alérgenos que unen iones son Amb a 3 y Amb a 7, glicoproteínas básicas y pequeñas (101 aminoácidos) que pertenecen a la familia de las plastocianinas. Éstas son proteínas de plantas que contienen iones cobre y que están implicadas en el transporte de electrones⁽¹²⁹⁾.

Proteínas estructurales

Profilinas

La ubicuidad de estas proteínas de pequeño tamaño molecular (12-15 kDa), presentes en la totalidad de especies animales y vegetales⁽⁸³⁾, es lógica si se tiene en cuenta su función esencial en la regulación del ensamblaje de los filamentos de actina (Figura 2, Phl p 2). A diferencia de los alérgenos de origen vegetal ligantes de calcio, presentes mayoritariamente en los pólenes, las profilinas forman parte de tejidos de almacenamiento (frutos, nueces, especias y látex) y, por tanto, son también responsables de la reactividad cruzada entre pólenes y alimentos e, incluso, entre pólenes y látex.

Al igual que otros panalérgenos, las profilinas poseen secuencias muy conservadas, con identidades entre 70 y 85% (Bet v 2 y Ole e 2), y una prevalencia del 20% en la mayoría de los alérgicos al polen, aunque existen excepciones, como la profilina del polen del quenopodio (Che a 2), para la que se ha encontrado una prevalencia del 55%⁽¹⁰⁰⁾.

Homología entre dominios de alérgenos y la molécula completa de alérgenos: una situación común entre los alérgenos de exterior

Varios alérgenos polínicos poseen dominios que comparten homología con alérgenos completos que constituyen entidades moleculares independientes dentro de la misma especie o en especies relacionadas. Estos alérgenos completos no constituyen productos de degradación a partir de un alérgeno de mayor tamaño, sino que se originaron de la evolución de un ancestro común que, a su vez, dio lugar al alérgeno que posee el dominio homólogo. Este fenómeno se repite en el caso de alérgenos de pólenes de gramíneas, cuyos grupos 2 y 3 exhiben un 60-70% de similitud y una identidad del 40% con el extremo C-terminal de los alérgenos del grupo 1⁽¹³⁰⁾. Aunque entre los grupos 1 y el 2 se ha encontrado reactividad cruzada a nivel de IgG, no se ha detectado ninguna correlación a nivel de IgE. Otro ejemplo es el caso de Ole e 10 y el dominio C-terminal de la β -1,3-glucanasa Ole e 9. Ambos son alérgenos del polen del olivo y muestran un grado de similitud mayor al del caso anterior (superior al 75%), que se manifiesta en la existencia de reactividad cruzada. La función del dominio de Ole e 9 y del alérgeno Ole e 10 parece ser la

unión de carbohidratos, del tipo β -1,3-glucanos, como la laminarina. Además, el dominio del alérgeno Ole e 9 podría regular la actividad catalítica de la proteína⁽¹²¹⁾. El dominio C-terminal de Ole e 9, expresado en la levadura *Pichia pastoris*, muestra una prevalencia de IgE similar a la de Ole e 10⁽¹³¹⁾.

Proteínas reguladoras

Ole e 1, alérgeno principal del polen de olivo, es el representante más importante de una amplia familia de proteínas, cuyo papel en la hidratación y el inicio de la germinación del polen ha sido documentado⁽¹³²⁾. Su función no ha sido esclarecida hasta la fecha. Sin embargo, LAT52, una proteína específica del polen de tomate y perteneciente a esta misma familia, parece regular la fertilización mediante la interacción con proteincinasas desencadenantes del proceso. Así, la función de estas proteínas reguladoras sería mantener bloqueado el proceso de germinación mediante la unión a las cinasas, y desencadenarlo cuando se libera de ellas⁽¹³³⁾.

Proteínas de función desconocida

Los alérgenos y, en general, los antígenos, deben poseer un tamaño mínimo, cuyo límite se desconoce, para poder ser reconocidos por los linfocitos B. En este grupo de alérgenos de función desconocida destacan varias proteínas de pequeño tamaño, como los alérgenos homólogos Amb a 5 y Amb t 5 de especies de gramíneas relacionadas, y Ole e 6. Las dos primeras son proteínas básicas de 5 kDa aisladas del polen de ambrosía⁽¹³⁴⁾ y la tercera es una proteína ácida de 5 kDa procedente del polen de olivo. La prevalencia de sensibilizaciones a los tres alérgenos es relativamente baja (aproximadamente, del 20%) pero, en el caso del Ole e 6, es muy dependiente del área geográfica, y este alérgeno puede alcanzar el calificativo de alérgeno principal en zonas del Sur de España. La estructura del Ole e 6 ha sido resuelta recientemente⁽¹³⁵⁾ (Figura 2). Los tres alérgenos tienen en común la abundancia en puentes disulfuro (con 8 y 6 residuos de cisteína, respectivamente) que pueden contribuir a su estabilidad.

Carbohidratos implicados en la alergenidad de la molécula

La mayoría de las áreas inmunológicamente relevantes están localizadas en la superficie de las moléculas alérgicas. Suelen estar constituidas por aminoácidos cercanos en el espacio, contiguos o separados en la estructura primaria de la proteína. Sin embargo, una gran parte de los alérgenos son glicoproteínas, cuyo oligosacárido se ha visto involucrado, en ocasiones, en la alergenidad de la molécula. Estos carbohidratos constituyen estructuras muy conservadas en las que residuos de xilosa y fucosa, ausentes en los carbohidratos animales, constituyen los principales monosacáridos del determinante alérgico. Por ello, estos carbohidratos, junto con los panalérgenos, profilinas y polcalcinas, son la causa de reactividad cruzada a alérgenos de plantas⁽¹³⁶⁾. Aunque la existencia de reactividad de la IgE de pacientes con carbohidratos se ha demostrado para varios alérgenos, su relevancia clínica sigue siendo objeto de debate⁽¹³⁷⁾.

REACTIVIDAD CRUZADA

Dos aspectos inmunológicos muy distintos deben distinguirse en cuanto a la capacidad alérgica de una determinada molécula: la inmunogenia y la reactividad. La primera se refiere a la capacidad intrínseca de un alérgeno para inducir una respuesta alérgica mediada por la síntesis de IgE, en el caso de la alergia, y la segunda, a la reactividad provocada a través de las IgE ya sintetizadas por una exposición previa, al unirse al alérgeno. Cuando la reactividad se produce contra una proteína distinta al alérgeno que originó la sensibilización, pero que es homóloga a él, se habla de reactividad cruzada. Este fenómeno se basa en la similitud entre la superficie molecular de las proteínas homólogas. Un grado de identidad en la secuencia de aminoácidos no superior al 25% puede ser suficiente para que dos proteínas se plieguen de modo equivalente y compartan una estructura terciaria común. Éste es el caso, por ejemplo, de las lipocalinas de mamífero previamente descritas. Sin embargo, un mayor grado de identidad (> 70%) es necesario para que dos proteínas compartan aminoácidos expuestos en la superficie molecular y epítomos de IgE y, por tanto, para que la reactividad cruzada tenga lugar.

Reactividad cruzada entre los alérgenos de interior

Se ha descrito la base molecular de la reactividad cruzada para los siguientes alérgenos de interior: la tropomiosina, la albúmina, el grupo 2 de alérgenos de ácaros y el grupo 1 de alérgenos de la cucaracha (Per a 1 y Bla g 1)^(52-56,138,139). Un estudio del grupo 2 de alérgenos de ácaros muestra cómo Der p 2 exhibe reactividad cruzada con Eur m 2, pero no con Lep d 2 y Tyr p 2. Der p 2 y Eur m 2 comparten una identidad en la secuencia de aminoácidos de ~83%, con lo cual Eur m 2 conserva buena parte de la superficie molecular en común con Der p 2. En cambio, Lep d 2 y Tyr p 2, que sólo comparten un ~40% de identidad con Der p 2, difieren lo suficiente en su superficie molecular como para no compartir epítomos de IgE⁽¹³⁹⁾.

Se observa también reactividad cruzada entre las tropomiosinas de invertebrados (cucarachas, ácaros, moluscos y crustáceos) que comparten ~80% de identidad en la secuencia de aminoácidos⁽²⁴⁾. Sin embargo, la falta de reactividad cruzada entre las tropomiosinas de invertebrados y de vertebrados (procedente de aves, como el gallo, y de mamíferos, como la vaca, el cerdo o el cordero) es probablemente un reflejo del bajo nivel de homología entre las tropomiosinas de ambos grupos de animales (~45% de identidad). Análogamente, la falta de reactividad contra las propias proteínas endógenas humanas de estructura similar a alérgenos como las albúminas y las lipocalinas indica que, en el alérgeno, los epítomos de IgE están situados en la parte de la molécula que difiere de la correspondiente proteína humana.

Reactividad cruzada entre pólenes

La reactividad cruzada es especialmente significativa en los pólenes debido al gran número de familias asociadas bajo un mismo orden, que dan lugar a la producción de moléculas con alto grado de identidad. Se puede predecir la reactividad cruzada entre alérgenos conociendo la taxonomía de las plantas que los

producen, de manera que las más relacionadas filogenéticamente son las que producen más alérgenos homólogos. Muchos de los componentes de determinadas fuentes alérgicas, como es el caso de los grupos 1 y 5 de las gramíneas, poseen una estructura tan parecida que la sensibilización a una de ellas implica la sensibilización al resto. Por tanto, el tratamiento de los pacientes se vería notablemente simplificado si el paciente alérgico a los miembros de estas familias fuera tratado exclusivamente con el extracto de la especie con mayor prevalencia geográfica⁽¹⁴⁰⁾.

La diagnosis y la terapia de la alergia estacional por inhalación está marcada por la similitud entre las moléculas alérgicas de los distintos pólenes, lo cual ha sido, y sigue siendo, crucial a tener en cuenta a la hora de simplificar el espectro de pólenes necesarios para su uso clínico. Es decir, aun suponiendo que las dosis óptimas de los alérgenos utilizadas en las aplicaciones clínicas estén perfectamente tipificadas, la reactividad cruzada afecta de manera decisiva a las dosis reales de las moléculas empleadas y el desconocimiento de dichas similitudes puede repercutir negativamente en la inocuidad de las muestras, pudiéndose incrementar el número de reacciones adversas en los pacientes.

Con respecto a los pólenes de árboles, existe reactividad cruzada en las familias del orden Fagales que incluyen el abedul, el avellano, el aliso, el carpe y el haya. Sus respectivos alérgenos Bet v 1, Cor a 1, Aln g 1 y Car b 1 poseen una identidad de secuencia superior al 70%. Es importante destacar la familia *Oleaceae*, ya que la secuencia de Ole e 1 posee una elevada identidad con sus alérgenos homólogos: 91% con Fra e 1, 88% con Lig v 1 y 90% con Syr v 1⁽¹⁴¹⁾. Mientras que Ole e 1 es un alérgeno mayoritario en regiones del área mediterránea, Fra e 1, alérgeno principal del fresno, es responsable de sensibilizaciones en la Europa central. Otros miembros alérgicos de esta familia pertenecen a varias especies de malezas, como el quenopodio (Che a 1) y el plantago (Pla l 1), y de gramíneas, como el ballico (Lol p 11), pero la reactividad cruzada asociada a ellas resulta prácticamente inexistente dada la baja similitud (alrededor de un 30%) entre sus secuencias de aminoácidos. Se han descrito reactividades cruzadas en una familia importante del orden Coniferales, las cupresáceas, que incluye cedros, enebros y cipreses⁽¹⁴²⁾. Los miembros de esta familia poseen un alto grado de reactividad cruzada a través de dos de sus alérgenos más relevantes, Jun o 1 y Jun o 4. Es curioso destacar que, aunque el grado de identidad en la cadena polipeptídica de los homólogos a Jun o 1 es alto, existen diferencias en cuanto al tipo y número de sitios de glucosilación en los distintos alérgenos de este grupo que pueden afectar su alergenicidad⁽¹⁴³⁾. Estas diferencias son relevantes cuando un epítomo alérgico está localizado en un carbohidrato, como es el caso de Cry j 1, alérgeno del polen de las cupresáceas⁽¹⁴⁴⁾.

No obstante, también puede ocurrir que exista reactividad cruzada entre plantas poco relacionadas desde un punto de vista filogenético, por medio de alérgenos como las profilinas, polcalcinas y, en menor medida, las β -1,3-glucanasas. Las profilinas y las polcalcinas han sido identificadas en prácticamente todas las especies del amplio espectro vegetal y sus miembros son considerados como panalérgenos^(145,146). Las diferencias entre las

secuencias aminoácidas de los miembros de estas dos familias de proteínas ubicuas y esenciales son pequeñas y, en la mayoría de los casos, son alérgenos minoritarios. Así, estas proteínas están presentes en diferentes familias de pólenes y ha sido demostrado su papel en la reactividad cruzada entre abedul y fresno⁽¹⁴⁷⁾, entre olivo y gramíneas y entre olivo y malezas.

Por otra parte, aunque el grado de similitud entre las β -1,3-glucanas hasta ahora descritas no es tan alto, se han encontrado homólogos en otros pólenes, como en los de otras oleáceas (fresno) o en el de abedul⁽¹⁴⁸⁾.

Reactividad cruzada entre pólenes y alimentos

Un efecto interesante del fenómeno de reactividad cruzada es que la sensibilización primaria por inhalación de un alérgeno puede provocar la reacción alérgica posterior a otra fuente alérgica, cuya ruta de exposición sea distinta. Éste es el caso de la reactividad cruzada entre aeroalérgenos de pólenes y ciertos alérgenos de alimentos que provocan el síndrome de alergia oral (SAO). Muchas de las reacciones alérgicas frente a alimentos como frutas, vegetales y frutos secos están asociadas con alergia a pólenes⁽¹⁴⁹⁾. Bet v 1, profilinas, glucanasas, así como los carbohidratos de glicoproteínas identificados como epítomos alérgicos (en Ole e 1, Cry j 1), están implicados en la reactividad cruzada con familias de alérgenos de alimentos vegetales. Por ejemplo, Bet v 1, el alérgeno principal del polen de abedul, muestra reactividad cruzada con alérgenos de frutas de la familia *Rosaceae* como la manzana (Mal d 1), la cereza (Pru av 1), el albaricoque (Pru ar 1), la pera (Pys c 1), y vegetales de la familia *Apiaceae*, como el apio (Api g 1) y la zanahoria (Dau c 1). Bet v 2, una profilina del polen de abedul, muestra reactividad cruzada con alérgenos de apio (Api g 4), pera (Pyr c 4), cacahuete (Ara h 5), soja (Gly m 3), manzana, zanahoria, patata, tomate, semillas de calabaza y avellana, siendo los síntomas originados por los alérgenos de vegetales más intensos que los originados por las frutas^(36,150).

Tanto las profilinas como los carbohidratos que poseen residuos de xilosa y fucosa están ampliamente distribuidos en todos los tejidos de plantas. Por tanto, estas estructuras pueden causar patrones de reactividad cruzada en toda clase de alimentos procedentes de plantas. Las profilinas y carbohidratos de los pólenes de artemisia, gramíneas, ambrosía, abedul u olivo, pueden estar implicados en la reactividad cruzada. Sin embargo, debido a que son moléculas sensibles a la desnaturalización térmica y a la digestión gástrica, la alergia alimentaria ocasionada por las profilinas está confinada al desencadenamiento del síndrome de alergia oral (SAO) solamente tras la ingestión de alimentos crudos⁽¹⁵¹⁾.

ALERGENICIDAD: ¿QUÉ HACE DE UNA PROTEÍNA UN ALÉRGENO?

A pesar del mayor conocimiento adquirido en los últimos años sobre la estructura y función de los alérgenos, poco se sabe de las razones por las cuales ciertas proteínas, y no otras, actúan

como alérgenos. En general, la estabilidad estructural es importante para su permanencia en el medio ambiente antes de ser inhalados. Sin embargo, no se ha encontrado ninguna característica molecular común que marque una proteína para ser un alérgeno⁽¹⁵²⁾.

La alergia es una enfermedad cuyo desarrollo y agravamiento están influidos de forma decisiva, no sólo por factores genéticos e intrínsecos de la fuente alérgica, sino también por condicionantes, tanto ambientales, como de origen natural o antropogénicos. Estos condicionantes influyen en mayor medida sobre la sensibilización a los alérgenos de exterior, ya que incluyen factores como la maduración del polen, el clima, los niveles de la fuente alérgica, la localización geográfica, la contaminación urbana y las emisiones gaseosas de los coches. Estos dos últimos factores parecen actuar como adyuvantes en la producción de inmunoglobulinas del tipo IgE, específicas para determinadas fuentes alérgicas, bien incrementando la prevalencia o agravando los síntomas de los pacientes afectados^(153,154).

La dosis y la ruta de exposición del alérgeno son importantes para la alergenidad, así como la predisposición genética del individuo⁽¹⁵⁵⁾. La exposición repetida a bajas dosis de aeroalérgenos (1-10 $\mu\text{g/año}$), presentes en el medio ambiente en partículas de 1-40 μm de diámetro, es suficiente para producir sensibilización en individuos con predisposición a desarrollar alergia. Estas condiciones han sido reproducidas por la administración de dosis subclínicas de alérgenos en sujetos atópicos, provocando un cambio hacia una respuesta Th2 *in vitro*⁽¹⁵⁶⁾. Una respuesta contraria, con reducción en la producción de IgE, se observa en individuos tratados con dosis crecientes de alérgenos durante la inmunoterapia. Curiosamente, esta situación se reproduce de manera natural bajo la exposición a altas dosis del alérgeno de gato Fel d 1 (> 20 $\mu\text{g/g}$ hasta 3.840 $\mu\text{g/g}$ de polvo), resultando en una reducción en la prevalencia de sensibilización a Fel d 1 y un incremento de los niveles de anticuerpos IgG e IgG4^(157,158).

En los últimos años, el análisis de los alérgenos mediante técnicas de biología molecular ha revelado que los alérgenos son un grupo de proteínas con amplia variedad estructural y funcional. A pesar de ello, varias hipótesis de alergenidad basadas en propiedades intrínsecas de los alérgenos han sido postuladas y aplicadas a subgrupos de alérgenos con ciertas características comunes.

Una hipótesis de alergenidad se basa en el mimetismo molecular de ciertos alérgenos con proteínas endógenas y fue formulada tras observar que algunos alérgenos de mamíferos son homólogos a proteínas endógenas^(159,160). La hipótesis postula que la alergia a ciertas proteínas puede ser consecuencia de una falta de discriminación entre proteínas propias y ajenas, e implica mecanismos de tolerancia a proteínas endógenas. Inicialmente se propuso esta hipótesis para las lipocalinas, ya que lipocalinas endógenas, como la apolipoproteína D o la proteína de la glándula de von Ebner, son homólogos a alérgenos.

Las propiedades surfactantes de algunos alérgenos, como las lipocalinas Equ c 1, Equ c 4, Equ c 5 y la fosfolipasa A2 del veneno de abeja, podrían influir en su alergenidad⁽¹⁶¹⁾. Estos

alérgenos tienen la capacidad de disminuir la tensión superficial del agua, y su interacción con el surfactante pulmonar podría resultar en una disminución de su papel fisiológico y favorecer la penetración del alérgeno en el tejido pulmonar.

Una hipótesis de alergenicidad que ha atraído mucha atención y se refleja en un gran número de publicaciones es la "hipótesis enzimática" (mencionada más arriba en la sección *Proteasas*), por la cual la actividad proteolítica de algunos alérgenos como Der p 1, puede contribuir a su alergenicidad y facilitar la penetración de otros alérgenos en el epitelio pulmonar. También se ha descrito el efecto de otras actividades enzimáticas en alergenicidad, como la de la fosfolipasa A2 del veneno de abeja, aunque su actividad enzimática resultó no afectar a la respuesta IgE, IgG4 y de citocinas en un estudio posterior⁽¹⁶²⁾. Sin embargo, la "hipótesis enzimática" está restringida a un reducido número de alérgenos y la gran variedad funcional de los alérgenos muestra que la actividad enzimática no es necesaria para la alergenicidad. Muchos alérgenos potentes no son enzimáticamente activos. La capacidad de unir ligandos es otra función de un grupo creciente de alérgenos cuya estructura molecular ha sido resuelta recientemente (Fel d 1, Bla g 2, Der p 2, Rat n 1, Mus m 1, Bet v 1). La influencia de esta función en su alergenicidad está todavía por demostrar.

ALÉRGENOS RECOMBINANTES: SISTEMAS DE EXPRESIÓN

Los extractos de fuentes naturales usados para la diagnosis de la alergia contienen una mezcla de proteínas, de las cuales no todas son alérgicas. Además, la disponibilidad de cantidades limitadas del material de partida (especialmente en el caso del polen) supone una gran carga económica y considerables dificultades a la hora de plantear la comercialización de estos materiales⁽¹⁶³⁾. Por tanto, la aplicación de las técnicas de ingeniería genética para la producción de alérgenos recombinantes puros en grandes cantidades ofrece la oportunidad de mejorar la diagnosis y, eventualmente, la inmunoterapia de la alergia, mediante su uso aislado o en combinación con extractos naturales. Una ventaja adicional de los alérgenos recombinantes reside en el hecho de que su estructura molecular puede ser modificada por técnicas de biología molecular, a través de alteraciones de la secuencia del gen que codifica la proteína, lo cual permite ahondar en el estudio de las bases moleculares de la respuesta alérgica⁽¹⁶⁴⁾.

Prácticamente todos los aeroalérgenos descritos han sido clonados, secuenciados y producidos en varios sistemas de expresión heteróloga. La capacidad de obtener alérgenos recombinantes en grandes cantidades ha resultado de especial utilidad para la disponibilidad de alérgenos de pólenes. El sistema de expresión *in vitro* más simple y fácil de manipular es, sin lugar a dudas, la bacteria *Escherichia coli*. Se han expresado con éxito en *E. coli* alérgenos pequeños, sin puentes disulfuro ni modificaciones postraduccionales y sin múltiples cadenas polipeptídicas. Los miembros de la familia de las policalcinas (Ole e 3, Bet v 4, Phl p 7) y de las profilinas (Ole e 2, Che a 2), Art v 1 y Amb

a 1 han sido producidos con un rendimiento muy satisfactorio^(97,100,123,165,166).

Una ventaja de la expresión de alérgenos recombinantes en *E. coli* es la posibilidad de obtener una proteína de fusión del alérgeno con otra proteína bacteriana que facilita la purificación posterior del alérgeno. Esta estrategia se ha seguido para expresar Ole e 1 unido a glutatión S-transferasa (GST), por ejemplo⁽¹⁶⁷⁾. La introducción de dianas específicas entre las dos proteínas permite la separación de ambas proteínas mediante proteólisis. Este sistema, empleado en la producción de los primeros alérgenos recombinantes, ha sido poco a poco abandonado debido al bajo rendimiento en el proceso de aislamiento. Otra estrategia que facilita la purificación del alérgeno producido en cualquier sistema de expresión es la introducción de una cola de histidinas en el extremo amino- o carboxilo-terminal de la proteína, lo que le confiere la capacidad de unirse a columnas de níquel.

Sin embargo, este sistema procariota presenta dificultades a la hora de expresar determinadas proteínas de origen eucariota. En ocasiones, las proteínas no se pliegan de modo equivalente a la forma natural. En otros casos, los alérgenos son expresados en el citoplasma y su purificación es más compleja que cuando la proteína es transportada al espacio periplasmático de la bacteria. También es posible que las proteínas precipiten en los llamados "cuerpos de inclusión" y requieran procesos adicionales de solubilización y plegado, como en el caso de la expresión de Der p 2 en *E. coli*.

La alternativa al sistema bacteriano que más se ha utilizado con resultados satisfactorios para la producción de alérgenos es la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. Aunque el protocolo de expresión es más complejo que el bacteriano, una vez optimizado el proceso, la purificación suele contener un menor número de etapas y menores dificultades técnicas. Los alérgenos de interior Bla g 1, Bla g 2, Bla g 4, Bla g 7, Per a 1, Bos d 2, Fel d 1, Can f 1, Can f 2, Der p 1, Der p 2, Blo t 1 y Blo t 13, entre otros^(46,49,57,168-174), y los de exterior Cup a 3, Cyn d 1, Dac g 1, Ole e 1, Pla l 1, Ole e 6, Ole e 10, Fra e 1 y Che a 1, incluyendo los dominios Nt y Ct de Ole e 9, han sido producidos en *P. pastoris* con buenos rendimientos^(80,99,131,175-182). Otros sistemas eucariotas alternativos para la expresión de alérgenos son las células de insecto infectadas con *Baculovirus* (utilizados para expresar Phl p 1, Fel d 1, Lep d 2, Der f 2 y Ole e 10)^(121,183,184), las células de mamífero (COS-1) para la expresión de Per a 1⁽¹⁸⁵⁾ y sistemas vegetales como las hojas de tabaco o *Arabidopsis*. Estos últimos son especialmente útiles, pese a las dificultades que entraña su manejo, para expresar alérgenos de origen vegetal, ya que las modificaciones postraduccionales introducidas por los sistemas de expresión se asemejan a los que tienen lugar en las fuentes naturales⁽¹⁸⁶⁾.

¿QUÉ NOS APORTA EL CONOCIMIENTO DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LOS ALÉRGENOS?

La capacidad de expresar alérgenos recombinantes ha facilitado la obtención de proteína pura en cantidad suficiente para la determinación de la estructura tridimensional (Figuras 1 y

2). Hasta la fecha se han resuelto más de 15 estructuras de alérgenos y muchas más se han obtenido por modelado sobre una proteína homóloga de estructura conocida. Se conocen las estructuras cristalográficas o por resonancia magnética nuclear (RMN) de Bla g 2, Der p 1, Der p 2, Der f 2, Fel d 1, Bos d 2, Equ c 1, Mus m 1, Rat n 1, Bet v 1, Bet v 2, Phl p 2, Phl p 5b, Phl p 7, Jun a 1, Amb t 5 y Ole e 6^(38,42,46,91,135,171,187-196).

Los aeroalérgenos muestran una amplia variedad estructural que se refleja en su gran variedad funcional. Este variado patrón estructural, ilustrado en las Figuras 1 y 2, incluye moléculas muy simples, como Ole e 6, o complejas, como Jun a 1, y oscila entre estructuras constituidas exclusivamente o bien por hélices α (Fel d 1, Ole e 6, LTP) o por hojas β -plegadas (Der p 2, Phl p 2), y alérgenos con ambas estructuras secundarias combinadas en distinta proporción (Der p 1, Bla g 2, Can f 1, Fel d 3, Phl p 7, Bet v 1, Jun a 1).

A partir de la estructura tridimensional de un alérgeno es posible conocer características moleculares que contribuyen de manera importante a su alergenicidad. Por ejemplo, la existencia de puentes disulfuro en el alérgeno confiere estabilidad a la molécula, lo cual facilita la permanencia del alérgeno en el medio ambiente antes de ser inhalado, y contribuye a su capacidad para atravesar las mucosas y su susceptibilidad a la acción de proteasas.

Un aspecto interesante que se ha podido investigar gracias al conocimiento de la estructura de los alérgenos, es la eficacia de la inmunoterapia específica usando un alérgeno en el tratamiento de la alergia a alérgenos homólogos que muestran reactividad cruzada con él. Por ejemplo, la inmunoterapia para la alergia al abedul ha mostrado protección contra Mal d 1, un homólogo de Bet v 1⁽¹⁹⁷⁾. El conocimiento de la estructura tridimensional del alérgeno también permite determinar la localización de sus epítopos de IgE en la superficie molecular, estudiar la base molecular de los fenómenos de reactividad cruzada y el diseño de formas hipoalérgénicas candidatas para inmunoterapia.

ALÉRGENOS PARA DIAGNOSIS E INMUNOTERAPIA

La inmunoterapia clásica, basada en la administración de dosis crecientes de extractos naturales constituye, hasta la fecha, la única estrategia curativa para la alergia del tipo I⁽¹⁹⁸⁾. Sin embargo, su utilización conlleva una serie de inconvenientes por el hecho de usar extractos, que podrían superarse con el uso de alérgenos recombinantes. Los más importantes son el riesgo de inducción de repuestas anafilácticas a dosis elevadas del alérgeno, y la co-administración de otros productos no alérgénicos presentes en el extracto que, entre otros efectos, pueden causar una sensibilización secundaria^(199,200).

El Comité de Estandarización de Alérgenos de la Organización Mundial de la Salud/Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (WHO/IUIS) ha establecido un programa (CREATE), con el soporte de la Unión Europea, para desarrollar estándares internacionales de aeroalérgenos purificados, tanto en

forma natural como recombinante, que permitirán cuantificar y comparar niveles de alérgenos presentes en extractos naturales y otros productos alergénicos⁽²⁰¹⁾. Aunque el uso clínico de alérgenos recombinantes no ha sido aprobado todavía, algunos de ellos ya han sido validados frente al alérgeno natural mediante técnicas *in vitro* e *in vivo* de unión a IgE, para la diagnosis de la alergia^(164,202-204). Un estudio clínico piloto reciente ha demostrado que una vacuna resultante de la combinación de cinco alérgenos recombinantes de la gramínea *Phleum pratense* es eficaz y segura para mejorar los síntomas de la rinitis alérgica⁽²⁰⁵⁾.

La existencia de estándares de alérgenos recombinantes también ofrece nuevas posibilidades para el futuro de la inmunoterapia. Los extractos naturales podrían usarse conjuntamente con alérgenos recombinantes (en el caso de que uno o varios alérgenos estuvieran escasamente representados en el extracto), o bien ser sustituidos por combinaciones de ellos en cantidades definidas, siempre y cuando estos cócteles de moléculas recombinantes fueran reconocidos por ~100% de pacientes alérgicos a la correspondiente fuente natural. Adicionalmente, gracias a técnicas de ingeniería genética, estas combinaciones podrían ser mejoradas, con el uso de alérgenos hipoalérgénicos modificados para reducir su capacidad de unir IgE pero manteniendo intactos los epítopos reconocidos por las células T. Un mejor conocimiento de la estructura de varios alérgenos ha permitido diseñar nuevas estrategias de inmunoterapia, que consisten en el uso de hipoalérgenos, vacunas de péptidos derivados de alérgenos y alérgenos combinados con adyuvantes, entre otros^(196,206,207).

Formas hipoalérgénicas

Los hipoalérgenos son variantes de alérgenos que muestran una reducida capacidad de unir IgE, reteniendo la mayoría de epítopos reconocidos por las células T. El uso de hipoalérgenos para inmunoterapia es una estrategia desarrollada, entre otros, para el grupo 2 de alérgenos de ácaros. (Alternativamente, por ejemplo.) Se han producido mutantes de Der p 2, Der f 2 y Lep d 2 carentes de algunos de los puentes disulfuro debido a la mutación de cisteínas específicas⁽²⁰⁸⁻²¹⁰⁾. Otras estrategias para producir hipoalérgenos consisten en introducir mutaciones puntuales o deleciones de aminoácidos específicos que originan cambios conformacionales en la proteína o cambios en su capacidad de reconocer IgE, la creación de proteínas híbridas o proteínas codificadas por genes fusionados derivadas de alérgenos diferentes y el uso de fragmentos o dominios de alérgenos, dímeros o trímeros derivados de los mismos o de isoalérgenos naturales con reducida alergenicidad^(206,211-216).

Péptidos

El diseño de vacunas de péptidos derivados de alérgenos es una estrategia de inmunoterapia basada en el conocimiento de la estructura primaria de los alérgenos⁽²¹⁷⁾. La administración de dosis incrementadas de péptidos puede inducir una anergia o respuesta reducida en las células T específicas. Los intentos iniciales de crear una vacuna peptídica derivada de Fel d 1 aportaron mejoras sintomáticas⁽²¹⁸⁾. Sin embargo, los estudios clíni-

cos no prosperaron debido a la aparición de reacciones adversas, ya que la longitud de los péptidos utilizados (27 aminoácidos) era suficiente para inducir respuestas dependientes de IgE. Recientemente, la inyección intradérmica de péptidos más cortos (12-14 aminoácidos) ha dado lugar a la tolerancia a Fel d 1 completo, aunque se han observado respuestas a largo plazo en el pulmón de pacientes asmáticos alérgicos a gato⁽²¹⁹⁾. Las vacunas de péptidos pueden constituir una estrategia interesante para tratar alergias con respuestas graves, como la del cacahuete, cuya administración durante la terapia convencional entraña riesgos demasiado altos de manifestaciones adversas. Sin embargo, en el caso del cacahuete, la existencia de epítopos de IgE lineales podría ser un inconveniente en el diseño de la vacuna.

Alérgenos combinados con adyuvantes

La combinación de alérgenos con adyuvantes ha sido diseñada para reducir la respuesta Th2 durante la inmunoterapia. Uno de los adyuvantes más estudiados, especialmente en combinación con Amb a 1, consiste en las secuencias inmunoestimuladoras CpG, que son una señal bacteriana inductora de una respuesta pro-inflamatoria Th1 en el sistema inmunitario de los vertebrados. Inicialmente, se combinaron plásmidos codificantes de alérgenos con estas secuencias de ADN y se utilizaron para inmunizar ratones^(196,220). En experimentos posteriores, el alérgeno purificado, en lugar del ADN que lo codifica, era combinado con CpG y estudiado *in vivo* en ratones o *in vitro* en PBMC (células mononucleares de sangre periférica) de pacientes, dando lugar a una mayor inmunogenicidad y una reducida alergenidad⁽²²¹⁻²²³⁾. Es interesante destacar que, en los estudios *in vivo* en los que se administró el complejo a humanos, esta estrategia generó un cambio prolongado de la respuesta inmunitaria de Th2 a Th1, sin reacciones locales o sistémicas significativas⁽²²⁴⁾.

Otros adyuvantes cuya combinación con alérgenos ha sido propuesta para inmunoterapia son IL-12, IL-18, lectinas o incluso microorganismos, como *Listeria*, inactivados por calor⁽¹⁶⁴⁾. Recientemente, se produjo una proteína recombinante resultante de la fusión del ADN que codifica Bet v 1 con el gen que codifica la proteína de la superficie celular bacteriana (*S-layer*) de *Geobacillus stearothermophilus*, como adyuvante. La proteína recombinante obtenida mostró una reducida alergenidad manteniendo su capacidad inmunomoduladora⁽²²⁵⁾.

Otras proteínas de fusión

Recientemente, dos proteínas de fusión han resultado en nuevos candidatos para inmunoterapia. Por un lado, se expresó rFel d 1 unido a un anticuerpo contra CD64, para dirigir el alérgeno a las células presentadoras de antígeno⁽¹⁸⁴⁾. Esta proteína de fusión, con capacidad de unir IgG e IgE comparable a la del alérgeno natural, está siendo estudiada por su uso potencial para inmunoterapia. Otra proteína de fusión fue producida combinando Fel d 1 con el IgG humano truncado Fcγ1. Este complejo induce una inhibición dependiente de la dosis de la liberación de histamina por basófilos de pacientes alér-

gicos a gato y mastocitos derivados de sangre de cordón umbilical humano⁽²²⁶⁾. Esta estrategia se basa en que la agregación de FcγRIIIb con FcεRI, unido a IgE, conduce a una inhibición de la señal mediada por FcεRI. Las proteínas de fusión de alérgenos con Fcγ humano podrían proporcionar prometedoras formas de inmunoterapia.

Alérgenos encapsulados en micropartículas

La forma de administrar el alérgeno también puede acentuar la eficacia de los alérgenos purificados incluidos en protocolos de inmunoterapia. Alérgenos como Ole e 1, encapsulados en micropartículas de polímeros de poli-D, L-lactato-co-glicolato (PLG), son capaces de desencadenar respuestas Th1 específicas tras ser administrados en modelos de ratón alérgico. Ésta es una alternativa prometedora a considerar en el futuro para vacunas contra determinadas alergias⁽²²⁷⁾.

En resumen, la posibilidad de la producción de alérgenos recombinantes, modificados o no, que sustituyan o complementen los extractos alérgicos usados en terapia convencional, proporciona nuevas perspectivas en el tratamiento de la alergia.

CONCLUSIÓN

Los aeroalérgenos son, en general, proteínas pequeñas (10-60 kDa), de origen diverso, transportadas por partículas volátiles que acceden a las vías respiratorias tras ser inhaladas, y de las que son liberadas gracias a su solubilidad en medios acuosos. Su relativa estabilidad en el medio ambiente es imprescindible para acceder al sistema inmunitario e inducir la producción de anticuerpos IgE en individuos con predisposición genética al desarrollo de alergias. Los estudios moleculares han revelado una amplia variedad estructural y funcional de los aeroalérgenos, sin características físico-químicas comunes. Algunas propiedades intrínsecas de cada alérgeno, como la actividad proteolítica de Der p 1, pueden influir, pero no son indispensables para su alergenidad. El conocimiento de la estructura y función de los alérgenos permite el diseño de nuevas formas de diagnóstico y terapia para el futuro tratamiento de la alergia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chapman MD. Allergens. En: Roitt IM and Delves PJ, eds. Encyclopedia of Immunology. 2ª ed. London: Academic Press; 1998. vol. 1, p. 1-6.
2. Platts-Mills TA, Vervloet D, Thomas WR, Aalberse RC, Chapman MD. Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop. J Allergy Clin Immunol 1997; 100: S2-24.
3. Leaderer BP, Belanger K, Triche E, Holford T, Gold DR, Kim Y et al. Dust mite, cockroach, cat, and dog allergen concentrations in homes of asthmatic children in the northeastern United States: impact of socioeconomic factors and population density. Environ Health Perspect 2002; 110: 419-25.

4. Sporik R, Squillace SP, Ingram JM, Rakes G, Honsinger RW, Platts-Mills TA. Mite, cat, and cockroach exposure, allergen sensitisation, and asthma in children: a case-control study of three schools. *Thorax* 1999; 54: 675-80.
5. Rosenstreich DL, Eggleston P, Kattan M, Baker D, Slavin RG, Gergen P et al. The role of cockroach allergy and exposure to cockroach allergen in causing morbidity among inner-city children with asthma. *N Engl J Med* 1997; 336: 1356-63.
6. Arruda LK, Vailes LD, Ferriani VP, Santos AB, Pomés A, Chapman MD. Cockroach allergens and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 419-28.
7. Reid MJ, Moss RB, Hsu YP, Kwasnicki JM, Commerford TM, Nelson BL. Seasonal asthma in Northern California: Allergy causes and efficacy of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 78: 590-9.
8. Helm RM, Pomés A. Cockroach and other inhalant insect allergens. *Clin Allergy Immunol* 2004; 18: 271-96.
9. Arruda LK, Ferriani VP, Vailes LD, Pomés A, Chapman MD. Cockroach allergens: environmental distribution and relationship to disease. *Curr Allergy Asthma Rep* 2001; 1: 466-73.
10. Fernández-Caldas E. Mite species of allergologic importance in Europe. *Allergy* 1997; 52: 383-7.
11. Montealegre F, Sepúlveda A, Bayona M, Quiñones C, Fernández-Caldas E. Identification of the domestic mite fauna of Puerto Rico. *P R Health Sci J* 1997; 16: 109-16.
12. Chew FT, Lim SH, Goh DY, Lee BW. Sensitization to local dust-mite fauna in Singapore. *Allergy* 1999; 54: 1150-9.
13. Fernández-Caldas E. Allergenicity of *Blomia tropicalis*. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1997; 7: 402-4.
14. Montealegre F, Fernández B, Delgado A, Fernández L, Román A, Chardón D et al. Exposure levels of asthmatic children to allergens, endotoxins, and serine proteases in a tropical environment. *J Asthma* 2004; 41: 485-96.
15. Eggleston PA. Improving indoor environments: reducing allergen exposures. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 122-6.
16. Platts-Mills TA, Vaughan JW, Carter MC, Woodfolk JA. The role of intervention in established allergy: avoidance of indoor allergens in the treatment of chronic allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 787-804.
17. Fernández-Caldas E, Trudeau WL, Ledford DK. Environmental control of indoor biologic agents. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94 (2 Pt 2): 404-12.
18. Chapman MD, Platts-Mills TA. Purification and characterization of the major allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus*-antigen P1. *J Immunol* 1980; 125: 587-92.
19. Chua KY, Stewart GA, Thomas WR, Simpson RJ, Dilworth RJ, Plozza TM et al. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. Homology with cysteine proteases. *J Exp Med* 1988; 167: 175-82.
20. Thomas WR, Chua KY. The major mite allergen Der p 2--a secretion of the male mite reproductive tract? *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 667-9.
21. Stewart GA, Kollinger MR, King CM, Thompson PJ. A comparative study of three serine proteases from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae*. *Allergy* 1994; 49: 553-60.
22. Takai T, Kato T, Sakata Y, Yasueda H, Izuhara K, Okumura K et al. Recombinant Der p 1 and Der f 1 exhibit cysteine protease activity but no serine protease activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 944-52.
23. Sauer J, Thorsted PB, Mutenda K, Ipsen H, Lund K. Identification of nDer p 3 as the serine protease activity associated with purified nDer p 1 from house dust mite extract. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: S89.
24. Pomés A, Smith AM, Grégoire C, Vailes LD, Arruda LK, Chapman MD. Functional properties of cloned allergens from dust mite, cockroach and cat – are they relevant to allergenicity? *Allergy Clin Immunol Int* 2001; 13: 162-9.
25. Asokanathan N, Graham PT, Stewart DJ, Bakker AJ, Eidne KA, Thompson PJ et al. House dust mite allergens induce proinflammatory cytokines from respiratory epithelial cells: the cysteine protease allergen, Der p 1, activates protease-activated receptor (PAR)-2 and inactivates PAR-1. *J Immunol* 2002; 169: 4572-8.
26. Baker SF, Yin Y, Runswick SK, Stewart GA, Thompson PJ, Garrod DR et al. Peptidase allergen Der p 1 initiates apoptosis of epithelial cells independently of tight junction proteolysis. *Mol Membr Biol* 2003; 20: 71-81.
27. Ghaemmaghami AM, Gough L, Sewell HF, Shakib F. The proteolytic activity of the major dust mite allergen Der p 1 conditions dendritic cells to produce less interleukin-12: allergen-induced Th2 bias determined at the dendritic cell level. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 1468-75.
28. Ghaemmaghami AM, Robins A, Gough L, Sewell HF, Shakib F. Human T cell subset commitment determined by the intrinsic property of antigen: the proteolytic activity of the major mite allergen Der p 1 conditions T cells to produce more IL-4 and less IFN-gamma. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1211-6.
29. Ghaemmaghami AM, Shakib F. Human T cells that have been conditioned by the proteolytic activity of the major dust mite allergen Der p 1 trigger enhanced immunoglobulin E synthesis by B cells. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 728-32.
30. Lake FR, Ward LD, Simpson RJ, Thompson PJ, Stewart GA. House dust mite-derived amylase: allergenicity and physicochemical characterization. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 1035-42.
31. Mills KL, Hart BJ, Lynch NR, Thomas WR, Smith W. Molecular characterization of the group 4 house dust mite allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus* and its amylase homologue from *Euroglyphus maynei*. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 120: 100-7.
32. Arruda LK, Vailes LD, Platts-Mills TA, Hayden ML, Chapman MD. Induction of IgE antibody responses by glutathione S-transferase from the German cockroach (*Blattella germanica*). *J Biol Chem* 1997; 272: 20907-12.
33. Satinover SM, Reefer AJ, Pomés A, Chapman MD, Platts-Mills TAE, Woodfolk JA. Specific IgE and IgG antibody binding patterns to recombinant cockroach allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 803-9.
34. O'Neill GM, Donovan GR, Baldo BA. Cloning and characterization of a major allergen of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*, homologous with glutathione S-transferase. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1219: 521-8.
35. Weber E, Hunter S, Stedman K, Dreitz S, Olivry T, Hillier A et al. Identification, characterization, and cloning of a complementary DNA encoding a 60-kd house dust mite allergen (Der f 18) for human beings and dogs. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 79-86.
36. Breiteneder H, Ebner C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 27-36.
37. Ichikawa K, Vailes LD, Pomés A, Chapman MD. Molecular cloning, expression and modelling of cat allergen, cystatin (Fel d 3), a cysteine protease inhibitor. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 1279-86.
38. Bocskei Z, Groom CR, Flower DR, Wright CE, Phillips SE, Cavaggioni A. Pheromone binding to two rodent urinary proteins revealed by X-ray crystallography. *Nature* 1992; 360: 186-8.
39. Smith W, Butler AJ, Hazell LA, Chapman MD, Pomés A, Nickels DG et al. Fel d 4, a cat lipocalin allergen. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1732-8.
40. Chan SL, Ong ST, Ong TC, Chew FT, Mok YK. Solution structure and epitope mapping of a major group 13 allergen from the house

- dust mites, *Dermatophagoides farinae*. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: S88.
41. Reginald K, Wenk MR, Chew FT. The major mite allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus*, Der p 2, is a sterol binding protein. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: S88.
 42. Kaiser L, Gronlund H, Sandalova T, Ljunggren HG, van Hage-Hamsten M, Achour A et al. The crystal structure of the major cat allergen Fel d 1, a member of the secretoglobulin family. *J Biol Chem* 2003; 278: 37730-5.
 43. Valenta R, Hayek B, Seiberler S, Bugajska-Schretter A, Niederberger V, Twardosz A et al. Calcium-binding allergens: from plants to man. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 117: 160-6.
 44. Hindley J, Wünschmann S, Satinover SM, Woodfolk JA, Chew FT, Chapman MD et al. Bla g 6: a troponin C allergen from *Blattella germanica* with IgE binding calcium dependence. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 1389-95.
 45. Buisson G, Duee E, Haser R, Payan F. Three dimensional structure of porcine pancreatic alpha-amylase at 2.9 Å resolution. Role of calcium in structure and activity. *EMBO J* 1987; 6: 909-16.
 46. Gustchina A, Li M, Wünschmann S, Chapman MD, Pomés A, Wlodawer A. Crystal structure of cockroach allergen Bla g 2, an unusual zinc binding aspartic protease with a novel mode of self-inhibition. *J Mol Biol* 2005; 348: 433-44.
 47. Pomés A, Chapman MD, Vailes LD, Blundell TL, Dhanaraj V. Cockroach allergen Bla g 2: Structure, function and implications for allergic sensitization. *Am J Resp Crit Care Med* 2002; 165: 391-7.
 48. Wünschmann S, Gustchina A, Chapman MD, Pomés A. Cockroach allergen Bla g 2: an unusual aspartic proteinase. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 140-5.
 49. Jeong KY, Lee J, Lee IY, Hong CS, Ree HI, Yong TS. Expression of tropomyosin from *Blattella germanica* as a recombinant non-fusion protein in *Pichia pastoris* and comparison of its IgE reactivity with its native counterpart. *Protein Expr Purif* 2004; 37: 273-8.
 50. Tsai L, Sun Y, Chao P, Ng H, Hung M, Hsieh K et al. Sequence analysis and expression of a cDNA clone encoding a 98-kDa allergen in *Dermatophagoides farinae*. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 1606-13.
 51. Kawamoto S, Suzuki T, Aki T, Katsutani T, Tsuboi S, Shigeta S et al. Der f 16: a novel gelsolin-related molecule identified as an allergen from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*. *FEBS Lett* 2002; 516: 234-8.
 52. Ayuso R, Reese G, Leong-Kee S, Plante M, Lehrer SB. Molecular basis of arthropod cross-reactivity: IgE-binding cross-reactive epitopes of shrimp, house dust mite and cockroach tropomyosins. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129: 38-48.
 53. Schou C, Lind P, Fernández-Caldas E, Lockey RF, Lowenstein H. Identification and purification of an important cross-reactive allergen from American (*Periplaneta americana*) and German (*Blattella germanica*) cockroach. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86 (6 Pt 1): 935-46.
 54. Wu CH, Wang NM, Lee MF, Kao CY, Luo SF. Cloning of the American cockroach Cr-P11 allergens: evidence for the existence of cross-reactive allergens between species. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101 (6 Pt 1): 832-40.
 55. Pomés A, Melén E, Vailes LD, Retief JD, Arruda LK, Chapman MD. Novel allergen structures with tandem amino acid repeats derived from German and American cockroach. *J Biol Chem* 1998; 273: 30801-7.
 56. Melén E, Pomés A, Vailes LD, Arruda LK, Chapman MD. Molecular cloning of Per a 1 and definition of the cross-reactive Group 1 cockroach allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 859-64.
 57. Pomés A, Vailes LD, Helm RM, Chapman MD. IgE reactivity of tandem repeats derived from cockroach allergen, Bla g 1. *Eur J Biochem* 2002; 269: 3086-92.
 58. Esch RE, Hartsell CJ, Crenshaw R, Jacobson RS. Common Allergenic Pollens, Fungi, Animals, and Arthropods. *Clin Rev Allergy Immunol* 2001; 21: 261-92.
 59. Accorsi CA, Bandini-Mazzanti M, Frenguelli G, Mincigrucci G, Romano B et al. Allergenic pollen: Morphology and microscopic photographs. En: D'Amato G, Spieksma FTHM, Bonini S, eds. *Allergenic pollen and Pollinosis in Europe*. Oxford: Blackwell; 1991. p. 24-44.
 60. Helander ML, Savolainen J, Ahlholm J. Effects of air pollution and other environmental factors on birch pollen allergens. *Allergy* 1997; 52: 1207-14.
 61. Fountain DW. Pollen and inhalant allergy. *Biologist* 2002; 49: 5-9.
 62. Suphioglu C, Singh MB, Taylor P, Bellomo R, Holmes P, Puy R et al. Mechanisms of grass-pollen-induced asthma. *Lancet* 1992; 339: 569-72.
 63. Schappi GF, Taylor PE, Staff IA, Rolland JM, Suphioglu C. Immunologic significance of respirable atmospheric starch granules containing major birch allergen Bet v 1. *Allergy* 1999; 54: 478-83.
 64. Grote M, Vrtala S, Niederberger V, Wiermann R, Valenta R, Reichelt R. Release of allergen-bearing cytoplasm from hydrated pollen: a mechanism common to a variety of grass (Poaceae) species revealed by electron microscopy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 109-15.
 65. Currie AJ, Stewart GA, McWilliam AS. Alveolar macrophages bind and phagocytose allergen-containing pollen starch granules via C-type lectin and integrin receptors: implications for airway inflammatory disease. *J Immunol* 2000; 164: 3878-86.
 66. Rantio-Lehtimäki A. Aerobiology of pollen and pollen allergens. En: Cox CS, Wathes CM, eds. *Bioaerosols Handbook*. Boca Raton, Fla: CRC Press; 1995. p. 387-406.
 67. Weeke ER, Spieksma FTHM. Allergenic significance of Gramineae (Poaceae). En: D'Amato G, Spieksma F, Bonini S, eds. *Allergenic pollen and pollinosis in Europe*. London: Blackwell Scientific Publications; 1991. p. 109-12.
 68. Subiza JL, Jerez M, Jiménez JA, Narganes MJ, Cabrera M, Varela S et al. Allergenic pollen and pollinosis in Madrid. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96: 15-23.
 69. van Ree R, van Leeuwen WA, Aalberse RC. How far can we simplify in vitro diagnostics for grass pollen allergy?: A study with 17 whole pollen extracts and purified natural and recombinant major allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 184-90.
 70. Andersson K, Lidholm J. Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 130: 87-107.
 71. Suphioglu C. What are the important allergens in grass pollen that are linked to human allergic disease? *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 1335-41.
 72. Grobe K, Becker W-M, Schalaak M, Petersen A. Grass group I allergens (beta-expansins) are novel, papain-related proteinases. *Eur J Biochem* 1999; 263: 33-40.
 73. Yman L. Botanical relations and immunological cross-reactions in pollen allergy. L Yman - Pharmacia Diagnostics AB. Uppsala. Sweden, 1982.
 74. Ericsson NE, Wihl JA, Arrendal H, Strandhede SO. Tree pollen allergy. III. Cross reactions based on results from skin prick tests and the RAST in hay fever patients: a multi-centre study. *Allergy* 1987; 42: 205-14.
 75. Mothes N, Westritschnig K, Valenta R. Tree pollen allergens. *Clin Allergy Immunol* 2004; 18: 165-84.
 76. D'Amato G, Mullins J, Nolard N, Spieksma FT, Wachter R. City spore concentrations in the European Economic Community (EEC). VII. Oleaceae (*Fraxinus*, *Ligustrum*, *Olea*). *Clin Allergy* 1988; 18: 541-7.
 77. Di Felice G, Barletta B, Tinghino R, Pini C. Cupressaceae pollinosis: identification, purification and cloning of relevant allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 125: 280-9.

78. Valenta R, Kraft D. Type I allergic reactions to plant-derived food: A consequence of primary sensitization to pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 893-5.
79. Kazemi-Shirazi L, Pauli G, Purohit A, Spitzauer S, Froschl R, Hoffmann-Sommergruber K et al. Quantitative IgE inhibition experiments with purified recombinant allergens indicate pollen-derived allergens as the sensitizing agents responsible for many forms of plant food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 116-25.
80. Barderas R, Purohit A, Papanikolaou I, Rodríguez R, Pauli G, Villalba M. Cloning, expression, and clinical significance of the major allergen from ash pollen, Fra e 1. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 351-7.
81. Batanero E, González de la Peña MA, Villalba M, Monsalve RI, Martín-Esteban M, Rodríguez R. Isolation, cDNA cloning and expression of Lig v 1, the major allergen from privet pollen. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 1401-10.
82. Batanero E, Villalba M, López-Otín C, Rodríguez R. Isolation and characterization of an olive allergen-like protein from lilac pollen. Sequence analysis of three cDNA encoding protein isoforms. *Eur J Biochem* 1994; 221: 187-93.
83. Valenta R, Duchene M, Pettenburger K, Sillaber C, Valent P, Bettelheim P et al. Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE auto-reactivity in sensitized individuals. *Science* 1991; 253: 557-60.
84. Hirschwehr R, Valenta R, Ebner C, Ferreira F, Sperr WR, Valent P et al. Identification of common allergenic structures in hazel pollen and hazelnuts: a possible explanation for sensitivity to hazelnuts in patients allergic to tree pollen. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 927-36.
85. Ledesma A, Rodríguez R, Villalba M. Olive-pollen profilin. Molecular and immunologic properties. *Allergy* 1998; 53: 520-6.
86. Tejera ML, Villalba M, Batanero E, Rodríguez R. Identification, isolation, and characterization of Ole e 7, a new allergen of olive tree pollen. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 797-802.
87. Schocker F, Luttkopf D, Scheurer S, Petersen A, Cisteró-Bahima A, Enrique E et al. Recombinant lipid transfer protein Cor a 8 from hazelnut: a new tool for in vitro diagnosis of potentially severe hazelnut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 141-7.
88. Díaz-Perales A, Lombardero M, Sánchez-Monge R, García-Sellés FJ, Pernas M, Fernández-Rivas M et al. Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of *Artemisia* pollen, *Castanea* nut and *Rosaceae* fruits, with different IgE-binding capacities. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 1403-10.
89. Sone T, Komiyama N, Shimizu K, Kusakabe T, Morikubo K, Kino K. Cloning and sequencing of cDNA coding for Cry j 1, a major allergen of Japanese cedar pollen. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199: 619-28.
90. Sakaguchi M, Inouye S, Tani ai M, Ando S, Usui M, Matuhasi T. Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen. *Allergy* 1990; 45: 309-12.
91. Liu D, Midoro-Horiuti T, White MA, Brooks EG, Goldblum RM, Czerwinski EW. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Jun a 1, the major allergen isolated from pollen of the mountain cedar *Juniperus ashei*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2003; 59: 1052-4.
92. González Minero FJ, Morales J, Candau P, Tomás MC, Pérez Tello AM. Aerobiological study of *Chenopodiaceae* and *Amaranthaceae* in the Mediterranean area of southwestern Spain. *Investig Allergol Clin Immunol* 1998; 8: 370-5.
93. Ezeamuzie CI, Thomson MS, Al-Ali S, Dowaisan A, Khan M, Hijazi Z. Asthma in the desert: Spectrum of the sensitizing aeroallergens. *Allergy* 2000; 55: 157-62.
94. Asero R. Birch and ragweed pollinosis north of Milan: a model to investigate the effects of exposure to "new" airborne allergens. *Allergy* 2002; 57: 1063-6.
95. Gadermaier G, Dedic A, Obermeyer G, Frank S, Himly M, Ferreira F. Biology of weed pollen allergens. *Curr Allergy Asthma Rep* 2004; 4: 391-400.
96. Rafnar T, Griffith IJ, Kuo MC, Bond JF, Rogers BL, Klapper DG. Cloning of Amb a 1 (antigen E), the major allergen family of short ragweed pollen. *J Biol Chem* 1991; 266: 1229-36.
97. Himly M, Jahn-Schmid B, Dedic A, Kelemen P, Wopfner N, Altmann F et al. Art v 1, the major allergen of mugwort pollen, is a modular glycoprotein with a defensin-like and a hydroxyproline-rich domain. *FASEB J* 2003; 17: 106-8.
98. Barderas R, Villalba M, Lombardero M, Rodríguez R. Identification and characterization of Che a 1 allergen from *Chenopodium album* pollen. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 127: 47-54.
99. Calabozo B, Díaz-Perales A, Salcedo G, Barber D, Polo F. Cloning and expression of biologically active *Plantago lanceolata* pollen allergen Pla l 1 in the yeast *Pichia pastoris*. *Biochem J* 2003; 372: 889-96.
100. Barderas R, Villalba M, Rodríguez R. Recombinant expression, purification and cross-reactivity of chenopod profilin: rChe a 2 as a good marker for profilin sensitization. *Biol Chem* 2004; 385: 731-7.
101. Asturias JA, Arilla MC, Gómez-Bayón N, Aguirre M, Martínez A, Palacios R et al. Cloning and immunological characterization of the allergen Hel a 2 (profilin) from sunflower pollen. *Mol Immunol* 1998; 35: 469-78.
102. Vallverdu A, Asturias JA, Arilla MC, Gómez-Bayón N, Martínez A, Martínez J et al. Characterization of recombinant *Mercurialis annua* major allergen Mer a 1 (profilin). *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 363-70.
103. Grote M, Vrtala S, Valenta R. Monitoring of two allergens, Bet v I and profilin, in dry and rehydrated birch pollen by immunogold electron microscopy and immunoblotting. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 745-50.
104. Valenta R, Kraft D. From allergen structure to new forms of allergen-specific immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 718-27.
105. Hoffmann-Sommergruber K. Plant allergens and pathogenesis-related proteins. What do they have in common? *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 122: 155-66.
106. Huecas S, Villalba M, Rodríguez R. Ole e 9, a major olive pollen allergen is a 1,3-beta-glucanase. Isolation, characterization, amino acid sequence, and tissue specificity. *J Biol Chem* 2001; 276: 27959-66.
107. Markovic-Housley Z, Degano M, Lamba D, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S, Susani M et al. Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. *J Mol Biol* 2003; 325: 123-33.
108. Hoffmann-Sommergruber K, O'Riordain G, Ahorn H, Ebner C, Laimer Da Camara Machado M, Pühringer H et al. Molecular characterization of Dau c 1, the Bet v 1 homologous protein from carrot and its cross-reactivity with Bet v 1 and Api g 1. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 840-7.
109. Gao ZS, van de Weg WE, Schaart JG, Schouten HJ, Tran DH, Kodde LP et al. Genomic cloning and linkage mapping of the Mal d 1 (PR-10) gene family in apple (*Malus domestica*). *Theor Appl Genet* 2005; 111: 171-83.
110. Rodríguez R, Villalba M, Monsalve RI, Batanero E. The spectrum of olive pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 125: 185-95.
111. Miralles JC, Caravaca F, Guillén F, Lombardero M, Negro JM. Cross-reactivity between *Platanus* pollen and vegetables. *Allergy* 2002; 57: 146-9.
112. Hiller KM, Lubahn BC, Klapper DK. Cloning and expression of ragweed allergen Amb a 6. *Scan J Immunol* 1998; 48: 26-36.
113. Colombo P, Bonura A, Costa M, Izzo V, Passantino R, Locorotondo G et al. The allergens of *Parietaria*. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 130: 173-9.

114. García-Sellés FJ, Díaz-Perales A, Sánchez-Monge R, Alcántara M, Lombardero M, Barber D et al. Patterns of reactivity to lipid transfer proteins of plant foods and *Artemisia* pollen: an in vivo study. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128: 115-22.
115. Duffort OA, Polo F, Lombardero M, Díaz-Perales A, Sánchez-Monge R, García-Casado G et al. Immunoassay to quantify the major peach allergen Pru p 3 in foodstuffs. Differential allergen release and stability under physiological conditions. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 7738-41.
116. Pastorello EA, Robino AM. Clinical role of lipid transfer proteins in food allergy. *Mol Nutr Food Res* 2004; 48: 356-62.
117. Grobe K, Poppelmann M, Becker WM, Petersen A. Properties of group I allergens from grass pollen and their relation to cathepsin B, a member of the C1 family of cysteine proteinases. *Eur J Biochem* 2002; 269: 2083-92.
118. Bufe A, Schramm G, Keown MB, Schlaak M, Becker WM. Major allergen Phl p Vb in timothy grass is a novel RNase. *FEBS Lett* 1995; 363: 6-12.
119. Leduc-Brodard V, Inacio F, Jaquinod M, Forest E, David B, Peltre G. Characterization of Dac g 4, a major basic allergen from *Dactylis glomerata* pollen. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 1065-72.
120. Asturias JA, Ibarrola I, Eraso E, Arilla MC, Martínez A. The major *Platanus acerifolia* pollen allergen Pla a 1 has sequence homology to invertase inhibitors. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 978-85.
121. Barral P, Serrano AG, Batanero E, Pérez-Gil J, Villalba M, Rodríguez R. A recombinant functional variant of the olive pollen allergen Ole e 10 expressed in baculovirus system. *J Biotechnol* 2006; 121: 402-9.
122. Tinghino R, Twardosz A, Barletta B, Puggioni EM, Iacovacci P, Butteroni C et al. Molecular, structural, and immunologic relationship between different families of recombinant calcium-binding pollen proteins. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 314-20.
123. Ledesma A, Villalba M, Batanero E, Rodríguez R. Molecular cloning and expression of active Ole e 3, a major allergen from olive-tree pollen and member of a novel family of Ca²⁺-binding proteins (polcalcins) involved in allergy. *Eur J Biochem* 1998; 258: 454-9.
124. Smith PM, Xu H, Swoboda I, Singh MB. Identification of a Ca²⁺ binding protein as a new Bermuda grass pollen allergen Cyn d 7: IgE cross-reactivity with oilseed rape pollen allergen Bra r 1. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 114: 265-71.
125. Welch J, Jones MG, Cullinan P, Coates OA, Newman Taylor AJ. Sensitization to oilseed rape is not due to cross-reactivity with grass pollen. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 370-5.
126. Seiberler S, Scheiner O, Kraft D, Lonsdale D, Valenta R. Characterization of a birch pollen allergen, Bet v III, representing a novel class of Ca²⁺ binding proteins: specific expression in mature pollen and dependence of patients' IgE binding on protein-bound Ca²⁺. *EMBO J* 1994; 13: 3481-6.
127. Tinghino R, Barletta B, Palumbo S, Afferni C, Iacovacci P, Mari A et al. Molecular characterization of a cross-reactive *Juniperus oxycedrus* pollen allergen, Jun o 2: a novel calcium-binding protein. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 772-7.
128. Barderas R, Villalba M, Pascual CY, Batanero E, Rodríguez R. Profilin (Che a 2) and polcalcin (Che a 3) are relevant allergens of *Chenopodium album* pollen: isolation, amino acid sequences, and immunologic properties. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 1192-8.
129. Klapper DG, Goodfriend I, Capra JD. Amino acid sequence of ragweed allergen Ra3. *Biochemistry* 1980; 19: 5729-34.
130. Barre A, Rougé P. Homology modeling of the cellulose-binding domain of a pollen allergen from rye grass: Structural basis for the cellulose recognition and associated allergenic properties. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 1346-51.
131. Palomares O, Villalba M, Rodríguez R. The C-terminal segment of the 1,3-beta-glucanase Ole e 9 from olive (*Olea europaea*) pollen is an independent domain with allergenic activity: expression in *Pichia pastoris* and characterization. *Biochem J* 2003; 369: 593-601.
132. Alché JD, Castro AJ, Olmedilla A, Fernández MC, Rodríguez R, Villalba M et al. The major olive pollen allergen (Ole e 1) shows both gametophytic and sporophytic expression during anther development, and its synthesis and storage takes place in the RER. *J Cell Sci* 1999; 112: 2501-9.
133. Johnson MA, Preuss D. On your mark, get set, GROW! LePRK2-LAT52 interactions regulate pollen tube growth. *Trends Plant Sci* 2003; 8: 97-9.
134. Ghosh B, Perry MP, Rafnar T, Marsh DG. Cloning and expression of immunologically active recombinant Amb a V allergen of short ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) pollen. *J Immunol* 1993; 150: 5391-9.
135. Trevino MA, García-Mayoral MF, Barral P, Villalba M, Santoro J, Rico M et al. NMR solution structure of Ole e 6, a major allergen from olive tree pollen. *J Biol Chem* 2004; 279: 39035-41.
136. van Ree R, Cabanes-Macheteau M, Akkerdaas J, Milazzo JP, Loutelier-Bourhis C, Rayon C et al. Beta(1,2)-xylose and alpha(1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. *J Biol Chem* 2000; 275: 11451-8.
137. van Ree R. Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129: 189-97.
138. Goubran Botros H, Gregoire C, Rabillon J, David B, Dandeu JP. Cross-antigenicity of horse serum albumin with dog and cat albumins: study of three short peptides with significant inhibitory activity towards specific human IgE and IgG antibodies. *Immunology* 1996; 88: 340-7.
139. Smith AM, Benjamin DC, Hozic N, Derewenda U, Smith WA, Thomas WR et al. The molecular basis of antigenic cross-reactivity between the group 2 mite allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 977-84.
140. Petersen BN, Janniche H, Munch EP, Wihl JA, Bowadt H, Ipsen H et al. Immunotherapy with partially purified and standardized tree pollen extracts. I. Clinical results from a three-year double-blind study of patients treated with pollen extracts either of birch or combinations of alder, birch and hazel. *Allergy* 1988; 43: 353-62.
141. Lombardero M, Obispo T, Calabozo B, Lezaún A, Polo F, Barber D. Cross-reactivity between olive and other species. Role of Ole e 1-related proteins. *Allergy* 2002; 57: 29-34.
142. Barletta B, Afferni C, Tinghino R, Mari A, Di Felice G, Pini C. Cross-reactivity between *Cupressus arizonica* and *Cupressus sempervirens* pollen extracts. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 797-804.
143. Midoro-Horiuti T, Goldblum RM, Kurosky A, Wood TG, Schein CH, Brooks EG. Molecular cloning of the mountain cedar (*Juniperus ashei*) pollen major allergen, Jun a 1. *Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 613-7.
144. Canini A, Giovanazzi J, Iacovacci P, Pini C, Grillo Caiola M. Localisation of a carbohydrate epitope recognised by human IgE in pollen of Cupressaceae. *J Plant Res* 2004; 11: 147-53.
145. Deviller P, Pauli G. Cross-reactions involving plant allergens. *Clin Rev in Allergy Immunol* 1997; 15: 405-13.
146. Pauli G. Evolution in the understanding of cross-reactivities of respiratory allergens: The role of recombinant allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123: 183-95.
147. Hemmer W, Focke M, Wantke F, Götz M, Jarisch R, Jäger S. Ash (*Fraxinus excelsior*) pollen allergy in Central Europe: Specific role of pollen panallergens and the major allergen of ash pollen, Fra e 1. *Allergy* 2000; 55: 923-30.

148. Palomares O, Villalba M, Quiralte J, Polo F, Rodríguez R. 1,3-beta-glucanases as candidates in latex-pollen-vegetable food cross-reactivity. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 345-51.
149. Wüthrich B, Stager J, Johansson SG. Celery allergy associated with birch and mugwort pollinosis. *Allergy* 1990; 45: 566-71.
150. Ballmer-Weber BK, Vieths D, Lüttkopf D, Heuschmann P, Wüthrich B. Celery allergy confirmed by double-blind, placebo-controlled food challenge: a clinical study in 32 subjects with a history of adverse reactions to celery root. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 373-8.
151. Jankiewicz A, Baltes W, Bögl KW, Dehne LI, Jamin A, Hoffmann A. Influence of food processing of the immunochemical stability of celery allergens. *J Sci Food Agric* 1997; 75: 359-70.
152. Aalberse RC. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 228-38.
153. Díaz-Sánchez D, Tsien A, Fleming J, Saxon A. Combined diesel exhaust particulates and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a helper cell 2-type pattern. *J Immunol* 1997; 158: 2406-13.
154. Kramer U, Koch T, Ranft U, Ring J, Behrendt H. Traffic-related air pollution is associated with atopy in children living in urban areas. *Epidemiology* 2000; 11: 64-70.
155. Pomés A. Intrinsic properties of allergens and environmental exposure as determinants of allergenicity. *Allergy* 2002; 57: 673-9.
156. Gabrielsson S, Paulie S, Roquet A, Ihre E, Lagging E, van Hage-Hamsten M et al. Increased allergen-specific Th2 responses in vitro in atopic subjects receiving subclinical allergen challenge. *Allergy* 1997; 52: 860-5.
157. Platts-Mills T, Vaughan J, Squillace S, Woodfolk J, Sporik R. Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. *Lancet* 2001; 357: 752-6.
158. Custovic A, Hallam CL, Simpson BM, Craven M, Simpson A, Woodcock A. Decreased prevalence of sensitization to cats with high exposure to cat allergen. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 537-9.
159. Virtanen T, Zeiler T, Rautiainen J, Mantylarvi R. Allergy to lipocalins: a consequence of misguided T-cell recognition of self and nonself? *Immunol Today* 1999; 20: 398-400.
160. Spitzauer S. Allergy to mammalian proteins: at the borderline between foreign and self? *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 120: 259-69.
161. Goubran Botros H, Poncet P, Rabillon J, Fontaine T, Laval JM, David B. Biochemical characterization and surfactant properties of horse allergens. *Eur J Biochem* 2001; 268: 3126-36.
162. Wymann D, Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Cramer R, Blaser K. Enzymatic activity of soluble phospholipase A2 does not affect the specific IgE, IgG4 and cytokine responses in bee sting allergy. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 839-49.
163. Valenta R, Duchene M, Vrtala S, Birkner T, Ebner C, Hirschwehr R et al. Recombinant allergens for immunoblot diagnosis of tree-pollen allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 889-94.
164. 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.
165. Twardosz A, Hayek B, Seiberler S, Vangelista L, Elfman L, Gronlund H et al. Molecular characterization, expression in *Escherichia coli*, and epitope analysis of a two EF-hand calcium-binding birch pollen allergen, Bet v 4. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239: 197-204.
166. Bond JF, Garman RD, Keating KM, Briner TJ, Rafnar T, Klapper DG et al. Multiple Amb a 1 allergens demonstrate specific reactivity with IgE and T cells from ragweed-allergic patients. *J Immunol* 1991; 146: 3380-5.
167. Villalba M, Batanero E, Monsalve RI, González de la Peña MA, Lahoz C, Rodríguez R. Cloning and expression of Ole e 1, the major allergen from olive tree pollen. Polymorphism analysis and tissue specificity. *J Biol Chem* 1994; 269: 15217-22.
168. Vailes LD, Kinter MT, Arruda LK, Chapman MD. High-level expression of cockroach allergen, Bla g 4, in *Pichia pastoris*. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 274-80.
169. van Ree R, van Leeuwen WA, Bulder I, Bond J, Aalberse RC. Purified natural and recombinant Fel d 1 and cat albumin in vitro diagnostics for cat allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 1223-30.
170. Best EA, Stedman KE, Bozic CM, Hunter SW, Vailes L, Chapman MD et al. A recombinant group 1 house dust mite allergen, rDer f 1, with biological activities similar to those of the native allergen. *Protein Expr Purif* 2000; 20: 462-71.
171. Rautiainen J, Auriola S, Rouvinen J, Kauppinen J, Zeiler T, Novikov D et al. Molecular and crystal properties of Bos d 2, an allergenic protein of the lipocalin family. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247: 746-50.
172. Saarelainen S, Taivainen A, Rytönen-Nissinen M, Auriola S, Immonen A, Mantylarvi R et al. Assessment of recombinant dog allergens Can f 1 and Can f 2 for the diagnosis of dog allergy. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1576-82.
173. Cheong N, Soon SC, Ramos JD, Kuo IC, Kolatkar PR, Lee BW et al. Lack of human IgE cross-reactivity between mite allergens Blo t 1 and Der p 1. *Allergy* 2003; 58: 912-20.
174. Labrada M, Uyema K, Sewer M, Labrada A, González M, Caraballo L et al. Monoclonal antibodies against Blo t 13, a recombinant allergen from *Blomia tropicalis*. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129: 212-8.
175. Suphioglu C, Smith PM, Ong EK, Knox RB, Singh MB. Recombinant expression and epitope mapping of grass pollen allergens. *Adv Exp Med Biol* 1996; 409: 147-55.
176. Smith PM, Suphioglu C, Griffith IJ, Theriault K, Knox RB, Singh MB. Cloning and expression in yeast *Pichia pastoris* of a biologically active form of Cyn d 1, the major allergen of Bermuda grass pollen. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 331-43.
177. Huecas S, Villalba M, González E, Martínez-Ruiz A, Rodríguez R. Production and detailed characterization of biologically active olive pollen allergen Ole e 1 secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *Eur J Biochem* 1999; 261: 539-46.
178. Grobe K, Poppelmann M, Becker WM, Petersen A. Properties of group I allergens from grass pollen and their relation to cathepsin B, a member of the C1 family of cysteine proteinases. *Eur J Biochem* 2002; 269: 2083-92.
179. Cortegano I, Civantos E, Aceituno E, del Moral A, López E, Lombardero M et al. Cloning and expression of a major allergen from *Cupressus arizonica* pollen, Cup a 3, a PR-5 protein expressed under polluted environment. *Allergy* 2004; 59: 485-90.
180. Barderas R, Villalba M, Rodríguez R. Che a 1: recombinant expression, purification and correspondence to the natural form. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 135: 284-92.
181. Barral P, Batanero E, Villalba M, Rodríguez R. Expression of the major olive pollen allergen Ole e 10 in the yeast *Pichia pastoris*: Evidence of post-translational modifications. *Protein Expr Purif* 2005; 44: 147-54.
182. Barral P, Tejera ML, Treviño MA, Batanero E, Villalba M, Bruix M et al. Recombinant expression of Ole e 6, a Cys-enriched pollen allergen, in *Pichia pastoris* yeast: detection of partial oxidation of methionine by NMR. *Protein Expr Purif* 2004; 37: 336-43.
183. Ball T, Edstrom W, Mauch L, Schmitt J, Leistler B, Fiebig H et al. Gain of structure and IgE epitopes by eukaryotic expression of the major Timothy grass pollen allergen, Phl p 1. *FEBS J* 2005; 272: 217-27.

184. Vailes LD, Sun AW, Ichikawa K, Wu Z, Sulahian TH, Chapman MD et al. High-level expression of immunoreactive recombinant cat allergen (Fel d 1): Targeting to antigen-presenting cells. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 757-62.
185. Wu CH, Lee MF, Wang NM. Expression of the American cockroach *Per a 1* allergen in mammalian cells. *Allergy* 2000; 55: 1179-83.
186. Krebitz M, Wiedermann U, Essl D, Steinkellner H, Wagner B, Turpen TH et al. Rapid production of the major birch pollen allergen *Bet v 1* in *Nicotiana benthamiana* plants and its immunological in vitro and in vivo characterization. *FASEB J* 2000; 14: 1279-88.
187. Meno K, Thorsted PB, Ipsen H, Kristensen O, Larsen JN, Spangfort MD et al. The crystal structure of recombinant *proDer p 1*, a major house dust mite proteolytic allergen. *J Immunol* 2005; 175: 3835-45.
188. Derewenda U, Li J, Derewenda Z, Dauter Z, Mueller GA, Rule GS et al. The crystal structure of a major dust mite allergen *Der p 2*, and its biological implications. *J Mol Biol* 2002; 318: 89-97.
189. Verdino P, Westritschnig K, Valenta R, Keller W. Three-dimensional structure of the panallergen *Phl p 7*. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 130: 10-1.
190. Johannessen BR, Skov LK, Kastrup JS, Kristensen O, Bolwig C, Larsen JN et al. Structure of the house dust mite allergen *Der f 2*: implications for function and molecular basis of IgE cross-reactivity. *FEBS Lett* 2005; 579: 1208-12.
191. Rajashankar K, Bufe A, Weber W, Eschenburg S, Lindner B, Betzel C. Structure of the functional domain of the major grass-pollen allergen *Phlp 5b*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2002; 58: 1175-81.
192. Gajhede M, Osmark P, Poulsen FM, Ipsen H, Larsen JN, Joost van Neerven RJ et al. X-ray and NMR structure of *Bet v 1*, the origin of birch pollen allergy. *Nat Struct Biol* 1996; 3: 1040-5.
193. Lascombe MB, Gregoire C, Poncet P, Tavares GA, Rosinski-Chupin I, Rabillon J et al. Crystal structure of the allergen *Equ c 1*. A dimeric lipocalin with restricted IgE-reactive epitopes. *J Biol Chem* 2000; 275: 21572-7.
194. Fedorov AA, Ball T, Valenta R, Almo SC. X-ray crystal structures of birch pollen profilin and *Phl p 2*. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113: 109-13.
195. Metzler WJ, Valentine K, Roebber M, Friedrichs MS, Marsh DG, Mueller L. Determination of the three-dimensional solution structure of ragweed allergen *Amb t V* by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 1992; 31: 5117-27.
196. Pomés A, Chapman MD. Can knowledge of the molecular structure of allergens improve immunotherapy? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001; 1: 549-54.
197. Bolhaar ST, Tiemessen MM, Zuidmeer L, van Leeuwen A, Hoffmann-Sommergruber K, Bruijnzeel-Koomen CA et al. Efficacy of birch-pollen immunotherapy on cross-reactive food allergy confirmed by skin tests and double-blind food challenges. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 761-9.
198. Malling, H. Allergen-specific immunotherapy in allergic rhinitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001; 1: 43-6.
199. Ball T, Sperr WR, Valent P, Lidholm J, Spitzauer S, Ebner C et al. Induction of antibody responses to new B cell epitopes indicates vaccination character of allergen immunotherapy. *Eur J Immunol* 1999; 29: 2026-36.
200. Moverare 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: 423-30.
201. van Ree R; CREATE Partnership. The CREATE project: EU support for the improvement of allergen standardization in Europe. *Allergy* 2004; 59: 571-4.
202. Simpson A, Green R, Custovic A, Woodcock A, Arruda LK, Chapman MD. Skin test reactivity to natural and recombinant *Blomia* and *Dermatophagoides* spp. allergens among mite allergic patients in the UK. *Allergy* 2003; 58: 53-6.
203. Quiralte J, González E, Arias De Saavedra JM, Villalba M, Florido JF, Sáenz de San Pedro B et al. Immunological activity of recombinant *Olea e 1* in patients with *Olea europaea* pollinosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 122: 101-7.
204. Díaz-Perales A, Sanz ML, García-Casado G, Sánchez-Monge R, García-Selles FJ, Lombardero M et al. Recombinant *Pru p 3* and natural *Pru p 3*, a major peach allergen, show equivalent immunologic reactivity: a new tool for the diagnosis of fruit allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 628-33.
205. Jutel M, Jaeger L, Suck R, Meyer H, Fiebig H, Cromwell O. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 608-13.
206. Ferreira F, Ebner C, Kramer B, Casari G, Briza P, Kungl AJ et al. Modulation of IgE reactivity of allergens by site-directed mutagenesis: potential use of hypoallergenic variants for immunotherapy. *FASEB J* 1998; 12: 231-42.
207. Akdis CA, Blaser K. Regulation of specific immune responses by chemical and structural modifications of allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 121: 261-9.
208. Smith AM, Chapman MD, Taketomi EA, Platts-Mills TA, Sung SS. Recombinant allergens for immunotherapy: a *Der p 2* variant with reduced IgE reactivity retains T-cell epitopes. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 423-5.
209. Takai T, Yokota T, Yasue M, Nishiyama C, Yuuki T, Mori A et al. Engineering of the major house dust mite allergen *Der f 2* for allergen-specific immunotherapy. *Nat Biotechnol* 1997; 15: 754-8.
210. Kronqvist M, Johansson E, Whitley P, Olsson S, Gafvelin G, Scheynius A et al. A hypoallergenic derivative of the major allergen of the dust mite *Lepidoglyphus destructor*, *Lep d 2.6Cys*, induces less IgE reactivity and cellular response in the skin than recombinant *Lep d 2*. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 126: 41-9.
211. Takai T, Ichikawa S, Hatanaka H, Inagaki F, Okumura Y. Effects of proline mutations in the major house dust mite allergen *Der f 2* on IgE-binding and histamine-releasing activity. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6650-6.
212. Takai T, Hatanaka H, Ichikawa S, Yokota T, Inagaki F, Okumura Y. Effects of double mutation at two distant IgE-binding sites in the three-dimensional structure of the major house dust mite allergen *Der f 2* on IgE-binding and histamine-releasing activity. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001; 65: 1601-9.
213. Holm J, Gajhede M, Ferreras M, Henriksen A, Ipsen H, Larsen JN et al. Allergy vaccine engineering: epitope modulation of recombinant *Bet v 1* reduces IgE binding but retains protein folding pattern for induction of protective blocking-antibody responses. *J Immunol* 2004; 173: 5258-67.
214. King TP, Jim SY, Monsalve RI, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Spangfort MD. Recombinant allergens with reduced allergenicity but retaining immunogenicity of the natural allergens: hybrids of yellow jacket and paper wasp venom allergen antigen 5s. *J Immunol* 2001; 166: 6057-65.
215. Kussebi F, Karamloo F, Rhyner C, Schmid-Grendelmeier P, Salagianni M, Mannhart C et al. A major allergen gene-fusion protein for potential usage in allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 323-9.
216. 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 U SA* 2004; 101: 14677-82.

217. Larché M. Inhibition of human T-cell responses by allergen peptides. *Immunology* 2001; 104: 77-82.
218. Norman PS, Ohman JL Jr, Long AA, Creticos PS, Geffer MA, Shaked Z et al. Treatment of cat allergy with T-cell reactive peptides. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1623-8.
219. Haselden BM, Larché M, Meng Q, Shirley K, Dworski R, Kaplan AP et al. Late asthmatic reactions provoked by intradermal injection of T-cell peptide epitopes are not associated with bronchial mucosal infiltration of eosinophils or T(H)2-type cells or with elevated concentrations of histamine or eicosanoids in bronchoalveolar fluid. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 394-401.
220. Van Uden J, Raz E. Immunostimulatory DNA and applications to allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 902-10.
221. Tighe H, Takabayashi K, Schwartz D, Van Nest G, Tuck S, Eiden JJ et al. Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen Amb a 1 enhances its immunogenicity and reduces its allergenicity. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 124-34.
222. Marshall JD, Abtahi S, Eiden JJ, Tuck S, Milley R, Haycock F et al. Immunostimulatory sequence DNA linked to the Amb a 1 allergen promotes T(H)1 cytokine expression while downregulating T(H)2 cytokine expression in PBMCs from human patients with ragweed allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 191-7.
223. Santeliz JV, Van Nest G, Traquina P, Larsen E, Wills-Karp M. Amb a 1-linked CpG oligodeoxynucleotides reverse established airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 455-62.
224. Simons FE, Shikishima Y, Van Nest G, Eiden JJ, HayGlass KT. Selective immune redirection in humans with ragweed allergy by injecting Amb a 1 linked to immunostimulatory DNA. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 1144-51.
225. Bohle B, Breitwieser A, Zwolfer B, Jahn-Schmid B, Sara M, Sleytr UB et al. A novel approach to specific allergy treatment: the recombinant fusion protein of a bacterial cell surface (S-layer) protein and the major birch pollen allergen Bet v 1 (rSbsC-Bet v 1) combines reduced allergenicity with immunomodulating capacity. *J Immunol* 2004; 172: 6642-8.
226. Zhu D, Kepley CL, Zhang K, Terada T, Yamada T, Saxon A. A chimeric human-cat fusion protein blocks cat-induced allergy. *Nat Med* 2005; 11: 446-9.
227. Batanero E, Barral P, Villalba M, Rodríguez R. Encapsulation of Ole e 1 in biodegradable microparticles induces Th1 response in mice: a potential vaccine for allergy. *J Control Release* 2003; 92: 395-8.