

# Importancia biológica de los anticuerpos asimétricos

Dres Ángel Alonso, Krikor Mouchián, Julio F. Albónico

Div. Alergia e Inmunología, Htal. de Clínicas, Asociación Médica Argentina, Asociación Química Argentina, Academia Nacional de Ciencias de Buenos Aires.  
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

## Resumen

Se exponen las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los anticuerpos asimétricos. También se reflexiona sobre su papel en la actividad protectora de los anticuerpos en las vacunas y en la seroterapia.

**Palabras claves.** Anticuerpos asimétricos, seroterapia, vacunas.

## Biological Significance of Asymmetric Antibodies

### Summary

The physicochemical and biological properties of asymmetric antibodies are reviewed. Their role in the protective activity of antibodies in vaccines and serotherapy is also discussed.

**Keywords.** Asymmetrical antibodies, serotherapy, vaccines.

## Abreviaturas

OMS: Organización Mundial de la Salud.

NIAID: Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas.

IT: Inmunoterapia específica.

GINA: Global Initiative for Asthma.

IDEHU: Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA.

FDA: Food & Drug Administration.

## Introducción

Las clásicas descripciones de Homero (siglo IX a. C.), Hipócrates (siglo V a. C.), Horacio (Quinto Horacio Flaco, 65-8 a. C.), Séneca “el joven” (Lucio Anneo, 4-65 d. C.), Areteo de Capadocia (siglos I-II d. C.) y Galeno (131-210), de la respiración suspirosa, ruidosa y sibilante atribuida a factores endógenos (“humores”) o exógenos (humedad, frío y esfuerzos físicos) no se modificaron hasta el despertar de la ciencia médica en los siglos XVI y XVII. Musa-ben-Maimón (Maimónides, 1135-1204) constituye la excepción, cuando al asistir al Sultán Saladino de Egipto señaló la pluralidad etiológica del asma extrínseca, enfatizando la existencia de alérgenos inhalantes, ingestantes y contactantes, anticipando así el concepto de la profilaxis en la exposición. La rebelión de Paracelso (Theophrastus Bombart von Hohenheim, 1493-1541), los conceptos de Johann Baptista van Helmont (1577-1644), Thomas Willis (1622-1675) y John Floyer (1649-

1734), los hallazgos de Franz Daniel Reisseisen (1772-1828), René Théophile Hyacinthe Laënnec (1781-1826) y Paul Bert (1830-1886), Anton Biermer (1827-1892), el asma por “las flores de las violetas” de Armand Trousseau (1801-1867) y la obra de Henry Hyde Salter “*On asthma, its pathology and treatment*” de 1864 -para muchos el tratado más acabado sobre el asma del siglo XIX-, todos ellos constituyen un grupo de trabajos pioneros de las enfermedades por alergia, que rememoraban las observaciones de Plinio (siglo I d. C.) sobre el efecto dañino de los plátanos sobre algunas personas. El escocés Charles Harrison Blackely (1820-1900), afectado de la “fiebre del heno” o “catarro del polen”, publicó sus investigaciones de 20 años en el libro “*Experimental Researches on the cause and nature of Catarrhus Aestivus*” (Edit. Baillere, Tindall & Cox, London, 1873), documentando la capacidad sensibilizante del polen del *Lolium italicum*.

Charles Harrison Blackely fue el primero en practicarse una prueba cutánea y otra de provocación bronquial con el polen, desencañando toda su sintomatología fuera de la época de polinación. Este hito fue corroborado en Harvard por Morrill Wyman, quien, sensible al polen de Ambrosia, publicó en 1872 su libro “*Autumnal Catarrh*” (Edit. Hurd & Houghton, New York), con todas sus sólidas experiencias.

Las obras de William Phillips Dunbar (1863-1922) en 1903 y de Clemens von Pirquet (1874-1929) en 1906, allanaron el camino para que un lustro después 2 osados anglosajones transformaran el diagnóstico y el tratamiento medicamentoso de la época dando sólido asidero a la terapia biológica.

En la literatura inglesa de 1911 (The Lancet, I, 1572), L. Noon y J. Freeman publicaron sus incursiones terapéuticas en pacientes afectados de “fiebre del heno” o rinoconjuntivitis polínica o estacional denominada más adelante por Warren T. Vaughan como polinosis. Esta desensibilización o hiposensibilización o inmunoterapia o vacunoterapia con extractos polínicos indujo mejoría sintomática, por la cual los afectados no sufrieron nuevas molestias oculares y respiratorias ante las reexposiciones a los alérgenos causales.

Desde entonces esta terapia biológica, que inocula cantidades crecientes de glucoproteínas heterólogas de origen vegetal o animal (insectos), se consolidó y generalizó en América del Norte y en la Argentina. Así, en los Estados

Unidos, Coca, Cooke, Stier, Stull y Vaughan, impulsaron la práctica de la inmunoterapia en la década de 1920, mientras que en la Argentina fueron Guido Ruiz Moreno, Miguel Agustín Solari, Alois Bachmann, Pablo Negroni, José A. Bózzola y el clérigo J. Monticelli quienes desde 1930 hasta 1950 sentaron reales para el estudio y tratamiento de los atópicos o alérgicos.

Históricamente, la Academia Nacional de Medicina y el Hospital de Clínicas de Buenos Aires (UBA), fueron los lugares desde donde se irradió esta onda expansiva de conocimientos, con amplia repercusión en Sociedades Científicas (Asociación Médica Argentina, 1940) y en las grandes ciudades del interior del país. Más adelante, algunos improvisados “vacunaron” irreflexivamente y el desprestigio enlodó impíamente a la inmunoterapia. Fue denostada durante décadas porque mágicamente se esperó de ella mucho más de lo que puede dar.

Esta desvalorización quedó superada con el Informe de Opinión de la Organización Mundial de la Salud (OMS) realizado en Ginebra (Suiza) entre el 27 y 29 de enero de 1997, redactado por Jean Bousquet de Francia, Richard F. Lockey de Estados Unidos y Hans-Jorgen Malling de Dinamarca, y apoyado por varias Instituciones de especialistas, tales como la Academia Americana de Alergia, Asma e Inmunología (AAAAI), la Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica (EAACI), la Sociedad Europea de Alergia Pediátrica e Inmunología Clínica (ESPACI), el Subcomité de Estandarización de Alérgenos, la Sociedad Japonesa de Alergología, el Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (NIAID) y la OMS, a las que luego se adhirieron el Colegio Americano de Alergia, Asma e Inmunología y la Asociación Internacional de Asma. El informe completo fue publicado en la revista Allergy (1998; 44 (53): 2-42), y así todas esas investigaciones tomaron estado público en la comunidad médica internacional con la sobriedad y seriedad que merecían aquellos que tanto habían bregado en el pasado por este tipo de tratamiento inmunológico.

### Mecanismos y metodologías

La Inmunología moderna a partir de 1970 arrojó luz y comprensión sobre los mecanismos íntimos de esta forma de inducción de “tolerancia” en el adulto. La vacunoterapia y los anticuerpos monoclonales inducen cambios concre-

tos en el 90% de los tratados, con una mejoría sintomática estable que se puede medir con los métodos de laboratorio actuales.

Las enfermedades alérgicas aumentaron en la última década y el desarrollo de una terapia eficaz se ha convertido en un objetivo trascendente. La inmunoterapia específica (IT) descrita por Noon y Freeman es uno de los tratamientos más efectivos para la rinitis alérgica atópica y el asma bronquial extrínseca, y es el único tratamiento que reduce los síntomas causados por una nueva exposición al alérgeno, modificando el curso ulterior de la enfermedad alérgica. La IT tiene el aval de la OMS (Bousquet J. y col., en 1998 con las “vacunas terapéuticas para la alergia”; Durham S. R. y col., en 1999; el *Global Initiative for Asthma* (GINA), 2010) y Jacobsen L. y col., 1998.

Los mecanismos protectores modulan a los LB, a los LT y a los isotipos de los anticuerpos sintetizados, así como a las células efectoras de la inflamación alérgica, como los eosinófilos, basófilos y mastocitos. La IT provoca una activación del fenotipo Th1, con un cambio de varias citoquinas: descenso de IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 y aumento del TGF- $\beta$  y de la IL-10, (C. T. Cady y col., 2010; S. R. Durham y col., 1999 y J. Bousquet y col., 1998). También se observa un aumento de las IgA e IgG (H. T. Johansson, 2000 y J. Bousquet y col., 1998); en los humanos el incremento de la IgG4 es uno de los logros más importante de la IT. (A. M. Ejrnaes, 2004 y P. A. Wacholz, 2004.)

La IT posee un mecanismo de acción complejo no definido aún en su totalidad, con la producción de anticuerpos IgG bloqueantes (S. Flicker, 2003 y R. T. Strait 2006). Estos anticuerpos antagonizan la cascada de la inflamación alérgica que resulta de la interacción IgE-alérgeno y de la liberación de mediadores (histamina y leucotrienos) desde los mastocitos y basófilos.

Históricamente, esos anticuerpos inhiben la prueba de Ovary-Bier o anafilaxia cutánea pasiva desde R. A. Margni en 1972 hasta R. T. Strait en 2006, al igual que la presentación del alérgeno a los LT, según R. J. Van Neerven en 1999. También la coagregación del receptor de baja afinidad para la IgG o RFcy IIB y del IgE/RFce I, por los complejos inmunes generaría la inhibición de los mastocitos y la desgranulación de basófilos según documentaron S. J. Till en 2004, F. Nimmerjahn en 2006, S. Kraft y K. Zhang en 2007.

En los que han recibido IT alérgeno-específica la síntesis de los anticuerpos bloqueantes se vincula con una menor síntesis de la IgE-específica. Al decir de S. Flicker en 2003, estos anticuerpos también inhiben la reacción tardía IgE-dependiente de la inflamación alérgica. La IT genera una respuesta dependiente de los LTCD4-Th1 en lugar de los díscolos LTCD4-Th2 merced a la actividad de los linfocitos reguladores (LT-reg), con incremento de los niveles de IL-10 y del TGF- $\beta$  que, según R. Cramer en 2006, aumentan la producción de los isotipos IgA e IgG4 específicos.

La inoculación parenteral (subcutánea) es la tradicional, pero dado que la mayoría de los patógenos y de los alérgenos ingresan al organismo por la vía inhalatoria u oral y ejercen satisfactoriamente su efecto deletéreo, se pensó que la IT por vía mucosa podría ser de utilidad terapéutica, más aun considerando que la posibilidad de reacciones adversas sistémicas con la IT, si bien son infrecuentes, pueden ser severas.

Un metaanálisis de estudios doble ciego, placebo controlado de la década pasada, demostró que la IT por la vía oral era clínicamente eficaz. Sin embargo, su beneficio era menor comparado con el de la IT subcutánea. Se propone que el alérgeno sería capturado por las células de Langerhans de la mucosa oral, que migrarían a los nódulos linfáticos proximales, favoreciendo la producción de anticuerpos IgG bloqueantes más la inducción de linfocitos con actividad supresora (M. Larché, 2005).

La IT oral o sublingual tiene ventajas en su más fácil administración, mayor economía, temor de los niños a las agujas, aunque el control de su administración debe estar siempre bajo la supervisión de profesionales o técnicos especializados, habida cuenta que los niños podrían deglutir la dosis administrada y no permitir la absorción sublingual. Desde el punto de vista académico, parece prudente proponer el empleo de la vía intranasal, que sería preferible a la oral-sublingual, ya que el ambiente de la vía nasal es menos perjudicial para los alérgenos al poseer un medio menos ácido y con enzimas menos proteolíticas y ser una mucosa muy irrigada y más permeable que las otras. Sería generadora de una respuesta inmune a nivel de toda la mucosa respiratoria, situación que a nivel del estómago y del intestino es mucho más improbable. (D. T. O'Hagan, 1998; I. Gutierrez, 2002).

Sin embargo, C. Apicella en su Tesis Doctoral de 2012 señaló que, en su modelo murino de alergia, la administración de un alérgeno por la vía nasal no inducía la misma intensidad de anticuerpos bloqueantes o asimétricos que la lograda por la vía subcutánea.

Las indicaciones clínicas son precisas y la selección de los pacientes es crítica desde el punto de vista metodológico. Las polinosis, las rinosinusitis atópicas, la sinusitis alérgica fúngica, el asma bronquial extrínseca, la anafilaxia provocada por las picaduras de los Hymenópteros, principalmente abeja y avispa, contados casos de urticaria crónica o angioedema con la técnica llamada del autosuero o autohemoterapia, de antigua administración y reivindicada últimamente ante la etiología autoinmune de la condición clínica, la “desensibilización” a la penicilina y a las insulinas bovina y porcina y a los portadores del eccema atópico con antecedentes de rinitis/asma con sensibilidad probada a los ácaros y a la cucaracha, conforman las indicaciones más precisas y que han demostrado un beneficio para los pacientes afectados.

Todos estos enfermos poseen una IgE sérica total elevada por encima de las 100 KU/L y floridos antecedentes heredo-familiares de enfermedad alérgica. Las inyecciones subcutáneas semanales de los diferentes extractos o de sus fracciones solubles adecuadamente caracterizadas desde el punto de vista fisicoquímico, a los cuales se ha demostrado hipersensibilidad fehaciente, tanto clínica como experimental, se mantendrán por un período no mayor de 5 años, lográndose mejorías clínicas evidentes a partir de los 6 meses ó 1 año de su administración. La falta de respuesta adecuada a esta administración obligará a replantearse el estudio más minucioso del paciente y no insistir obcecadamente en un tratamiento que no parece ser el apropiado para ese enfermo. Estos extractos alergénicos son la preparación de un alérgeno obtenido por medio de la extracción de los principios activos de sustancias animales o vegetales en un medio adecuado. La Farmacopea Europea llama producto alergénico al preparado farmacéutico que deriva de materiales existentes en la naturaleza que contienen alérgenos, por ello el Comité de la OMS decidió llamar “**vacunas alergénicas**” a nuestros preparados destinados a los pacientes portadores de un padecimiento de hipersensibilidad del tipo I.

Las subpoblaciones de células T reguladoras (LT-reg) juegan un papel importante en la

homeostasis periférica y en el mantenimiento de una respuesta inmune controlada y saludable. Tanto los LT-reg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (Foxp3<sup>+</sup>) que son generados naturalmente como aquellos inducidos por el alérgeno específico (LT-reg-tipo 1 o LT-reg-1) secretores de IL-10 inhiben a las células efectoras alérgeno específicas, como se demostró en modelos murinos. Por su parte, los LTCD8<sup>+</sup>, los LTCD4<sup>-</sup>CD8- $\gamma\delta$ , los LB, las NKC y las células dendríticas que producen IL-10 junto con los macrófagos con acciones regulatorias participan en los eventos supresores de la respuesta inmune. (C.A. Akdis, 2009).

Dado que se han fenotipificado distintas subpoblaciones de LT-reg, que se desarrollan como parte normal del sistema inmune, las mejor caracterizadas son las CD4<sup>+</sup> que expresan altos niveles de CD25 en la membrana (cadena  $\alpha$  del receptor para IL-2 o células T CD25hi), que si bien no proliferan ni producen citoquinas al ser estimuladas por antígenos, son capaces de suprimir ambos efectos de otros LT estimulados. El factor de transcripción Foxp3<sup>+</sup> juega un papel trascendental en el desarrollo tímico, tolerancia periférica y funcionalidad supresora de los LT-reg-CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>.

En los seres humanos, su deficiencia da origen a un síndrome llamado IPEX, que asocia desregulación inmune (autoinmune y alérgica), poliendocrinopatía (o síndrome pluriglandular) y enteropatía ligada al cromosoma X. El Foxp3<sup>+</sup> amplifica y estabiliza la expresión de muchos genes que codifican moléculas de la membrana celular, tales como fg12, CD39, CD73, TRAIL y CTLA-4, sintetizadas por los LT luego de la estimulación del RcT, y que son capaces de regular negativamente su activación. (C. Ozdemir, 2009).

Los LTCD25hi forman agregados con las células dendríticas en presencia de las moléculas de adhesión LFA-1, CTLA-4, CD80 y CD86, provocando una disminución de la expresión de estas últimas en las células dendríticas y reduciendo su habilidad para activar a los LT efectores. (D. S. Robinson, 2009).

La tolerancia inmune en el contexto de las enfermedades alérgicas luego de discontinuar el tratamiento, se podría definir como la eficacia y persistencia de las modificaciones de la respuesta de memoria de los LB y LT alérgeno-específicos. La importancia clínica de esta tolerancia es la prevención de nuevas sensibilizaciones con el antígeno y de la progresión de una rinitis alér-



gica hacia el asma bronquial. (M. Akdis, 2006; 2007; 2009).

La tolerancia periférica de los LT se caracteriza por la generación de LT-reg alérgeno específicos que suprimen la respuesta proliferativa y la síntesis de citoquinas frente a los principales alérgenos. Esta respuesta es iniciada por la acción autócrina de la IL-10 y del TGF- $\beta$  producidos por los LT-reg-1 y LTh3. (C. A. Akdis, 2009).

Por ende, el desarrollo de una respuesta alérgica o saludable estaría determinado por la relación entre los LTh2/LTh1/LT-reg, que en diferentes proporciones poseemos tanto sanos como enfermos, y el cambio del subgrupo dominante determinaría el desarrollo de la alergia o de su recuperación.

En los no-alérgicos no-atópicos la respuesta inmune hacia moléculas alergénicas es llevada a cabo por los LT-reg-1 o LTCD4+reg-Foxp3+ productores de IL-10. (C. Ozdemir, 2009).

### Los LT-reguladores en la alergia

Los LT reguladores (LT-reg) cumplen un rol central en la tolerancia periférica y en la homeostasis del sistema inmune. Una alteración en su número o funcionalidad se asocia con patologías autoinmunes y cáncer. Son aproximadamente el 5% de los LT CD4+ circulantes, adquiriendo la capacidad supresora durante su proceso de maduración en el timo. Uno de los marcadores más importantes de esta población es *Foxp3*, el factor de transcripción que otorga y regula la función supresora de los LT-reg; aunque también puede expresarse transitoriamente en células activadas.

Recientemente se demostró que los LT CD4+Foxp3+ constituyen una población heterogénea desde el punto de vista fenotípico y funcional, e incluyen a los LT-reg capaces de suprimir a células de la inmunidad innata y adaptativa y a células que si bien comparten algunas características fenotípicas con las LT-reg, no son supresoras y secretan citoquinas proinflamatorias.

Varios autores han estudiado a los LT-reg en patologías humanas, identificándolas por la expresión de marcadores que no permiten discriminar entre las subpoblaciones supresoras y no supresoras; incluso pocos lograron estudiar su comportamiento en los órganos blanco de dichas patologías. Un objetivo en alergia podría ser la caracterización de los LT CD4+Foxp3+

supresores y no supresores, haciendo hincapié en las diferencias fenotípicas y funcionales que puedan existir con aquellas residentes en tejidos periféricos, y profundizando el estudio de su interacción con otras células de la respuesta inmune innata como las NKC.

De acuerdo al origen, fenotipo y mecanismos de acción podemos distinguir varios subtipos de LT CD4+ con propiedades regulatorias. Dos de ellos, los LT reguladores de tipo I y los Th3, se originan en los órganos linfáticos secundarios bajo condiciones tolerogénicas luego del encuentro de los LT CD4+ vírgenes con un antígeno. El tercer subtipo corresponde a las LT reg CD4+Foxp3+ (T-reg) que constituyen el linaje celular mejor caracterizado y con más potente actividad supresora. Estas últimas se encuentran ampliamente distribuidas en el organismo y pueden originarse en el timo (T-reg naturales) o en la periferia (T-reg inducibles).

Desde el punto de vista fenotípico, los T-reg, se caracterizan por la expresión constitutiva y muy intensa de la molécula CD25 (cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2), la expresión muy baja o ausente de la molécula CD127 (receptor de IL-7) y la expresión del factor de transcripción *Foxp3* que confiere y regula su capacidad supresora.

Sin embargo, se ha demostrado que los LT CD4+Foxp3+ constituyen una población heterogénea compuesta por 2 subpoblaciones de T-reg: una precursora CD45RA+ Foxp3low (rT-reg); otra efectora de la supresión CD45RA- Foxp3high (aT-reg) y que se originaría de las anteriores; y una tercera subpoblación CD45RA- Foxp3low (Foxp3+ non-T-reg) que constituye más de la mitad de los LT CD4+Foxp3+ circulantes y que no posee capacidad supresora, pero es secretora de citoquinas con diferentes perfiles de diferenciación (Th1, Th2, Th17).

Se señaló que los LT CD4+Foxp3+ tienen plasticidad funcional y en ciertas enfermedades autoinmunes, son capaces de producir mayores cantidades de INF- $\gamma$  o IL-17.

Funcionalmente, los T-reg interactúan con otras células del sistema inmune: inhiben la activación, la expansión clonal, la producción de citoquinas y la diferenciación de los LT y LB en células efectoras y de otros tipos celulares como las NKC y las NKT, macrófagos y células dendríticas. Lo hacen a través del contacto celular y/o a través de la liberación de factores solubles.

Aquellos que requieren el contacto físico entre las T-reg y las células dendríticas o los LT respondedores, están mediados por la molécula CTLA-4 que interactúa con otras presentes en las CPAs. Otra de las moléculas efectoras es CD39, una ectonucleotidasa que hidroliza ATP y genera adenosina, un mediador antiinflamatorio. Además, las T-reg podrían actuar mediante la liberación de granzimas y perforinas (mecanismo previamente evidenciado en NKC y LT- CD8+).

También liberan las citoquinas antiinflamatorias IL-10 y TGF- $\beta$  y se ha descrito el consumo por parte de los LT-reg de citoquinas necesarias para la expansión y supervivencia de las LT respondedoras. Diferentes autores han descrito la capacidad de los LT-reg de inhibir la función de las NKC. Dentro de los mecanismos mencionados, el TGF- $\beta$  sería el responsable de inhibir la actividad citotóxica y secretora de citoquinas de las NKC, por medio de la baja modulación de un receptor activador de estas células, el NKG2D. La liberación de moléculas citotóxicas podría ser un mecanismo por el cual los LT-reg activados, en algunos tumores, matarían a las NKC, protagonistas importantes de la inmunidad antitumoral. Si bien las NKC activadas son capaces de eliminar a los LT-reg en ciertas condiciones, aquellas NKC residentes en la decidua podrían inducir LT-reg y favorecer la inmunosupresión local durante el embarazo.

Las células NKT expresan las moléculas CD56 y CD3, las cuales identifican a las NK y a los LT, reuniendo características funcionales de la inmunidad innata y adaptativa. Poseen, al igual que los LT-reg, funciones inmunomoduladoras. Las NKT secretan citoquinas del perfil Th1 y Th2 y en humanos son capaces de hipo-modular la producción de IL-17 en los LT- CD4+ de memoria, una citoquina implicada en la patogénesis de varias patologías autoinmunes. Secretan IL-2 e IL-4 capaces de expandir a los LT-reg. En ratones transplantados con médula ósea, las NKT del huésped, por medio de la producción de IL-4, inducían la proliferación de los LT-reg del dador, evitando la enfermedad de injerto contra el huésped. Los LT-reg podrían inhibir in vitro la proliferación y la producción de citoquinas de las NKT por medio del contacto celular.

### Receptores para la IgE

La IgE es la inmunoglobulina con menor concentración en el suero humano, y con una vida

media muy corta (2-3 días) en comparación con las otras 4 inmunoglobulinas conocidas. (K. D. Stone, 2010). El receptor de alta afinidad para la IgE o RFc $\epsilon$ -I se expone en la membrana celular de los mastocitos y de los basófilos como un tetrámero compuesto por las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y dos cadenas  $\gamma$ . Es miembro de la familia de los receptores para el Fc con estructuras conservadas y papeles similares en relación al comienzo de las cascadas intracelulares. Su afinidad por la IgE es elevada y en las células presentadoras de antígenos se expresan en niveles mucho más bajos y como un trímero ( $\alpha\gamma_2$ ). El entrecruzamiento por antígenos multivalentes del RFc $\epsilon$ I resulta en la activación de otras vías de señalización, lo cual genera respuestas efectoras de la inflamación alérgica con liberación de mediadores preformados y almacenados en los gránulos citoplasmáticos (histamina, triptasa, quimasa y catepsina-G-carboxipeptidasa), mediadores lipídicos sintetizados (prostaglandina D2 y leucotrienos C4, D4 y E4), citoquinas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, TNF- $\alpha$  y G-CSF) así como quimioquinas (RANTES, MIP-1 $\alpha$  y eotaxina).

Dicha unión produce un fenómeno pues lleva a la expresión de un número mayor de RFc $\epsilon$ I tanto en los mastocitos y basófilos de los humanos como de los ratones, promoviendo su supervivencia. Esta activación provoca que la tirosina-kinasa Lyn fosforila a las tirosinas de los motivos ITAM de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ . Esta última, que es un homodímero, recluta a la kinasa Syk y desencadena una cascada de fosforilaciones con la ulterior degradación del fosfatidilinositol bifosfato a inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 eleva las concentraciones citoplasmáticas de Ca $^{++}$  y el DAG activa a la protein-kinasa C (PKC). Por su parte, el entrecruzamiento del RFc $\epsilon$ I activa a la protein-kinasa FYN que resulta en la fosforilación de moléculas adaptadoras como la Gab2 que también activan a la PKC. (M. Alasdair, 2006).

La PKC activada lleva a la disociación de los complejos actina-miosina, posibilitando que los gránulos se pongan en contacto con la membrana citoplasmática. También se activa un integrante de las MAP-quinasas, que a través de intermediarios activados lleva a la translocación nuclear del factor nuclear de los LT activados (NFAT) y del NFk $\beta$ , al igual que la activación de AP-1. Los factores de transcripción estimulan la síntesis de las citoquinas.

La síntesis de los mediadores lipídicos está controlada por la fosfolipasa A2 (PLA2). Esta enzima se activa por el aumento de los niveles del  $\text{Ca}^{++}$  citoplasmático y por la fosforilación catalizada por una proteína-kinasa activada por mitógenos (MAP). La PLA2 hidroliza a los fosfolípidos de la membrana como el ácido araquidónico que se transforma en el sustrato de la ciclooxigenasa o de la lipooxigenasa. El mediador derivado más conspicuo es la prostaglandina D2 (PGD2), que actúa como vasodilatador y broncoconstrictor. De la vía de la lipooxigenasa se producen los leucotrienos (LT) que provocan broncoconstricción, sobre todo, los LTC4, LTD4 y LTE4.

El RFcεI, desempeña un papel importante en la inducción y perpetuación de la respuesta alérgica-atópica, al mismo tiempo que confiere una protección fisiológica en las infestaciones por los parásitos. (H. Turner, 1999).

El receptor para la IgE de baja afinidad (RFcεII o CD23) es en realidad una lectina  $\text{Ca}^{++}$  dependiente que se halla en los LB, células de Langerhans, macrófagos, monocitos, eosinófilos, plaquetas y células epiteliales. Está compuesto por un largo dominio extracelular con una cabeza de lectina que atrapa a la IgE, un dominio simple transmembrana y una cola corta citoplasmática. Su activación regula a la IgE, la diferenciación de los LB y la presentación de los antígenos. Este receptor aumenta su expresión en respuesta a la IgE y a la IL-4 y posee una forma soluble (sCD23) que aparece por efecto de varias proteasas endógenas y exógenas. (K. D. Stone, 2010). El RFcεII soluble escindido del LB interactúa con el CD21 y es la señal adicional para el cambio isotípico a IgE, lo cual contribuye al mantenimiento de la inflamación atópica.

Estos pacientes poseen un aumento en la expresión del CD23 en los LB y en los macrófagos, y del RFcεI en las células dendríticas y en los monocitos. La expresión de RFcεI en las células presentadoras de antígenos podría tener un papel en la presentación de alérgenos a los LT específicos. (K. D. Stone, 2010). Los anticuerpos bloqueadores neutralizan al alérgeno antes de que éste pueda interactuar con la IgE unida al RFcεI en mastocitos y basófilos y también inhiben la presentación a los LTCD4+ específicos mediada por RFcεI o por el CD23. (R. J. J. Van Neerven, 1999).

En los últimos años, el concepto de anticuerpos bloqueadores ha sido avalado por las

evidencias de que los complejos inmunes antígeno-IgG, en concentraciones equivalentes, inhiben la desgranulación de los mastocitos por el entrecruzamiento del RFcεI al receptor inhibitorio RFcγIIB. (R. T. Strait, 2006). Este mecanismo inhibitorio necesitaría de la intervención del RFcγIIA, ya que la fosforilación de RFcγIIB y el reclutamiento y la activación de las fosfatasa (SHIP-1 y SHP-1) que requieren la activación de la tirosina-kinasa Lyn que se logra por la coagregación de los dominios ITAM existentes en RFcγIIA o en el RFcεI. O sea que los inmunocomplejos IgG+alérgeno co-agregan RFcγIIA y B, posibilitando la activación de Lyn que fosforila a las tirosinas de los ITIM del RFcγIIB, resultando en la activación de SHIP-1 que actúa con Dok-1 para inhibir la señalización por el RFcεI. (C. T. Cady, 2010).

Todos estos mecanismos sostienen que los anticuerpos bloqueadores requieren mayores dosis del alérgeno para inducir la proliferación de los LT y la síntesis y liberación de citoquinas que promueven la respuesta alérgica. (C. Apicella, 2012).

### Respuestas inmediata y tardía de la IgE

La reacción humana para producir una respuesta de hipersensibilidad depende del agente exterior (patógeno o no) y de la información genética de la persona que responderá de una u otra forma a dicho agente. Gell & Coombs (1963) organizaron dichas respuestas en 4 tipos diferentes de acuerdo a los mecanismos involucrados en las mismas. La respuesta alérgica, quizás por la frecuencia de entonces y por los antecedentes históricos señalados brevemente en la Introducción, fue bautizada como del tipo I y se responsabilizó a la IgE como su mediador incuestionable.

Previamente, en 1923, Fernández Coca y Grove estudiaron el fenómeno de la atopía con la asistencia del filólogo Edward D. Perry, y lo describieron como “algo raro, inusual, paradójico”, que atribuyeron a la presencia de cuerpos lábiles al calor a los que llamaron “reaginas” debido a su semejanza con el sistema complemento (inactivado por el calor). Más adelante, esta condición se relacionó con la rinitis polínica o fiebre del heno, la rinitis perenne, el asma bronquial, el eccema atópico y las alergias por alimentos.

Durante largos años esta “reagina” fue atribuida a varias proteínas séricas, y, en especial,

a la IgA. Luego vinieron los descubrimientos de Ishizaka y Johansson (1968) con la caracterización en el suero humano de una inmunoglobulina (IgE) con propiedades diferentes a las estudiadas con antelación desde el célebre trabajo de Porter y la definición del monómero de IgG con 2 cadenas de aminoácidos llamadas pesadas y 2 livianas. Fue Pepys el que en 1975 propuso que las enfermedades mediadas por la IgE fueran consideradas como “atopía alérgica”, lenguaje que se popularizó entre los científicos, fueran o no médicos, hasta la actualidad. El riesgo de un niño de desarrollar una “enfermedad alérgica” suele ser del 5 al 10% si los padres no son alérgicos, pero del 40 al 60% si ambos lo son. (N. I. M. Kjellman, 1977).

En las últimas décadas, se describieron varias asociaciones entre locus genéticos puntuales y codificación de moléculas que participan activamente en el desarrollo y perpetuación de la inflamación alérgica. Así, en el cromosoma 2 (CD28, CTLA-4 e ICOS), en el 5 (CD14, receptor  $\beta$ -adrenérgico y citoquinas como IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 y GM-CSF), en el 6 (las moléculas de clases I y II del complejo mayor de histocompatibilidad y el TNF- $\alpha$ ), en el 11, otrora llamado por Cookson con poca fortuna “el gen del asma”, (cadena  $\beta$  del RFc $\epsilon$ I), en el 12 (IFN- $\gamma$ , NO-sintetasa y STAT-6) y en el 16 (receptor de IL-4).

Así, se deduce que la atopía es una condición poligénica, y que por lo tanto, por ahora, las posibilidades de inducir una terapia génica como ocurre en algunas inmunodeficiencias primarias son remotas. De ahí que la IT se constituya en un aliado terapéutico invaluable en el paciente adecuado. Por otra parte, sin un marcador genético específico, el paciente atópico no puede ser identificado antes de desarrollar la sensibilización a un determinado alérgeno, dado que la presencia de una IgE elevada por encima de los estándares poblacionales no indica necesariamente “enfermedad atópica” pues ciertas parasitosis y otras condiciones infecciosas (p. ej. virus HIV, Epstein-Barr, sincicial respiratorio y sarampión) pueden modificar esos valores, aunque sea transitoriamente. Los antecedentes heredo-familiares y personales suelen ser más ilustrativos de la constitución atópica del individuo, que luego será confirmada o no con los exámenes de laboratorio específicos. O sea que si bien puede haber IgE elevada sin síntomas, ese nivel anormal puede ser predictivo de enfermedad, tal como lo sostuvo R. Nickel en 1977.

S. G. O. Johansson, en 2001, sostuvo que cerca del 40% de la población era atópica y que la mitad de la misma desarrollaría una enfermedad clínica desde la rinitis hasta el asma bronquial y que, con la polución ambiental creciente, en especial en los grandes centros urbanos, la exposición continua a alérgenos favorecería el aumento de la prevalencia del asma. Estos alérgenos capturados por células presentadoras profesionales son transportados a los ganglios linfáticos de drenaje, procesados y presentados a los linfocitos o bien son captados por inmunoglobulinas de membrana de los LB. Si el paciente tiene un fenotipo Th2 se induce la síntesis de citoquinas como IL-4 e IL-13 que favorecen el cambio (“switch”) de isotipo hacia la IgE específica para ese antígeno. (I. Scholl, 2005; F. D. Filchelman, 2005; L. Hummelshoj, 2007 y L. K. Poulsen, 2007).

Luego, la IgE específica pasa a la circulación general y se une a los receptores de alta y de baja afinidad para ella ubicados en las células. Estas células quedan entonces “sensibilizadas” para un encuentro futuro con el mismo alérgeno, cuando desencadenarán la cascada de hechos bioquímicos y clínicos característicos de las reacciones de hipersensibilidad inmediata. Esta fase de sensibilización conduce también a la generación de LT y de LB de memoria; éstos últimos se activarán en un nuevo contacto con el alérgeno y en presencia de LT colaboradores inducirán una mayor síntesis de IgE.

Los mediadores bioquímicamente activos provocan aumento de la permeabilidad vascular, vasodilatación, contracción del músculo liso bronquial y visceral e inflamación local, los cuales componen las manifestaciones clínicas de la alergia inmediata. Como consecuencia de los cambios fisiopatológicos inducidos por los mediadores químicos liberados durante la fase aguda de la reacción alérgica y por la persistencia de ellos, se producen modificaciones duraderas (desde horas hasta días) en los tejidos afectados (mucosas respiratoria y digestiva y la piel), que pasan a constituir la llamada *fase tardía* dependiente de la IgE, para diferenciarla de la respuesta tardía del tipo IV de Gell & Coombs macrófago-linfocito dependiente. Estas citoquinas Th2 (p. ej. IL-5) inducen eosinofilia tisular y liberación de mediadores inflamatorios de los eosinófilos (R. Valenta, 2002). Si bien hay datos que avalan que la IL-4



promueve la diferenciación de los LTCD4 hacia el fenotipo Th2 (R. Seder, 1994), existe disenso en relación a cuáles son las células que sintetizarían tempranamente la IL-4. Investigaciones recientes proponen que los basófilos serían potentes células presentadoras que selectivamente inducirían células Th2, pues expresan moléculas de clase II y CD80/86 y capturan proteínas intactas, las procesan y producen IL-4. (K. Nakanishi, 2010). Otros autores refutan estos hallazgos, aunque sostienen que los basófilos, en realidad, más que como CPA cooperarían con las células dendríticas en la orientación de la diferenciación de los LTCD4+ en el perfil funcional Th2. La identificación de diversos subgrupos de células dendríticas aportó mecanismos supletorios por los cuales pueden controlar el desarrollo de los LT hacia el linaje Th1/Th2. A estas células se agregan en un infiltrado celular muy abundante, macrófagos, monocitos, eosinófilos, plaquetas, fibroblastos y polinucleares neutrófilos, que, ante la presencia de la IL-8 son capaces de provocar la netosis, forma muy peculiar de necrosis celular (*"neutrophil-extracellular-traps"*), con gran destrucción de los núcleos de las células epiteliales y de la mucosa. Este infiltrado inflamatorio observado en las biopsias de mucosa bronquial de los asmáticos crónicos redefine a esta condición clínica originariamente atribuida a la contracción de las fibras musculares, al edema de la mucosa y a la secreción mucoide de la hipercrinia y discrinia clásicas. Esta cronificación lleva con el tiempo a la reparación fibrótica de la vía aérea, merced al efecto del TGF- $\beta$  con las consecuencias espirométricas documentadas en el patrón restrictivo de los hallazgos.

### Anticuerpos IgG asimétricos

Cuando se establece la dinámica de la respuesta inmune humoral ante la agresión de un antígeno exógeno o endógeno, suceden numerosas modificaciones en la calidad y en la cantidad de los anticuerpos sintetizados. Ya en 1935, Heidelberger y Kendall señalaron que en los sueros inmunes se producían anticuerpos que no eran capaces de formar complejos insolubles con el antígeno, mientras que podían bloquearlo o bien co-precipitar en presencia de anticuerpos precipitantes de la misma especificidad. A estas moléculas se las bautizó, originariamente, anticuerpos co-precipitantes. Con los estudios bioquímicos ulteriores estas moléculas

se redefinieron como moléculas de **IgG asimétricas**, que se caracterizan por la existencia de un residuo hidrocarbonado del tipo **oligomano-sa** en uno de los fragmentos Fd (J. Leoni, 1986; M. Labeta, 1986). Esta característica provoca un impedimento estérico en la unión del paratope al epítipo antigénico, determinando la univalencia funcional de estos anticuerpos.

La existencia de este **hidrato de carbono** es el responsable de la funcionalidad anómala de las moléculas asimétricas y fue certificado por el tratamiento de la IgG con endo- $\beta$ -N-acetilglicosidasa H, enzima que rompe la unión del resto oligosacárido a la molécula proteica, y las convierte en moléculas capaces de formar complejos insolubles con el antígeno. (J. Leoni, 1996). La existencia de moléculas de **IgG asimétricas**, al igual que todas sus propiedades biológicas, fueron descritas en varias especies animales (ratón, rata, cobayo, conejo, oveja, caballos y vacas) en sus sueros y en otros fluidos biológicos; también en el tejido placentario humano y en todas las subclases de las inmunoglobulinas de estas especies estudiadas. (R. A. Margni, 1972, 1977, 1998; I. MalanBorel, 1991; G. Gutiérrez, 2001).

Dada su **univalencia funcional** los anticuerpos asimétricos actúan como bloqueantes del antígeno, siendo incapaces de formar los complejos necesarios para la activación de los mecanismos inmunes efectores que conduzcan a su eliminación. (R. A. Margni, 1972, 1977 y 1998; I. MalanBorel, 1991; G. Gutiérrez, 2001). Estos anticuerpos **no** fijan el complemento por la vía clásica, **no** inducen la fagocitosis **ni** son opsonizantes y **no** inducen la reacción de Arthus. (E. Cordal, 1973; R. A. Margni, 1974, 1977, 1983, 1998; S. Goerd, 1999; A. Canellada, 2002; M. Cortés, 2008).

Utilizando la técnica de fijación del complemento y de depuración antigénica se comprobó que si ambos tipos de anticuerpos, simétricos y asimétricos, se hallan en la misma muestra de suero, compiten por el antígeno, y el resultado final de la reacción estará dado por la proporción en la que ellos se encuentren. Sin embargo, en los ensayos de neutralización se halló que las moléculas de **IgG asimétricas** eran 3 veces menos eficientes que las simétricas. (S. Miranda, 1992). Experimentos realizados en conejos inoculados repetidamente con ovoalbúmina soluble y ovoalbúmina particulada demostraron que, si el antígeno es soluble, los

anticuerpos asimétricos representan del 15 al 20% del total de los anticuerpos sintetizados en el transcurso de la respuesta inmune.

Al utilizar como inmunógeno a la ovoalbúmina polimerizada u ovoalbúmina fijada a un soporte particulado (p. ej. bacteria), se observó que el estado de agregación o particulado del antígeno cambiaba la evolución de la respuesta inmune con un claro predominio de las moléculas IgG asimétricas. (A. Parma, 1984; R. A. Margni, 1986 y 1998; T. Gentile, 2004).

Teniendo en cuenta estas propiedades biológicas, si los anticuerpos asimétricos son específicos para los antígenos propios su papel será **beneficioso** para el enfermo como se ha visto en algunas enfermedades autoinmunes. Así, en la artritis reumatoidea experimental inducida por el colágeno tipo II en las ratas, se observó la síntesis de anticuerpos asimétricos con la misma especificidad durante el período de remisión de la enfermedad (M. Cortés, 2008). Por otro lado, si los anticuerpos asimétricos son específicos para agentes agresores extraños como sucede en las infecciones **bacterianas y parasitarias** crónicas, el predominio de estos anticuerpos es **perjudicial** para el huésped, ya que los mismos bloquean al patógeno, sin favorecer su eliminación, y, por ende, facilitan su supervivencia y la cronificación de la infección. (S. Hajos, 1982; R. A. Margni, 1983; A. Parma, 1984; C. Carbonetto, 1986; S. Venturiello, 1996).

La protección de los antígenos extraños por los anticuerpos **IgG asimétricos** no siempre resulta perjudicial para el huésped, como en las enfermedades alérgicas-atópicas y en la preñez, donde los anticuerpos asimétricos ejercerían un efecto beneficioso. (I. Borel, 1991; T. Gentile, 1992; R. A. Margni, 1998; G. Gutiérrez, 2005; V. Dubinsky, 2008; G. Barrientos, 2009).

La mayoría de los estudios que posibilitaron avanzar en el conocimiento de las propiedades y factores reguladores en la producción de las moléculas **IgG asimétricas** se realizaron en cultivos de hibridomas murinos. Los estudios estructurales sobre las moléculas de IgG segregadas por los diferentes hibridomas demostraron que estas moléculas exhiben glicosilación asimétrica en la región Fab. (L. Morelli, 1989; 1993). La presencia de **hidratos de carbono** adicionales en los Fab de la inmunoglobulina modifica sus propiedades y funciones. No obstante, los mecanismos moleculares que llevan

a la presencia o ausencia de estos N-glicanos aún no fueron totalmente esclarecidos. (M. B. Prados, 2011). Es factible separar las moléculas de IgG simétricas de las asimétricas utilizando columnas de concanavalina-A-Sepharosa como inmunoabsorbente (M. Labeta, 1986; J. Leoni, 1986), teniendo en cuenta la diferente afinidad que poseen por la lectina concanavalina-A, pues esta lectina se une a los residuos de  $\alpha$ -D-manosa presentes en los oligosacáridos del tipo oligomanosa.

Por su parte, varios experimentos demostraron la participación de la IL-6 en la inducción de la síntesis de los anticuerpos asimétricos (G. Gutiérrez, 1998), y, la relación entre el aumento de las proteínas del estrés y la producción de este tipo de moléculas de IgG. Las proteínas del estrés actuarían como chaperonas y modificarían el plegamiento de las proteínas sintetizadas por los LB durante el procesamiento antigénico o durante el plegamiento de la cadena de la IgG, de manera de exponer nuevas secuencias de glicosilación en la cadena peptídica. (S. Miranda, 2001 y 2005). Los anticuerpos son glicoproteínas; la molécula de la IgG posee por lo menos un carbohidrato con una unión N-glucosídica en un residuo de Asn (297) ubicado en el dominio constante de la cadena pesada (C $\gamma$ 2). Este carbohidrato es complejo y está muy conservado en las diferentes especies. (T. W. Rademacher, 1988). También se hallan oligosacáridos en las regiones hipervariables de los 2 Fab. (A. Wright, 1993). El oligosacárido del Fc de la IgG juega un importante papel en sus propiedades biológicas, como en su velocidad de depuración, inmunogenicidad, estabilidad, velocidad de proteólisis, unión al C1q del complemento y ADCC o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. (A. Solthys, 1994; H. W. Schroeder, 2010; R. M. Anthony, 2010). En varias patologías, se describieron alteraciones de la glicosilación de la IgG; en la artritis reumatoidea, en el LES y en la enfermedad de Crohn, la IgG carece de ácido siálico o de galactosa, y se observaron hallazgos similares en la nefropatía por IgA con disminución de la depuración de ésta de la circulación. (H. W. Schroeder, 2010). La existencia de N-glicanos en los Fab de la IgG afecta -en más o en menos- la afinidad, la estabilidad y la actividad biológica de la molécula, tal como lo demostraron varios autores, entre ellos R. A. Margni del Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral

de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA (IDEHU) ( desde la década de 1970, quien los bautizó como “**anticuerpos asimétricos**”.

En la respuesta inmune a los antígenos solubles la **IgG asimétrica** representa entre 10 a 15% del total de los anticuerpos sintetizados, porcentaje que se incrementa cuando el antígeno es particulado. G. Gutiérrez (2001) señaló que la citoquina involucrada en la síntesis específica de estos anticuerpos era la IL-6, que, también participa en la glicosilación de las proteínas de la fase aguda. A. Canellada (2002) demostró que la sumatoria de IL-4, IL-6 e IL-10 recombinantes aumentaba la proporción de **IgG asimétrica** producida por los LB aislados de placentas humanas y por las células de un hibridoma.

G. Barrientos (2009) señaló una correlación positiva entre el aumento sérico de la IL-10 y el incremento de la IgG asimétrica en mujeres gestantes. Los LT-reg-CD4+CD25+ alérgenos específicos, al ser estimulados por la IT específica generan IL-10 que modula la respuesta Th2 inducida por el alérgeno y reorienta la respuesta hacia la síntesis de anticuerpos bloqueantes. (K. T. Nouri-Aria, 2004; A. M. Ejrnaes, 2004; M. Akdis, 2006; C. Möbs, 2010). Los anticuerpos asimétricos se determinan por columnas cromatográficas de afinidad con Concanavalina-A, dado que, los  $\alpha$ -D-manopiranosil,  $\alpha$ -D-glucopiranosil y los residuos estéricamente relacionados, se unen a la Concanavalina-A-Sepharosa. La proporción de IgG que se fijó a la Con-A se deduce mediante la relación entre la IgG que no se unió a la Con-A-sepharosa (IgG simétrica) presente en el sobrenadante de la absorción y la IgG total. La ecuación es: % IgG unida a Con-A =  $100 - (\text{DO IgG no fijada a la Con-A} / \text{DO IgG total}) \times 100$ . En un trabajo reciente con el Dr. José Dokmetjián del IDEHU hemos detectado entre un 17 y un 25% de anticuerpos **IgG asimétricos** en sujetos atópicos vacunados con aeroalérgenos durante 3 años consecutivos acompañados de mejoría clínica ostensible.

### **Opinión de la OMS sobre las vacunas alérgicas**

Dice la OMS que “la IT con alérgenos consiste en administrar cantidades gradualmente crecientes de un extracto alérgico a un sujeto alérgico para mejorar la sintomatología causada por la exposición posterior al alérgeno causante.” “La IT es el único tratamiento que puede alterar el curso natural de las enfermedades

alérgicas y también puede impedir el desarrollo de asma en los pacientes con rinitis alérgica.”

Estas 2 aseveraciones constituyen un sólido basamento para el estudio pormenorizado del paciente alérgico-atópico y la instauración de la IT si correspondiere, dejando de lado las críticas y las objeciones que la denostaron durante décadas. Se define “extracto alérgico” a la preparación de un alérgeno obtenido mediante extracción de los constituyentes activos de sustancias animales o vegetales en un medio adecuado. Llámase “producto alérgico” al producto biológico incluyendo extractos alérgicos y otros que son administrados al hombre para el diagnóstico, prevención y tratamiento de la alergia y de las enfermedades alérgicas. Estos conceptos fueron expresados por la Food & Drug Administration (FDA) en 1985: 21 CRF Parts 600.610 and 680 - Docket n° 81-N-0096- *Federal Register: Allergenic extracts: Implementation of efficacy review*. En la Farmacopea Europea (*Allergen products o Producta allergenica* 1997; 1063-1068), se define como “producto alérgico” al preparado farmacéutico que deriva de vacunas de materiales existentes en la Naturaleza que contienen alérgenos y son sustancias que causan y/o provocan enfermedad alérgica (hipersensibilidad). Con todos estos antecedentes el Comité de la OMS reunido en Ginebra, acordó el nombre de “**vacuna alérgica**” en lugar de extracto o producto alérgico a la solución que se utiliza en el tratamiento convencional para la atopía. Las **vacunas alérgicas** fueron estandarizadas de diferentes formas, sin embargo, solamente se deberían emplear para el diagnóstico alergológico e IT aquellas en las que se especifica la potencia total y la concentración de cada alérgeno individualmente. Las unidades empleadas son: las unidades de nitrógeno proteico o **PNU** iniciadas en el Centro de Alergia del Hospital de Clínicas por la Doctora en Bioquímica Ethel Annecchini (1922-2011) con el método del micro-Khejdahl, que consideraba al concentrado como poseedor de 10.000 unidades; las unidades de alergia o **AU** (de los EEUU) basadas en las pruebas in vitro, reemplazadas por la FDA por las unidades bioequivalentes de alergia o **BAU**, vinculadas con la reactividad cutáneas in vivo; las unidades biológicas o **BU**; las unidades internacionales o **IU**, y, finalmente, los miligramos de proteína por mililitro (mg/ml), que empleamos actualmente aplicando méto-

dos como el de Lowry o el de Bradford para su ulterior determinación.

En 1911, Leonar Noon, de Londres, publicó un breve artículo en *The Lancet* sobre las inoculaciones preventivas para el tratamiento de la fiebre del heno (polinosis). Con un extracto acuoso de *Phleum* que había preparado, verificaba la sensibilidad de sus pacientes a una instilación conjuntival en función de la respuesta inflamatoria local que se producía. Con este método determinó la “fuerza del extracto”, que según él correspondía a 0,1 mg de polen en granos. Comenzó las inoculaciones con dosis muy pequeñas cada 2 semanas por vía subcutánea, y observó las reacciones de los ojos para determinar la protección contra la “toxina” del polen. Al disminuir la reacción ocular, Noon incrementó 100 veces la concentración del polen y prosiguió con el experimento. Comprobó que, a pesar de estar en la estación polínica, sus pacientes no sufrían sus ataques anuales de fiebre del heno. Como Noon no se encontraba bien de salud y no quería postergar sus experimentos, invitó a su colega Joseph Freeman a que prosiguiera con ellos. Este último publicó el mismo año y en la misma revista sus resultados con 20 polínicos, 14 de los cuales habían mostrado un resultado muy satisfactorio sin síntomas al año de las vacunaciones, mientras que los 5 restantes (uno había abandonado) continuaban con síntomas más atenuados para la evaluación de la época.

Ambos autores coincidían en que estos pacientes eran sensibles a la “toxina” del polen y que las inoculaciones generaban “antitoxinas” que mejoraban su cuadro clínico. Se hallaban muy influidos por los conceptos consagrados en el siglo anterior, ya que las bases de la alergia atópica apenas acababan de ser delineadas por el pediatra vienés Clemens von Pirquet en 1906. Hacia 1918, el norteamericano R. A. Cooke sostuvo que era creencia extendida que, tanto la fiebre del heno como el asma bronquial -que asimilaba a la anafilaxia de Richet y Portier-, se debían a la producción de anticuerpos específicos contra los pólenes transportados por el aire, así como contra otros elementos animales y aun alimentarios. Se adelantó así 46 años a la confirmación de Voorhorst del papel de los ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* en el asma humana.

No obstante, se instaló el vocablo “desensibilización” para designar la técnica de Noon y

Freeman, como reminiscencia de los trabajos de Besredka y Steinhart sobre toxinas y antitoxinas durante el siglo anterior. No se la consideraba hasta entonces un verdadero fenómeno inmunológico, sino una técnica que inducía una especie de tolerancia al agente ofensor, que era mantenida por las inyecciones semanales con la consecuente mejoría de los síntomas.

En 1922, el propio Cooke, en una suerte de autocritica de su tratamiento, propuso el término “hiposensibilización” tras haber comprobado que, si bien en la mayoría de los casos tratados la mejoría era casi total, en otros no se observaba un resultado tan venturoso. Solo 50 años después Harley demostraría que el tratamiento era eficaz, al corroborar, además de la mejoría de los síntomas, la negativización de las pruebas cutáneas con el alérgeno ofensor y aun de las pruebas conjuntivales, que para ese entonces se consideraban de gran margen de sensibilidad a los aeroalérgenos, sin sopesar demasiado si el ojo estaba en condiciones de soportar tal ensayo diagnóstico (glaucoma).

En 1921, Prausnitz y Küstner demostraron que la sensibilidad anafiláctica podía ser transferida por el suero de un paciente sensible a un ser humano insensible o virgen de sensibilidad a determinada sustancia. Para la reacción de Prausnitz-Küstner, (P-K) se inyecta por vía intradérmica el suero “sensible” no calentado a un no alérgico y 24 horas después se inyectan en la misma zona pequeñas cantidades del alérgeno. Si aparecen eritema y numerosas pápulas a veces pruriginosas, la prueba es positiva. El propio Küstner se sometió a ella, pues era alérgico al pescado. De Besche extendió en 1923 el abanico de alérgenos, al comprobar por medio de esta reacción la sensibilidad a otros aeroalérgenos. En 1935 Cooke demostró que el suero de personas vacunadas con polen de *Ambrosia* protegía a las personas sensibles a éste durante la estación de polinización que no habían recibido vacunaciones previas. Este “factor sérico” también era capaz de bloquear la prueba de P-K clásica. En aquel entonces, tal “factor” se ubicaba en la fracción “seudoglobulina”, antes de los importantes experimentos de Tiselius en 1939 y posteriormente de Kabat y Meyer, que caracterizaron las diferentes inmunoglobulinas séricas, hasta los de Ishizaka y Johansson en 1966.

Loveless bautizó en 1940 a estos anticuerpos como “bloqueadores”, dado que resistían



el calentamiento a 56° C, se descartó el sistema complemento y ulteriormente la IgE.

En la década de 1950 comenzó a cuestionarse la ausencia de control crítico en las observaciones relacionadas con la desensibilización. Así, los estudios de Feinberg (1952), Frankland (1954), Johnstone (1957), Lowell (1963), Franklin (1965) y Fontana (1965) corroboraron la eficacia de la vacunoterapia polínica. Cabe destacar el seguimiento pediátrico de Johnstone a lo largo de 14 años, que registró un 68% de remisión total del asma infantil, frente a escasa mejoría en el 19% y reacción nula en el 7%. En sus series de 5 años de tratamiento de niños de diferentes edades, Fontana constató el alivio de los síntomas que había observado inicialmente Johnstone.

Desde 1960 comenzaron a incorporarse los estudios complementarios de laboratorio para valorar los datos inmunológicos. Van Arsdel y Middleton (1961) iniciaron la cuantificación de la histamina liberada por los leucocitos en presencia del antígeno específico. Lichtenstein y Osler (1964) mejoraron la técnica anterior e hicieron posible la detección de la histamina por la desgranulación de los basófilos, King (1964) dio paso a la estandarización de los alérgenos al comprender que estos son glicoproteínas complejas que poseen regiones que no son inmunodominantes. Norman y Rhyne (1966) comenzaron a utilizar el vocablo IT al darse cuenta de que la desensibilización implicaba varios procesos y mecanismos inmunitarios más allá de la existencia de un anticuerpo IgG bloqueador. Pruzansky y Patterson (1967), Lichtenstein (1968) y Sadan (1969) corroboraron los estudios anteriores y revalorizaron el papel de la IgG específica en la mejoría clínica de los atópicos. Levy y Osler (1967), Ishizaka y Johansson (1967), Wide y Bennich (1967), Ceska (1972), Yunginger y Gleich (1973) y Gleich (1977) estudiaron la biología de la IgE y posibilitaron su detección sérica, lo cual puso fin a numerosas especulaciones acerca de las propiedades físico-químicas de esta “reagina”.

Rocklin (1974 y 1980) incursionó inteligentemente en la participación de los linfocitos en la respuesta alérgica y en sus cambios tras la desensibilización. Naclerio (1983) sentó un hito al estandarizar las pruebas desencadenantes nasales con el antígeno ofensor y la ulterior cuantificación de los mediadores químicos involucrados en la inflamación alérgica. Creticos (1985) rati-

ficó los hallazgos anteriores y detectó modificaciones significativas con la IT.

Platts-Mills (1976 y 1979) describió anticuerpos de los isotipos IgG e IgA específicos en las secreciones nasales, o sea, la producción local de tales anticuerpos. Aas publicó en 1971 un meduloso estudio doble ciego con polvillo habitacional en el que confirmó su utilidad sobre la hiperreactividad bronquial. En 1978, Hunt publicó sus conclusiones acerca de la indudable utilidad de la IT con venenos de insectos (Hymenópteros) en aquellos pacientes, profesionales o no, que habían sufrido episodios graves de anafilaxia ante la picadura de una abeja o de una avispa. Debe alcanzarse una dosis vacunante útil de 100 mcg para lograr un título protector de IgG específica. No ha de emplearse un extracto de cuerpo entero, pues se demostró su incapacidad para generar anticuerpos protectores. Ya en su momento, Stull y Cooke (1940) practicaron IT con pólenes en fresco y con adyuvantes como el alumbre de potasio; los resultados fueron similares, pero las reacciones locales con estos últimos fueron más notables, aunque la comodidad de las menores aplicaciones resultó un atractivo insoslayable. Estos autores también ensayaron con tirosina, con formolización, con acetilación y con calentamiento, pero la síntesis de anticuerpos IgG protectores fue menor y en algunos casos casi irrelevante.

Marsh (1970) creó los “alergoides” al tratar el antígeno con formol únicamente, y evidentemente modificó la alergenidad, pero no la inmunogenicidad. Pegelow (1984) y Corrado (1989) publicaron sus hallazgos sobre la utilidad de la copulación del antígeno con alginatos. Fuchs y Strauss (1959) utilizaron piridina, que produjo reacciones locales importantes que obligaron a suspenderla a pesar de comprobarse la síntesis de anticuerpos. Miller (1974) empleó glutaraldehído y tirosina con idénticos resultados. De estos antecedentes históricos de la evolución de la IT se desprende que las inyecciones subcutáneas con alérgenos acuosos son las que se toleran mejor y muestran escasos efectos adversos locales y muy pocos generales o sistémicos, generalmente debidos a imprudencias negligentes del profesional que indica la dosis y la concentración vacunantes.

El ulterior secuenciamiento aminoacídico de las proteínas abrió nuevas posibilidades para la síntesis de los alérgenos. El clonado de genes ofrece mayor facilidad para obtener nucleótidos

e, indirectamente, la secuencia de las proteínas. El clonado posibilita registrar por homología los péptidos que reaccionan con los LT y producir proteínas recombinantes. También es factible estudiar la estructura terciaria de los alérgenos aplicando la cristalografía de rayos X y la resonancia nuclear magnética. Los métodos usados para el estudio de las bibliotecas de ADN con anticuerpos IgE o anticuerpos monoclonales o policlonales de ratón se desarrollaron rápidamente; así, podrían producirse proteínas recombinantes de todos los péptidos alérgenos inmunodominantes. La única limitación sería -por el momento- su elevado costo para la vacunación del paciente. Estos métodos han permitido identificar algunas familias interesantes, como la de las serina-proteasas, las profilinas, las lipocalinas y el grupo subtilasa. Estas enzimas pueden llegar a presentar cierta homología entre sus estructuras y su papel como antígenos activos. De esta manera, Der p 1 es capaz de clivar *in vitro* al CD23 y al CD25, lo cual modificará sin duda la dinámica de la respuesta inmune humana. (Hewitt, 1995, y, Comoy, 1998).

No obstante, no todos los alérgenos son enzimas, y, por ende, su relación con los RcT y con los RcB necesita mayor información (Fel d 1 y Der p 2). Empleando secuencias aminoacídicas primarias de un alérgeno (Fel d 1), es posible hacer plegamientos que permitan estudiar las interacciones con el RcT y con las moléculas de clase II del CMH y alterar la respuesta T. Los epítomos reconocidos por el RcB son conformacionales y no todos pueden gatillar así una respuesta dependiente de IgE.

El fracaso de la terapia con péptidos en seres humanos, no obstante los resultados contrarios hallados por el Dr. Krikor Mouchián en su Tesis Doctoral de 2011 (con los péptidos 33 y 38 del polen de la gramínea *Lolium perenne*), podría estar vinculado con las siguientes posibilidades: 1) que el péptido elegido no sea relevante para la activación, 2) que los péptidos sean rápidamente clivados o eliminados *in vivo* y no interactúen con el sistema inmunitario y 3) que, aunque los péptidos sean presentados correctamente a los LT no generen la respuesta adecuada.

Para la IT podría ser necesario emplear vectores (un fago) o adyuvantes proteicos o no. En una experiencia realizada en 1990, se obtuvieron anticuerpos IgG específicos al emplear una fracción soluble de 52 kDa del hongo *Peni-*

*cillium notatum* (Allergol et Immunopathol, 1990; 18: 301-307). La técnica para expresar proteínas recombinantes se desarrolló rápidamente en los últimos años con el empleo de vectores bacterianos o levaduras. En la actualidad se pueden producir cantidades importantes de estas proteínas recombinantes muy similares a las naturales, pero con menos posibilidades de producir anafilaxia.

Se propusieron 3 enfoques para modificar estas proteínas: a) la expresión natural de isoformas que son menos reactivas con la IgE b) el uso de sitios mutagénicos directos que alteran los epítomos que unen los anticuerpos y c) la expresión de grandes polipéptidos o fragmentos de la molécula. Una vez que la molécula es clonada, es posible alterar específicamente el gen y modificar así las estructuras primaria, secundaria y terciaria de la proteína recombinante. La posibilidad de liberar genes en los pacientes creó notables expectativas para la terapia génica en enfermedades causadas por la pérdida de un producto simple de un gen (v.g. algunas inmunodeficiencias primarias).

Sin embargo, subsisten problemas mayores relacionados con el mantenimiento de la expresión de ese gen en el tejido seleccionado y con la prevención del rechazo de los vectores virales que transfieren el gen. Los plásmidos han sido tecnificados para incorporar una amplia variedad de genes eucarióticos. Los plásmidos manipulados para promover el control de la iniciación de la transcripción pueden ser específicos de tejido o inducibles bajo circunstancias particulares. Algunos genes o partes de genes pueden incorporarse dentro del plásmido; así, podrían producirse vacunas de ADN para una proteína total, para una proteína parcial o para parte de una de ellas. Se han ensayado plásmidos codificados con Hev b 5 del látex, con Ara h 2 del maní y con Der p 2 del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* en modelos animales, con resultados contradictorios en lo relativo a la respuesta inmune específica, pero con reacciones adversas no alérgicas que deberán ser adecuadamente valoradas antes de aplicar esta tecnología al ser humano. El empleo de señales inmunoestimuladoras ligadas a las proteínas constituyó toda una sorpresa investigativa.

Así, la vacunación de ratones con plásmidos que contenían la proteína de la  $\beta$ -galactosidasa impidió la síntesis de una IgE específica. Estas

señales o SIS (por *specific Immunostimulatory sequences*) son segmentos cortos de ADN con una secuencia purina-purina-citosina-guanosina-pirimidina-pirimidina en la que la citosina no está metilada. Un grupo de investigadores señaló recientemente que la inmunomodulación debida a la BCG y al adyuvante de Freund completo podría depender de SIS bacterianas que estimularían a los macrófagos a segregar IL-12. En ratones, se comprobó que la inoculación de SIS antes de suministrar un antígeno producía una disminución de los Th2 y de sus citoquinas, al igual que de la eosinofilia. Con un antígeno extraído de la cucaracha *Periplaneta americana* logramos modificaciones en los valores de los anticuerpos específicos IgE e IgG al igual que las citoquinas IL-2, IL-4 e IL-4R en varios seres humanos atópicos sensibles a glucoproteínas del insecto. (J. Invest. Allergol. Clin. Immunol., 1999; 9: 299-304).

El rápido desarrollo de tecnologías modernas para el análisis del ADN como de las proteínas posibilita mejores métodos para la estandarización de las vacunas alergénicas. Muchos péptidos de los pólenes, de los ácaros del polvillo habitacional, de las cucarachas, de los epitelios de los animales domésticos, de los Hymenópteros y de alimentos, han sido clonados y expresados como proteínas recombinantes homogéneas. De esta manera, se puede caracterizar a la vacuna alergénica en términos del contenido en los alérgenos mayoritarios (en ng o µg), lo cual permite controlar con precisión la homogeneidad de cada lote. La composición de la vacuna puede determinarse por diversos métodos, tales como, el isoelectroenfoque, la electroforesis SDS-PAGE, la inmunotransferencia con IgE y la radioinmuno-electroforesis cruzada (CRIE). (J. Bousquet, 1994). En el Japón, las vacunas alergénicas están estandarizadas por la cuantificación del alérgeno mayoritario por su actividad biológica y se etiquetan en unidades japonesas de Alérgeno (JAU). La Farmacopea Europea dice que "los productos alergénicos para la IT pueden ser tanto vacunas no modificadas como vacunas modificadas químicamente y/o por adsorción en distintos vehículos". Las vacunas pueden ser acuosas, depot y modificadas. Las primeras son mezclas heterogéneas de alérgenos y materiales no alergénicos pudiendo estar estandarizadas y emplear alérgenos inhalatorios y venenos, generalmente, medidos en mg/ml de proteínas. Las depot pretenden incrementar la inmunoge-

nicidad y disminuir los efectos secundarios modulando el sistema inmune y manteniendo la eficacia clínica. Los alérgenos estructuralmente alterados están todavía lejos de ser aclarados. La modificación física incluye la adsorción con hidróxido de aluminio, fosfato cálcico, tirosina y liposomas. Los llamados alergoides son vacunas modificadas con formaldehído, glutaraldehído y alginato. Otras no polimerizadas con metoxipoli-etilenglicol se revelaron menos eficaces que las anteriores. Se han asociado ambos métodos de modificación para incrementar la inmunogenicidad y la comodidad de inoculaciones mensuales en lugar de semanales, aunque se han descrito reacciones adversas locales con la formación de lesiones granulomatosas por la histopatología de las mismas en las preparadas con piridina y tirosina. La utilización de glicerol como conservante, no así la de albúmina sérica, puede prevenir en cierto modo la degradación por proteasas.

Las mezclas de alérgenos en un mismo vial para facilitar la administración en un paciente polisensibilizado es una práctica frecuente por razones económicas y de comodidad. Sin embargo, varios autores como H. S. Nelson, 1981 y 1996; R. E. Esch, 1992; T. R. Kordash, 1993, y entre nosotros, la Doctora en Química Silvia G. Irañeta, 2011, demostraron que las proteasas de algunos alérgenos son deletéreas para las proteínas de otros alérgenos, en especial, las de los ácaros, cucarachas y hongos, que clivan a los epitopes de alérgenos polínicos. Estos hallazgos permitirán replantearse la estrategia terapéutica a utilizar para evitar estos perjuicios. Por ello, la OMS aconseja las vacunas de una sola fuente de material antigénico o en su defecto una mezcla de alérgenos relacionados entre sí como podrían ser varios pólenes integrantes de la familia Gramíneas o con pólenes de árboles caducifolios o con pólenes de Ambrosia. La utilidad del empleo de péptidos aislados por columnas cromatográficas del polen de *Lolium perenne* en la IT quedó sólidamente confirmada en la Tesis de Doctorado del Dr. Krikor Mouchián, en 2011, lo cual abre una estrategia más exquisita en la administración de moléculas muy purificadas de un material que contiene elementos no antigénicos y que se administran en la IT convencional.

La eficacia de la IT subcutánea, más allá de un pasado de empirismo y fe, fue asazmente demostrada por estudios controlados randomi-

zados y a doble ciego con placebo en los centros más importantes del mundo, tanto en Europa como en los Estados Unidos. La IT es específica para el antígeno administrado, y, antes de instaurarla, se requiere una valoración clínica completa del paciente. La IT con dosis bajas suele ser ineficaz, aunque es la recomendación inicial de todo tratamiento; por su parte, las vacunas con dosis muy elevadas están relacionadas con reacciones adversas tanto locales como sistémicas; éstas constituyen una emergencia médica que deberá obviarse con un control más cercano de la tolerancia del paciente, asumiendo que cada uno de ellos tiene una historia propia aún ante el mismo alérgeno y con similares dosis. Los estudios de IT con alérgenos de Ambrosia, Gramíneas, gato, ácaros y venenos de Hymenópteros, aportan buenas pruebas de que una dosis de mantenimiento de 5-20 µg del alérgeno mayoritario por inoculación se asocia con una mejoría significativa en la puntuación de los síntomas del paciente. Con respecto a la duración de la IT, los autores no establecen un período definido, sino que en general recomiendan que el tratamiento se prolongue entre 3 y 5 años, con inoculaciones semanales en dosis progresivas hasta los 5-20 µg por dosis, observando críticamente la tolerancia y la respuesta clínica.

Ante reacciones adversas locales o empeoramiento sintomático la dosificación no será incrementada; por el contrario, se disminuirá hasta aquella tolerada sin problemas aunque se prolongue el tiempo de tratamiento.

Los fármacos proporcionan un tratamiento sintomático, mientras que la evitación del alérgeno y la IT son las únicas modalidades terapéuticas que tienen la posibilidad de modificar el curso natural de la enfermedad. Así sucede en la IT con los venenos de abeja y de avispa que mejoran la situación clínica de los afectados; por extensión, aunque no existen tantas publicaciones como con los anteriores, los extractos de hormigas colorada y negra (géneros *Solenopsis* y *Pogonomyrmex*) también resultaron eficaces en su administración crónica superando la hipersensibilidad previa. En estos casos, la pureza de los antígenos es menor que aquella de los señalados anteriormente, habida cuenta de la escasez de casos clínicos existentes y del interés de la industria farmacéutica para elaborarlos. No obstante obliga señalar que determinar la taxonomía de la hormiga o de otro insecto poco común

en una determinada zona geográfica también conspira contra el interés de desarrollar una vacuna alergénica muy purificada en su calidad proteica. La dosis de mantenimiento establecida por convención en el caso de veneno de abeja es de 100 mcg que nunca se debe superar, considerando los diversos esquemas terapéuticos existentes para esta especial IT: rápidos, ultrarápidos y con internación en terapia intensiva con desensibilización en el día. No compartimos estas estrategias desensibilizantes por todos los riesgos absurdos que implican. Siempre hemos logrado buenos resultados con estos venenos utilizando una vacunoterapia subcutánea clásica.

La IT con extractos de hongos anemófilos fue observada por la OMS por la baja calidad de los mismos; estudios serios avalan a *Alternaria*, *Cladosporium* y *Aspergillus*, pero dudan de la utilidad de *Candida* y de *Tricophyton*. Sin embargo, nuestro equipo de investigación y asistencia ha empleado satisfactoriamente extractos de *Penicillium notatum*, *Rhizopus nigricans*, *Fusarium*, *Mucor mucedo*, *Dreschlera*, *Curvularia* y *Bipolaris australiensis*, en especial, en el diagnóstico y tratamiento de la sinusitis alérgica fúngica.

En su libro "Lecciones de Alergia", de López Editores, 1957, Guido Ruiz Moreno (1910-1979) señaló la utilidad de la vacunación con extracto de *Candida albicans* en mujeres afectadas de una candidiasis alérgica palpebral bilateral (lesión ecematosas deshabitada) como consecuencia de una candidiasis vaginal tratada eficientemente con antimicóticos, pero sin solución para su lesión cutánea lejana inducida por una exagerada reacción inmunológica del tipo IV de Gell & Coombs o de hipersensibilidad retardada.

Por su parte, la OMS también señaló la nula eficiencia de las vacunas bacterianas para el tratamiento de las rinitis y del asma sin considerar que los extractos con gérmenes muertos podrían actuar como adyuvantes inespecíficos al estimular la actividad macrofágica y de sus citoquinas y que al acompañar al alérgeno podrían potenciar la respuesta inmune específica.

Un metaanálisis de 20 ensayos clínicos de la IT con alérgenos para valorar la eficacia de esta forma de tratamiento en el asma reveló categóricamente la utilidad de la misma, y se necesitarían 33 estudios negativos con IT de iguales características metodológicas en los cuales también se midiera el VEMS (FEV1) antes y después de la IT para equilibrar los resul-



tados positivos. La eficiencia a largo plazo de la IT es variable según el alérgeno empleado; así, los polínicos logran varios años de remisión luego de la suspensión del tratamiento (entre 7 y 10 años) mientras que los alérgenos provenientes de insectos y hongos promueven una tolerancia entre 5 y 7 años luego de la suspensión del mismo.

Los factores de riesgo fueron tratados críticamente y se sugirieron normas que enfatizan la formación de todo el personal implicado, tanto profesional como técnico, para evitar o controlar las reacciones adversas sistémicas y locales. Así, se señalan errores en las dosis, presencia de asma sintomática, alto grado de hipersensibilidad documentado por las pruebas cutáneas o por la IgE específica-RAST, empleo concomitante de fármacos beta-bloqueantes, inoculación de extractos de reciente preparación, al igual que la inyección del alérgeno (p. ej. pólenes) durante la estación de exacerbación de los síntomas. En todos los casos, el paciente deberá esperar por lo menos 20 minutos luego de la inyección en el consultorio, donde estará disponible el material y los fármacos necesarios para tratar la emergencia anafiláctica: estetoscopio, tensiómetro, jeringas y agujas de diverso calibre, adrenalina 1/1000, antihistamínicos inyectables, glucocorticoides para la vía venosa, equipo para administrar oxígeno y para la administración de líquidos intravenosos.

El informe concluye señalando que se administran millones de inyecciones de IT anualmente. El riesgo de una reacción anafiláctica es extremadamente bajo, aunque no menciona datos estadísticos en general ni por países. Sin embargo, cualquier tipo de reacción es inaceptable, y los médicos que la prescriben y/o administran deben instituir las medidas adecuadas para minimizarlas.

Podría ser útil volver al concepto de la “dosis óptima” ajustándola en las vacunas estandarizadas de mayor potencia. Hace hincapié luego a las otras vías de la IT, que se clasifican en 1) oral deglutida, 2) sublingual ingerida luego de 2 minutos, 3) sublingual escupida luego de 2 minutos, 4) nasal y 5) bronquial, ambas acuosas o en polvo. Para demostrar la eficacia de estas vías y poder compararlas con la inyección subcutánea, para **los autores la más útil y segura**, señala algunas consideraciones sobre los diferentes proyectos de investigación, como ser, estudios a doble ciego con placebo, vacunas

alergénicas con dosis definidas, inclusión de las puntuaciones de síntomas y de las medicaciones que se empleen paralelamente en un protocolo adecuado de tratamiento. Advierte además que los profesionales deberán estar presentes durante la administración, pues en especial los niños pueden ser los pacientes más difíciles de controlar en forma crítica y científicamente válida.

Con respecto a la vacunoterapia en los niños, el informe de la OMS señala la controversia entre diversos autores, pues algunos aconsejan iniciarla en los mayores de los 5 años mientras que otros la recomiendan desde el año o a lo sumo desde los 2 años de edad. Los primeros acotan que no existen datos publicados suficientes que avalen iniciarla a edades muy tempranas. Sin embargo, consideramos que, si el calendario nacional de vacunaciones en la Argentina recomienda y obliga a vacunar a los infantes contra numerosos patógenos para el bien de su salud, habida cuenta de las muertes infantiles evitables del pasado por esas infecciones, su sistema inmune (salvo manifiesta y documentada inmunodeficiencia) está perfectamente en condiciones de elaborar una respuesta específica contra algún aeroalérgeno que le provoca la signosintomatología respiratoria. En la década pasada, investigadores japoneses inocularon la BCG en niños atópicos para estimular a los LTCD4-Th1 y equilibrar a las poblaciones LTCD4-Th2 tan inquietas en el sujeto atópico. Sería interesante inocular conjuntamente con la BCG una pequeña dosis de antígenos del *Dermaphagoides pteronyssinus* en el recién nacido atópico para inducir tolerancia desde la edad temprana a esos alérgenos tan conspicuos en la alergia respiratoria.

La IT modifica la historia natural de la enfermedad y cuánto más tempranamente se practique mejor será el resultado evolutivo de la enfermedad, en especial en la transformación de la rinitis alérgica en asma bronquial. Por otro lado, está demostrado que la IT con un alérgeno determinado **no** evita la sensibilización a otros alérgenos (p. ej. ácaros → gato) por lo cual las medidas higiénicas que instaure el médico deberán ser respetadas por los padres para evitar el contacto con otras fuentes potencialmente alergizantes. La IT es estrictamente específica contra los alérgenos detectados en el diagnóstico alergológico previo, hubiere sido realizado éste por pruebas cutáneas

(scratch, prick o intradermorreacciones) o por RAST (IgE-monoespecífica por RIA o ELISA). L. Jacobsen, 1995 y 1996; A. Des-Roches, 1995; D. R. Ownby, 1994).

Aquí es donde la IT por la vía oral encuentra simpatizantes para evitar las inoculaciones repetidas en los niños. Con ese criterio deberíamos evitar las vacunas triples virales y/o bacterianas, sus refuerzos, o bien, la alergia a los Hymenópteros (v. g. abeja) en los infantes en los cuales la IT es una indicación precisa y sumamente beneficiosa. Afortunadamente, la vacunoterapia como método va ganando terreno en el tratamiento de las enfermedades alérgicas y no alérgicas existiendo proyectos de investigación muy adelantados con antígenos relacionados con otras patologías autoinmunes y neoplásicas (v. g. próstata, mama, riñón, etc). Un párrafo final correspondería a la IT con anticuerpos monoclonales humanizados anti-IgE o con mimotopos IgE. Esta glucoproteína juega un papel destacado en la patogenia de las enfermedades alérgicas y la inhibición de la respuesta a IgE evitando su síntesis o bloqueando la fase efectora por medio de anticuerpos neutralizantes anti-IgE debería tener un valor potencialmente terapéutico.

C. C. Vasella en 1994, señaló que los niveles elevados de anticuerpos anti-IgE al nacer parecen estar asociados con una menor predisposición a desarrollar patologías atópicas. S. Miescher, en 1994, acotó que los anticuerpos anti-IgE humanos tanto inhiben como potencian la unión de la IgE a los receptores de baja afinidad o CD23, enfatizando la importancia de tales anticuerpos en la regulación de la síntesis de IgE y en la liberación de los mediadores mastocitarios y de los basófilos, tal como lo señaló F. Shakib en 1994, probando que la IgG1 y la IgG4 anti-IgE modulaban la actividad de las 2 células citadas. L. Presta, en 1994, señaló que un anticuerpo monoclonal humanizado de ratón anti-IgE humana se liga a la IgE libre, pero no a la IgG ni a la IgE ligada a mastocitos y bloquea la unión de la IgE a su receptor de alta afinidad (RFcε I).

Por su parte, J. Fahy y P. Demoly, en 1997, demostraron que este anticuerpo inhibió la síntesis de IgE inducida por el alérgeno en los cultivos de linfocitos humanos, y, aunque no suprimió la reactividad en las pruebas cutáneas, disminuía la provocación bronquial inducida por el alérgeno. L. Hellman en 1994 y B. Stadler en 1997, propusieron la inducción de autoan-

ticuerpos contra el lugar de unión de la IgE (o RFcε I) por medio de fragmentos de IgE recombinante humana o mimotopos que incluyan el lugar de unión al receptor.

### **El Centro de Alergia del Hospital de Clínicas y la vacunoterapia con aeroalérgenos**

Creado por Resolución del Consejo Directivo de la Facultad de Medicina de la UBA el 15 de junio de 1938 el Centro de Alergia del Hospital de Clínicas comenzó a atender y tratar pacientes el 12 de mayo de 1939, y sigue haciéndolo ininterrumpidamente hasta la fecha. En el mismo acto administrativo el Consejo Directivo aprobó la creación del Centro de Hemoterapia, hoy Departamento de Hemoterapia e Inmunohematología del Hospital.

El primer Jefe de Alergia fue el Dr. José A. Bózzola (1897-1967) quien enfatizó la vacunoterapia con extractos polínicos que motivaron su Tesis Doctoral de 1940. No obstante, muchos profesionales adscriptos a los aspectos clínicos generales tuvieron una interpretación amplia del fenómeno "alérgico" y bautizaron a muchos cuadros clínicos como tal, indicando la vacunoterapia donde ésta conducía a un fracaso irremediable y al desprestigio de la técnica. Con el correr del tiempo, la mayoría de los pacientes respiratorios recibieron vacunas con extractos de polvillo habitacional, epitelios (pelos y escamas de animales domésticos), hongos anemófilos (en general) y la llamada "stock-vacuna" o un extracto de gérmenes bacterianos Gram positivos y negativos muertos, que actuaba empíricamente como protector de las infecciones respiratorias que sufrían estos enfermos.

En esa época, y aún hoy en día, existen productos medicinales avalados por la industria farmacéutica que contienen suspensiones o liofilizados de gérmenes muertos para ser administrados por vía parenteral o eventualmente oral. Productos con ribosomas de esas bacterias se inhalan por aerosolización nasal para inducir inmunidad local IgA dependiente en la mucosa respiratoria. No obstante, las bondades explicitadas por el laboratorio productor no son avaladas en el informe de la OMS, y tampoco hemos valorado certeramente su eficacia terapéutica, aunque por vía subcutánea podrían actuar como adyuvantes inespecíficos como el de Freund o las micobacterias (BCG o *Corynebacterium parvum*) estimulando la actividad macrofágica y la cascada de citoquinas que deviene de aquella.

Otras sustancias como la histamina, la peptona de Witte y la leche tyndalizada se utilizaron como “desensibilizantes” inespecíficos, en especial en pacientes dermatológicos, con la finalidad de bloquear el prurito de las urticarias o de los eccemas, sin indagar demasiado en la etiología (alérgica o no) del padecimiento. Un específico histórico empleó histamina por vía inyectable con o sin gamma-globulina para inducir mejoría en la sintomatología tratada. Esas estrategias estaban influenciadas por tratamientos de otros tiempos, donde se utilizaba el habón de aceite de trementina para generar un “absceso frío” que estimulaba en forma inespecífica la inflamación inmunológica con la esperanza de generar la curación. Todavía se continúan empleando recursos cuasi-mágicos como los antiguos lisados (1930) o celuloterapia de Paul Niehans (1882-1971), originariamente con células frescas de fetos de animales, y más adelante liofilizadas, que nada tienen que ver con los proyectos de investigación que están utilizando las llamadas “células madre” humanas, o las dosis potenciadas de los principios homeopáticos de Christian Friedrich Samuel Hahnemann (1755-1843) y las maravillosas “virtudes” de innumerables fitoterápicos, que encuentran en los pacientes alérgicos un terreno fértil para ser aplicados, olvidando que muchos pólenes pueden estar enmascarados en dichos productos y resultar desencadenantes de cuadros alérgicos graves.

En la actualidad, se utilizan extractos críticamente obtenidos y purificados aplicados estrictamente en aquellos pacientes cuya historia clínica detallada así lo amerita, empleándose la vía subcutánea en la vacunoterapia y el *prick-test* o las intradermorreacciones en el diagnóstico alérgico previo. No se emplean la IT sublingual, oral o nasal, aunque es posible que un plan de investigación futuro para un proyecto de Tesis Doctoral pueda ser valorado seriamente.

## Bibliografía

- Artículo de Opinión de la Organización Mundial de la Salud. “Inmunoterapia con alérgenos: vacunas terapéuticas para las enfermedades alérgicas”. Edit. Bousquet J., Lockey R. F., Malling H. J., publicado en *Allergy*, 1998; 44 (53), 2-42.
- Apicella, Carolina Eugenia: Tesis de Doctorado en Bioquímica (UBA): “Efecto del antígeno particulado sobre la síntesis de anticuerpos bloqueantes IgG asimétricos. Estudios realizados in vitro y en un modelo de alergia murino”. 2012.
- Akdis C. A.: Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T-cells. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2009; 123 (4): 735-746.
- Akdis M., Akdis C. A.: Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2007; 119 (4): 780-791.
- Akdis M., Akdis C.A.: Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J. Exp. Med.*, 2004; 199 (11): 1567-1575.
- Akdis M.: Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. *Curr. Opin. Immunol.*, 2006; 18 (6): 738-744.
- Alonso A., Albónico J. F., Mouchián K., Pionetti C. H., Varela M. R: Alergia atópica. Edit. Héctor A. Macchi, Buenos Aires, 1987.
- Alonso A.: Claves de la Inmunología. Edit. López. Buenos Aires. 1992.
- Alonso A.: Fundamentos de Alergia para el médico general. Edit. El Ateneo. Buenos Aires. 1996.
- Alonso A.: Temas de Inmunoalergia. Tomos I al VI. Edit. CTM. Buenos Aires. 1998-2006.
- Barrientos G.: Low levels of serum asymmetric antibodies as a marker of threatened pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, 2009; 79: 201-210.
- Cady C.T.: IgG antibodies produced during subcutaneous allergen immunotherapy mediate inhibition of basophil activation via a mechanism involving both FcγRIIA and FcγRIIB. *Immunol. Lett.*, 2010; 130 (1-2): 57-65.
- Canellada A.: Interleukin regulation of asymmetric antibody synthesized by isolated placental B cells. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2002; 48 (4): 275-282.
- Canellada A., Margni R.: Modified immunoglobulin G glycosylation pattern during turpentine-induced acute inflammation in rats. *Medicina (Buenos Aires)*, 2002; 62 (3): 249-255.
- Carbonetto C., Malchiodi E., Margni R.: IgG antibody type in sera from patients with chronic Chagas’ disease. *Inmunología*, 1986; 5: 18-29.
- Cordal E., Margni R.A.: Isolation, purification and biological properties of horse precipitating and non-precipitating antibodies. *Immunochem.*, 1974; 11: 765-770.
- Cortés M., Canellada A.: Placental secreted factors: their role in the regulation of anti CII antibodies and amelioration of collagen induced arthritis. *Immunology Letters*, 2008; 119 (1-2): 42-48.
- Cramer R.: Novel vaccines and adjuvants for allergen-specific immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.*, 2006; 18 (6): 761-768.
- Des Roches A.: Immunotherapy with a standardized Dermatophagoides pteronyssinus extract. VI. Specific immunotherapy prevents the onset of new sensitization in children. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1997; 99 (4): 450-453.

20. Durham S. R.: Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N. Engl. J. Med.*, 1999; 341 (7): 468-475.
21. Ejrnaes A. M.: The blocking activity of birch pollen-specific immunotherapy induced IgG4 is not qualitatively superior to that of other IgG subclasses. *Mol. Immunol.*, 2004; 41 (5): 471-478.
22. Flicker S.: Renaissance of the blocking antibody concept in type I allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2003; 132 (1): 13-24.
23. Furukawa K.: IgG galactosylation -its biological significance and pathology. *Mol. Immunol.*, 1991; 28 (12): 1333-1340.
24. Gentile T., Margni R.A.: Preferential synthesis of asymmetric antibodies in rats immunized with paternal particulate antigens. Effect on pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, 1992; 22 (2): 173-183.
25. GINA (Global Initiative for Asthma) reports, 2010.
26. Gutiérrez G., Margni R. A.: The placental regulatory factor involved in the asymmetric IgG antibody synthesis responds to IL-6 features. *J. Reprod. Immunol.*, 2001; 49: 21-32.
27. Gutiérrez G., Margni R. A.: Asymmetric antibodies: a protective arm in pregnancy. *Chem. Immunol. Allergy*, 2005; 89: 158-168.
28. Hajos S. E., Margni R. A.: Purification and properties of anti-Trypanosomacruzi antibodies isolated from patients with chronic Chagas' disease. *Immunol. Lett.*, 1982; 4 (4): 199-203.
29. Ishizaka K.: Identification of gamma-E antibodies as a carrier of reaginic activity. *J. Immunol.*, 1967; 99 (6): 1187-1198.
30. Jarolim E.: A long-term follow-up study of hypsensitization with immunoblotting. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1990; 85 (6): 996-1004.
31. Labeta M., Margni R. A.: Structure of asymmetric non-precipitating antibody: presence of carbohydrate residue in only one Fab region of the molecule. *Immunology*, 1986; 57 (2): 311-317.
32. Mark Larché A.: Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 2006; 6: 761-771.
33. Leoni J., Margni R. A.: The asymmetric IgG non-precipitating antibody. Localization of the oligosaccharide involved by concanavalin-A interaction. *Mol. Immunol.*, 1986; 23 (12): 1397-1400.
34. Malling H. J.: Immunotherapy as an effective tool in allergy treatment. *Allergy*, 1998; 5: 461-472.
35. Margni R. A.: *Inmunología e inmuoquímica*. Ed. Panamericana. Buenos Aires. 1993.
36. Margni R. A., Binaghi R.: Purification and properties of non-precipitating rabbit antibodies. *Immunology*, 1972; 71: 271-282.
37. Margni R. A., Cordal M.: Non-precipitating antibodies isolated by immunoadsorption. *Immunochem*, 1977; 14 (4): 299-303.
38. Margni R. A., Hajos S.: Biological and physico-chemical properties of purified anti-DNP guinea pig non-precipitating antibodies. *Immunology*, 1973; 24: 435-443.
39. Margni R. A., Gentile T.: Immunological behavior of rabbit precipitating and non-precipitating (co-precipitating) antibodies. *Immunology*, 1980; 48: 681-686.
40. Margni R. A., Dokmetjián J.: IgG precipitating and co-precipitating antibodies in rabbits repeatedly injected with soluble and particulate antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1986; 13: 51-61.
41. Margni R. A., Malán Borel I.: Paradoxical behavior of asymmetric IgG antibodies. *Immunol. Review*, 1998; 163: 77-87.
42. Margni R. A., Parma A.: Agglutinating and non-agglutinating antibodies in rabbits inoculated with a particulate antigen (*Salmonella typhimurium*). *Immunology*, 1983; 48: 351-359.
43. Miranda S., Dokmetjián J., Margni R. A.: Asymmetric non-precipitating antibodies in commercial hyperimmune gamma-globulin for therapeutic use. *Immunology*, 1992; 75 (4): 707-709.
44. Morelli L., Margni R. A.: Analysis of oligosaccharides involved in the asymmetrical glycosylation of IgG monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.*, 1993; 30: 695-700.
45. Omtvedt L. A.: Glycosilation of immunoglobulin light chains associated with amyloidosis. *Amyloid*, 2000; 7(4): 227-244.
46. Parma A., Margni R. A.: Analysis and in vivo assays of cattle agglutinating and non-agglutinating antibodies. *Vet. Immunol.*, 1984; 9: 391-398.
47. Perdigón G., Margni R. A.: Human anti-tetanus toxin precipitating and co-precipitating antibodies. *Immunology*, 1982; 45: 183-190.
48. Strait R. T.: IgG-blocking antibodies inhibit IgE mediated anaphylaxis in vivo through both antigen interceptions. *J. Clin. Invest.*, 2006; 116 (3): 833-841.
49. Zhang K.: Chimeric human Fc-gamma-allergen fusion proteins in the prevention of allergy. *Immunol. Allergy Clin. North Am.*, 2007; 27: 93-103.