

Immunoterapia orale e induzione della tolleranza in età pediatrica

M.L.K. Tang^{1,2,3} & D.J. Martino⁴

¹Allergy and Immune Disorders, Murdoch Childrens Research Institute, Melbourne, Vic., Australia; ²Department of Allergy and Immunology, Royal Children's Hospital, Melbourne, Vic., Australia; ³Department of Paediatrics, University of Melbourne, Melbourne, Vic., Australia; ⁴Gastroenterology and Food Allergy, Murdoch Childrens Research Institute, Melbourne, Vic., Australia



Parole chiave

Età pediatrica; desensibilizzazione; allergia alimentare; immunoterapia orale; tolleranza orale

Abstract

I tassi di prevalenza delle allergie alimentari sono aumentati rapidamente negli ultimi decenni. In particolare i tassi di aumento sono più rilevanti nei bambini di età inferiore ai 5 anni e nei soggetti con allergie che tipicamente persistono in età adulta, come quella alle arachidi, alla frutta a guscio e ai crostacei. Secondo questo andamento, la prevalenza complessiva di allergia alimentare aumenterà nel tempo dal momento che i bambini con allergia alimentare sono aumentati vertiginosamente e che gran parte di questi avrà una persistenza della patologia anche in età adulta. È pertanto vitale identificare nuovi approcci nel trattamento delle allergie alimentari. L'acquisizione di tolleranza orale nei confronti dell'ampio spettro di antigeni alimentari assunti e del microbiota intestinale è un processo immunologico attivo che si stabilisce con successo nella maggioranza degli individui. Nei soggetti che sviluppano allergia alimentare si assiste a un fallimento o a una perdita dell'acquisizione della tolleranza nei confronti di un limitato numero di allergeni alimentari. L'immunoterapia orale offre un approccio promettente per indurre la tolleranza orale specifica verso selezionati allergeni alimentari e rappresenta una strategia potenziale per il trattamento a lungo termine delle allergie alimentari. Questa review sintetizza le conoscenze attuali sulla tolleranza orale e gli studi clinici sull'immunoterapia orale per il trattamento di allergia alimentare.

I tassi di prevalenza di allergia e anafilassi alimentare sono cresciuti esponenzialmente negli ultimi decenni, specialmente nei paesi con uno stile di vita occidentalizzato. In uno studio australiano l'aumentata prevalenza di anafilassi alimentare degli ultimi dieci anni colpiva principalmente i bambini sotto i 5 anni di vita, e le percentuali di crescita erano maggiori per le allergie alle arachidi e ai crostacei (approssimativamente un incremento del 300% tra il 1994 e il 1998) (1). Questo significa che i tassi di allergia alimentare probabilmente cresceranno, dal momento che le allergie che stanno aumentando più rapidamente sono quelle che persistono nell'età adulta. Le allergie alimentari si sviluppano come risultato della mancanza o della perdita della tolleranza orale. Nuovi approcci terapeutici che possano stabilire o ristabilire la tolleranza orale agli allergeni alimentari offriranno la possibilità di un trattamento curativo a lungo termine delle allergie alimentari.

Tolleranza orale

Il termine tolleranza orale fa riferimento a una tolleranza antigene-specifica indotta nella periferia del tessuto linfatico del tratto digerente (GALT). Wells e Osborne per primi descrissero la tolleranza orale, più di cento anni fa, nel 1911, dopo aver osservato che i maiali della guinea non sviluppavano anafilassi verso gli antigeni alimentari ingeriti (2). Molti decenni dopo è stato dimostrato che la tolleranza orale è un processo immunologico attivo e non solamente l'assenza di risposta immune ad antigeni assunti oralmente. L'adoptive transfer di cellule T CD4+ o CD8+ ricavate da cavie rese tolleranti a un antigene attraverso l'assunzione di alimenti può conferire a una cavia suscettibile una tolleranza antigene-specifica (3, 4).

Nei modelli murini la tolleranza orale può essere indotta sia dall'ingestione di una sola dose massiccia di antigene (5–100 mg) o dalla ripetuta ingestione di piccole dosi di antigene (0.5–1.0 mg/die per 5 giorni) (5, 6). L'ingestione di una dose alta di antigene induce anergia o delezione clonale delle cellule T-helper antigene-specifiche. L'anergia delle cellule T è un processo in cui le cellule T antigene-specifiche vengono bloccate dal punto di vista funzionale quando la presentazione dell'antigene avviene in assenza di molecole costimolatorie (5). Le cellule T anergizzate persistono nella periferia ma perdono la loro capacità di espandersi clonalmente e di sintetizzare l'intero repertorio di citochine che segue l'incontro con l'antigene, risultando quindi limitate alla produzione di IL-10. Nelle cavie transgeniche nutrite con ovoalbumina (OVA), sia le cellule Th1 che le cellule Th2 dopo la loro iniziale attivazione per esposizione a una dose alta di antigene subiscono la delezione, mentre le cellule T regolatorie (Treg) che secerne il Fattore di Crescita trasformante (TGF) sono

resistenti alla delezione (6). Questo suggerisce che le Treg possano giocare un ruolo anche nella tolleranza verso dosi elevate di antigene.

L'ingestione ripetuta di basse dosi di antigene porta all'induzione di cellule T regolatorie antigene-specifiche che hanno attività soppressiva. In particolare possono essere indotte varie popolazioni di cellule T regolatorie, tra cui le cellule TGF β , le CD4+, le cellule T helper-3 (Th3) (4) e le cellule T antigene-specifiche derivate dall'intestino CD4+, CD25+ e Foxp3+, conosciute come cellule Treg adattative o inducibili (iTreg) (7). Mentre vari sottogruppi di cellule T con attività regolatoria possono conferire tolleranza negli esperimenti di transfer, è stato dimostrato che le cellule iTreg derivate dall'intestino sono critiche per l'induzione della tolleranza orale in quanto in un modello murino DEREK la delezione di iTreg dà luogo a perdita di tolleranza (8). Per contro, le cellule Treg derivate naturalmente dal timo (nTreg) non sembrano necessarie per la riuscita dell'induzione della tolleranza orale (9). Questa può essere sviluppata anche nelle cellule CD8 dei topi knockout (10), suggerendo che il ruolo delle cellule T CD8+ può essere limitato al mantenimento anziché all'induzione della tolleranza orale.

Generazione di iTreg e induzione della tolleranza nei tessuti linfatici associati all'intestino (GALT)

Il GALT è responsabile del mantenimento dell'omeostasi immune delle mucose; in altri termini, discrimina tra gli antigeni patogenetici e quelli innocui nel lume intestinale provocando l'immunità verso i primi mentre induce e mantiene la tolleranza verso i secondi. La generazione di Treg, in particolare di iTreg, è fondamentale per l'induzione e il mantenimento della tolleranza orale. Questo processo è diretto dalle cellule dendritiche specializzate (DC), che esistono come due distinti sottogruppi nell'intestino: le CD103+ DC che sono in grado di migrare verso i linfonodi mesenterici (MLN), e le CX3CR1+ DC che rimangono nell'intestino (11, 12). I peptidi digeriti con la dieta possono essere presentati alle cellule DC intestinali in diversi modi (Fig. 1). Gli antigeni luminali possono essere prelevati da cellule M specializzate nell'epitelio follicolare che riveste le placche di Peyer, con conseguente presentazione alle cellule CD103+ DC. In alternativa, le cellule CX3CR1+ DC possono prelevare direttamente gli antigeni luminali estendendo i dendriti tra le cellule epiteliali (13). Gli antigeni luminali che attraversano l'epitelio intestinale possono anche venire processati dai CD103+ DC. Un successivo step critico riguarda la migrazione CCR7-dipendente delle cellule CD103+ DC ai linfonodi mesenterici (14). In questi, le cellule tolerogeniche

Risposta immune mucosale

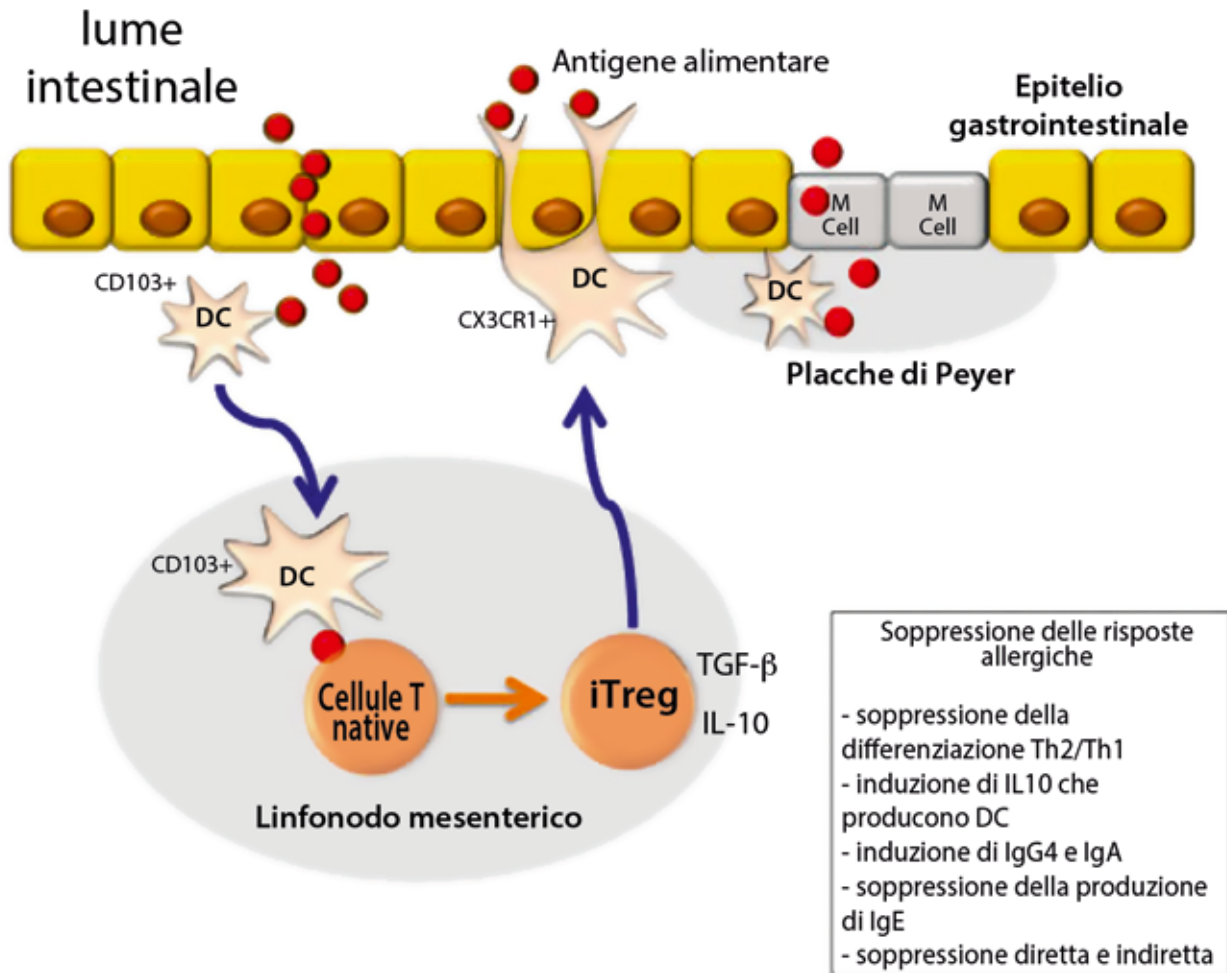


Figura 1. Risposta immune mucosale e generazione di iTreg.

La risposta immune mucosale agli antigeni assunti oralmente generalmente dà luogo alla tolleranza orale. In questo processo le Treg indotte derivate dall'intestino (iTreg) giocano un ruolo cruciale. La generazione di iTreg è diretta dalle cellule dendritiche specializzate (DC) che risiedono nell'intestino. Gli antigeni luminali sono prelevati in diversi modi: le cellule M specializzate che rivestono le placche di Peyer prelevano l'antigene con conseguente presentazione alle cellule CD103+ DC; le cellule CX3CR1+ DC possono prelevare direttamente gli antigeni luminali estendendo i dendriti tra le cellule epiteliali intestinali; l'antigene può attraversare l'epitelio intestinale (*attraverso uptake da parte delle cellule epiteliali*) per essere processato dai CD103+ DC nella lamina propria. Le cellule CD103+ DC migrano nei linfonodi mesenterici (MLN) dove interagiscono con le cellule T naive, inducendo la loro differenziazione in Treg indotte (iTreg) CD4+, CD25+, Foxp3+. Le iTreg generate nei linfonodi mesenterici ritornano all'intestino dove l'interazione con le cellule CX3CR1+ DC promuove la loro espansione.

CD103+ DC inducono la differenziazione delle cellule T naive in CD4+, CD25+, Foxp3+, Treg indotte (iTreg) e imprimono su queste iTreg la capacità di migrare nell'intestino (9).

Questo processo richiede acido retinoico (RA) e sembra essere positivamente influenzato da indoleamine 2,

3 diossigenasi, dalla famiglia B7 di molecole costimolatorie e dalle citochine TGF- β (9, 15, 16). Queste iTreg generate nei linfonodi mesenterici ritornano alla lamina propria dell'intestino dove l'interazione con le cellule residenti CX3CR1+ DC dà luogo a una espansione di iTreg antigene-specifiche, consentendo la soppressione di

risposte immuni antigene-specifiche localmente a livello dell'intestino (8). Mentre le iTreg giocano un ruolo critico nella tolleranza orale, altre classi importanti di Treg sono anch'esse indotte in seguito all'ingestione dell'antigene e possono contribuire a effetti regolatori, tra cui cellule Th3 che secernono TGF β (LAP+), cellule Tr1 che secernono IL10, e le Treg CD8+ (17).

Allergia alimentare: una manifestazione di mancanza o perdita della tolleranza orale

Si ritiene che l'allergia alimentare si verifichi come risultato della mancanza o della perdita di tolleranza orale. Studi sulle allergie respiratorie indicano che le cellule allergene-specifiche Th1, Th2 e Treg possono essere identificate sia nei soggetti allergici che in quelli non allergici, ed è proprio l'equilibrio tra le cellule allergene-specifiche Treg e le cellule Th2 l'elemento critico che determina la progressione verso l'allergia piuttosto che verso la tolleranza (18). È stato dimostrato che soggetti allergici nei confronti di allergeni respiratori presentano una predominanza di risposte allergene-specifiche Th2 e una relativa carenza di risposte allergene-specifiche Treg, mentre i soggetti non allergici mostrano una risposta Treg dominante o una risposta attenuata agli allergeni (18).

Un paradigma simile sembra essere presente nell'allergia alimentare. Nei bambini allergici l'allergia alimentare IgE-mediata è associata alla produzione di IgE allergene-specifiche, a una produzione scarsa o assente di IgG1 o di IgG4 allergene-specifiche, così come a un aumento di Th2 e a risposte basse delle citochine Treg all'allergene (19–23), mentre i bambini non allergici dimostrano una risposta predominante di citochine Treg o Th1 (21–23) oppure non mostrano alcuna risposta all'allergene (20, 22).

Inoltre i bambini con allergia alimentare hanno meno linfociti TGF β + nell'epitelio duodenale e nella lamina propria e una espressione ridotta di TGF β nell'epitelio duodenale (19, 24).

Ancora, questa ridotta attività T regolatoria in bambini con allergia alimentare è presente dalla nascita ed è quindi precedente al manifestarsi della malattia (25). Al contrario, la risoluzione dell'allergia alimentare è associata alla riduzione delle IgE allergene-specifiche e al ritorno a risposte dominanti delle citochine Th1 all'allergene (21). Per di più, pazienti che hanno superato la loro allergia al latte vaccino hanno un aumentato numero di cellule CD4+ CD25+ circolanti (presunte Treg) e ridotte risposte proliferative alla b-lattoglobulina in confronto ai pazienti con allergia al latte vaccino persistente (26). La deplezione delle cellule CD4+ CD25+ in colture cellulari monoclonali di sangue periferico prelevato da bambini che han-

no acquisito la tolleranza dà luogo a un marcato aumento delle risposte proliferative indotte dalla b-lattoglobulina in vitro, suggerendo che la risoluzione dell'allergia alimentare è associata a un'aumentata attività delle cellule Treg allergene-specifiche (26). Studi di popolazioni individuali di cellule T con tecnologia tetramer indicano che i pazienti allergici mostrano anche una maggior frequenza di cellule allergene-reattive in confronto agli individui non allergici (27).

Ciononostante, alcuni studi non hanno convalidato questi risultati. La produzione di citochine Th2 è riportata sia in adulti con allergia alimentare sia in adulti tolleranti con o senza sensibilizzazione all'alimento, anche se l'intensità di produzione di citochine Th2 è più alta in quelli con allergia alimentare (28). I bambini con allergia al latte vaccino hanno un'aumentata espressione di mRNA FoxP3 nelle cellule mononucleari del sangue periferico stimulate con b-lattoglobulina confrontati ai controlli non allergici o ai bambini che hanno risolto spontaneamente l'allergia al latte vaccino, e la risoluzione spontanea dell'allergia al latte vaccino non è associata all'attivazione delle cellule Treg (29). Una frequenza simile di Treg CD25+ CD27+ allergene-specifiche è osservata in soggetti allergici e non allergici al latte vaccino, anche se i soggetti allergici che sono tolleranti al latte riscaldato (che può rappresentare un fenotipo più lieve di allergia al latte vaccino) hanno una frequenza più alta di cellule T regolatorie CD25+ CD27+ paragonati a quelli allergici al latte vaccino sia crudo sia cotto (30). Questi risultati divergenti sulla attività Treg nelle allergie alimentari può dipendere da differenze nei parametri clinici (ad esempio dall'età della popolazione in studio e dal tempo trascorso dall'esposizione all'allergene alimentare) e/o da differenze tecniche nell'esame delle cellule Treg. Mentre è noto che le popolazioni Treg giocano un ruolo critico nell'induzione della tolleranza orale, sono necessari altri studi per chiarire meglio il loro ruolo nella patogenesi dell'allergia alimentare.

La ricerca di un trattamento efficace: desensibilizzazione vs tolleranza

La ricerca di trattamenti efficaci a lungo termine per le allergie alimentari si è concentrata sulle strategie che possono indurre la tolleranza orale, e tra queste l'immunoterapia orale (OIT) gode del più grande interesse. Nel valutare l'efficacia di terapie potenzialmente risolutive, è importante comprendere la distinzione tra "desensibilizzazione" e "tolleranza". La desensibilizzazione descrive la capacità di assumere un alimento senza avere reazioni avverse in un periodo di regolare assunzione di dosi dello stesso alimento (per esempio, continuan-

do l'immunoterapia orale). La condizione di desensibilizzazione è mediata da cambiamenti nelle cellule effettrici (mastcellule, basofili), senza modulazione dei sottostanti meccanismi patogenetici di tipo immunologico (31). Quindi l'individuo rimane allergico all'allergene alimentare, e l'ingestione dell'alimento dopo un periodo di eliminazione (interruzione dell'immunoterapia) potrebbe dar luogo a una reazione allergica acuta. A questo proposito, la desensibilizzazione a un alimento è simile al processo di desensibilizzazione ai farmaci nelle allergie a farmaci.

Al contrario, la tolleranza è l'abilità di tollerare un alimento dopo che è trascorso un periodo di tempo dall'assunzione dell'alimento stesso (per esempio, dopo interruzione della immunoterapia orale). Si ritiene che l'acquisizione della tolleranza rifletta la riprogrammazione della risposta immune all'allergene, coinvolgendo le cellule T regolatorie o altri insiemi di cellule T e/o anergia allergene-specifica e delezione clonale. Ci si aspetta che la tolleranza persista almeno per mesi o anni dopo l'interruzione della terapia alimentare (31). L'induzione di una tolleranza allergene-specifica di lunga durata è stata dimostrata nel contesto dell'immunoterapia subcutanea per allergia a punture di insetto e per allergie ad allergeni inalanti. Nel contesto dell'allergia alimentare, la desensibilizzazione e la tolleranza possono essere determinate attraverso dei challenge con alimenti. In particolare la desensibilizzazione è dimostrata attraverso un challenge orale che viene eseguito mentre il soggetto sta ancora ricevendo il trattamento (come l'immunoterapia orale) o assumendo dosi regolari dell'alimento; la tolleranza è confermata attraverso un challenge eseguito dopo una interruzione dell'assunzione dell'alimento di almeno 2-4 settimane (31).

Immunoterapia orale per le allergie alimentari

L'immunoterapia orale è stata descritta per la prima volta nel 1908 in un paziente con anafilassi all'uovo (32). Quasi un secolo dopo, alcuni case reports sull'immunoterapia orale per allergia a latte vaccino rivelavano una desensibilizzazione efficace (33, 34) associata a cambiamenti immunologici che includevano ridotte IgE al latte vaccino e produzione di IL4 indotta da latte vaccino, insieme a un aumento delle IgG4 e delle IgA, così come una produzione di IFN γ indotta da latte vaccino (34). Questi primi casi hanno spinto i ricercatori a perseguire l'immunoterapia orale come approccio promettente al trattamento dell'allergia alimentare, e da allora sono state realizzate numerose serie di casi, studi pilota e trials randomizzati controllati (revisionati in (35)).

Gli RCT sull'immunoterapia orale con latte vaccino, uova

e arachidi hanno costantemente descritto il verificarsi di desensibilizzazione completa (food challenge superato con immunoterapia in corso) nel 33-90% dei soggetti (36-42). Una recente metanalisi Cochrane di trials relativi all'immunoterapia orale a latte vaccino ha confermato gli effetti benefici dell'immunoterapia orale nell'indurre la desensibilizzazione quando confrontata a diete standard di eliminazione (43). Si noti che la revisione Cochrane ha usato il termine "tolleranza totale" per denotare la desensibilizzazione, dal momento che tutti gli studi inclusi valutavano la desensibilizzazione e non la tolleranza, in accordo alle definizioni del NIAID workshop on food allergy clinical trials (31).

In contrasto con il gran numero di studi che valutano la capacità dell'immunoterapia orale di indurre la desensibilizzazione, gli studi che hanno considerato la tolleranza come outcome dello studio sono pochi (Tabella 1). Sei studi hanno presentato dati sulla tolleranza successiva all'immunoterapia orale; di questi, 3 sono studi aperti non controllati e 3 sono RCT. Il primo studio che valuta la tolleranza come outcome dell'immunoterapia orale è un piccolo studio pilota sull'immunoterapia orale all'uovo che riporta la tolleranza in 2 soggetti su 7 (29%) (44). In uno studio di follow-up, gli stessi ricercatori hanno applicato un protocollo modificato di immunoterapia orale che aggiustava la dose e la durata del trattamento in base alla quantità di sIgE dell'uovo nel soggetto; le dosi venivano scalate (a un massimo di 3.6 gr di proteine dell'uovo) se le sIgE rimanevano > 2 kU/I e il trattamento di mantenimento veniva continuato finché le sIgE dell'uovo non scendevano sotto i 2 kU/I, allorché venivano fatti dei challenge con l'alimento per verificare la desensibilizzazione e la tolleranza. Sei bambini sono arrivati alla fine dello studio (dopo 18-50 mesi di trattamento) e tutti e sei hanno raggiunto la tolleranza (45). Dal momento che in questi studi non c'era un gruppo di controllo, è difficile accertare se il tasso di tolleranza associato all'immunoterapia orale sia stato più alto di quello delle risoluzioni spontanee dell'allergia all'uovo.

Un terzo studio aperto sull'immunoterapia orale in 23 bambini con allergia alle arachidi (confermata da DBPCFC all'ingresso nello studio) ha descritto il raggiungimento della tolleranza nel 17% dei soggetti (4/23) (46). L'acquisizione della tolleranza in questi soggetti è stata probabilmente associata all'immunoterapia orale, dal momento che il test di provocazione orale in doppio cieco contro placebo (DBPCFC) è stato condotto all'ingresso nello studio; tuttavia, rimane la possibilità che un tasso simile di risoluzioni spontanee di allergia sarebbe stato osservato in un gruppo di controllo. Pertanto, è difficile

Tabella 1. Studi sull'immunoterapia orale (OIT) che hanno indagato la tolleranza come outcome.

	Disegno dello studio e dimensione del campione	Allergene	Durata della OIT	Tasso di tolleranza
Buchanan et al. 2007	Studio in aperto n=7	Uovo (300 mg di uovo in polvere)	2 anni	2/7 (29%)
Vickery et al. 2010	Studio in aperto n=6	Uovo (3.6 g proteine dell'uovo)	Mediana 33 mesi (18-50 mesi)	6/6 (100%)
Blumchen et al. 2010	Studio in aperto NB: DBPCFC all'ingresso nello studio n=23	Arachidi (125-500 mg)	2-22 mesi	4/23 (17%)
Staden et al. 2007	RCT - studio in aperto OIT (n=25) vs. dieta di eliminazione (n=20) NB: DBPCFC all'ingresso nello studio	Latte vaccino (8.2 g di proteine del latte vaccino); Uovo (2.8 g proteine dell'uovo)	Mediana 21 mesi (11-59 mesi)	9/25 (36%) OIT 7.20 (35%) placebo
Burks et al. 2012	RCT - studio ibrido (in aperto/controllato contro placebo)* OIT (n = 40) vs. placebo (n = 15)	Uovo (2 g di albume sodo)	22 mesi*	11/40 (28%) OIT 0/1 (0%) controlli
Keet et al. 2012	RCT - studio in aperto SLIT (n = 10) vs. SLIT/OIT 1 g (n= 10) vs. SLIT/OIT 2 g (n= 10)	Latte vaccino SLIT (7 mg proteine) SLIT/OIT (1 g proteine) SLIT/OIT (2 g proteine)	SLIT mediana 58 settimane (56-62 settimane) SLIT/OIT mediana 76 settimane (68-89 settimane)	1/10 (10%) SLIT 3/10 (30%) SLIT/ OIT 1 g 5/10 (50%) SLIT/ OIT 2 g

* I partecipanti venivano a conoscenza del trattamento al decimo mese, dopodiché il trial continuava come studio in aperto nel quale i soggetti del gruppo attivo continuavano la OIT mentre i partecipanti del gruppo di controllo sospendevano il placebo. Al mese 22 veniva determinata la desensibilizzazione attraverso un DBPCFC per tutti i soggetti del gruppo di trattamento attivo (n = 34) e per quelli del gruppo di controllo con sIgE per uovo <2 kU/l (n = 1). I soggetti che superarono il DBPCFC al mese 22 fecero un secondo DBPCFC al mese 24 dopo aver fatto una seconda dieta di eliminazione per 4-6 settimane (sospensione di immunoterapia orale) per stabilire la tolleranza come definito dal NIAID workshop on Food Allergy Clinical trials (31). Tutti i soggetti del gruppo che faceva OIT che non acquisirono la tolleranza al mese 24 ricominciavano la OIT, che continuerà per altri due anni.

stabilire in base a questi studi l'efficacia dell'immunoterapia orale nell'indurre tolleranza.

Sono disponibili anche i risultati dei 3 RCT. Staden et al. (47) hanno randomizzato 45 bambini con allergia all'uovo o al latte sottoponendoli a immunoterapia orale (dose massima 2.8 g di proteine dell'uovo o 8.25 g di proteine del latte vaccino) o a una dieta di eliminazione per 18-24 mesi. Alla conclusione dello studio per stabilire la tolleranza è stato eseguito un DBPCFC a distanza di due mesi da una seconda, stretta dieta di eliminazione. La tolleranza è stata dimostrata nel 36% dei soggetti nel gruppo attivo e nel 35% dei soggetti del gruppo di controllo, indicando che l'intervento di immunoterapia orale non è stato più efficace della dieta di eliminazione nell'indurre la tolleranza (47). In un altro RCT relativo all'immunoterapia per allergia all'uovo, Burks et al. (48) hanno randomizzato 55 bambini con allergia all'uovo che dovevano ricevere

l'immunoterapia (n = 40) o il trattamento placebo (n = 15). I partecipanti e i ricercatori venivano a conoscenza del trattamento al decimo mese, dopodiché il trial continuava come studio aperto. Al mese 22 tutti i soggetti del gruppo di trattamento attivo (n = 30) e quelli del gruppo placebo con sIgE per uovo <2 kU/l (n = 1) venivano sottoposti a DBPCFC per determinare la desensibilizzazione. I ricercatori hanno deciso che i soggetti sarebbero stati inseriti nel gruppo del challenge con placebo se le sIgE dell'uovo fossero state <2 kU/l, dal momento che era stato evidenziato che livelli più alti di sIgE erano associati a rischi durante il challenge alimentare e a una maggiore probabilità di allergia. I soggetti che superarono il DBPCFC al mese 22 fecero un secondo DBPCFC 4-6 settimane dopo aver fatto una seconda dieta di eliminazione (sospensione di immunoterapia orale nel gruppo attivo) per stabilire la tolleranza. Undici dei 40 soggetti (28%) nel gruppo attivo

di immunoterapia orale e nessuno (0/1) dei soggetti nel gruppo placebo hanno acquisito la tolleranza. Se da una parte questi risultati sembrano incoraggianti, è importante considerare il bias potenziale introdotto dalla semplice esecuzione del DBPCFC per determinare la tolleranza in un sottogruppo selezionato di partecipanti all'interno del braccio che riceve il trattamento placebo. È possibile che una parte dei soggetti che hanno ricevuto il placebo e che avevano sIgE dell'uovo >2 kU/l abbiano perso la loro allergia all'uovo entro un periodo di 2 anni. Certamente molti dei soggetti nel braccio di controllo dello studio di Staden che hanno sviluppato tolleranza spontaneamente avevano le sIgE >2 kU/l (47). Inoltre, nello studio di Staden et al. (47), il 35% dei soggetti nel gruppo di controllo ha perso la propria allergia al latte vaccino o all'uovo entro la conclusione dello studio (mediana 21 mesi; range 11–59 mesi), ed è un tasso di tolleranza simile a quello riportato per i soggetti che ricevono immunoterapia orale nello studio di Burks et al. (48).

Un terzo RCT in aperto ha randomizzato 30 soggetti con allergia al latte vaccino: il primo gruppo riceveva terapia sublinguale (SLIT) a una dose di mantenimento di 7 mg di proteine del latte, il secondo gruppo SLIT seguita da immunoterapia orale a una dose di mantenimento di 1 gr di proteine del latte e il terzo gruppo SLIT seguita da immunoterapia orale a una dose di mantenimento di 2 grammi di proteine del latte (n = 10 per gruppo) (49). Tutti i soggetti venivano sottoposti a SLIT (3.7 mg di proteine del latte) prima di essere randomizzati in uno dei 3 gruppi di trattamento. Dopo aver ricevuto una dose di mantenimento per 48 settimane, un challenge aperto con latte vaccino veniva realizzato per determinare la desensibilizzazione. Quelli che hanno superato questo challenge hanno sospeso il trattamento e rifatto il challenge 1 e 6 settimane dopo; i soggetti che hanno superato il challenge 6 settimane dopo la cessazione del trattamento erano considerati aver acquisito la tolleranza. Un soggetto su dieci che aveva ricevuto solo la SLIT, 3 su dieci di quelli che avevano ricevuto 1 grammo di proteine del latte con SLIT/OIT e 5 su dieci di quelli che avevano ricevuto SLIT/OIT con 2 gr di proteine del latte acquisirono la tolleranza (nessuna differenza significativa tra gruppi). Tuttavia, quando tutti i soggetti che ricevevano SLIT/immunoterapia orale venivano raggruppati, il tasso di tolleranza con SLIT/OIT tendeva ad essere più alto di quello di tolleranza con la sola SLIT (p= 0.09). Questi risultati dovrebbero essere interpretati con cautela dal momento che la dimensione del campione era piccola e non erano inclusi gruppi placebo. Ciononostante, questi risultati sono incoraggianti e la SLIT/OIT appare più effi-

cace della SLIT effettuata singolarmente per l'induzione della tolleranza.

Una recente metanalisi ha valutato l'efficacia dell'immunoterapia orale nell'indurre la tolleranza (riducendo il rischio di allergia); tuttavia solo uno dei tre RCT inclusi nell'analisi ha indagato la tolleranza come outcome, mentre gli altri due hanno indagato solo la desensibilizzazione (50). I dati da tutti e tre gli studi erano soggetti a una analisi aggregata, e gli autori conclusero che l'immunoterapia orale non era efficace per l'induzione della tolleranza. Poiché solo uno dei tre studi indagava la tolleranza, non è possibile trarre alcuna conclusione dai risultati.

In sintesi, in base alle evidenze attuali, l'immunoterapia orale è efficace per l'induzione della desensibilizzazione; tuttavia la capacità dell'immunoterapia orale di indurre una tolleranza di lunga durata rimane incerta. In futuro gli studi sull'immunoterapia orale dovrebbero valutare la tolleranza come outcome e dovrebbero includere gruppi placebo e gruppi attivi per controllare la risoluzione spontanea dell'allergia, particolarmente per studi sulle allergie al latte e all'uovo, che sono associate a tassi alti di risoluzione spontanea (36, 47). Una volta che saranno stati completati altri RCT, delle metanalisi sugli studi che riguardano l'immunoterapia orale saranno opportune.

Cambiamenti immunologici associati all'immunoterapia orale

Anche se la capacità dell'immunoterapia orale di indurre la tolleranza clinica rimane incerta, è stato dimostrato che modula le risposte immuni allergene-specifiche, direzionandole verso risposte tipicamente associate alla tolleranza. Tuttavia è importante ricordare che tutti i cambiamenti immunologici osservati sono stati associati sia alla desensibilizzazione che alla tolleranza che seguono l'immunoterapia orale, suggerendo che gli effetti immuni identificati in un momento non sono di per sé determinanti decisivi dell'acquisizione della tolleranza.

Generalmente l'immunoterapia orale è associata a una riduzione delle IgE allergene-specifiche e a un aumento delle IgG4 allergene-specifiche. Un aumento nei livelli sierici di SIgG4 è stato riportato universalmente (quando indagato) (44–46, 48, 51), invece una riduzione nei livelli di sIgE è stata osservata solo in alcuni studi (41, 45, 47, 51–53) mentre in altri non sono stati notati cambiamenti (40, 42, 44, 48, 54). L'aumento delle IgG4 allergene-specifiche sembra riflettere un repertorio clonale molto esteso con nuove specificità verso i componenti dell'allergene, mentre ridotti livelli di IgE specifiche per le arachidi sono associati a una ridotta diversità in un sottogruppo di individui (55). È interessante

notare che Burks et al. (48) hanno osservato che i soggetti che hanno ricevuto immunoterapia orale per l'uovo hanno avuto reazioni ridotte allo Skin Prick Test (SPT) in confronto ai soggetti trattati con placebo, nonostante non vi siano differenze nei livelli sierici di sIgE dell'uovo nei due gruppi. Questa riduzione nella reattività agli SPT presumibilmente è il risultato di una inibizione dell'attivazione delle cellule basofile (e delle mastcellule) e/o dei livelli aumentati di IgG4 per uovo (48) associati all'immunoterapia orale. Infatti le IgG4 inibiscono la formazione di complessi IgE immuni e di conseguenza l'attivazione basofila. In questo stesso studio, una ridotta attivazione dei basofili è associata a desensibilizzazione, mentre una aumentata produzione di anticorpi IgG4 e una riduzione nella dimensione del pomfo degli SPT rispetto al basale sono legati alla tolleranza orale, suggerendo che questi ultimi possano essere dei markers più rilevanti di tolleranza (48). I meccanismi che mediano lo shift dell'isotipo anticorpale allergene-specifico da sIgE a sIgG4 durante l'immunoterapia orale (nel contesto sia della desensibilizzazione che della tolleranza) non sono chiari. Vi è qualche evidenza che questo potrebbe coinvolgere la regolazione dei pathways apoptotici delle cellule T (51) o la delezione clonale delle cellule B che producono IgE allergene-specifiche insieme all'espansione clonale di cellule B che producono IgG4 allergene-specifiche (55). Con l'immunoterapia orale sono stati osservati cambiamenti nelle risposte delle citochine. Ridotti Th2 e aumentate risposte Treg sono risultati comuni. L'immunoterapia orale per allergia alle arachidi è associata a una ridotta produzione di citochine Th2 indotte dall'allergene (37, 46). Blumchen et al. (46) hanno trovato che la desensibilizzazione è associata a una produzione ridotta di IL5, mentre la tolleranza mantenuta è associata a una riduzione nelle risposte di IL4 e IL2. Al contrario, Jones et al. (51) hanno riportato produzioni aumentate di IL5, IFN γ , IL-1 β , e TNF α nei pazienti sottoposti a immunoterapia per arachidi. È stato osservato che le risposte di Th1 (IFN γ) aumentano (51) o rimangono invariate (46). È stato riportato che le popolazioni Treg (56, 57) e la produzione di citochine regolatorie come TGF β (58) aumentano con l'immunoterapia orale, mentre uno studio ha segnalato solo cambiamenti transitori (45). Una caratterizzazione più dettagliata degli effetti immuni dell'immunoterapia orale è necessaria per decifrare i processi fondamentali che modula.

Sicurezza della OIT

Gli effetti avversi sono frequenti nell'immunoterapia orale, ma generalmente sono moderati e comprendono reazioni localizzate (orali e periorali) o reazioni moderate gene-

ralizzate che riguardano la pelle o il tratto gastrointestinale (38). Le reazioni allergiche severe che compromettono il sistema respiratorio o cardiovascolare sono meno comuni. Reazioni all'immunoterapia orale di solito si presentano quando si aumentano i dosaggi (38), ma possono verificarsi anche con dosaggi precedentemente tollerati (59, 60). In una revisione sistematica di trials sull'immunoterapia orale per latte vaccino (43), questa era associata a un aumentato rischio di reazioni allergiche: prurito labiale e/o al cavo orale (RR 34.4; 95% CI 4.8–244.7), orticaria periorale (RR 9.9; 95% CI 4.3–22.9), eritema o orticaria generalizzati (RR 12.1; 95% CI 3.0–49.1), dolori addominali, vomito, diarrea (RR 16.6; 95% CI 4.1–66.9), moderato laringospasmo (RR 40.9; 95% CI 2.5–673.7), moderato broncospasmo (RR 10.0; 95% CI 2.4–41.4), così come un aumentato rischio di ricorso a epinefrina intramuscolare (RR 5.8; 95% CI 1.6–21.9) in confronto a una dieta di mantenimento o di eliminazione. In corso di immunoterapia orale era più facile che i partecipanti ricevessero iniezioni di adrenalina in confronto ai soggetti in corso di dieta di eliminazione (23 iniezioni per 100 pazienti per anno [range 5–40] vs. 0 iniezioni per 100 pazienti per anno) ed era più probabile che richiedessero corticosteroidi sistemici (15 per 100 [range 4–62] vs. 1 per 100), ma era meno probabile che avessero una esacerbazione di eczema (8 per 100 [range 1–100] vs. 14 per 100). Reazioni a una dose di immunoterapia orale precedentemente tollerata sono comuni durante il dosaggio eseguito a casa. Barbi et al. (59) hanno presentato la loro esperienza con immunoterapia orale in 132 pazienti e hanno riportato reazioni durante il dosaggio eseguito a casa nel 63.7% dei soggetti (84/132), con il 29.5% che aveva 1–5 reazioni, il 23.5% che aveva 5–15 reazioni, e il 10.7% che riportava più di 15 reazioni. Il 47.7% delle reazioni durante il dosaggio effettuato a casa colpiva il tratto respiratorio ed era comparabile a una reazione severa sistemica o a anafilassi, mentre il 28.8% delle reazioni coinvolgeva il tratto gastrointestinale e il 23.5% delle reazioni era cutaneo.

Comuni fattori scatenanti le reazioni a dosaggi già precedentemente tollerati includono un'infezione concomitante (particolarmente se febbrile), attività fisica entro due ore dall'assunzione della dose, l'assunzione della dose a stomaco vuoto, asma scarsamente controllato, stagione pollinica e mestruazioni (59, 60). Nessuno fattore scatenante è stato identificato nel 28.5% delle reazioni domiciliari nei casi di Barbi et al. (59). Le reazioni possono essere minimizzate evitando il trattamento in caso di febbre, evitando attività fisica per le due ore successive all'assunzione della dose, facendo il trattamento dopo un pasto e mantenendo un ottimo controllo dell'asma (60).

Direzioni future della OIT

Per sostenere la fattibilità e l'efficacia dell'immunoterapia orale come trattamento futuro per l'allergia alimentare nel setting clinico, è richiesto uno sforzo per migliorarne la sicurezza e la capacità tolerogenica. Anche se l'immunoterapia orale è stata applicata con successo a soggetti con allergia severa (anafilassi) (anaphylaxis) (39, 61), possono essere necessari molti mesi per raggiungere la dose di mantenimento e spesso i soggetti presentano reazioni durante la fase di aumento del dosaggio. L'uso di omalizumab, un anticorpo monoclonale ricombinante umanizzato che si lega alle IgE libere circolanti, è stato suggerito come uno degli approcci per ridurre le reazioni allergiche durante il rash e la fase di aumento del dosaggio dell'immunoterapia orale. L'omalizumab si lega alla regione CHe3 delle IgE e impedisce a queste di legarsi ai recettori FcεRI e FcεRII presenti sulla superficie delle mast cellule e dei basofili prevenendo quindi la loro attivazione e il rilascio di mediatori. Uno studio pilota sul trattamento con omalizumab insieme a immunoterapia orale per latte vaccino ha mostrato una migliorata tollerabilità della stessa (62). Gli RCT che valutano l'uso di omalizumab con immunoterapia orale per latte o arachidi sono attualmente in corso. L'omalizumab può anche modulare la risposta allergica per promuovere la tolleranza [rivisto in (63)].

Un altro approccio che può migliorare la sicurezza dell'immunoterapia orale è l'uso di uova o latte cotti al forno (baked) al posto dell'allergene nativo (64, 65). Una parte dei bambini allergici all'uovo o al latte vaccino è in grado di tollerare uova e latte baked mentre è reattiva all'uovo crudo o al latte intero. In questi individui, la regolare assunzione di uova o latte cotti è associata a cambiamenti immuni simili a quelli osservati con l'immunoterapia standard, inclusa la riduzione della misura del pomfo negli SPT, le IgE allergene-specifiche ridotte, e le IgG4 allergene-specifiche aumentate (64–66), e il trattamento con uova cotte sembra anche promuovere la tolleranza alle uova come tali (67). Tuttavia, queste scoperte richiedono conferma in studi controllati. Negli studi di cui sopra, i dati immunologici dei controlli non erano disponibili, quindi è possibile che qualcuno di questi cambiamenti possa riflettere la storia naturale dell'allergia all'uovo o al latte. In modo simile, Leonard et al. (67) hanno esaminato lo sviluppo della tolleranza all'uovo come tale in soggetti con allergia all'uovo che ricevevano immunoterapia con uovo baked se vi erano tolleranti (gruppo attivo, n = 79) e includeva un gruppo di controllo di soggetti con allergia all'uovo (n = 47) che continuavano a fare una stretta dieta di eliminazione; tuttavia, l'outcome della tolleranza non

era valutato in modo standardizzato né nel gruppo attivo né in quello di controllo (67). In questo studio, i soggetti allergici all'uovo nel gruppo attivo erano sottoposti a challenge con uovo baked, e quelli che lo tolleravano (n = 56 all'ingresso dello studio e n = 70 alla fine dello studio) erano istruiti a inserire ogni giorno nella loro dieta da 1 a 3 volte uovo baked, mentre quelli che vi erano reattivi (n = 23 all'ingresso nello studio e n = 9 alla fine dello studio) continuavano a fare una stretta dieta di eliminazione. La tolleranza a uovo baked o a uovo come tale era quindi valutata attraverso un challenge alimentare dopo un periodo ≥6 mesi se i soggetti erano tolleranti all'uovo baked, e ricevendo uovo baked dopo ≥12 mesi se erano reattivi a quest'ultimo. Il gruppo di controllo era seguito parallelamente senza un piano specifico per la valutazione della tolleranza, e i challenge erano realizzati in tempi variabili in accordo alle raccomandazioni dell'allergologo di riferimento di ciascun paziente. In una analisi intention to treat, i soggetti allergici all'uovo nel gruppo attivo (n = 70 che ricevevano uovo baked e n = 9 che continuavano con una dieta di eliminazione) avevano 4.7 (1.9–11.5) probabilità in più di sviluppare la tolleranza all'uovo come tale di quelli del gruppo di controllo in dieta di eliminazione. Nell'analisi per protocollo, i partecipanti del gruppo attivo che erano tolleranti all'uovo baked e ricevevano uovo baked (n = 70) avevano 18.3 (5.5–60.9) probabilità in più di sviluppare tolleranza a uovo come tale in confronto al gruppo di controllo. Questi risultati sono notevoli e suggeriscono che l'immunoterapia all'uovo baked può ostacolare l'acquisizione della tolleranza all'uovo come tale. Ciò nonostante, come scritto sopra, i dati devono essere interpretati con cautela poiché l'approccio variabile alla valutazione della tolleranza nel gruppo attivo e di controllo introduce dei bias significativi. Sono raccomandati degli RCT (che idealmente includono un gruppo placebo) per valutare gli effetti dell'immunoterapia orale al latte cotto o all'uovo cotto sullo sviluppo della tolleranza e delle risposte immuni.

Una nuova classe di adiuvanti, conosciuti come modificatori della risposta immune, è emersa negli ultimi dieci anni e offre una strategia per aumentare le risposte tolerogeniche associate all'immunoterapia. Gli adiuvanti immuno-modificanti tipicamente comunicano attraverso recettori di ricognizione del patogeno ed è stato dimostrato che promuovono le risposte T regolatorie e Th1. Ad esempio, il monofosforil lipide A, un componente della parete cellulare batterica che comunica attraverso il recettore TLR4, e i complessi di DNA dell'allergene contenenti CPG, negli esseri umani sembrano rinforzare gli effetti tolerogenici dell'immunoterapia subcutanea a pol-

lini (68–70). Lo stesso effetto è stato osservato in modelli murini di allergia respiratoria in cui venivano usati diversi ligandi TLR e batteri probiotici insieme a immunoterapia sublinguale (71–73). Nel contesto dell'immunoterapia orale ci si potrebbe attendere effetti simili. A questo proposito, abbiamo recentemente completato un trial controllato randomizzato contro placebo di un probiotico in combinazione con immunoterapia orale per il trattamento dell'allergia alle arachidi (ANZ Clinical Trials Registry #12608000594325), e i risultati saranno disponibili a breve.

Conclusioni

Le allergie alimentari continuano ad aumentare esponenzialmente e la ricerca di terapie che possa-

no cambiare la storia naturale di malattia è una priorità. L'allergia alimentare si presenta come risultato della mancanza o della perdita della tolleranza orale. Una maggiore comprensione dei meccanismi della tolleranza orale può facilitare lo sviluppo di nuovi approcci all'induzione della tolleranza nell'allergia alimentare. L'immunoterapia offre una strategia promettente per l'induzione della tolleranza orale e il trattamento dell'allergia alimentare, tuttavia gli studi clinici sull'immunoterapia orale dimostrano sì una desensibilizzazione efficace, ma la capacità di indurre una tolleranza a lungo termine rimane incerta. L'uso di adiuvanti immuno-modificanti può aprire la strada a un rafforzamento della capacità tollerogena dell'immunoterapia orale, e attualmente vi sono trials che stanno esplorando questa via.

Bibliografia

- Liew WK, Williamson E, Tang ML. Anaphylaxis fatalities and admissions in Australia. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 434–42.
- Wells HG, Osborne TB. The biological reactions of the vegetable proteins. I. Anaphylaxis. *J Infect Dis* 1911; 8: 66–124.
- Miller A, Lider O, Roberts AB, Sporn MB, Weiner HL. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 421–5.
- Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994; 265: 1237–40.
- Friedman A, Weiner HL. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6688–92.
- Chen Y, Inobe J, Marks R, Gonnella P, Kuchroo VK, Weiner HL. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* 1995; 376: 177–80.
- Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Shen S, Ding Y, Yee H, Lafaille JJ. Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity* 2008; 29: 114–26.
- Hadis U, Wahl B, Schulz O, et al. Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity* 2011; 34: 237–46.
- Mucida D, Kutchukhidze N, Erazo A, Russo M, Lafaille JJ, Curotto de Lafaille MA. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest* 2005; 115: 1923–33.
- Garside P, Steel M, Liew FY, Mowat AM. CD4+ but not CD8+ T cells are required for the induction of oral tolerance. *Int Immunol* 1995; 7: 501–4.
- Schulz O, Jaensson E, Persson EK, et al. Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J Exp Med* 2009; 206: 3101–14.
- Bogunovic M, Ginhoux F, Helft J, et al. Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* 2009; 31: 513–25.
- Niess JH, Brand S, Gu X, et al. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 2005; 307: 254–8.
- Worbs T, Bode U, Yan S, et al. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med* 2006; 203(3): 519–27.
- Fukaya T, Takagi H, Sato Y, et al. Crucial roles of B7-H1 and B7-DC expressed on mesenteric lymph node dendritic cells in the generation of antigen-specific CD4+ Foxp3+ regulatory T cells in the establishment of oral tolerance. *Blood* 2010; 116: 2266–76.
- Matteoli G, Mazzini E, Iliev ID, et al. Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut* 2010; 59: 595–604.
- Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F, Wu H. Oral tolerance. *Immunol Rev* 2011; 241: 241–59.
- Akdis M, Verhagen J, Taylor A, et al. 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: 1567–75.
- Beyer K, Castro R, Birnbaum A, Benkov K, Pittman N, Sampson HA. Human milk-specific mucosal lymphocytes of the gastrointestinal tract display a TH2 cytokine profile. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 707–13.
- Flinterman AE, Pasmans SG, den Hartog Jager CF, et al. T cell responses to major peanut allergens in children with and without peanut allergy. *Clin Exp Allergy* 2010; 40: 590–7.
- Turcanu V, Maleki SJ, Lack G. Characterization of lymphocyte responses to peanuts in normal children, peanut-allergic children, and allergic children who acquired tolerance to peanuts. *J Clin Invest* 2003; 111: 1065–72.
- Tiemessen MM, Van Ieperen-Van Dijk AG, Bruijnzeel-Koomen CA, Garssen J, Knol EF, Van Hoffen E. Cow's milk-specific T-cell reactivity of children with and without persistent cow's milk allergy: key role for IL-10. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 932–9.
- Dorion BJ, Burks AW, Harbeck R. The production of interferon-gamma in response to a major peanut allergy, Ara h II correlates with serum levels of IgE anti-Ara h II. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93(1 Pt 1): 93–9.
- Perez-Machado MA, Ashwood P, Thomson MA, et al. Reduced transforming growth factor-beta1-producing T cells in the duodenal mucosa of children with food allergy. *Eur J Immunol* 2003; 33: 2307–15.
- Smith M, Tourigny MR, Noakes P, Thornton CA, Tulic MK, Prescott SL. Children with egg allergy have evidence of reduced neonatal CD4+ CD25+ CD127lo/- regulatory T cell function. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 1460–6.
- Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P. Allergen-responsive CD4+ CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med* 2004; 199: 1679–88.
- Delong JH, Simpson KH, Wambre E, James EA, Robinson D, Kwok WW. Ara h 1-reactive T cells in individuals with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 1211–8.e3.

28. Thottingal TB, Stefura BP, Simons FER, et al. Human subjects without peanut allergy demonstrate T cell-dependent, TH2- biased, peanut-specific cytokine and chemokine responses independent of TH1 expression. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 905–14.
29. Savilahti EM, Karinen S, Salo HM, et al. Combined T regulatory cell and Th2 expression profile identifies children with cow's milk allergy. *Clin Immunol* 2010; 136: 16–20.
30. Shreffler WG, Wanich N, Moloney M, Nowak-Węgrzyn A, Sampson HA. Association of allergen-specific regulatory T cells with the onset of clinical tolerance to milk protein. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 43–52.e7.
31. Plaut M, Sawyer RT, Fenton MJ. Summary of the 2008 National Institute of Allergy and Infectious Diseases-US Food and Drug Administration Workshop on Food Allergy Clinical Trial Design. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124: 671–8.e1.
32. Schofield AT. A case of egg poisoning. *Lancet* 1908; 171: 716.
33. Bauer A, Ekanayake Mudiyanse S, Wigger-Alberti W, Elsner P, et al. Oral rush desensitization to milk. *Allergy* 1999; 54: 894–5.
34. Nucera E, Schiavino D, D'Ambrosio C, et al. Immunological aspects of oral desensitization in food allergy. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 637–41.
35. Ismail IH, Tang ML. Oral immunotherapy for the treatment of food allergy. *Isr Med Assoc J* 2012; 14: 63–9.
36. Morisset M, Moneret-Vautrin DA, Guenard L, et al. Oral desensitization in children with milk and egg allergies obtains recovery in a significant proportion of cases. A randomized study in 60 children with cow's milk allergy and 90 children with egg allergy. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2007; 39: 12–9.
37. Varshney P, Jones SM, Scurlock AM, et al. A randomized controlled study of peanut oral immunotherapy: clinical desensitization and modulation of the allergic response. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 654–60.
38. Hofmann AM, Scurlock AM, Jones SM, et al. Safety of a peanut oral immunotherapy protocol in children with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124: 286–91, 291.e1–6.
39. Longo G, Barbi E, Berti I, et al. Specific oral tolerance induction in children with very severe cow's milk-induced reactions. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 343–7.
40. Skripak JM, Nash SD, Rowley H, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 1154–60.
41. Martorell A, De la Hoz B, Ibanez MD, et al. Oral desensitization as a useful treatment in 2-year-old children with cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy* 2011; 41: 1297–304.
42. Pajno GB, Caminiti L, Ruggeri P, et al. Oral immunotherapy for cow's milk allergy with a weekly up-dosing regimen: a randomized single-blind controlled study. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010; 105: 376–81.
43. Brozek JL, Terracciano L, Hsu J, et al. Oral immunotherapy for IgE-mediated cow's milk allergy: a systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Allergy* 2012; 42: 363–74.
44. Buchanan AD, Green TD, Jones SM, et al. Egg oral immunotherapy in nonanaphylactic children with egg allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 199–205.
45. Vickery BP, Pons L, Kulis M, Steele P, Jones SM, Burks AW, et al. Individualized IgE-based dosing of egg oral immunotherapy and the development of tolerance. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010; 105: 444–50.
46. Blumchen K, Ulbricht H, Staden U, et al. Oral peanut immunotherapy in children with peanut anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 126: 83–91.e1.
47. Staden U, Rolinck-Werninghaus C, Brewe F, Wahn U, Niggemann B, Beyer K, et al. Specific oral tolerance induction in food allergy in children: efficacy and clinical patterns of reaction. *Allergy* 2007; 62: 1261–9.
48. Burks AW, Jones SM, Wood RA, et al. Oral immunotherapy for treatment of egg allergy in children. *N Engl J Med* 2012; 367: 233–43.
49. Keet CA, Frischmeyer-Guerrero PA, Thyagarajan A, et al. The safety and efficacy of sublingual and oral immunotherapy for milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129: 448–55, 455.e1–5.
50. Fisher HR, du Toit G, Lack G. Specific oral tolerance induction in food allergic children: is oral desensitisation more effective than allergen avoidance?: a meta-analysis of published RCTs. *Arch Dis Child* 2011; 96: 259–64.
51. Jones SM, Ponsz L, Roberts JL, et al. Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124: 292–300, 300.e1–97.
52. Alonso R, Zapatero L, Fuentes V, Barranco R, Davila G, Martinez M. Specific oral tolerance induction in 39 children with IgE mediated persistent cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: S246.
53. Patriarca G, Nucera E, Roncallo C, et al. Oral desensitizing treatment in food allergy: clinical and immunological results. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 459–65.
54. Meglio P, Giampietro PG, Gianni S, Galli E. Oral desensitization in children with immunoglobulin E-mediated cow's milk allergy—follow-up at 4 yr and 8 months. *Pediatr Allergy Immunol* 2008; 19: 412–9.
55. Vickery BP, Lin J, Kulis M, et al. Peanut oral immunotherapy modifies IgE and IgG4 responses to major peanut allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131: 128–34.e1–3.
56. Urra JM, Garcia Rodriguez R, Feo Brito F, Mur P, Guerra F. Oral desensitization to egg enables CD4+ FoxP3+ cells to expand in egg-stimulated cells. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2012; 22: 71–3.
57. Varshney P, Jones SM, Pons L, et al. Peanut Oral Immunotherapy (OIT) induces immunologic changes supporting the development of tolerance. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: AB59 (Abstract).
58. Itoh N, Itagaki Y, Kurihara K. Rush specific oral tolerance induction in school-age children with severe egg allergy: one year follow up. *Allergol Int* 2010; 59: 43–51.
59. Barbi E, Longo G, Berti I, et al. Adverse effects during specific oral tolerance induction: in home phase. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2012; 40: 41–50.
60. Varshney P, Steele PH, Vickery BP, et al. Adverse reactions during peanut oral immunotherapy home dosing. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124: 1351–2.
61. Blumchen K, Ulbricht H, Staden U, et al. Oral peanut immunotherapy in children with peanut anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126: 83–91.e1.
62. Nadeau KC, Schneider LC, Hoyte L, Borrás I, Umetsu DT. Rapid oral desensitization in combination with omalizumab therapy in patients with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 1622–4.
63. Nadeau KC, Kohli A, Iyengar S, DeKruyff RH, Umetsu DT. Oral immunotherapy and anti-IgE antibody-adjunctive treatment for food allergy. *Immunol Allergy Clin North Am* 2012; 32: 111–33.
64. Lemon-Mule H, Sampson HA, Sicherer SH, Shreffler WG, Noone S, Nowak-Węgrzyn A, et al. Immunologic changes in children with egg allergy ingesting extensively heated egg. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 977–83.e1.
65. Nowak-Węgrzyn A, Bloom KA, Sicherer SH, et al. Tolerance to extensively heated milk in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 342–7.
66. Leonard SA, Sampson HA, Sicherer SH, et al. Dietary baked egg accelerates resolution of egg allergy in children. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130: 473–80.e1.
67. Leonard SA, Martos G, Wang W, Nowak-Węgrzyn A, Berin MC. Oral immunotherapy induces local protective mechanisms in the gastrointestinal mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129: 1579–87.e1.
68. Creticos PS, Schroeder JT, Hamilton RG, et al. Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N Engl J Med* 2006; 355: 1445–55.
69. Drachenberg KJ, Wheeler AW, Stuebner P, Horak F. A well-tolerated grass pollen-specific allergy vaccine containing a novel adjuvant, monophosphoryl lipid A, reduces allergic symptoms after only four pre-seasonal injections. *Allergy* 2001; 56: 498–505.
70. Simons FE, Shikishima Y, Van Nest G, Eiden JJ, HayGlass KT. Selective immune redirection in humans with ragweed allergy by injecting Amb a 1 linked to immunostimulatory DNA. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 1144–51.
71. Van Overtvelt L, Moussu H, Horiot S, et al. Lactic acid bacteria as adjuvants for sublingual allergy vaccines. *Vaccine* 2010; 28: 2986–92.
72. Mascarell L, Van Overtvelt L, Lombardi V, et al. A synthetic triacylated pseudo-dipeptide molecule promotes Th1/TReg immune responses and enhances tolerance induction via the sublingual route. *Vaccine* 2007; 26: 108–18.
73. Lombardi V, Van Overtvelt L, Horiot S, et al. Toll-like receptor 2 agonist Pam3CSK4 enhances the induction of antigen-specific tolerance via the sublingual route. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 1819–29.