

Vacunación simultánea única parenteral y mucosa contra *Dermatophagoides siboney* en murinos

Yaxsunaris Pérez Fumero ¹

¹ Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba, yatxu@infomed.sld.cu

Resumen:

Introducción: En Cuba existe una alta prevalencia de enfermedades alérgicas, y en la actualidad la inmunoterapia con vacunas constituye la estrategia terapéutica más efectiva.

Objetivo: determinar la influencia de inmunizaciones simultáneas sobre la respuesta anti *Dermatophagoides siboney* (*D. siboney*) y evaluar el comportamiento de respuesta inmune después de un reto intranasal con *D. siboney* en un modelo profiláctico de ratones Balb/c.

Métodos: Se realizó una investigación de desarrollo, longitudinal prospectiva y experimental en el Centro de Biopreparados de Mayabeque, en el periodo de un año. Se empleó la técnica de ELISA para la determinación de IgE, IgG, específicas en suero, y perfil de citocinas Th1/Th2 en fluido del lavado bronco alveolar (BALF).

Resultados: Los niveles de IgG sérica posteriores al reto alérgico fueron mayores con tres aplicaciones de la vacunación simultánea por vía subcutánea y sublingual que con tres dosis de *D.siboney*/Salina sublingual y Prolinem Ds subcutánea independientes. No hubo inducción de IgE sérica contra *D. siboney* con las inmunizaciones simultáneas, solo se indujo IgE en el grupo inmunizado con *D.siboney*/Alúmina por vía subcutánea. Desde las primeras horas posteriores al reto alérgico intranasal se logra inducir la producción de IFN- γ con SinTimVaS y esta aumenta a los 8 días después del reto y disminución de citocinasTh2.

Conclusiones: La estrategia de vacunación unitemporal (SinTimVaS o Single time vaccination strategy) demostró ser eficiente en inducir una respuesta antialérgica sistémica protectora contra *D. siboney* y reducir el número de dosis.

Palabras clave: Vacunas unitemporales; SinTimVaS; inmunoterapia en alergia; *Dermatophagoides siboney*.

INTRODUCCIÓN

La alergia es causada por el desarrollo de una respuesta inmune inducida por alérgenos y puede conllevar a diversas enfermedades: asma, rinitis, conjuntivitis, anafilaxis, alergia a drogas, alimentos y a picaduras de insectos, eccema, urticaria y el edema angioneurótico. Cada vez está más claro que las enfermedades alérgicas son entidades complejas en las que existen diversas variantes causadas por diferentes mecanismos celulares y moleculares subyacentes. ^(1, 2)

La enfermedad respiratoria alérgica es caracterizada por la presencia de Inmunoglobulina E (IgE) específica del alérgeno y la inflamación eosinofílica. ⁽²⁾ El asma y las enfermedades alérgicas representan un gran problema de salud en países industrializados. Estas representan una causa importante de morbilidad y ocasionalmente, mortalidad. Los desórdenes atópicos se han convertido en un problema socio económico relevante, causándole a la sociedad gastos relacionados con el cuidado de la salud en el orden de billones de dólares americanos. ⁽³⁾

Aunque existe una gran diversidad de alérgenos, ahora sabemos que los ácaros son considerados los principales agentes causales de las enfermedades alérgicas, y los pertenecientes al género Dermatophagoides constituyen la fuente fundamental de alérgenos del polvo doméstico. Alrededor del 40% de la población cubana es alérgica. D. siboney es el principal ácaro participante en las alergias cubanas. ^(4,5)

Las manifestaciones clínicas son tratadas fundamentalmente con antihistamínicos, simpaticomiméticos, cromoglicato de sodio y esteroides. Estos tratamientos son generalmente inadecuados, pues tratan los signos y síntomas y no su etiopatogenia, por lo que en la actualidad se va en busca de otros procedimientos más efectivos entre los que se encuentran la inmunoterapia o vacunas terapéuticas. Este tipo de tratamiento consiste en la administración de dosis progresivamente crecientes de los alérgenos específicos al cual el individuo está sensibilizado, en pacientes con afecciones mediadas por la IgE. ^(6,7,8)

Aunque han sido probadas diversas vías de administración de estas vacunas de alergia: subcutánea, sublingual, oral, intranasal, conjuntival, epicutánea, intralinfática. Algunas se han desechado por no ser suficientemente eficaces y otras están en fase de experimentación. Dos métodos han demostrado ser altamente eficaces y han sido aprobados por la Organización Mundial de la Salud (OMS). La vía subcutánea con 100 años de eficacia probada y la administración de gotas o tabletas por vía sublingual aprobada desde 1998. ^(9,10)

La Organización Mundial de la Salud incluye en su plan estratégico 2006-2009 obtener vacunas que requieran menos dosis para alcanzar el nivel de inmuno respuesta deseada. Las vacunas concurrentes consisten en la aplicación simultánea de más de un antígeno vacunal, en el mismo tiempo; pero en lugares diferentes, basándose en la regionalización del sistema inmune que permite inducir respuestas diferentes en cada región. Frente a desafíos simultáneos se obtienen respuestas cualitativamente superiores al estimular además de la respuesta sistémica la producción de inmunoglobulina A secretoria (IgAs). ^(11,12)

La estrategia vacunal unitemporal puede resolver los problemas de las vacunaciones multidosas, cuando se produce la inasistencia o pérdida de los sujetos a las dosis sucesivas y hace a las vacunas parenterales actuales más eficientes al inducir también, respuestas mucosas usando combinaciones de eficientes adyuvantes mucosales y formulaciones parenterales con antígenos vacunales incluidos, conjugados o co- administrados. ⁽¹³⁾

Por vacunas "unitemporales" se entiende que, la aplicación simultánea de una o más dosis mucosas y una dosis parenteral, Este concepto se extiende a cualquier combinación simultánea de antígenos adyuvados o no, aplicados por diferentes vías de inmunización, sean estas mucosas o pa-

renterales, aunque preferiblemente es de interés en las combinaciones de ambas vías y con la aplicación de varias vías mucosas. Este concepto se extiende a otras vacunas que usen adyuvantes diferentes a los referidos. Este concepto excluye a las vacunas unidosis que evidentemente son aplicadas también en un solo tiempo. ^(13,14)

Problema científico: Se desconoce la pertinencia de inducir respuestas mucosas en las vacunas contra las alergias, muchas de las cuales afectan las mucosas y se sabe que la IgAs es el principal anticuerpo que protege las mismas. El uso de potentes adyuvantes como el AFPL[®]1/alúmina en Prolinem-Ds ha permitido avanzar en la estrategia de reducción de las dosis. Contar con SinTimVaS permite comparar la efectividad de dos productos ya en la clínica reduciendo aún más sus dosis y potenciar la respuesta mucosa en las alergias.

Este trabajo se realizó con el objetivo de determinar la influencia de inmunizaciones simultáneas sobre la respuesta anti *Dermatophagoides siboney* (*D. siboney*) y evaluar el comportamiento de respuesta inmune después de un reto intranasal con *D. siboney* en un modelo profiláctico de ratones Balb/c.

MÉTODO

Se realizó una investigación de desarrollo, longitudinal prospectiva y experimental en el Centro de Biopreparados de Mayabeque, en el periodo de un año. Se emplearon 70 ratones Balb/c, machos, de 6 a 8 semanas de edad y peso corporal promedio de 18±2g libres de patógenos, condición avalada por el certificado de calidad emitido por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

Se emplearon 7 grupos de 10 de ratones Balb/c.

Grupo A: Control negativo.

Inmunización con Solución salina tamponada con fosfato(SSTF) 1X ph=7.4. 3 dosis subcutáneas Tiempo 0(T0), Tiempo 7(T7), Tiempo 14(T14)

Grupo B: Control de respuesta inmunológica de tipo alérgico/ Th2.

Inmunización con Alérgeno *D.siboney* + Al (OH)₃ 3 dosis subcutáneas T0, T7, T14

Grupos C: Control positivo.

Inmunización con Alérgeno *D.siboney* + Solución salina 3 dosis sublingual T0, T7, T14

Grupos D: Control positivo.

Inmunización con vacuna terapéutica antialérgica Prolinem-Ds (alérgeno +AFPL[®]1/alúmina) 3 dosis subcutáneas T0, T7, T14

Grupo E: Experimento STVS 1

Inmunización con Prolinem-Ds subcutáneo y alérgeno (*D.siboney*) + Solución salina sublingual. 1 dosis por ambas vías T0

Grupo F: Experimento STVS 2

Inmunización con Prolinem-Ds subcutáneo y alérgeno (*D.siboney*) + Solución salina sublingual. 2 dosis por ambas vías T0 y T7

Grupo G: Experimento STVS 3

Inmunización con Prolinem-Ds subcutáneo y alérgeno (*D.siboney*) + Solución salina sublingual. 3 dosis por ambas vías T0, T7 y T14.

La extracción de sangre se realizó a través del plexo retro orbital, en los días 0, 7, 14 y 21 a 5 animales de cada grupo alternándolos en cada fecha. Las muestras obtenidas se incubaron durante 1 h a 37^oC, posteriormente se centrifugaron a 2000 g, durante 10 min a 4^oC, para obtener suero (200-500 µL por animal). Se conservaron a -20^o C hasta su uso.

Se realizó exposición intranasal de extracto alérgico. La concentración del alérgeno fue de 500 µg/ml. Se realizaron 2 dosis, una a los 8 días de la última inmunización y otra a los 7 días. A las 24 horas de concluido el reto alérgico a 2 animales de cada grupo se les realizó lavado bronco alveolar. Para la obtención de BALF la tráquea fue canulada y los pulmones lavados dos veces con 0.5 y 1 mL de SSTF Ph 7.4 frío, 24 horas posteriores al último desafío alérgico, los animales fueron anestesiados previamente mediante inyección intraperitoneal de una solución que contenía Diazepán y Ketamina (Labsynth, Brasil). El BALF fue centrifugado y el sobrante se conservó a -20°C hasta su uso.

Se empleó la técnica de ELISA para la determinación de IgE, IgG, específicas en suero, y perfil de citocinas Th1/Th2 en BALF.

El comportamiento de las diferentes variables fue descrito a través de los parámetros descriptivos de los métodos paramétricos: promedio, desviación estándar e intervalos del 95% de confianza. El ajuste a la normalidad de cada uno de los conjuntos de datos fue verificado mediante la prueba de Kolmogórov-Smirnov, $p < 0.05$. Para la comparación entre grupos, así como entre diferentes fechas en un mismo grupo, se empleó el ANOVA complementado con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, $p < 0.05$. Para el análisis de los resultados de anticuerpos se empleó un ANOVA de dos factores, complementado con la prueba de Bonferroni, $p < 0.05$. Los datos fueron procesados con el Software GraphPadPrism versión 4.00.

Como análisis adicional se realizó la prueba de X² con corrección de Bonferroni; aunque debido a las limitaciones de esta metodología^[44, 45] sus resultados se analizaron en el contexto de la significación estadística de las diferencias determinadas a través de la estimaciones puntuales y de intervalos de confianza del OR.

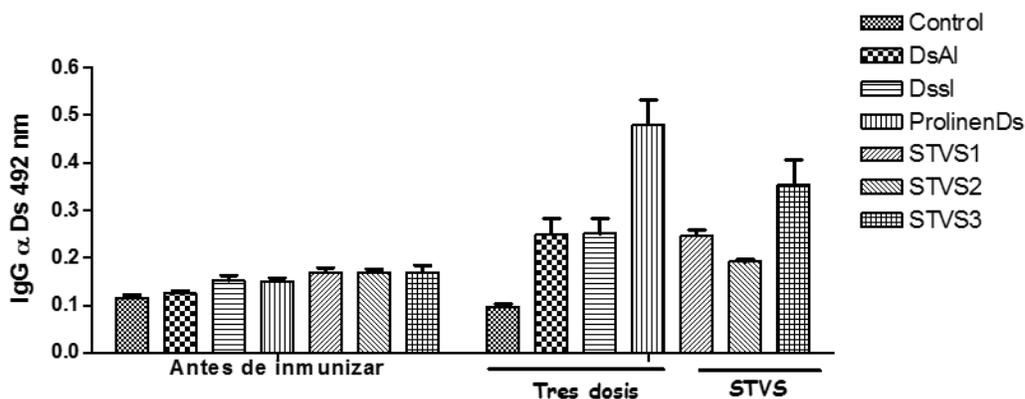
Las fórmulas utilizadas para determinar los niveles de corte en los ensayos se muestran a continuación (\bar{X} = media y DE = desviación estándar): $NC = \bar{X}(\text{No EC}) + 2 * DE(\text{No EC})$

Si el resultado excede el nivel de corte se asume como positivo y para el caso de que este sea menor o igual al nivel de corte se reporta como negativo.

Los gráficos fueron confeccionados con el Software GraphPadPrism versión 4.00 para Windows, San Diego, California, USA

RESULTADOS

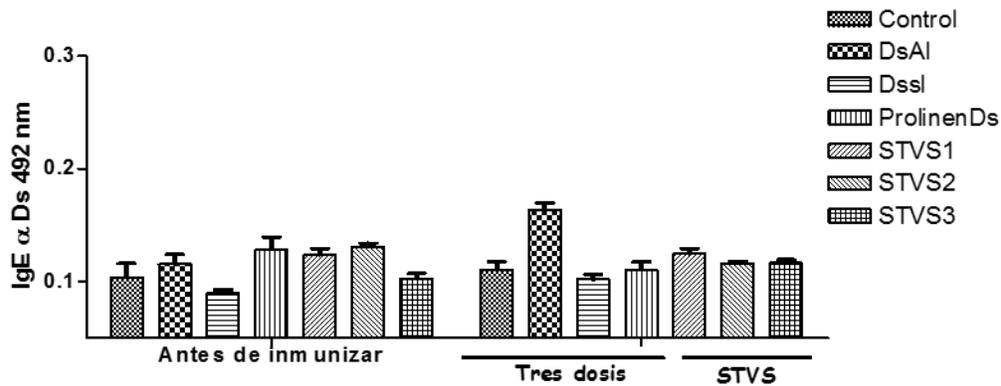
Gráfico 1: respuesta de igG sérica contra *D. Siboney* según tiempo de la inmunización



Leyenda: Control: SSTF, DsAI: alérgeno Ds+ Al (OH)₃ por vía subcutánea, Dssl: alérgeno Ds+ Solución salina por vía sublingual, STVS: vacuna unitemporal.

A los 7 días después de la última inmunización se alcanzaron niveles séricos de IgG alérgeno específica superiores en el grupo inmunizado con Prolinem-Ds comparado con STVS, a su vez este último grupo STVS 2 y el STVS 1 mostraron un mayor nivel de IgG sérica alérgeno específica con respecto al grupo control, siendo estas diferencias estadísticamente significativas y el grupo STVS 3 mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto a los grupos: Control, DsAI, Dssl .

Gráfico 2: Respuesta de IgE sérica contra *D. siboney* según tiempo de la inmunización

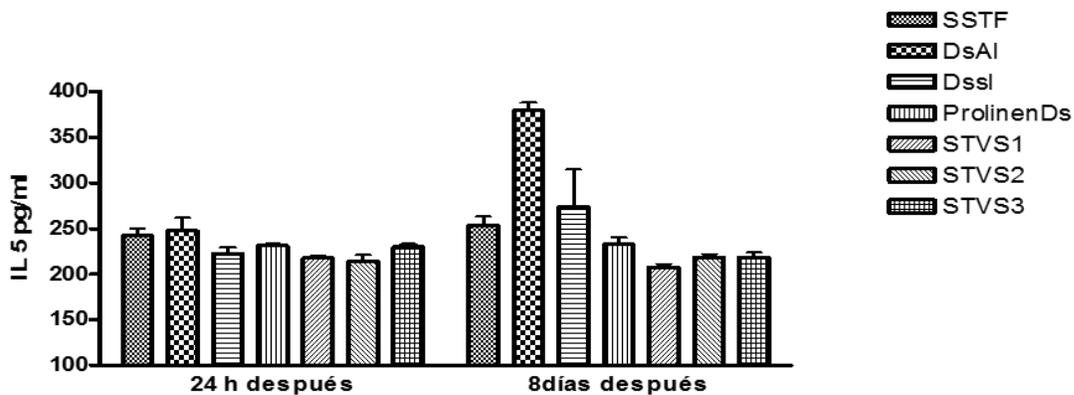


Leyenda: Control: SSTF, DsAI: alérgeno Ds+ Al (OH)₃ por vía subcutánea, Dssl: alérgeno Ds+ Solución salina por vía sublingual, STVS: vacuna unitemporal.

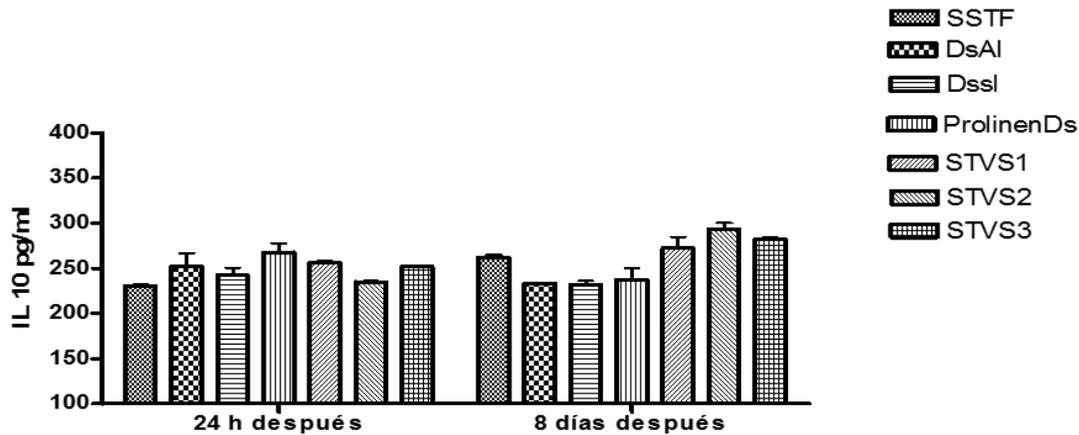
No hubo inducción de IgE sérica contra *D. siboney* en los grupos STVS 1, 2 y 3, solo se indujo IgE en el grupo DsAI (control Th2+).

Gráfico 3: Patrón de citocinas en el fluido bronco alveolar después del reto alérgico intranasal

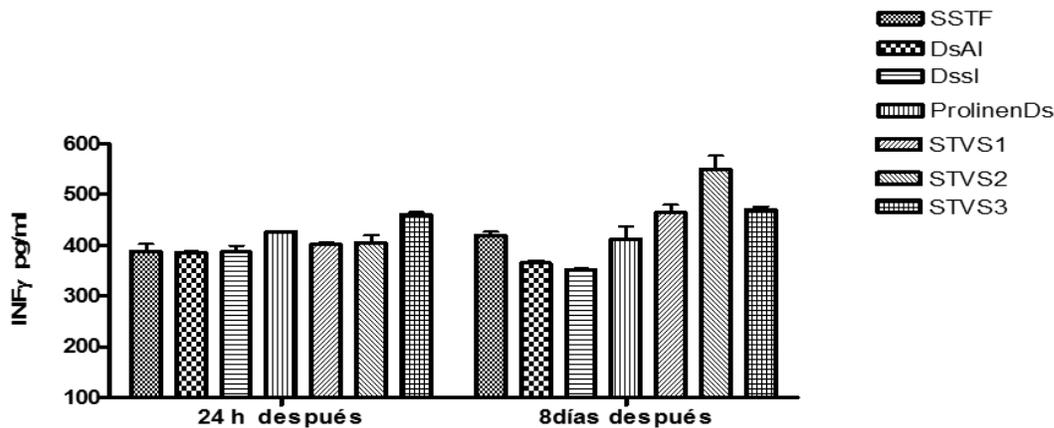
3A



3B



3C



DISCUSIÓN

Los resultados de nuestro estudio indican que se logró con la estrategia de vacunación unitemporal alcanzar niveles séricos de IgG alérgeno específica contra *D. siboney* superior a los grupos: Control negativo, DsAl por vía subcutánea a la semana de la primera inmunización. A los 14 días el grupo inmunizado dos veces con Prolinem-Ds por vía subcutánea, superó al grupo que recibió dos dosis de STVS y este a su vez superó significativamente los niveles de IgG sérica específica contra *D. siboney* de los grupos inmunizados dos veces por vía subcutánea solamente con DsAl y el inmunizado por vía sublingual solamente con Dssl.

Esta es la primera vez que en Cuba y a nivel mundial se aplica la estrategia de vacunación unitemporal en la inmunoterapia de la alergia, los resultados se compararon con los de otros trabajos que aplicaron esta estrategia para otros inmunógenos no alérgenos.

Pérez y cols. Coinciden con nuestros resultados presentados. Ellos en su investigación empleando la estrategia de vacunación unitemporal con *Neisseria meningitidis* B obtuvieron que la inmunización simultánea de una dosis mucosa (intranasal, sublingual, oral) y una dosis por vía parenteral como un esquema completo de inmunización induce respuestas sistémicas y mucosas

eficientes, similares a las obtenidas por dos inmunizaciones parenterales solas y tres dosis por vía mucosa, respectivamente.⁽¹⁴⁾

Zimra y cols. Emplearon una estrategia de vacunación por vía parenteral y mucosa inmunizando con SIVmac251 en microesferas y lograron inducir una fuerte respuesta sistémica de IgG específica contra el virus de inmunodeficiencia simia, así como en el lavado bronco alveolar y en el lavado vaginal de macacus Rhesus. La mayoría de los animales que recibieron la primera dosis intramuscular mantuvieron altos niveles de IgG sistémica incluso dos años después de suspendido el protocolo de tratamiento.⁽¹⁵⁾

McCluskie y cols. Emplearon también una estrategia de inmunización por vía parenteral y mucosa en ratones e inmunizaron con el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y CpG DNA. Ellos demostraron que la respuesta inmune de IgG sistémica específica contra HBVAg inducida por una primera dosis parenteral puede ser potenciada con una inmunización mucosa. Además, la presencia de un adyuvante a la hora de aplicar el refuerzo por vía mucosa puede influir en la naturaleza de la respuesta inmune subsiguiente (Th1 / Th2).⁽¹⁶⁾

Los estudios antes mencionados coinciden con nuestros resultados en que SinTimVaS induce respuestas sistémicas específicas contra el antígeno.

Estudios previos han mostrado que un largo periodo con vacunación con alérgenos provoca una disminución en la producción de IgE y un incremento de los niveles de IgG. Este cambio permite a los anticuerpos reconocer y eliminar el alérgeno, evitando la reacción alérgica.^(17,18)

En nuestra investigación a los 21 días posteriores a la inmunización, no hubo aumento de los niveles de IgE sérica específica contra *D. siboney* en los grupos con la vacunación unitemporal, que sí aumentó en el grupo con inmunización subcutánea con DsAl con diferencia estadísticamente significativa.

Este hecho es de gran relevancia, pues se conoce que la IgE es el principal agente de la respuesta alérgica tanto inmediata (anafiláctica) como tardía.⁽¹⁹⁾ Estas diferencias podrían deberse a que la formulación DsAl para la vía subcutánea contiene Alúmina un adyuvante Th2, y en la formulación para la vacunación unitemporal se empleó un adyuvante Th1 para la inmunización subcutánea.

En este trabajo fueron estudiadas las características de la respuesta inmune inducida localmente, se cuantificaron citocinas en el fluido bronquio alveolar.

El efecto protector antialérgico con la estrategia de vacunación simultánea única parenteral y mucosa, se evidenció en los animales sometidos al reto alérgico. Los resultados indicaron para esta estrategia una reducción de los niveles de IL-5 en el fluido bronquio alveolar de los animales vacunados STVS con respecto al control Th2.

A las 24 horas posterior al reto los niveles de IL-5 fueron similares en el grupo control Th2 que en los grupos tratados con dosis simultáneas por la vía mucosa y subcutánea, sin embargo a los 8 días fueron superiores desde el punto de vista estadístico los niveles de IL-5 en el grupo control Th2, respecto a los grupos tratados con la estrategia unitemporal.

Se detectaron niveles de IL-10 significativamente superiores en los grupos STVS2, STVS 3 con respecto a los grupos inmunizados con DsAl, Dssl, Prolinem Ds. Los niveles de IFN- γ fueron mayores en los grupos STVS1, STVS2 y STVS 3 con respecto a los grupos DsAl, Dssl, y STVS 2 con Prolinem Ds con diferencia estadísticamente significativa.

Se puede apreciar que desde las primeras horas posteriores al reto alérgico intranasal se logra inducir la producción de IFN- γ con SinTimVaS y esta aumenta a los 8 días después del reto.

Por otra parte, se logra inducir la producción de IL-10 que habla de regulación y tolerancia frente al alérgeno inmunizado.

Ramírez y cols. Empleando una formulación que contenía PL+alum+Ds lograron luego del reto alérgico niveles locales moderados de IFN- γ e IL- 10, y menos IL-13 al comparar con los controles.⁽²⁰⁾

Los resultados nos indican que la estrategia de vacunación simultánea única parenteral y mucosa induce un efecto protector anti-alérgico, evidenciado en el tipo de respuesta desarrollada ante la exposición al alérgeno por vía respiratoria, con reducción tanto de sus indicadores sistémicos (IgE) y en el órgano de choque (IL-5 en el BALF). Dicho efecto puede estar asociado a la inducción de una respuesta Th1 moderada caracterizada por la inducción de anticuerpos IgG e INF- γ moderado. Un efecto similar de inducción de Th1, con inducción de IgG e INF- γ y reducción de IL-5 e IgE, había sido reportado previamente con el empleo de alérgenos y PL, a pesar del uso de Hidróxido de Aluminio.⁽²¹⁾

CONCLUSIONES

Se indujo una respuesta sistémica contra *D. siboney* efectiva, demostrándose la posibilidad de reducir el número de dosis, hallazgo que podría extrapolarse a la inmunoterapia alérgica específica en humanos donde actualmente el número de dosis es elevado. La estrategia de vacunación unitemporal tuvo un efecto protector frente a la exposición a *D. siboney* posterior al reto por vía intranasal.

REFERENCIAS

1. Akdis CA. Therapies for allergic inflammation: refining strategies to induce tolerance. *Nature medicine*, 2012. 18(5): p. 736-749.
2. Nedergaard J, Broge L and Jacobi H. Allergy immunotherapy: the future of allergy treatment. *Drug Discovery Today*, 2016.21(1). □ DOI:10.1016/j.drudis.2015.07.010
3. Tulaeva I, Kratzer B, Campana R, Curin M, van Hage M, Karsonova A, et al. Preventive Allergen-Specific Vaccination Against Allergy: Mission Possible? *Front. Immunol.* 11:1368. doi: 10.3389/fimmu.2020.01368
4. Chang A, Figueroa I, Lahera T and González O. Sensibilización a ácaros domésticos en niños asmáticos severos. *Revista Cubana de Pediatría*, 2013. 85(3): p. 311-319.
5. Ronquillo M, Castro RL, Álvarez M, Rodríguez J, García I, Irraragori C, Abdo A, Navarro B, González M, Labrada A, Oliva Y, Mateo M. Primeros ensayos clínicos a doble ciegas controlados por placebo con las vacunas antialérgicas VALERGEN-DP, VALERGEN-DS y VALERGEN-BT en asmáticos en Cuba. En: Premio Anual de Salud 2008. 33ª Edición. p.13-25. Editorial Ciencias Médicas, La Habana 2009. ISBN 978-959-212-478-3.
6. Ridaio M. Inmunoterapia en patología alérgica pediátrica. *Pediatr Integral* 2018; XXII (3): 116 – 124. Disponible en: <https://www.pediatriaintegral.es/wp-content/uploads/>

7. Hill DA, Spergel JM. The atopic march: Critical evidence and clinical relevance. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2018 Feb;120(2):131-137. doi: 10.1016/j.anai.2017.10.037.
8. Cardona R, Sánchez A, Larenas-Linnemann D, Járes E, & Sánchez Jorge. Extractos alérgicos para inmunoterapia en Latinoamérica. *Revista alergia México*, 2018;65(1), 25-40. doi: 10.29262/ram.v65i1.287
9. Rahman RS and Wesemann DR. Immune mechanisms of allergic immunotherapies. *Immunotherapy Advances*. 2022;2:1–15.doi:10.1093/immadv/ltac022
10. Xiong L, Lin J, Luo Y et al. The efficacy and safety of epicutaneous immunotherapy for allergic diseases: a systematic review and meta-analysis. *Int Arch Allergy Immunol* 2020;181:170–82. doi:10.1159/000504366
11. Burks AW, Calderon MA, Casale T, Cox L, Demoly P, Jutel M, et al. Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/European Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRACTALL consensus report. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 May;131(5):1288-96.e3. doi: 10.1016/j.jaci.2013.01.049.
12. Bousquet J, Lockey R, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases A WHO position paper. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1998; 102(4), 558-562. E1 14
13. Perez O y LASTRE M. Proteoliposoma: corazón de VA-MENGOC-BC® y plataforma de adyuvantes. *Vaccinmonitor*.2013;22(3):13http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025028X2013000300001&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1025-028X.
14. González E, Romeu B, Lastre M, Zayas C, Cuello M, Cabrera O, et al. Mucosal and systemic immune responses induced by a single time vaccination strategy in mice. *Can J Microbiol*. 2015 Aug;61(8):531-8. doi: 10.1139/cjm-2015-0063.
15. Israel ZR, Gettie A, Ishizaka ST, Mishkin EM, Staas J, Gilley R, et al. Combined systemic and mucosal immunization with microsphere-encapsulated inactivated simian immunodeficiency virus elicits serum, vaginal, and tracheal antibody responses in female rhesus macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1999 Aug 10;15(12):1121-36. doi: 10.1089/088922299310412. PMID: 10461832.
16. McCluskie MJ, Weeratna RD, Payette PJ and Davis HL. Parenteral and mucosal prime-boost immunization strategies in mice with hepatitis B surface antigen and CpG DNA. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002 Feb 18;32(3):179-85. doi: 10.1111/j.1574-695X.2002.tb00551. x. PMID: 11934561.
17. Saranz RJ, Lozano A, Cáceres ME, Arnolt RG, Máspero JF, Bozzola CM, et al. Inmunoterapia con alérgenos para la prevención y el tratamiento de las enfermedades alérgicas respiratorias de la infancia. *Arch Argent Pediatr*. 2010;108(3):258-265
18. Cantillo JF, Puerta L. Nuevos esquemas de inmunoterapia específicas con alérgenos. *Biomédica*.2010; 30(3):440453.http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012041572010000300017&lng=en.
19. Abbas KA, Litchman AH and Pillai S. *Inmunología celular y molecular*. 8va ed.Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2014. p. 417-429.
20. Ramírez W, Labrada A, Masa A, Tamargo B, Bourgo V, Pérez O et al. Novel Anti-Allergic Vaccine Candidate From House Dust Mite Together with a Combination Adjuvant: Treatment or Prevention of Respiratory Allergy. *J allergy clin immunol*, 2008.131(2).
21. Bortolatto J, Borducchi E, Rodriguez D, Keller AC, Faquim-Mauro E, Bortoluci KR, et al. Toll-like receptor 4 agonists adsorbed to aluminium hydroxide adjuvant attenuate ovalbumin-specific allergic airway disease: role of MyD88 adaptor molecule and



interleukin-12/interferon-gamma axis. Clin Exp Allergy. 2008;38(10):1668-79. doi:
10.1111/j.1365-2222.2008.03036.x.