



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas

Trabajo de Tesis para optar por el grado de Doctor de la Facultad de Ciencias
Exactas

Inmunomodulación de la respuesta inmune local
y sistémica en un modelo murino de alergia
alimentaria a leche bovina.
Aplicaciones a posibles estrategias terapéuticas
en alergia alimentaria

Directores: Dr. Docena Guillermo H.

Dr. Fossati Carlos A.

Lic. Bioq. Smaldini Paola Lorena

2012

El presente trabajo de tesis para optar por el grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, ha sido realizado bajo la dirección del Dr. Guillermo H. Docena y la co-dirección de Dr. Carlos A. Fossati en el Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune (LISIN) de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

La Plata, Febrero de 2012.

Agradecimientos

Este trabajo de tesis ha significado un gran crecimiento en lo profesional como en lo personal, por lo que quiero agradecer a todas las personas que han colaborado para que este trabajo se pueda realizar....

En primer lugar quería agradecer a Guillermo, mi director, por su dedicación, su optimismo y sobre todo por su paciencia.

A Alberto, mi co-director, por haberme recibido en el laboratorio, por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo esta tesis, por los consejos.

A ambos gracias por su confianza y por darme libertad de trabajo.

Al Alergo team....Nati, Reni, y especialmente a mi Amandis, por haber compartido trabajos, horas de EASTs, seminarios y sobre todo por brindarme su amistad.

No quiero dejar de agradecer a todos mis compañeros que forman parte de esta familia que es el LISIN, con quienes compartimos momentos de trabajo, almuerzos y sobremesa, charlas, mates, afterlabs, también compartimos alegrías, nuestros logros y frustraciones.....muchas gracias a todos y a cada uno: Maru, Belu, Facu, Vani, Yessi, Romi A, Costy, Eze, Paula B, Vero, Sergio, Fer, Yani, Loli, Gri, Agus, David, Herni, Agus Z, Dom, Martin, Romi, Juancito, Nico, Flor, Pau, Ceci, Coquita, Rodri y especialmente a mi pequeña saltamontes Lu, por estar a mi lado. A Yani, gracias por la flagelina.

También agradecer especialmente a Nico, quien con su ingenio y buena predisposición nos ha facilitado tanto el trabajo en el lab.....gracias!!!!

Gracias a mis compañeros de la cátedra de Fisiología por enseñarme y guiarme en las tareas docentes: Belu, Romi, Vero, Sil, Alejandro y Gustavo.

A mi gente:

A mis amigos de acá y de allá, por acompañarme y estar siempre, en las buenas y en las no tan buenas, a pesar de los distintos caminos que hemos tomado en la vida.

A la memoria de mi amiga, hermana del corazón....Marie.

A Carli y Mari, por tantas horas de estudios hasta recibirnos, y luego por acompañarnos durante la carrera de postgrado, compartiendo las buenas y las malas y fundamentalmente por darme su amistad...

Mi familia, papá, mamá y a mi hermano que sin ellos no hubiese llegado hasta acá. A mi familia política por acompañarme siempre, y especialmente quiero agradecer a Mariano, mi amor, por compartir la vida conmigo, por el apoyo y la paciencia, sobre todo en estos últimos días.

Finalmente quiero agradecer a:

La Facultad de Ciencias Exactas y la Universidad Nacional de La Plata, por brindarme la formación de grado y de posgrado.

Y a la ANPCyT, a CONICET y las autoridades por otorgarme las becas para el desarrollo de esta Tesis doctoral.

Abreviaturas

Ag	antígeno
ACP	Anafilaxia cutánea pasiva
ALV	alergia a leche de vaca
APC	célula presentadora de antígeno
BCA	ácido bicinconínico
BSA	seroalbúmina bovina
Con A	Concanavalina A
DO	desafío oral
DTH	prueba de hipersensibilidad retardada
DTT	ditiotretiol
EAST	Enzyme Attached Sorbent Test
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Flic	flagelina
Gb	<i>Gordonia brochialis</i>
HBSS	solución buffer salino de Hank
HRP	Horse Radish Peroxidase
id	intradérmica
ig	intragástrica
in	intranasal
IT	inmunoterapia
iv	intravenosa
LP	Lámina propia
LPS	lipopolisacárido
MLN	ganglios linfáticos mesentéricos
NAC	N-acetilcisteína
OIT	inmunoterapia oral
Omp	proteína de membrana externa
OPD	orto fenilendiamina
OVA	ovoalbúmina
PBS	buffer fosfato de sodio
PC	prueba cutánea
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PLV	proteínas de leche de vaca
PNPP	p-nitrofenilfosfato de sodio
PP	Placa de Peyer
PS	proteínas de soja
qPCR	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
Rc	<i>Rodococcus coprophilus</i>
sc	sub-cutánea
SDS-PAGE	sodum dodecyl sulphate polyacrlamide gel electrophoresis
SE	suero equino
SF	solución fisiológica
TBS	tris buffer de sodio

Abreviaturas

TC	toxina colérica
Ti	<i>Tsukamurella inchonensis</i>
β -Lg	β -lactoglobulina

Indices



Resumen	- 1 -
Hipótesis de trabajo	- 3 -
Objetivo general	- 3 -
Introducción	- 5 -
Enfermedades alérgicas.....	- 7 -
Sistema inmune de mucosas.....	- 12 -
Tolerancia.....	- 15 -
Alergia alimentaria.....	- 17 -
Diagnostico alergia alimentaria.....	- 21 -
Tratamiento	- 25 -
Modelos animales.....	- 28 -
Materiales y Métodos	- 37 -
Preparación y caracterización de extractos proteicos	- 39 -
Proteínas de leche de vaca.....	- 39 -
Proteínas de soja.....	- 39 -
Proteína recombinante de <i>Brucella abortus</i>	- 39 -
Cuantificación de proteínas	- 39 -
Planes de inmunización	- 40 -
Plan de sensibilización	- 40 -
Plan de modulación	- 41 -
Desafío oral	- 41 -
Evaluación de la respuesta inmune	- 41 -
Pruebas <i>in vivo</i>	- 41 -
Ensayos <i>in vitro</i>	- 44 -
Biología Molecular	- 49 -
Extracción de RNA	- 49 -
Reacción de transcripción reversa.....	- 49 -
Real time PCR.....	- 50 -
Técnicas de cultivo celulares	- 53 -
Cultivos empleando líneas celulares	- 53 -
Cultivos empleando suspensiones celulares obtenidas de bazo y de ganglios linfático mesentéricos de ratón.....	- 53 -
Cultivos celulares empleando suspensiones celulares obtenidas de intestino de ratón.....	- 54 -
Obtención de extractos celulares para inmunoblotting	- 54 -

Obtención de extracto celular total	- 54 -
Obtención de extracto nuclear	- 55 -
Electroforesis SDS-PAGE e inmunoblotting.....	- 56 -
Técnicas de microscopia	- 57 -
Microscopia de fluorescencia/confocal	- 57 -
Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS).....	- 57 -
Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	- 57 -
Microscopia electrónica de Transmisión (MET).....	- 58 -
Ensayo de asa ligada intestinal	- 59 -
Análisis estadístico	- 59 -
Capítulo 1	
<i>Optimización de un modelo murino de alergia alimentaria a proteínas de leche bovina</i>	- 61 -
I.1 INTRODUCCIÓN	- 66 -
I.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	- 66 -
I.3 RESULTADOS	- 67 -
I.4 DISCUSIÓN	- 75 -
Capítulo 2	
<i>Empleo de proteínas recombinantes de Brucella abortus como moduladores de la respuesta inmune</i> - 77 -	
II.1. INTRODUCCION	- 79 -
II.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	- 83 -
II.3. RESULTADOS	- 84 -
II.4. DISCUSION	- 107 -
Capítulo 3	
<i>Empleo de bacterias del género Actinomycetales como agentes inmunomoduladores de la respuesta inmune</i>	- 109 -
III. 1 INTRODUCCIÓN.....	- 111 -
III.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	- 114 -
III. 3. RESULTADOS	- 115 -
III. 4. DISCUSIÓN.....	- 138 -

Capítulo 4	- 143 -
<i>Empleo de proteínas de soja en inmunoterapia tolerogénica aplicando el modelo murino de alergia a proteínas bovinas</i>	- 143 -
IV.1. INTRODUCCIÓN	- 145 -
IV.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	- 148 -
IV.3. RESULTADOS.....	- 149 -
IV.4. DISCUSIÓN	- 164 -
Discusión y conclusiones finales	- 169 -
Bibliografía	- 179 -

Figura 1. Esquema de la fase de sensibilización y de la fase efectora	- 9 -
Figura 2. proceso inflamatorio.....	- 10 -
Figura 3. componentes del sistema inmune intestinal.....	- 13 -
Figura 4. Mecanismos de tolerancia oral	- 17 -
Figura 5. Esquema de prick test.....	- 22 -
Figura 6. Algoritmo diagnóstico en la alergia a la leche mediada por IgE.	- 25 -
Figura 7. Estructura de la toxina colérica	- 31 -
Figura 8. Esquema general de sensibilización	- 40 -
Figura 9. Curva de amplificación de pcr tiempo real	- 50 -
Figura 10. Esquematización del procedimiento de fraccionamiento celular.....	- 55 -
Figura 11. Evaluación de la respuesta alérgica inducida.	- 68 -
Figura 12. Prueba cutánea.....	- 69 -
Figura 13. Determinación de IgE, IgG1 e IgG2a sérica específicas para PLV	- 71 -
Figura 14. Concentración de citoquinas en sobrenadante de cultivo de esplenocitos y células de ganglios mesentéricos	- 72 -
Figura 15. Expresión de RNAm de citoquinas y factores de transcripción por qPCR.....	- 74 -
Figura 16. Signos clínicos inducidos luego del desafío oral y niveles séricos de IgE específica	- 85 -
Figura 17. Niveles séricos de IgE específica para PLV por EAST	- 86 -
Figura 18. Valores séricos de IgG1 e IgG2a específicos	- 87 -
Figura 19. Concentración de citoquinas.....	- 88 -
Figura 20. Prueba de DTH.....	- 89 -
Figura 21. Expresión de CCL20 en A549 por qPCR	- 90 -
Figura 22. Score de signos clínicos inducidos luego del desafío oral y niveles de IgE sérica específica	- 92 -
Figura 23. Score clínico en ratones sensibilizados que recibieron distintos tratamientos con Omp	- 94 -
Figura 24. Prueba cutánea en los ratones sensibilizados y tratados con Omp	- 95 -
Figura 25. Niveles séricos de isotipos específicos de PLV	- 96 -
Figura 26. Prueba de DTH.....	- 96 -

Figura 27. Concentración de citoquinas	- 97 -
Figura 28. Expresión de RNAm de citoquinas por qPCR	- 98 -
Figura 29. Estudio <i>in vitro</i> en Caco-2	- 99 -
Figura 30. Expresión de RNAm CCL20 en Caco-2	- 100 -
Figura 31. Evaluación <i>in vivo</i> de la respuesta inducida por el desafío oral con PLV	- 102 -
Figura 32. Prueba cutánea con PLV en animales sensibilizados y tratados	- 102 -
Figura 33. Isotipos específicos a PLV sérico	- 103 -
Figura 34. Prueba de DTH con PLV en los ratones sensibilizados y tratados	- 104 -
Figura 35. Concentración de citoquinas	- 105 -
Figura 36. Expresión de RNAm de citoquinas Th1 y Th2 por qPCR	- 106 -
Figura 37. Expresión de RNAm de quimioquinas de citoquinas en Caco-2	- 116 -
Figura 38. Expresión relativa de luciferasa	- 117 -
Figura 39. Expresión relativa de luciferasa en células Caco-luc en reposo o activadas	- 117 -
Figura 40. Expresión relativa de luciferasa bajo condiciones de cultivo con distinta relación bacterias: células	- 118 -
Figura 41. Producción de CCL20 bajo condiciones de cultivo con distinta relación bacterias: células	- 118 -
Figura 42. Expresión relativa de luciferasa frente a un panel de 10 especies distintas de Actinomycetales	- 119 -
Figura 43. Expresión relativa de quimioquinas pro-inflamatorias en Caco-2 activadas e incubadas con bacterias Actinomycetales	- 120 -
Figura 44. Expresión relativa de citoquinas pro-inflamatorias en Caco-2 activadas e incubadas con bacterias Actinomycetales	- 121 -
Figura 45. Inmunoblotting de componentes de la vía de señalización de NF- κ B en células Caco-2	- 122 -
Figura 46. Inmunofluorescencia de células Caco-2 activadas y tratadas con Gb	- 123 -
Figura 47. Generación de ROS en células Caco-2 por microscopía de fluorescencia	- 124 -
Figura 48. Generación de ROS en células Caco-2 en presencia de anti-oxidantes por microscopía de fluorescencia	- 124 -
Figura 49. Microscopia electrónica correspondiente a células Caco-2 en presencia de Gb	- 126 -
Figura 50. Microscopia de barrido electrónico de células Caco-2 activadas con flagelina en presencia de Gb	- 126 -

Figura 51. Expresión de RNAm CCL20 en loops intestinales en ratones BALB/c	- 127 -
Figura 52. Expresión y modulación de quimioquinas y citoquinas en intestino delgado de ratón.....	- 128 -
Figura 53. Expresión de RNAm CCL20 en el intestino de animales tratados con Gb y Rc	- 128 -
Figura 54. Score clínico posterior al desafío oral en los animales que fueron sensibilizados y tratados	- 131 -
Figura 55. Niveles de isotipos específicos a PLV séricos.....	- 132 -
Figura 56. Niveles de IgA específica a PLV en materia fecal	- 132 -
Figura 57. Concentración de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos.....	- 133 -
Figura 58. Expresión de RNAm de citoquinas por qPCR.....	- 134 -
Figura 59. Concentración de citoquinas medidas por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de células mononucleares aisladas de ganglios mesentéricos	- 135 -
Figura 60. Expresión de RNAm de citoquinas por qPCR en células de Lámina propia.....	- 135 -
Figura 61. Resultado de las pruebas de DTH.....	- 136 -
Figura 62. Score clínico e isotipos de anticuerpos en ratones de la cepa BALB/c sensibilizados y tratados	- 137 -
Figura 63. Evaluación <i>in vivo</i> de la respuesta inducida	- 150 -
Figura 64. Isotipos específicos a PLV o PS sérico.....	- 152 -
Figura 65. Concentración de citoquinas en sobrenadante de cultivo de esplenocitos.....	- 153 -
Figura 66. Concentración de citoquinas en sobrenadante de cultivo de MLN.....	- 154 -
Figura 67. Prueba Cutánea.....	- 155 -
Figura 68. Prueba de DTH.....	- 156 -
Figura 69. Evaluación <i>in vivo</i> de la respuesta inducida.....	- 158 -
Figura 70. Prueba cutánea.....	- 158 -
Figura 71. Isotipos específicos a PLV sérico	- 159 -
Figura 72. Determinación de IgA específica de PLV en materia fecal	- 159 -
Figura 73. Concentración de citoquinas.....	- 160 -
Figura 74. Expresión de Foxp3 por citometría.....	- 161 -
Figura 75. Intensidad de fluorescencia media (MFI) de Foxp3	- 162 -
Figura 76. Expresión de RNAm de citoquinas	- 162 -
Figura 77. Expresión de RNAm de citoquinas	- 163 -

Tabla 1. Escala de puntajes utilizada para evaluar la intensidad de los signos clínicos observados luego del desafío oral.....	- 42 -
Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de genes murinos expresados en muestras de ratón.....	- 52 -
Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de genes humanos expresados en las líneas celulares.....	- 52 -
Tabla 4 Transferencia Cutánea Pasiva.....	- 70 -
Esquema 1 Protocolos de sensibilización.....	- 67 -
Esquema 2 Protocolos de sensibilización y modulación con Omp-16 sc.....	- 84 -
Esquema 3 Protocolos de sensibilización y modulación con Omp-16 in.....	- 91 -
Esquema 4 Protocolos de sensibilización y modulación con Omp-16 in.....	- 93 -
Esquema 5 Protocolos de sensibilización y modulación con Omp-16 ig.....	- 101 -
Esquema 6 Protocolos de sensibilización y modulación con Gb.....	- 130 -
Esquema 7 Protocolo de sensibilización.....	- 149 -
Esquema 8 Protocolos de sensibilización y tolerización.....	- 157 -

*Resumen, hipótesis y
Objetivo general*



Resumen

La alergia a las proteínas que contiene la leche de vaca (LV) es la alergia alimentaria más frecuente en nuestro país, y en muchas regiones del mundo, y se presenta principalmente en niños menores de 3 años (6 á 8%). La alergia puede presentarse desde los primeros meses de vida debido a la exposición temprana a las proteínas de leche de vaca, y se estima que en el 80-90% de los pacientes aproximadamente se inducen los mecanismos de tolerancia específica a partir de los 3 á 6 años de vida que permiten un adecuado control inmunológico de estos alergenicos en la mucosa gastrointestinal. Para su tratamiento la primera elección terapéutica es la dieta de supresión, evitando toda estimulación antigénica. Sin embargo, en lactantes significa una tarea muy difícil y debe reemplazarse por un sustituto lácteo, que generalmente son hidrolizados extensivos de las proteínas de LV. Un sustituto alternativo frecuentemente empleado en nuestro medio son las fórmulas a base de proteínas de soja. Aunque suelen ser tolerados por la mayoría de los pacientes la literatura internacional describe que un 15-40% de los pacientes alérgicos a las proteínas de LV no toleran las proteínas de soja, aún cuando no han sido previamente expuestos a la soja. Nuestro grupo ha descrito la existencia de reactividad cruzada entre las proteínas de LV y de soja lo cual permite explicar la intolerancia descrita (Rozenfeld et al.2002; R Curciarello et al. 2008; Smaldini et al. 2011). Otra dificultad que el médico debe considerar con la familia del chico alérgico, y no es menor, es el hecho que las proteínas de la leche (y de la soja) son frecuentemente utilizadas por la industria alimenticia como suplemento por sus propiedades funcionales. Esto determina que la educación del paciente y su entorno en cuanto a qué alimentos pueden comer y cuáles no es un punto fundamental en el tratamiento. Inclusive estas proteínas también pueden presentarse como alergenicos ocultos no declarados por el fabricante, o como contaminantes de un alimento. A partir de estas observaciones, en este trabajo se decidió optimizar un modelo murino de alergia a proteínas de leche bovina, previamente desarrollado por el grupo, para su posterior empleo como herramienta *in vivo* para distintos tipos de estudios. En este trabajo de tesis, el mismo se ha empleado para evaluar potenciales estrategias terapéuticas basadas en la inmunomodulación. De esta manera hemos logrado re-direccionar el sistema inmune, o la respuesta inmune Th2-dependiente específica de alergenicos de la leche bovina administrando por mucosas proteínas de membrana de *Brucella abortus*, bacterias muertas del género *Actinomycetales*, y proteínas de leche de vaca o de soja. En los 3 casos los mecanismos inmunológicos inducidos son diferentes, pero tienen en común que cuando el animal

alérgico y tratado es expuesto a proteína de leche bovina por vía oral, los síntomas inducidos son más suaves en comparación con un ratón alérgico no tratado. Estos resultados son alentadores para el desarrollo de futuras terapias inmunomodulatorias a aplicar en pacientes con alergia alimentaria explotando la posible modulación de la inmunidad sistémica a través de la manipulación del sistema inmune asociado a mucosas, y de la interconexión que existe entre las mismas.

Es importante resaltar que en un individuo no alérgico la tolerancia oral es el proceso que evita la instauración de mecanismos de hipersensibilidad frente a la exposición a antígenos de la dieta y de la flora comensal en la mucosa gastrointestinal. En individuos alérgicos, y por razones aún no completamente dilucidadas, fallas en los mecanismos de tolerancia a los alérgenos que ingresan por la vía oral determinan una activación aberrante del sistema inmune local y sistémico, y la consiguiente instauración de un proceso inflamatorio en la mucosa. Hay trabajos que demuestran que el balance tolerancia vs activación en estos pacientes no funciona adecuadamente (Sicherer y Sampson 2006; J. Wang y Sampson 2011) y los estudios aquí planteados podrían ser la base experimental para el desarrollo de futuras terapias preventivas o correctivas.

Hipótesis de trabajo

La hipótesis de trabajo sobre la cual se basan los objetivos propuestos en este proyecto es que la administración por diferentes vías mucosales de antígeno y/o MAMPs es capaz de inducir una respuesta Th1 específica o tolerogénica en un modelo murino de alergia alimentaria y el consiguiente re-direccionamiento de la respuesta Th2 específica de antígenos dietarios inducida.

Objetivo general

Modular la respuesta inmunológica específica Th2 de antígenos dietarios en animales sensibilizados en un modelo murino de alergia alimentaria, mediante la aplicación de diferentes estrategias experimentales dirigidas a inducir tolerancia o una respuesta Th1 específica, basadas en el empleo de antígenos solos o combinados con el uso de bacterias o componentes bacterianos.

Introducción



Enfermedades alérgicas

Los organismos viven en un medio en el cual están en permanente contacto con microorganismos, muchos de los cuales son patógenos para determinados seres vivos. La supervivencia de los organismos en el ambiente es posible gracias a la existencia de mecanismos de defensas. A lo largo del tiempo los microorganismos se han adaptado a sobrevivir en diferentes medios y en muchos casos han tenido que invadir seres vivos donde hallan los metabolitos y las condiciones necesarias para su replicación. De esta manera tanto los organismos como los microorganismos han co-evolucionado a lo largo del tiempo y mantenido una supervivencia que posibilita su co-existencia. El sistema inmune también ha sufrido grandes cambios a lo largo de la escala evolutiva y esto refleja la presión selectiva ejercida por el medio en el cuál se desarrollan, a través de la presencia de los microorganismos. Por lo tanto el sistema inmune desempeña importantes funciones en la detección y defensa frente a las infecciones microbianas. Sin embargo, bajo determinadas circunstancias, se generan respuestas inmunes que pueden tener efectos nocivos contra antígenos (Ag) inocuos (propios o extraños), ocasionando daño en los tejidos, patologías graves, e incluso la muerte. En estos casos el sistema inmune se activa en forma inadecuada o no se regula como corresponde, y estas respuestas en su conjunto, reciben el nombre de **reacciones de hipersensibilidad**. En ellas los microorganismos pueden estar directamente (enfermedades autoinmunes) o indirectamente (enfermedades alérgicas) involucrados. Cuando el Ag es una proteína extraña, inocua, ampliamente distribuida en el ambiente, aparentemente no relacionada con antígenos microbianos, el Ag se denomina **alergeno** y la respuesta inmune se denomina **alergia**. Sin embargo trabajos recientes relacionan la secuencia aminoacídica de los alergenos con la de antígenos parasitarios (Fitzsimmons y Dunne 2009; Santiago et al. 2011). Si se trata de un Ag presente en un tejido propio, la respuesta se denomina *autoinmunidad*.

Las **enfermedades alérgicas** son manifestaciones clínicas producto de una falla en los mecanismos de activación o regulación de la respuesta inmune frente a antígenos inocuos, ampliamente distribuidos en el ambiente. Este tipo de respuesta denominada reacciones de hipersensibilidad, fueron clasificadas clínicamente por Gell y Coombs en la década del 60 (Gell y Coombs 1963) en cuatro tipos de reacciones: mecanismos de hipersensibilidad tipo I, II, III y IV. Originalmente fueron clasificados en cinco tipos de reacciones de

hipersensibilidad, aunque con el tiempo el tipo V fue incluido en el tipo II. Actualmente se conocen los mecanismos moleculares y celulares que las originan y se clasifican a las reacciones de tipo I, II y III como reacciones mediadas por anticuerpos, mientras que la de tipo IV está mediada por células. Una reacción alérgica puede ser causada por cualquiera de los 4 mecanismos, e inclusive es común que varios mecanismos se presenten en forma simultánea o secuencial en el tiempo. Esto determina que en numerosas ocasiones se identifiquen más de un elemento inmunopatogénico, células y/o moléculas, lo cual puede dificultar el diagnóstico.

En particular nos interesa profundizar el análisis de las reacciones de **hipersensibilidad tipo I o inmediatas**. Éstas se caracterizan por la producción exacerbada de **inmunoglobulinas IgE**, proceso mediado por los **linfocitos T (LT) helper CD4⁺ de fenotipo Th2** (LT Th2) y los **linfocitos B (LB)**. La interleuquina-4 (IL-4) producida por las células Th2 es esencial para la síntesis de la IgE, mientras que la IL-3, la IL-5 y el factor estimulador de la formación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) favorecen la producción y la supervivencia de **mastocitos, eosinófilos y basófilos**, los cuales unen la IgE, sintetizada y secretada por las células plasmáticas, a través de sus receptores de membrana de alta afinidad y de baja afinidad (Morafo et al. 2003). Estas células “sensibilizadas” con los anticuerpos IgE, al contactar el alérgeno, en exposiciones posteriores, para activarse requieren que una misma molécula de alérgeno sea capaz de unir y puentear al menos dos complejos IgE/IgE R_c con la consiguiente generación de una señal intracelular que culmina con la degranulación y liberación del contenido de sus gránulos citosólicos en forma inmediata, y con la síntesis *de novo* de otros mediadores pro-inflamatorios que mantienen el foco inflamatorio en el tiempo. Por lo tanto una reacción de este tipo requiere de una **fase de sensibilización** y una fase posterior **efectora**. Asimismo es importante tener en cuenta que el proceso inflamatorio inducido por la fase efectora consta de dos etapas: una inmediata (a los 30-60 minutos de la exposición al alérgeno) y una tardía (a las 24-72 hs de la exposición original) (**figura 1**).

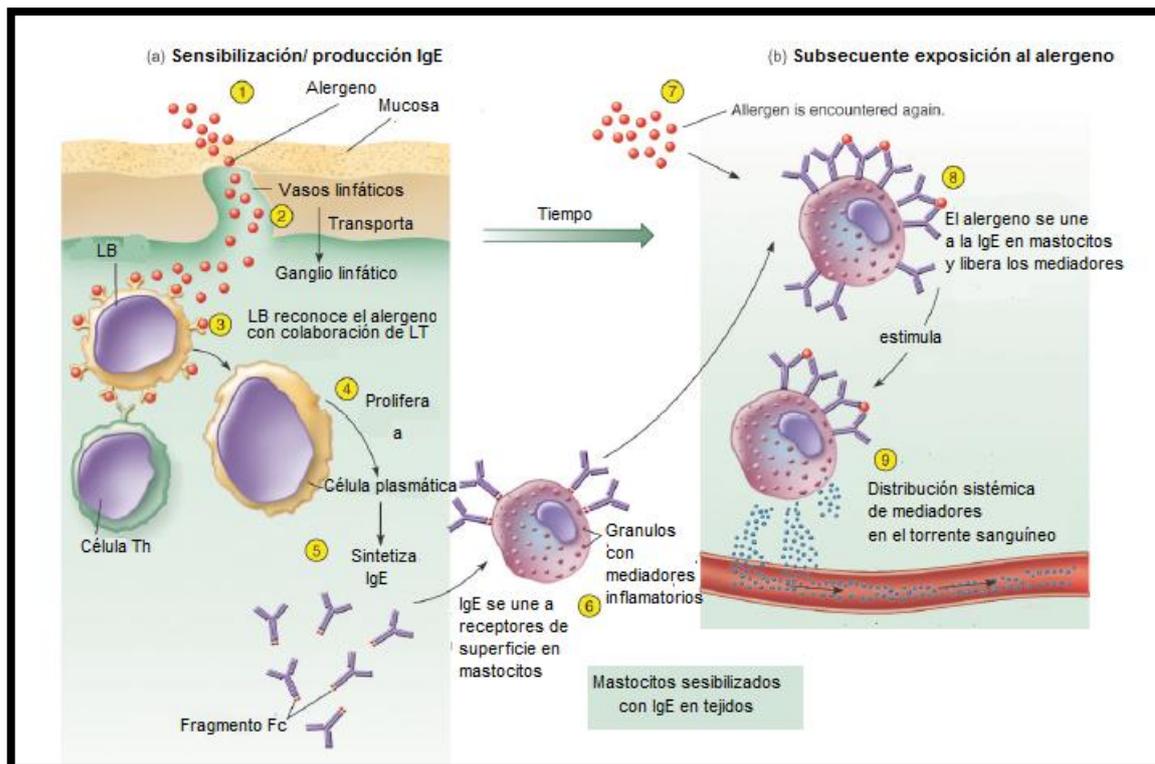


Figura 1. Esquema de (a) la fase de sensibilización y (b) de la fase efectora. (Figura adaptada de copyright © The Mc-Graw Hill Companies, Inc.)

Dado que las principales sustancias que se encuentran en los gránulos tienen una importante función pro-inflamatoria, entre ellas la histamina es la más importante, se genera un proceso inflamatorio intenso e inmediato. Además se induce la síntesis de una serie de mediadores pro-inflamatorios (prostaglandinas y leucotrienos) cuya función será sostener el proceso inflamatorio en el tiempo a través de vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar, hipersecreción glandular, espasmo del músculo liso e infiltración tisular de eosinófilos y otras células inflamatorias que son atraídas específicamente al foco inflamatorio.

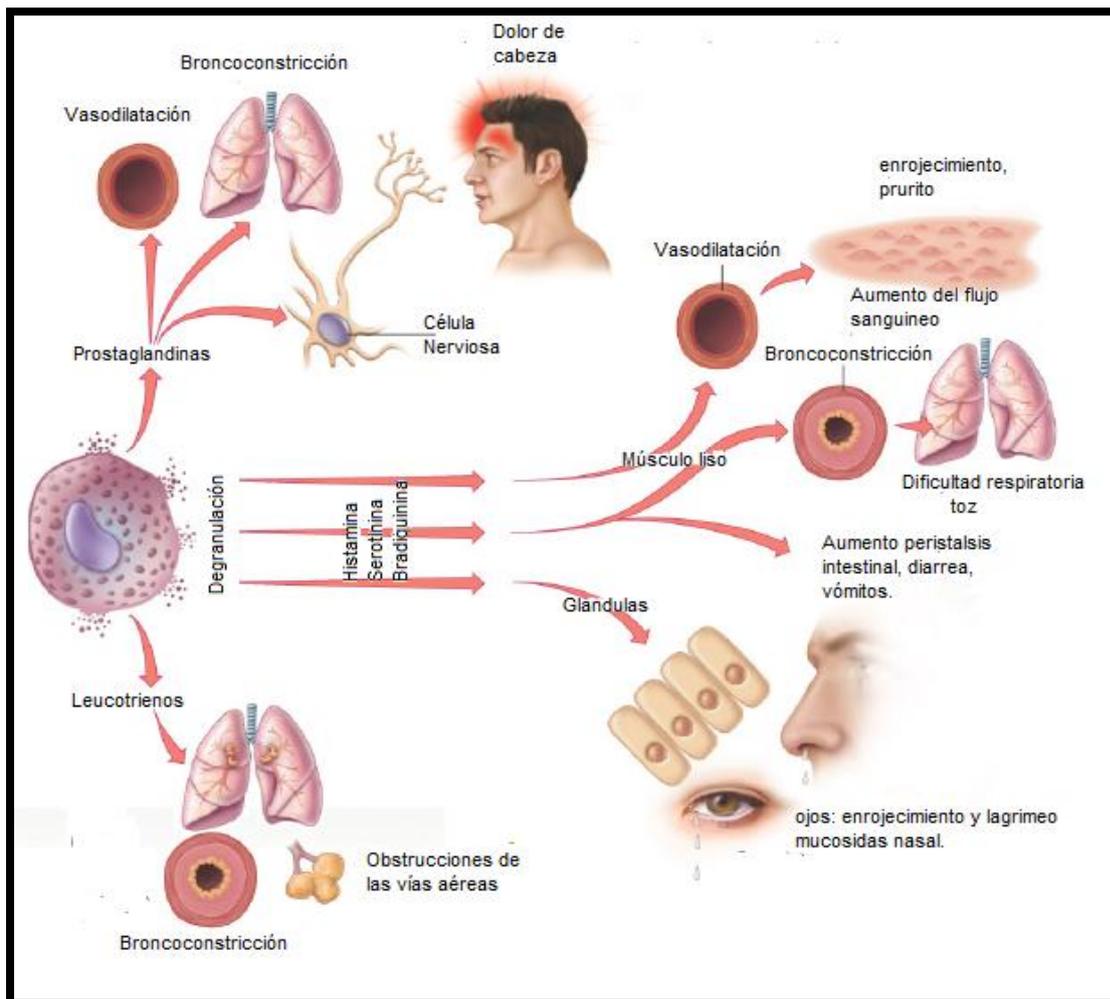


Figura 2. Esquema del **proceso inflamatorio** desarrollado por la desgranulación y liberación de mediadores químicos al torrente sanguíneo; con la consecuente aparición de signos cénicos en diversos órganos. (Figura adaptada de copyright © The Mc-Graw Hill Companies, Inc.)

Cuando estos eventos se producen reiteradamente, el proceso inflamatorio puede llegar a alterar la histología y la fisiología del tejido y del órgano, principalmente si intervienen células como eosinófilos o neutrófilos. En este caso estamos ante una **reacción alérgica (figura 2)**.

El término **atopía** fue introducido por Coca en 1923 y se refiere a la tendencia personal y/o familiar de producir niveles elevados de anticuerpo IgE en respuesta a la exposición de alérgenos, usualmente proteínas. Como consecuencia, se desarrollan síntomas típicos de asma, rinoconjuntivitis o eczema (Johansson et al. 2004).

El modo de herencia de esta condición es poligénica y multifactorial. Se ha descrito un polimorfismo en numerosos genes que están asociados al funcionamiento del sistema inmune, tratándose de genes de susceptibilidad. Por lo tanto se trata de una patología que presenta una base poligénica de predisposición asociada a una serie de factores ambientales

disparadores. El marcado incremento en la incidencia de este tipo de enfermedades en las últimas décadas no puede atribuirse a cambios en la constitución genética de los individuos, por lo cual las causas deberían encontrarse en los factores ambientales disparadores. Aunque estas enfermedades no están directamente relacionadas con la presencia de microorganismos, éstos están íntimamente involucrados en la inducción y regulación de los mecanismos inmunológicos específicos de los alérgenos. Así, la Hipótesis de la higiene hace referencia a que principalmente en país industrializados, o hábitos de vida “occidentalizados”, una menor exposición a microorganismos intracelulares patógenos en los últimos tiempos (mejores planes de vacunación, mejores antibióticos, hábitos de vida con menor contacto con la naturaleza, etc.), junto a una mayor exposición a alérgenos (hábitos de vida más intra-domiciliarios, más de hora de trabajo en lugares cerrados con calefacción o refrigeración cerrada, mayor amueblamiento y alfombras en los hogares, etc) ha sido determinante en la instauración de mecanismos Th2-dependientes en contra-posición a los Th1-mediados que operan frente a microorganismos patógenos (Strachan 1989). Sin embargo, actualmente esta teoría es debatible dado que tanto las patologías Th2- (alergias), como las Th1-mediadas (autoinmunes) se han incrementado en las últimas décadas (Schaub, Lauener, y von Mutius 2006; Okada et al. 2010). En los últimos años, se ha descrito que en este tipo de patologías la causa puede radicar en fallas a nivel de los mecanismos de tolerancia (Cochrane et al. 2009; MacDonald y Di Sabatino 2009; Perrigoue et al. 2009). En este sentido la exposición a microorganismos comensales es esencial para el desarrollo del sistema inmune asociado a las mucosas, principalmente a través de la producción de citoquinas inmunosupresoras como IL-10 o TGF- β (M Wills-Karp, Santeliz, y Karp 2001). De esta manera, la presencia de microorganismos procarióticos favorece el desarrollo de los distintos mecanismos de tolerancia a los Ags inocuos presentes en estas mucosas (flora comensal y antígenos del medio ambiente y dietarios) (Sudo et al. 1997; Wannemuehler et al. 1982). Para el caso particular de los individuos alérgicos, se ha observado que la flora comensal en niños con alergia alimentaria difiere de la de un individuo no alérgico, por lo cual en estos casos la microbiota podría estar relacionada con un funcionamiento anómalo de los mecanismos regulatorios del sistema inmune (F. He et al. 2001). El desarrollo post-natal de la homeostasis del sistema inmune de mucosas depende del establecimiento en el tiempo de la microflora comensal, y de la introducción de los alimentos en los primeros meses y años de vida (Brandtzaeg 2002). Así se ha demostrado que la completa maduración de las distintas

estructuras linfoides que se encuentran en la mucosa gastrointestinal sólo se alcanza luego del nacimiento, una vez que la flora comensal ha comenzado a poblar la mucosa.

Sistema inmune de mucosas

Las mucosas son la principal vía de entrada de la mayoría de los antígenos que el sistema inmune debe enfrentar. La principal razón que permite explicar este fenómeno es que en estos sitios anatómicos se produce un intenso intercambio de nutrientes o gases, junto a funciones digestivas y de absorción. Para maximizar la eficiencia de estos procesos las mucosas tienen un área efectiva que supera holgadamente la superficie corporal, 400 m² vs 20 m², respectivamente en un adulto. Estas superficies están recubiertas por una monocapa de células epiteliales que cumplen 2 funciones: como barrera física que separa el lumen, en el cual se encuentran los antígenos del medio ambiente y microorganismos, del medio interno por un lado, y como un elemento esencial del sistema inmune por su capacidad de detectar procariones e interactuar con células inmunes. Por lo tanto las mucosas constituyen un muy extenso sistema permeable por donde pueden ingresar al organismo distintos tipos de Ags.

El *sistema inmune de mucosa (SIM)* intestinal es un sistema complejo que está expuesto a un ambiente que recibe cada día una gran cantidad de carga antigénica proveniente de bacterias comensales, proteínas de la dieta, proteínas del ambiente y microorganismos patógenos (Mayer 2003). Se han descrito distintos SIM (en la cavidad oral, esófago, laringe, intestino, árbol respiratorio, sistema genito-urinario, glándulas exócrinas, etc), siendo el más complejo el tejido linfóide asociado a la mucosa gastrointestinal (GALT-gut associated lymphoid tissue). Los SIM tienen 2 compartimentos funcionales: el *sitio inductivo* que incluye los ganglios regionales y corresponde al tejido donde se inducen los elementos efectoras, y el *sitio efector* que corresponde al tejido donde los elementos del sistema inmune inducidos cumplen sus funciones efectoras. En el GALT podemos diferenciar estos dos compartimentos: a) GALT organizado, es el sitio inductivo para la respuesta inmune intestinal formado por Placas de Payer (PP), folículos aislados, “vellosidades llenas de linfocitos” y ganglios linfáticos mesentéricos, y b) GALT difuso, sitio efector de la respuesta inmune formado por el compartimento epitelial y la lámina propia (Mowat et al. 2003). Este tejido linfóide como se mencionó anteriormente está separado del lumen intestinal por una monocapa de células epiteliales que en el caso del sitio efector se denomina FAE o epitelio asociado al folículo. Aproximadamente el 10% de las células epiteliales tienen características muy particulares y se denominan células M. Estas células no sólo se localizan en el FAE, sino que recientemente se ha descubierto que se encuentran distribuidas en todo el compartimento

epitelial del GALT. Su función es la de trasladar antígenos del lumen intestinal al interior, para lo cual su cara basal presenta concavidades en las cuales se alojan células dendríticas, macrófagos o linfocitos. Otra característica que las diferencia de las células epiteliales es que su cara apical no expresa enzimas hacia el lumen, y estas células tienen una muy baja capacidad de procesamiento o degradación. Otra célula muy particular que se intercala entre las células epiteliales son las células Goblet o caliciformes. Su función es la producir el mucus y se distribuyen a lo largo del GALT, aunque su distribución no es homogénea y se encuentra mayor número en el intestino grueso. Las PP, ubicadas en la sub-mucosa del intestino delgado, contienen folículos o acúmulos de LB y áreas donde se concentran células T (**figura 3**). Las células B naïve forman el centro germinal y están en contacto con células dendríticas foliculares. Cada folículo está rodeado por un área parafolicular rica en células T las cuales también están en contacto con distintas células dendríticas (Mowat et al. 2003). En situación de homeostasis intestinal, cuando estos linfocitos B se activan en el sitio inductivo donde contactan al Ag, se diferencian a linfocitos IgA^+ , luego del switch isotípico inducido por la colaboración T y se dirigen a los MLN para completar el proceso de diferenciación y maduración. Luego migran al sitio efector. (Tsuji et al. 2009; K. Suzuki et al. 2010).

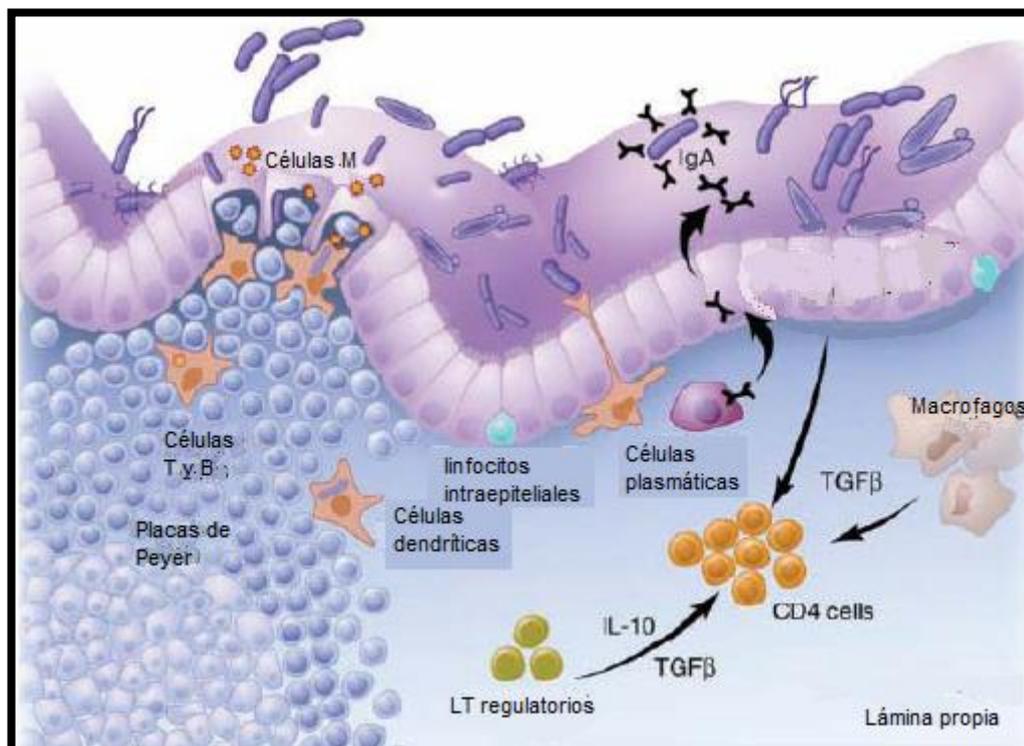


Figura 3. Representación esquemática de los principales componentes del sistema inmune intestinal (Figura adaptada de MacDonald & Monteleone, Science 2005)

En este escenario tan particular, el sistema inmune de la mucosa gastrointestinal es el encargado de discernir entre inducir mecanismos de tolerancia (frente a antígenos de la dieta

que son necesarios absorber, o de la flora comensal que son necesarios preservar en el medio externo) o de activación inmunológica (frente a antígenos o microorganismos patogénicos). La compleja interacción molecular y celular que se establece en las mucosas permite mantener un estado de homeostasis en el cual el sistema inmune es capaz de discernir y “clasificar” a los distintos antígenos y decidir qué tipo de mecanismo efector activar cuando sea necesario. En este proceso es fundamental la participación de las células epiteliales y los distintos elementos de la inmunidad innata, para luego posibilitar la inducción de la inmunidad adaptativa con la participación de los diferentes sitios inductivos de las mucosas, junto a los ganglios regionales (Mowat et al. 2003). Por lo tanto las células del sistema inmune que se encuentran en el epitelio de las mucosas están ubicadas en el sitio donde se produce la exposición temprana a los distintos antígenos. Recientes evidencias experimentales han demostrado que las células epiteliales interactúan con otras células de la inmunidad innata y adaptativa constituyendo un elemento esencial en el inicio de la respuesta inmune (Sokol et al. 2008; H. Li et al. 2007).

Por otro lado, las células epiteliales intervienen en el ingreso de los Ags al organismo. La mayoría de las macromoléculas ingeridas alcanzan la circulación ya degradadas, pero una pequeña parte lo hace en estado nativo. Esto es consecuencia de los diferentes mecanismos de traslocación o captación de antígenos y nutrientes que operan en las mucosas:

-mecanismo paracelular: los Ags ingresan a través de las uniones estrechas, sin ingresar a las células epiteliales. De esta manera pasan al medio interno sin ser procesados, y aunque ocurre en un muy bajo porcentaje, si lo extendemos a toda la superficie cubierta por células epiteliales constituye el principal mecanismo para traslocar Ags nativos.

-mecanismo transcelular: los Ags ingresan a través de las células epiteliales y son procesados intracelularmente. Aunque es controversial si una célula epitelial puede comportarse como una célula presentadora de Ag profesional se ha demostrado que puede haber presentación de péptidos en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (clase I y II) (Hershberg y Mayer 2000), por lo pueden inducir la activación de linfocitos CD4 y CD8. Preferentemente con Ags inocuos ocurre presentación en moléculas clase I y esto da lugar a LT CD8 supresores, en ausencia de un microentorno inflamatorio.

- mecanismos mediados por células M: estas células tienen la capacidad de traslocar Ags sin procesarlos y constituye un mecanismo de muestreo del contenido luminal a las células del sistema inmune subyacente.

Estos distintos procesos de muestreo de Ag están íntimamente relacionados con la inducción de mecanismos de activación inmunológica o tolerancia que describiremos a continuación.

Tolerancia inmunológica

Se denomina *tolerancia oral* al conjunto de mecanismos que median la inducción de tolerancia o falta de activación frente a antígenos que ingresan por la vía oral, los cuales si ingresaran por otra vía inducirían mecanismos de activación inmunológica. Por lo tanto en un individuo normal la tolerancia oral es la que posibilita no inducir mecanismos inmunes efectores o de hipersensibilidad frente a antígenos de la dieta y de la flora comensal (MacDonald y Monteleone 2005). En individuos alérgicos, y por razones aún no completamente dilucidadas, el balance tolerancia vs activación no funciona adecuadamente y existen evidencias experimentales que apoyan tanto la hipótesis de una tolerancia deficiente, como de una activación aberrante, frente a antígenos de la dieta o alergenitos alimentarios. Lo que sí está claro es que los linfocitos Th2 específicos de los alergenitos son centrales en la inmunopatogenia de las enfermedades IgE-mediadas (Beyer et al. 2002). Por lo tanto, en un individuo con alergia alimentaria se producen fallas en el reconocimiento inmune de los alergenitos y en lugar de inducirse mecanismos de tolerancia, se activan mecanismos Th2-dependientes, responsables de la síntesis exacerbada de anticuerpos IgE específicos (Nowak-Wegrzyn 2003).

Los alergenitos son sustancias antigénicas, pero inocuas y no relacionados con componentes procarióticos. Por lo tanto no son reconocidos por los receptores de la inmunidad innata y de esta manera la respuesta esperable frente a los mismos es la inducción de mecanismos de tolerancia. Sin embargo, se ha encontrado que las reacciones alérgicas son influenciadas por mecanismos de la inmunidad innata. Originalmente se describió en dermatitis atópica que células de la piel producen en forma exacerbada una quimioquina llamada linfopoyetina del estroma tímico (TSLP), aunque luego se evidenció experimentalmente que células epiteliales de las mucosas gastrointestinal y respiratoria secretan en forma exacerbada esta quimioquina (Soumelis et al. 2002; Kashyap et al. 2011). TSLP en ratones interviene en la ontogenia de los LT en el timo, mientras que en humanos participa en mecanismos efectores de la inmunidad innata que dan origen a respuestas Th2-dependientes (Al-Shami et al. 2005; Kitajima et al. 2011) y en el control del pool de linfocitos T de memoria (Wang et al. 2006). Recientemente se ha encontrado que el control genético de

esta quimioquina está desregulado en individuos alérgicos (Semlali et al. 2010; S. F. Ziegler 2010) y se ha observado que a través de las células dendríticas de la mucosa es capaz de modular la inmunidad adaptativa hacia un perfil Th2. Sin embargo, también se ha demostrado *in vitro* que TSLP puede actuar directamente sobre células T vírgenes y promover su diferenciación a linfocitos Th2. TSLP induce la transcripción del factor Gata3 de manera Stat6-dependiente, y este factor aumenta la expresión de IL-4, citoquina fundamental para que se produzca la diferenciación a LT Th2 (Omori y Ziegler 2007). Sin embargo, recientemente se ha descrito que en ratones, TSLP también es capaz de intervenir en la diferenciación de LT a LT Th2 (Soumelis et al. 2002; Wang et al. 2006; J. Tanaka et al. 2010; Ying et al. 2005). Ratones transgénicos para TSLP presentan inflamación sistémica, principalmente en pulmón, u órgano-específica dependiendo del promotor empleado (Zhou et al. 2005). Además, TSLP participa junto a NF-κB del proceso inflamatorio (Lee y Ziegler 2007) y llamativamente mapea en una zona cercana al clúster de citoquinas Th2 e IL-4R en el cromosoma 5 (Walley et al. 2001), genes en los que se han descrito polimorfismos en pacientes asmáticos. Por lo tanto, polimorfismo a nivel de los genes que codifican esta quimioquina serían marcadores de susceptibilidad para las enfermedades alérgicas (Hunninghake et al. 2008; R. He et al. 2008; C. J. Corrigan et al. 2009). Existen otras evidencias que indican que la inmunidad innata también está involucrada en la respuesta alérgica, a través de las endotoxinas y TLR4. Ciertos polimorfismos de moléculas adaptadoras del TLR4, están asociadas a un mayor riesgo de atopía (Simpson y Martinez 2010) debido a un reconocimiento y señalización defectuosa del LPS (Préfontaine et al. 2010). Por lo tanto defectos a nivel de reconocimiento y activación de la inmunidad innata están relacionados con fallas en la instauración de la tolerancia.

El fenómeno de tolerancia oral puede explicarse por tres mecanismos:

- a. Delección clonal: la administración oral de dosis altas de Ag conduce a la delección clonal, por apoptosis vía Fas/FasL, de los clones T específicos al Ag administrado.
- b. Anergia clonal: ocurre cuando el reconocimiento antigénico de los LT se produce en ausencia de la señal 2 co-estimuladora por parte de las APC.
- c. Inducción de LT regulatorios CD4⁺ CD25⁺, Tr1 y Th3. Dependiendo de las condiciones de inducción, especie, mucosa y caracterización experimental se han descrito distintas subpoblaciones de LTreg que no está claro si son distintas subpoblaciones celulares o se trata de una única población celular regulatoria dinámica. De esta manera se han descrito 3 tipos de Treg, que podrían estar vinculadas con fallas a nivel de tolerancia en alergia alimentaria.

Th3: Producen TGF- β y cantidades variables de IL-4 e IL-10. TGF- β sería la citoquina fundamental en el alcance de la tolerancia inmunológica. Se ha encontrado que la expresión de TGF- β e IL-10 se encuentra disminuida en linfocitos intestinales de pacientes alérgicos a leche cuando se cultivan *in vitro* en presencia de leche.

Tr1: Producen IL-10 que además actúa como un factor autócrino sobre estas células. IL-10 suprime las respuestas antígeno-específicas. Se ha demostrado la presencia de IL-10 en las PP de ratones tolerantes tras ser alimentados con β -lactoglobulina, pero no en ratones con anafilaxia inducida por β -lactoglobulina.

CD4⁺CD25⁺: Son células con poca capacidad de proliferación y que producen IL-2. Su actividad supresora está posiblemente mediada por la unión de TGF- β a receptores de membrana. Este tipo celular expresa el factor de transcripción Foxp3 que bloquea la respuesta Th1 y favorece la respuesta Th2. Se ha encontrado en individuos alérgicos menos cantidad de LTreg Foxp3⁺ en sangre periférica.

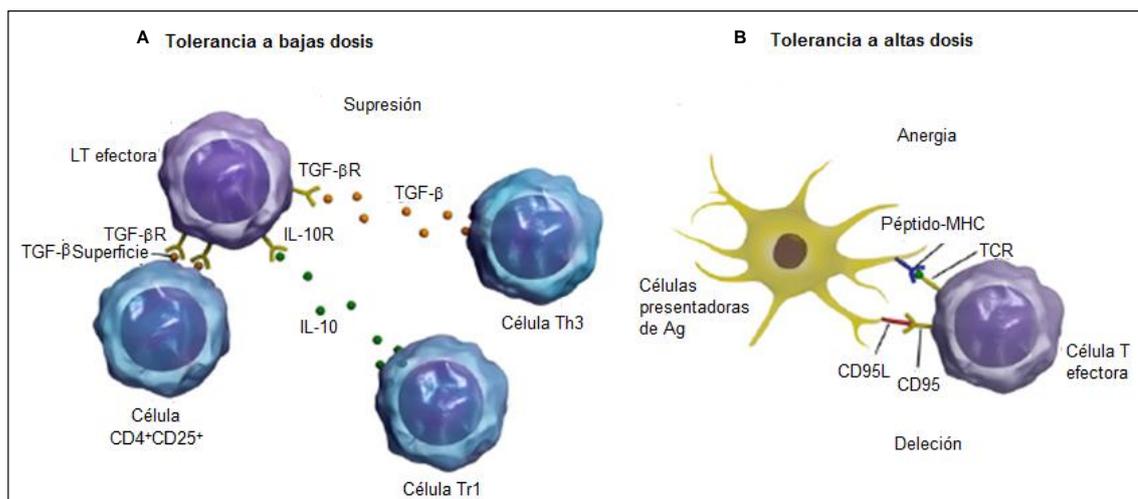


Figura 4. Mecanismos de tolerancia oral. (A) Antígenos en bajas dosis favorece la tolerancia a través de células T regulatorias, las cuales suprimen la respuesta inmune a través de citoquinas supresoras solubles o asociadas a la superficie celular. (B) Tolerancia a altas dosis está mediada por anergia o deleción clonal de los linfocitos. La anergia ocurre a través de la unión del receptor T en ausencia de señal co-estimuladora. La deleción clonal ocurre por apoptosis mediada por FAS (CD95) en LT activados. (Figura adaptada de Wesley Burks, *J.Allergy and Clinical Immunology*, 2008).

Alergia alimentaria

La alergia alimentaria es resultado de una *pérdida de tolerancia hacia las proteínas de la dieta* por una reacción adversa atribuida a una respuesta inmune anormal. Afecta principalmente a niños y en menor medida a adultos. Las reacciones alérgicas inducidas por alimentos son responsables de una gran variedad de síntomas, que involucran la piel, el tracto gastrointestinal y el tracto respiratorio; estos pueden ser causados por mecanismos IgE-

Autora: Smaldini Paola Lorena

Directores: Dr. Docena G. y Dr. Fossati C.

dependientes o IgE-independientes (Sicherer y Sampson 2010; J. Wang y Sampson 2011). Cabe resaltar que las enfermedades alérgicas son las patologías de origen inmunológico que con mayor incidencia se presentan en el mundo. En países desarrollados se han reportado datos de 20-30 % de incidencia con una tendencia a continuar incrementándose (Branum y Lukacs 2009). Este fenómeno genera enormes problemas económicos y sanitarios ya que afecta directamente la asistencia laboral, escolar y el estilo de vida de los pacientes.

Dado que uno de los principales factores predisponente a una enfermedad alérgica es la exposición y la edad, la leche de vaca (LV) constituye el principal alérgeno alimentario en numerosas regiones. Por ejemplo en Estados Unidos, además de la leche bovina y el huevo de gallina es muy importante el maní, y luego la soja, trigo, nueces, pescados y moluscos. En Europa son importantes las alergias alimentarias a manzana, sésamo, mostaza, lupines, cítricos, chocolates, avellanas, frutillas, kiwi, tomate, entre otros (R Asero et al. 2009; Cochrane et al. 2009; Roux et al. 2003; Wangorsch et al. 2007; Oberhuber et al. 2008; Cianferoni y Spergel 2009). En términos generales, más allá de la importancia de la constitución genética del individuo y sus hábitos dietarios, es relevante tener en cuenta que cualquier antígeno puede ser potencialmente alergénico, siempre y cuando tenga propiedades inmunogénicas y antigénicas. Más de 150 alimentos han sido descritos como alergénicos, sin embargo sólo 8 de ellos han sido descritos como los responsables de originar el 70-90 % de las alergias alimentarias, y por lo tanto deben ser indicados en la composición de un alimento. Estos son leche (y sus derivados), huevo (y productos a base de huevos), pescados (y productos a base de pescados), crustáceos (langosta, camarón, cangrejo), cereales que contienen gluten (trigo, cebada, centeno, avena), soja (y productos a base de soja), maní (y productos a base de maní) y frutas secas (nueces, avellanas, castañas y almendras) (S. Wilson et al. 2005; Solinas et al. 2010; Pascual et al. 2008; Cianferoni y Muraro 2012). Luego, la Unión Europea a este listado le agregó otros alérgenos que deben ser incluidos en el etiquetado de un alimento (apio, mostaza, sésamo, lupino, moluscos), y aditivos como anhídrido sulfuroso y sulfito.

Con respecto a la fisiopatogenia, las alergias alimentarias pueden ser clasificadas como:

a) **Dependientes de IgE:** los signos clínicos aparecen rápidamente (en minutos) luego de la exposición al alérgeno; son las mejor caracterizadas desde el punto de vista de los mecanismos moleculares y celulares involucrados y constituyen más del 60 % de las alergias alimentarias. Los signos clínicos más frecuentes con que se presentan son: diarrea, urticaria,

eczema, asma, rinitis, distensión abdominal, el síndrome de alergia oral con manifestaciones peri-orales, esofagitis, anafilaxia, etc.

b) **Mediadas por células:** pueden estar involucrados los linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺, eosinófilos, neutrófilos o macrófagos. En general la presentación clínica es tardía (horas o días) a la exposición a los alérgenos y suelen manifestarse como enterocolitis, esofagitis, enteritis, dermatitis de contacto, proctocolitis, etc.

c) **Mixtas o mediadas por IgE y células:** son muy comunes, se detectan anticuerpos IgE específicos del alérgeno, pero además participan células en la instauración del proceso inflamatorio y daño tisular. Suelen presentarse como dermatitis atópica, esofagitis, gastroenteritis o enteritis eosinofílicas.

No se encuentra completamente dilucidado la razón por la cual la alergia alimentaria se manifiesta preferentemente en la niñez. Se puede inferir que el contacto temprano con antígenos dietarios a través de la mucosa gastrointestinal determina una marcada sensibilización en este sitio anatómico. Además es importante tener en cuenta que existe una inmadurez inmunológica en la mucosa gastrointestinal, debida a una inmadurez anatómo-histológica, al establecimiento de la flora comensal intestinal y la incipiente interacción entre ésta y los elementos del sistema inmune que comienzan a poblar la mucosa (Sicherer y Sampson 2006). De igual manera se debe considerar que la sensibilización a través del ingreso de antígenos por la piel es importante en la instauración de los signos clínicos como la dermatitis, frecuentemente asociados a trastornos gastrointestinales. Por ejemplo numerosas cremas y aceites frecuentemente empleados a edades tempranas contienen alérgenos de LV (Jarmoc y Primack 1987; Saloga y Knop 2000). Asimismo las células inmunes que se originan en una determinada mucosa pueden alojarse en otras mucosas relacionadas y esto podría explicar porque un antígeno que ingresa por tracto gastrointestinal suele ocasionar síntomas en el árbol respiratorio, por ejemplo (J J Campbell et al. 2001). En estos procesos de tráfico celular participan quimioquinas y sus receptores, y moléculas de adhesión específicos para cada población celular (Alvarez et al. 2007).

Por lo tanto, numerosos factores parecen estar involucrados en la instauración de una enfermedad alérgica, siendo el alérgeno otro factor importante, cuyas características pueden determinar el curso de la enfermedad.

Alergia a proteínas de leche de vaca

Como se mencionó anteriormente la LV es el principal alérgeno alimentario en el mundo. La prevalencia de la alergia a leche de vaca (ALV) oscila entre un 2-5 % de la población pediátrica (Rona et al. 2007; Branum y Lukacs 2009). La mayoría de los niños con ALV no mediada por IgE pierden tal sensibilidad al tercer año de vida, pero entre 10% y 25% de los niños con ALV dependiente de IgE mantienen la reactividad en años subsiguientes, además el 50% de ellos desarrollan sensibilidad hacia otros alimentos (Høst et al. 2002; Saarinen et al. 2005). De manera similar ocurre con los niños alérgicos a huevo de gallina, con la excepción de aquellos con niveles de IgE específica elevados, no logran desarrollar tolerancia específica (Järvinen et al. 2007; Boyano-Martínez et al. 2002). Las alergias a maní y las frutas secas tienen un desarrollo más prolongado, suelen ser persistentes y observarse en adultos (Wood 2003). Las chances de perder sensibilidad a maní y a alérgenos de sésamo es de sólo el 20%, y aproximadamente el 10% para frutas secas (Palmer y Burks 2006; Roux et al. 2003). También se ha descrito que dependiendo de las características del alérgeno y de la respuesta inmune inducida se podría predecir una instauración temprana o tardía de la tolerancia oral. Se ha descrito para alérgenos de la LV que el reconocimiento de epitopes conformacionales determina que se adquiera tolerancia a edades más tempranas, en comparación con el reconocimiento de epitopes lineales (E. M. Savilahti et al. 2010) que determina una alergia persistente.

Sin embargo, más allá de la instauración de los procesos de tolerancia oral que permiten restituir los mecanismos inmunorregulatorios con la edad, aún en individuos alérgicos o atópicos, en la mucosa gastrointestinal puede recuperarse la capacidad de inhibir las reacciones de hipersensibilidad, pero en las otras mucosas la situación no es la misma y es probable que los alérgenos continúen generando reacciones inflamatorias. Tal es así que la sensibilización a LV o huevo en la primera infancia está asociada con mayor riesgo de sensibilización a alérgenos ambientales y el desarrollo de asma (Cianferoni y Spergel 2009). Es decir, que una temprana sensibilización a través del tracto gastrointestinal permite poner en evidencia la condición de alérgico, que se manifestará de distinta manera a lo largo de su vida de no mediar un correcto manejo terapéutico. Por lo tanto, una sintomatología gastrointestinal inicial, que suele presentarse simultáneamente con manifestaciones dermatológicas, va a continuarse con el tiempo en una sensibilización por alérgenos inhalatorios y las consiguientes manifestaciones clínicas del tipo rinitis, asma, etc.

Diagnostico alergia alimentaria

Historia clínica

El diagnóstico de una alergia alimentaria se inicia con la confección de una **historia clínica** (HC) personal y familiar detallada. La clínica más frecuente con la que se manifiesta la alergia a la leche es cutánea y aparece de forma inmediata, en la mayoría de los casos en el transcurso de la primera hora luego de su ingesta, lo cual facilita la identificación de la leche como responsable. Esto ocurre en general en las alergias IgE-mediadas y permiten reconocer muy fácilmente al alimento nocivo y el diagnóstico está prácticamente concluido. (SEAIC 2009). Pero en la mayoría de los casos, esta no es la situación con la que se encuentra el médico y se debe recurrir a pruebas complementarias que permiten conocer o inferir a cerca del mecanismo inmunológico que está involucrado, y el alergen que puede ser el disparador del mismo. Es importante diferenciar las distintas reacciones que puede originar un alimento. En general todas las reacciones anómalas causadas por un alimento se denominan **reacciones adversas**, y pueden clasificarse en:

- Reacciones tóxicas: originadas por algún elemento tóxico presente en el alimento. Entre las más comunes están las contaminaciones bacterianas y fúngicas y las toxinas que éstos secretan. También es común la presencia de sustancias farmacológicamente activas como la histamina o la serotonina que se encuentra entre otros en pescados en descomposición, chocolate, banana, palta, etc.

- Reacciones no tóxicas: dependen de la susceptibilidad del individuo y se pueden dividir en intolerancias (cuando no participa el sistema inmune -deficiencias enzimáticas, alteraciones anatómicas, problemas psico-somáticos, etc) y alergias (está involucrado el sistema inmune a través de los mecanismos de hipersensibilidad).

Por lo tanto al momento del diagnóstico es importante que éste sea de certeza y diferencial dado que en general sólo el 20% de lo que originalmente se considera una alergia alimentaria es verdaderamente una reacción alérgica. Deben considerarse las diferentes reacciones adversa, para lo cual existen pruebas que permiten poner en evidencia diversos mecanismos moleculares y/o celulares.

Pruebas diagnósticas complementarias

Las pruebas complementarias pueden clasificarse en

- pruebas *in vivo* y pruebas *in vitro*.

- mediadas por IgE y no mediadas por IgE

Detección de IgE específica

Las pruebas *in vivo* de elección son las **pruebas cutáneas** (PC) realizadas en forma estandarizada con extractos de alérgenos o con la fuente natural del alérgeno.

Las PC se realizan tanto al momento del diagnóstico como durante el tratamiento. La técnica de “**skin prick test**” (SPTs) consiste en inocular una muy pequeña cantidad de un extracto que contiene el alérgeno en la piel del antebrazo empleando una lanceta calibrada para tal fin. Se emplean controles negativo (solución fisiológica) y positivo (histamina) y se observa a los pocos minutos la aparición de una reacción inflamatoria en la zona de inoculación. Una variante frecuentemente empleada es el **Prick-to-Prick** que consiste en emplear el alimento natural en lugar del extracto alérgico en aquellos casos en que el alérgeno es sensible a la degradación (Bock et al. 1978; Rosen et al. 1994; Asero et al. 2007; Londres et al. 2011).



Figura 5. Esquema de prick test

La ventaja de esta prueba es que pone de manifiesto la presencia de anticuerpos IgE específicos en la superficie de mastocitos de la piel y reproduce la reacción inflamatoria que se produce en el órgano de choque en forma controlada en la piel. En general es una prueba segura aunque el médico debe considerar en qué caso es factible su ejecución.

La detección *in vitro* de la IgE específica se realiza de forma rutinaria para el diagnóstico, junto a la PC antes de la realización de una prueba de provocación oral (PO) controlada. También se la emplea para el seguimiento de pacientes alérgicos de larga evolución, o que han presentado reacciones graves (anafilaxia). Para su determinación se requieren de inmunoensayos de elevada detectabilidad y especificidad dado que estos Ac se

miden en el suero, donde se encuentran en concentraciones muy bajas (el orden de los ng/ml). Existen ensayos que detectan los anticuerpos IgE específicos de la totalidad de los alérgenos que se encuentran en la fuente alérgica (leche por ejemplo), o ensayos que determinan Ac IgE específicos de alérgenos individuales (por ejemplo IgE específica para α -lactoglobulina, β -lactoglobulina o caseínas) (H A Sampson y Albergo 1984; H A Sampson y Ho 1997) o más recientemente detectan anticuerpos contra péptidos que contienen epítopes inmunodominantes. Estos ensayos en general son inmunoensayos del tipo ELISA o radioinmunoensayos, aunque estos últimos prácticamente han quedado en desuso.

La gran ventaja de estos ensayos es que no ponen en riesgo la salud del paciente. Sin embargo, la gran limitación de estos ensayos es que no dosan al componente patognomónico de la reacción, dado que la IgE soluble no es capaz de desencadenar una reacción alérgica, sino hasta que se une a los receptores específicos en las células inflamatorias. Sin embargo estas pruebas son ampliamente utilizadas ya que en conjunto con los resultados de las PC permiten inferir a cerca de la presencia de IgE específica y su posible relación con la instauración de una reacción inflamatoria.

Prueba de degranulación de basófilos por citometría de flujo

La técnica de **activación de basófilos es una prueba funcional** de activación de basófilos mediado por el antígeno. Los basófilos constituyen una fracción minoritaria de leucocitos en sangre periférica (<0,2%), son capaces de liberar el contenido de sus gránulos tras un proceso de activación dependiente del estímulo antigénico. La degranulación se produce cuando el alérgeno es capaz de puentear al menos 2 receptores de IgE que tienen unido la IgE y es consecuencia de la activación del citoesqueleto a través de una compleja red de mecanismos de señalización intracelular. Los gránulos al fusionarse con la membrana plasmática traslocan a ésta la expresión de CD63. Por lo tanto la célula en reposo expresa este marcador en las membranas internas, mientras que al activarse lo hacen en la superficie celular. En este fenómeno se fundamenta el análisis de la activación de basófilos por citometría de flujo. Esta técnica permite trabajar con cantidades mínimas de sangre y aunque ha sido estandarizada para algunos alérgenos, todavía faltan muchos estudios para poder emplearla como una herramienta *in vitro* de diagnóstico para las alergias mediadas por IgE (Boumiza et al. 2005; Mayorga et al. 2010). Asimismo, se la puede emplear para monitorear el tratamiento desensibilizante y evaluar el momento en que el paciente deja de responder al alérgeno para restaurar la dieta (Ocmant et al. 2009; Rubio et al. 2011).

Prueba de provocación oral controlada con leche

La PO será innecesaria para confirmar el diagnóstico de ALV en el caso de una HC compatible con una reacción alérgica mediada por IgE acompañada de una demostración de un mecanismo IgE mediante una PC positiva o una determinación de de IgE específica sérica positiva. Pero en casos en que no está claro cuál es el mecanismo patogénico, o se desea confirmar un mecanismo sospechado se recurre a esta prueba. Por lo tanto, se trata de una prueba confirmatoria. También suele realizarse luego del tratamiento y antes de restituir la dieta ante la sospecha de la instauración fisiológica de los mecanismos de tolerancia.

La ***PO es el último eslabón en la cadena del diagnóstico*** de la ALV, pero en la actualidad sigue siendo la única ***prueba que confirma o descarta con total seguridad la alergia*** a este alimento cuando se realiza en forma estandarizada, doble ciego y con placebo.

Para realizar esta prueba el paciente debe estar internado transitoriamente y bajo la supervisión de personal médico especializado. El paciente debe suspender la ingesta del alimento sospechoso durante 2 semanas previas y se le administra el alimento en dosis crecientes y a determinados intervalos de tiempo. Se comienza con dosis por debajo de la “dosis umbral” con que reaccionan la mayoría de los pacientes, aunque depende de cada alimento, y se registra la aparición de signos clínicos inmediatos y tardíos.

En numerosos casos esta prueba no puede realizarse y existen pruebas de provocación alternativas: PO abierta (el paciente y el médico conocen con qué se está desafiando al paciente), simple ciego (sólo el evaluador conoce el contenido del desafío) o domiciliaria (la madre o el entorno familiar le realiza el desafío con el alimento habitual).

La prueba estandarizada y recomendada es el desafío doble ciego y con placebo (Perry et al. 2004; SEAIC 2009; H A Sampson 1999; Mari et al. 2008).

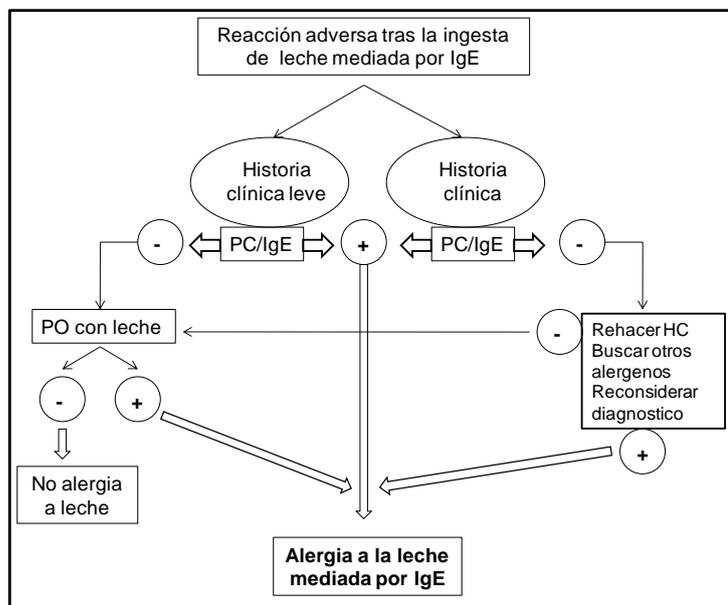
La principal ventaja de esta prueba es que directamente se está evaluando el órgano de choque al desafiarlo con el antígeno sospechoso, pero tiene el riesgo de las reacciones adversas que pueden inducirse, y por lo tanto sólo deben realizarse bajo supervisión médica y en lugares adecuados.

Reacciones no mediadas por IgE

En los casos en que no se puede poner de manifiesto la presencia de reacciones IgE-dependientes se dispone de herramientas diagnósticas muy limitadas. En estos casos ***las pruebas de PO son fundamentales*** y a lo sumo se puede recurrir a análisis histológicos o celulares a partir de muestras de tejidos o biopsias. En general se recurre a este tipo de pruebas para descartar otras patologías (enfermedad celíaca, procesos tumorales, colitis

eosinofílicas, enteritis eosinofílicas, etc) (Cianferoni y Spergel 2009). En estos casos se observa la relación de longitud vellosidad/cripta, presencia de infiltrados celulares y estado de activación celular, y parámetros que indiquen signos de remodelamiento tisular en casos crónicos.

Figura 6. Algoritmo diagnóstico en la alergia a la leche mediada por IgE.



Tratamiento de las alergias alimentarias

Tratamiento sustitutivo

Para el tratamiento de las alergias alimentarias, lo más efectivo es la **eliminación estricta del alérgeno de la dieta**, sobretodo antes de los 2 años de edad o hasta la instauración de los mecanismos de tolerancia. Si el paciente tiene menos de 2 años de edad se debe reemplazar la LV por un sustituto que asegure un correcto crecimiento pondo-estatural, mientras que por encima de los 2 años de edad únicamente se lo elimina de la dieta. En el caso de los niños alérgicos, este proceso de maduración intestinal suele retrasarse con respecto a un niño no alérgico. En el caso de la ALV este período de restricción dietaria constituye una tarea compleja ya que no existe en nuestro medio una gran variedad de sustitutos lácteos, con el agravante que no existe una legislación clara sobre el etiquetado de los alimentos. Distintos estudios han demostrado que salvo las formulaciones a base de aminoácidos, los hidrolizados o las leches de otras especies de mamíferos no han probado ser muy eficientes (Docena et al. 2002). Los hidrolizados parciales están totalmente desestimados y el éxito de los hidrolizados extensivos va a depender del paciente. Todos estos factores impactan en forma directa sobre la calidad de vida del paciente y es un problema muy complejo de resolver principalmente en lactantes.

Los sustitutos con los que se han logrado los mejores resultados son hidrolizados extensivos de caseínas bovinas o de proteínas del suero de LV, (Benhamou et al. 2009; Kneepkens y Meijer 2009), y las fórmulas a base de aminoácidos individuales en las cuales no existen epitopes. Asimismo, fórmulas a base de proteínas de soja son frecuentemente empleadas en el tratamiento de la alergia a leche de vaca. Sin embargo actualmente se ha desestimado su uso en niños con alto riesgo de alergia por la diversidad de efectos adversos que pueden producir (Osborn y Sinn 2004; Osborn y Sinn 2006) y por los trastornos nutricionales que pueden ocasionar. Por lo tanto no se recomienda su uso antes de los 6 meses de edad. Además, se ha observado que entre el 15-40% de los pacientes alérgicos a leche de vaca desarrollan una intolerancia a este sustituto sin haber estado previamente sensibilizados a la soja (Zeiger et al. 1999; Zoppi y Guandalini 1999; Klemola et al. 2002; Klemola et al. 2005). A pesar que la soja no es importante como alergeno alimentario, se la debe considerar en una sensibilización secundaria. Se ha observado que presenta reactividad cruzada con alergenitos del polen de abedul (De Swert et al. 2011; Kosma et al. 2011), maní (Mittag et al. 2004), y más recientemente nuestro grupo ha descrito que cruza con caseínas bovinas (Rozenfeld et al. 2002; R Curciarello et al. 2008). En estos casos en que los pacientes se encuentran sensibilizados a otros alergenitos de reactividad cruzada la soja parece comportarse como un alergeno importante y generar distintos tipos de trastornos clínicos.

Tratamiento farmacológico

Es común que se empleen *anti-histamínicos* frente a una ingesta accidental del alimento alérgico y la aparición de signos clínicos que indiquen la instauración de un proceso inflamatorio. En general, no se recomienda la administración de anti-histamínicos por el riesgo que existe de enmascaramiento de manifestaciones sistémicas potencialmente graves, cuyo desarrollo no sería evitado por estos fármacos. Ningún tratamiento sintomático administrado de forma mantenida se ha convertido en una opción terapéutica para esta patología, dado que aún en el supuesto de que consiguiera evitar por completo la reacción con la ingesta del alimento, obligaría, en el caso de alimentos de ingesta habitual, como la leche y el huevo, a la toma diaria durante años del fármaco, o incluso durante toda la vida. En asma y en alergia alimentaria no han resultado ser efectivos para disminuir los síntomas. Este tratamiento consiste en la administración de antagonistas de los receptores de histamina H1 y H2. Sin embargo, los niveles de histamina en el suero hacen un pico durante la anafilaxia y luego retornan a sus niveles basales aún cuando los síntomas persisten (J. Wang y Sampson 2007).

Es importante resaltar que en los últimos años se ha reportado un creciente número de casos de anafilaxia desencadenada por leche de vaca por lo cual estas consideraciones deben ser tenidas en cuenta (Silva et al. 2011; K. M. Järvinen 2011). Estos casos revisten una extrema gravedad y en general se debe recurrir al empleo de adrenalina.

Tratamiento correctivo

En los últimos años, y gracias a la información obtenida sobre los mecanismos moleculares y celulares que intervienen en las reacciones alérgicas, algunos grupos han comenzado a aplicar protocolos de desensibilización o **inducción oral de tolerancia (IOT)** o de **inmunoterapia (IT) específica con alimentos**. Hasta el momento se han realizado un número muy limitado de ensayos clínicos de IT en alergia a maní, avellana y melón, y se han desarrollado protocolos de IOT en alergia a leche y huevo (Enrique et al. 2005; Nelson et al. 1997; Oppenheimer et al. 1992; Fernández-Rivas et al. 2009).

La IOT consiste en administrar dosis crecientes del alimento por vía oral, bajo supervisión médica, hasta alcanzar la tolerancia, es decir conseguir que el paciente tome el alimento en cantidades adecuadas sin presentar reacción. Se observa en la literatura diversos ensayos clínicos en los que se ha conseguido alcanzar la tolerancia en el 70-90% de los casos (Bauer et al. 1999; Patriarca et al. 1998; Meglio et al. 2008), y en aquellos que no consiguen llegar a tolerar una ración normal del alimento, al menos se aumenta su nivel umbral de respuesta con lo que se consigue protegerlos de las reacciones accidentales inducidas por pequeñas cantidades de alérgeno encontradas como trazas, o ingredientes ocultos en alimentos preparados. No se conoce por el momento cual es la evolución a largo plazo de los pacientes en los que se ha inducido tolerancia oral (desensibilizados), ni se han estudiado en profundidad los mecanismos inmunológicos subyacentes (Morisset et al. 2007; Niggemann et al. 2006; Patriarca et al. 2003; Rolinck-Werninghaus et al. 2005).

Debido a que muchos pacientes son alérgicos a más de un alérgeno se ha planteado como alternativa terapéutica la aplicación de terapias no alérgeno-específicas. Así se han empleado tratamientos con anticuerpos monoclonales quiméricos o humanizados anti-IL-5, con anti-leucotrienos, etc. aunque han mostrado ser muy poco efectivos en alergia alimentaria (Stone y Prussin 2008). Sin embargo, el empleo de anticuerpos monoclonales anti-IgE humanizados ha comenzado a estudiarse en alergia al maní en USA y se han obtenido resultados alentadores (Riffelmann 2008). Estos anticuerpos recombinantes se unen a la IgE

circulante impidiendo su unión a los receptores de alta afinidad (FcεRI) en mastocitos y basófilos; pero es incapaz de unirse a la IgE ya unida a la superficie celular (Milgrom et al. 1999). El principal efecto a nivel molecular es la reducción del número de RFcε en mastocitos, basófilos y eosinófilos (Rabe et al. 2011). Este tratamiento ha resultado ser efectivo en disminuir las reacciones de hipersensibilidad inmediatas (Rabe et al. 2011), ha resultado muy eficaz en asma y rinitis alérgica (Morjaria et al. 2007). El mayor inconveniente es su costo, y por el momento está indicado para pacientes con asma severo (Vichyanond 2011).

Empleo de modelos animales

Dado que la experimentación en humanos es limitada desde el punto de vista ético, el desarrollo de modelos animales nos provee una herramienta para el estudio de su patogénesis y para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Los modelos animales de alergia alimentaria han sido aplicados al estudio de la fase inductiva de la patología (mecanismos de sensibilización) y de la fase efectora (mecanismos fisiopatológicos del proceso inflamatorio) (Berin y Mayer 2009).

Por otro lado, el desarrollo de terapias destinadas tanto a la prevención, como a la supresión de sus múltiples manifestaciones clínicas, requiere el conocimiento de su patogénesis y de los mecanismos moleculares y celulares subyacentes. El empleo de modelos animales ha proporcionado importantes aportes y se sabe que los LT juegan un rol central en su inmunopatogénesis y que una activación crónica de linfocitos Th2 puede perpetuar una respuesta inflamatoria en diferentes órganos generando diversos signos clínicos (Kay 1988; Smarr et al. 2011). Por otro lado, las células dendríticas son las APC más eficientes en la activación y diferenciación de LT a Th1, Th2 o Th17 en humanos y en ratones (Maldonado-López y Moser 2001; Moser y Murphy 2000; Iwakura y Ishigame 2006). Y en este sentido el estudio de células humanas ha permitido identificar y diferenciar distintas sub-poblaciones de CD en individuos alérgicos y no alérgicos (van den Heuvel et al. 1998; Soumelis et al. 2002). Estos hallazgos hacen suponer que ciertas sub-poblaciones de LT y de CD intervendrían en la patogénesis de las enfermedades alérgicas. En individuos atópicos la exposición a alérgenos inocuos y comunes del medio ambiente genera una diferenciación a LT Th2 (Sutton y Gould 1993), con una incrementada producción de IL-4, IL-5 e IL-13 y bajas cantidades de IFN-γ (Mosmann et al. 1986). Estas interleuquinas afectan directamente la maduración, activación, y diferenciación de linfocitos B (LB), mastocitos, basófilos y eosinófilos (Morafo et al. 2003; Turcanu et al. 2003). En humanos se ha descrito que la acción de TSLP o linfopoyetina del

estroma tímico, secretada por distintas células epiteliales, ejerce una acción moduladora sobre las células dendríticas CD11c⁺ generando un subtipo quimioattractante y activador de linfocitos Th2 (Soumelis et al. 2002; N. Watanabe et al. 2004). En los últimos años, se ha estudiado la importancia de la interacción de TSLP con su receptor para regular la inmunidad y la inflamación intestinal (Rimoldi et al. 2005). Se encontró que TSLP está constitutivamente expresada a lo largo del tracto intestinal en forma de mRNA y de proteína en condiciones de homeostasis (B. C. Taylor, Zaph, et al. 2009).

La relevancia de los modelos animales de alergia alimentaria que incluyen los pequeños animales de laboratorio (ratones, ratas, cobayos), respecto a los animales domésticos (perros, cerdos), se debe en gran parte a la mejor caracterización inmunológica de los mismos, a su fácil manipulación y mantenimiento bajo condiciones ambientales definidas, junto a su relativo bajo costo de mantenimiento, lo que permite un mayor grado de flexibilización en cuanto al diseño de protocolos. Una ventaja sustancial para el uso de ratones consiste en la gran diversidad de cepas existentes, el extenso conocimiento actual sobre las características genéticas de las mismas, lo cual posibilita su manipulación genética y principalmente, la disponibilidad de reactivos inmunológicos específicos. Sin embargo el hecho de utilizar animales obtenidos por endocria puede no ser representativo de la respuesta observada frente algunos alérgenos, comparado con lo que ocurre en humanos. Esto se debe principalmente a la restricción por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) para montar una respuesta IgE específica contra algunos alérgenos. Este hecho limita sin duda la posibilidad de emplear este tipo de modelos como herramientas para evaluar la alergenicidad de nuevas proteínas (McClain y Bannon 2006). No siempre se encuentra una cepa capaz de responder frente a una proteína y en forma Th2- o IgE-dependiente. Además se debe ser cauto en la interpretación de los resultados obtenidos en los experimentos con roedores, debido a que existen importantes diferencias anatómicas, fisiológicas, e inmunológicas entre estos animales y el hombre (Finkelman y Wills-Karp 2008; Takeda y Gelfand 2009). Sin embargo, a pesar de que ninguno de los modelos murinos desarrollados hasta la actualidad refleja completamente el amplio rango de manifestaciones clínicas que se observan en esta patología en humanos, muchos reproducen en forma parcial distintos aspectos de la misma. No debemos dejar de tener presente que las alergias alimentarias constituyen un espectro heterogéneo de enfermedades alérgicas, con formas variables de presentación clínica.

Con el avance de la biotecnología, y la introducción al mercado de productos modificados genéticamente, se torna necesaria la evaluación del potencial alergénico de nuevas proteínas mediante el empleo de herramientas *in vivo*, como lo son los modelos animales. En este campo, los modelos animales constituyen una valiosa herramienta, ya que permiten estudiar el potencial impacto que genera la introducción en la dieta de alimentos modificados, incluso en aquellos en los cuales se evalúan estrategias para reducir su alergenicidad, o la evaluación del efecto que tiene el procesamiento de los alimentos en su potencial alergénico (Dearman y Kimber 2009).

A partir del advenimiento de los modelos animales de alergia numerosos progresos se han introducido. Se pueden encontrar modelos en los que simplemente la administración repetitiva del alérgeno genera una respuesta inmune Th2-dependiente (Gonipeta et al. 2010; X.-W. Chen, Lau, et al. 2011), hasta los que emplean adyuvantes mucosales y administran el alérgeno por la misma vía que en humanos (X. M. Li, Schofield, et al. 1999; X. M. Li et al. 2001). Estos modelos pueden emplear protocolos de sensibilización sistémicos (vía intraperitoneal) o mucosales (intra-gástrico, nasal, cutáneo, etc.) (van Halteren et al. 1997; Gizzarelli et al. 2006; X. M. Li, Zhang, et al. 2001) y en general reproducen aspectos parciales de la patología.

Adyuvantes empleados

La mayoría de las proteínas alergénicas se comportan como inmunógenos muy pobres cuando son administradas por vía intragástrica, produciendo una respuesta inmune regulatoria o tolerogénica, conocida como tolerancia oral (Berin y Shreffler 2008). Esto se debe a que no contienen PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) o MAMPs (patrones moleculares asociados a microorganismos). Por lo tanto ***para inducir un proceso alérgico es necesario “romper” esta tolerancia natural***, al igual que ocurre en humanos. Para ello es necesario el empleo de adyuvantes, y que induzcan una respuesta Th2-dependiente (adyuvantes pro-Th2).

Se han caracterizado nuevos adyuvantes mucosales con capacidad de activar la inmunidad innata e inducir la maduración de las APC (Berin y Mayer 2009). Se ha observado que la ***toxina colérica*** (TC), toxina producida por la bacteria *Vibrio cholerae*, es capaz de estimular la maduración *in vitro* de las células dendríticas y de los macrófagos, induciendo la expresión en la superficie de las células de moléculas de MHC clase II y moléculas co-estimuladoras. Estas células, en estas condiciones son capaces de activar células T CD4⁺

CD45RA⁺ naïve, con la posterior secreción de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) (Gagliardi y De Magistris 2003). Muchos de estos nuevos adyuvantes son agonistas de los receptores tipo Toll (TLR), pero otros, como la TC se unen a otros tipos de receptores presentes en la membrana de células de la inmunidad innata. La TC está compuesta por las subunidades A y B como se muestra en la **figura 7**. La acción de la TC comienza por la unión de la subunidad B al gangliósido GM1 presente en la superficie de todas las células nucleadas, incluyendo los enterocitos y las células dendríticas, luego es endocitada y posteriormente la subunidad A activa la proteína G de la adenilato ciclasa, aumentando los niveles de AMP cíclico intracelulares.

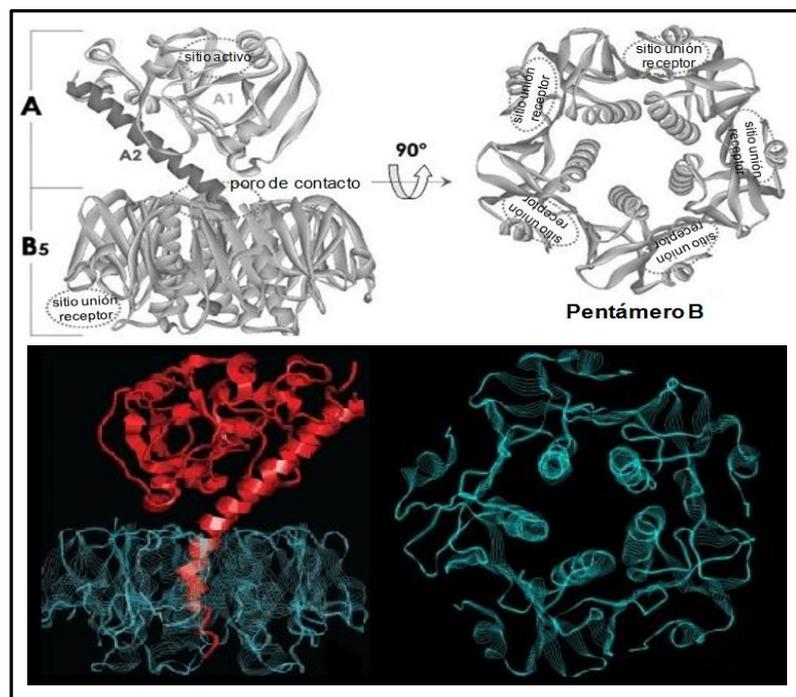


Figura 7. Estructura de la toxina colérica. Se muestran los 2 dominios de la subunidad A y el pentámero que forma la subunidad B. (Modificado de Fan y col. *International Journal of Medical Microbiology* 2004)

La administración oral de TC induce un aumento en la migración de las CDs inmaduras a la mucosa intestinal (sitio inductivo), su activación, y su posterior migración a los MLN. El flujo de CDs inmaduras a la mucosa se produce por la secreción de la quimioquina CCL20/MIP3 α en intestino (Anjuère et al. 2004).

Es conocido que la TC es un adyuvante mucosal muy efectivo en modelos animales, sin embargo poco se conoce sobre su mecanismo. Hay trabajos que muestran que pueden originar una respuesta pro- o anti-inflamatoria *in vivo*, y se ha identificado a la vía involucrada es la vía del NF- κ B como la principal mediadora de las reacciones inflamatorias (Mempel et al. 2004; Lycke 2005).

Muchos de los modelos animales de asma y de hipersensibilidad a alimentos utilizan como adyuvante pro-Th2 al **hidróxido de aluminio** (Dahlin et al. 2011; Comstock et al. 2010). A pesar de ser un adyuvante muy utilizado, no hay consenso sobre el mecanismo de acción. Se proponen los siguientes 3 mecanismos: (a) formación de un depósito con liberación gradual del antígeno adsorbido, acentuando una mayor interacción APC-antígeno, (b) presentación de los antígenos de una manera multivalente particulada, que permite una internalización más eficiente del Ag por parte de las APC, y (c) activación del complemento y la formación de un ambiente inflamatorio en el lugar de la inyección que permite la maduración de las APC (Gavin et al. 2006; Lambrecht, Kool, et al. 2009; Kwissa et al. 2007; Brewer 2006; Kool, Soullié, et al. 2008). No activan directamente a los TLR, pero facilitan la maduran de células el sistema inmune.

Otro de los adyuvantes utilizados es el **adyuvante de Freund completo**, es uno de los adyuvantes más potentes conocidos. Se desarrolló en 1936 y consta de una mezcla de agua, aceites y micobacterias. En 1969, fue modificado por Stuart-Harris quién eliminó las micobacterias para disminuir su toxicidad, y es llamado **adyuvante incompleto de Freund**. Estos adyuvantes mantienen más tiempo al Ag en el sitio de inoculación dado que forman una emulsión que mantienen al Ag atrapado. Este fenómeno genera una respuesta inmunológica de mayor intensidad dado que reproduce sucesivas inmunizaciones. Debido a su toxicidad no es aceptado su uso en humanos, pero si en animales (Strid et al. 2004), el agregado de micobacterias, induce la activación y maduración de APC, principalmente CDs, por el contenido de ligandos de TLR en la superficie bacteriana.

Estrategias de modulación de la respuesta:

Inmunomodulación

Una de las posibles estrategias de modulación consiste en el **re direccionamiento de la respuesta Th2** inducida en los animales sensibilizados con antígenos dietarios hacia una respuesta Th1 específica, procedimiento que se denomina **inmunomodulación**. Para ello se ha estudiado la aplicación de diferentes moléculas con poder adyuvante o directamente se han empleado citoquinas pro-Th1.

Mediante la aplicación de diferentes estrategias de este tipo se ha logrado revertir los cuadros asociados a procesos alérgicos en modelos animales.

Una estrategia de modulación más estudiada consiste en la administración de oligonucleótidos sintéticos ricos en secuencias CpG hipometiladas (CpG ODN) como

adyuvante, junto al antígeno. Estos motivos ricos en CpG actúan directamente sobre células B y CPA a través del TLR9, activándolas y produciendo así una fuerte respuesta humoral y celular que lleva hacia una respuesta inmune de perfil Th1 (Y. Zhang et al. 2001; A. Krug et al. 2001; Sidhapuriwala et al. 2006). Adel-Patient y col. han utilizado CpG ODN como adyuvante para prevenir la sensibilización gastro-intestinal en un modelo murino de alergia a maní (Karine Adel-Patient et al. 2007). Efectos similares se encontraron mediante la administración de IL-12 recombinante, junto al antígeno en un modelo murino de alergia a β -lactoglobulina (Cortes-Perez et al. 2007). Otras estrategias consisten en la administración de plásmidos bacterianos que codifican para distintos alergenicos (Raz et al. 1996; Mohapatra et al. 2010), o con genes codificantes de alergenicos que además contienen secuencias CpG ODN (Maecker et al. 2001). De esta manera el plásmido es captado por las CPA y el alergenico sintetizado es presentado por MHC clase I a células T CD8. El IFN- γ producido genera una respuesta Th1 con la consiguiente síntesis de IgG2a y la supresión de la producción de IgE alergenico específica (D. J. Lee et al. 1997; Slater y Colberg-Poley 1997; F. Zhang et al. 2011).

Inducción de tolerancia

Empleando modelos animales se ha demostrado que la transferencia adoptiva de células CD4⁺CD25⁺ suprimían la eosinofilia inducida por la exposición a un determinado antígeno en las vías aéreas (Jaffar et al. 2004). Por otro lado, se produjeron ratones knock out en Foxp3 y estos animales no presentan LT regulatorios en circulación. En humanos se descubrió que la patología llamada Síndrome Poliendocrinopatía ligado al X (IPEX) el gen que codifica para Foxp3 es no funcional y estos pacientes tampoco tienen Treg inducibles. Tanto los animales como los pacientes desarrollan espontáneamente luego del nacimiento un proceso inflamatorio generalizado, con una severa enfermedad autoinmune (tiroiditis, diabetes tipo I, inflamación intestinal) y signos clínicos relacionados con enfermedades alérgicas (eczema severo, trastornos gastrointestinales, etc.). Presentan además altos niveles de IgE y eosinofilia. Estos hallazgos han resultado importantes para postular la hipótesis sobre fallas a nivel de tolerancia asociada a procesos alérgicos. Además, se ha observado que niños que revierten su alergia a proteínas de leche de vaca incrementan sus células CD4⁺CD25⁺ circulantes, en comparación con los que mantienen un alergia clínica activa (Karlsson et al. 2004; Skrinido et al. 2008). Sin embargo y dependiendo de los pacientes suele observarse un bajo número de Tregs o células con una funcionalidad alterada (Ling et al. 2004; Grindebacke et al. 2004). Además en modelos animales de alergia a proteínas de maní, se encontró que la

transferencia de células Treg provenientes de ratones tolerizados a ratones sensibilizados, no revierte la producción de citoquinas de perfil Th2, ni disminuye los niveles séricos de IgE específico; sin embargo se observa una disminución de la activación de basófilos (Marcondes Rezende et al. 2011). Por lo tanto resta aún mucho camino por recorrer para lograr una completa comprensión de los mecanismos regulatorios subyacentes en esta patología.

A partir del conjunto de resultados, varios grupos han estudiado distintos protocolos de inducción o restauración de la tolerancia, como posible terapia para las reacciones alérgicas. Curotto y col. han desarrollado un modelo de hiper-IgE en ratón que presentan un repertorio de células T y B monoclonales (M A Curotto de Lafaille et al. 2001). En este modelo han estudiado que la tolerancia oral puede ser inducida en ausencia de Treg naturales provenientes del timo. Este restablecimiento de la tolerancia oral se correlaciona con la inducción *de novo* de Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ específicas al alérgeno en periferia (Treg inducibles), la cual es inhibida por el bloqueo de TGF- β (Mucida et al. 2005). También analizaron la importancia de los Treg Foxp3⁺ inducibles en condiciones de tolerancia e inflamación, encontrando que Foxp3 es esencial para establecer la tolerancia en la mucosa intestinal y respiratoria. Empleando un modelo de inflamación alérgica crónica, demostraron la existencia de mecanismos supresores dependientes e independientes de Foxp3. La severidad de la inflamación alérgica mediada por IL-4 es controlada por la presencia de las células Treg Foxp3⁺; sin embargo, la producción de IL-5 y la eosinofilia observada en la inflamación es suprimida por el IFN- γ pero es independiente de la acción de las células Treg Foxp3⁺ (M A Curotto de Lafaille et al. 2008).

Otro tipo de terapias tendientes a disminuir la aparición de signos clínicos frente a la exposición natural al alérgeno son aquellas que emplean algunas modificaciones. En este sentido se han realizado estudios en los que se emplean proteínas alimentarias recombinantes en la inmunoterapia alérgeno-específica (Li et al. 2003). De esta manera alterando la secuencia de los epitopes B del alérgeno principal del maní (Ara h 1) el grupo de Sampson logró disminuir la capacidad de unión a la IgE, conservando la capacidad de estimular células T de pacientes alérgicos (Nina King et al. 2005; G A Bannon et al. 2001). Esta proteína mutagenizada fue expresada en *E. coli*, las cuales luego de ser muertas por calor fueron administradas a un modelo murino de anafilaxia a maní lográndose resultados muy alentadores (Xiu-Min Li et al. 2003).

Otra alternativa de inmunoterapia en desarrollo es el empleo de péptidos que contengan epitopes T reactivos y con epitopes B mutagenizados para evitar que la molécula puentee dos moléculas de IgE y active mastocitos y basófilos (Briner et al. 1993; Sicherer y Sampson 2010).

Por lo tanto se ha avanzado mucho en el conocimiento de los mecanismos inmunes involucrados en la patogénesis de las enfermedades alérgicas. El desarrollo de modelos animales ha sido clave en este punto y ha permitido plantear nuevas terapias. Sin embargo, como se ha mencionado, actualmente el único tratamiento eficaz empleado es la eliminación del estímulo inmunológico (alergeno).

En este trabajo de tesis hemos abordado el estudio de diferentes estrategias inmunomoduladoras en un modelo en ratón de alergia a proteínas de leche de vaca. Consideramos que este trabajo aporta información que puede ser relevante para ampliar los conocimientos para el planteo de futuras terapias inmunomodulatorias para la alergia alimentaria a leche de vaca.

Materiales y Métodos



1. Preparación y caracterización de extractos proteicos

1.2 Proteínas de leche de vaca (PLV): se utilizó leche descremada comercial, en polvo (Svelty, Nestle) para la preparación de los extractos proteicos acuosos. Se prepararon soluciones de distinta concentración según el método en el que se van a emplear, en agua bi-distilada, PBS pH 7.4 o buffer bicarbonato pH 8.4. Se agitó hasta lograr la máxima disolución y se filtró.

1.2 Proteínas de soja (PS): para la preparación de los extractos proteicos crudos se trituraron las semillas de soja transgénicas (*Glycine max.* L merr genotipo Asgrow) empleando un molinillo eléctrico y mortero, y se disolvieron en NaHCO₃ 0,01N a 90 °C (65 g de semillas molidas y 0,5 g de NaHCO₃ en 365 ml de agua destilada). Luego se homogeneizó (homogeneizador Ultraturax UT 20.000) y al alcanzar la temperatura ambiente se centrifugó durante 20 minutos a 5000 xg a 20°C. Se tomó el sobrenadante y se realizó una nueva centrifugación a 10.000 xg durante 15 minutos a 4°C. Seguidamente se procedió a la extracción de lípidos con cloroformo durante 8 horas a 4°C, utilizando una relación solución acuosa:cloroformo 2:1. Finalmente los extractos se dializaron contra agua bi-distilada durante toda la noche utilizando una membrana de diálisis de 2kDa de punto de corte, y se almacenaron a -20°C.

1.3 Proteína recombinante de *Brucella abortus*: se utilizó la proteína de membrana externa Omp-16, provista por el grupo de la Dra. Juliana Cassataro (Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, FMED-UBA). Brevemente, las bacterias *E.coli* BL21 (DE3) competentes (Stratagene) fueron transformadas con la construcción (pET-U-Omp16 con colita de histidina). La Omp recombinante fue expresada y aislada por sonicación y luego purificada por cromatografía de afinidad en resina de Ni-NTA. Para eliminar el LPS, la Omp recombinante fue adsorbida en Polimixina B. Se obtuvo un contenido menor a 0,25 unidades de endotoxina/ug de proteína, el cual fue determinado con el test de *Limulus amoebocyte*. (Giambartolomei et al. 2004).

1.4 Cuantificación de proteínas: la concentración de proteínas totales en los extractos crudos de soja, de leche de vaca y en la fracción recombinante purificada se determinó por el micrométodo de Bradford (Bradford 1976) o mediante el método de ácido Bicinconínico (*Pierce BCA Protein Assay*), empleando en ambos métodos seroalbúmina bovina como standard de proteínas para la curva de calibración .

2 Planes de inmunización

2.1 Plan de sensibilización: se emplearon ratones de 4 á 6 semanas de edad de la cepa BALB/c para su sensibilización por vía intragástrica (ig). Mediante una sonda metálica se administró la solución del antígeno (PLV) en buffer bicarbonato de sodio 3% pH 8 junto a toxina colérica (*Sigma*) como adyuvante mucosal. Dos horas antes de cada administración se les retiró el alimento y 30 minutos antes se les administró 200 µl de la solución de NaHCO₃ al 3 % pH 8 para disminuir la acidez estomacal. El plan de sensibilización consistió en una administración semanal, durante 4-6 semanas según los niveles séricos de IgE específica a PLV. A los diez días se realizó el desafío oral únicamente con PLV (**figura 8**). Los animales se agruparon en distintos lotes: animales sensibilizados (toxina colérica y PLV), animales control (PLV ó toxina colérica) y animales tratados (según el tratamiento que recibieron).

En todos los casos los ratones BALB/c fueron adquiridos con certificado de salubridad para gérmenes específicos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinaria de la UNLP. Los animales fueron mantenidos en el Bioterio del LISIN con foto período natural, en ambiente con temperatura de entre 18°C y 24°C, con disponibilidad de agua y alimento estériles *ad libitum*. El alimento balanceado usado (Cooperación, para rata y ratón, Cooperativas Argentinas) poseía proteína bruta (mínimo) 10%, extracto etéreo (mínimo) 5%, fibra cruda (máximo) 6%, minerales totales (máximo) 10%, calcio 1,3%, fósforo (disponible) 0,8%, humedad (máxima) 12%. Este alimento no contenía en su composición proteínas de leche de vaca.

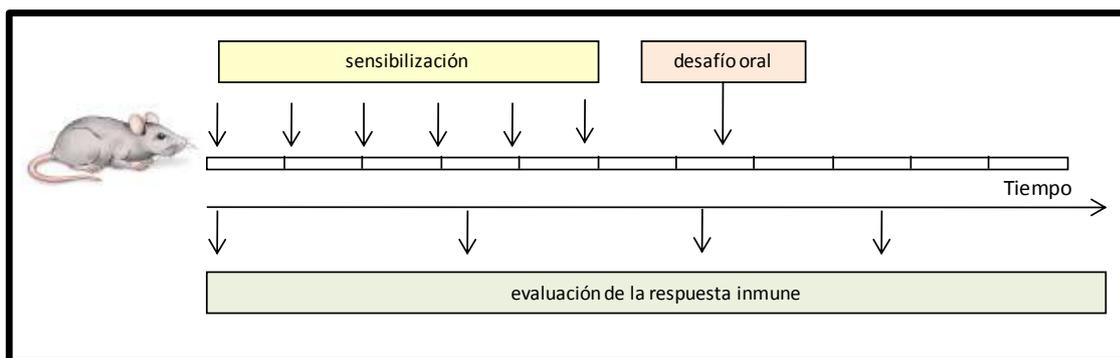


Figura 8. Esquema general de sensibilización utilizado durante los distintos planes de inmunización de los ratones.

2.2 Plan de modulación: para la optimización de la modulación de la respuesta Th2 inducida se evaluaron las siguientes variables:

Agentes moduladores: se empleó la proteína recombinante de *Brucella abortus*, Omp-16, y bacterias muertas del género actinomycetales [*Gordonia bronchialis* (Gb) y *Tsukamurella inchonensis* (Ti)] muertas provistas por BioEos Ltd. (Dr. John Stanford, Essex, Inglaterra). Los cultivos bacterianos se realizaron en medio Sauton y las suspensiones bacterianas se prepararon como se describe en Fontanella *et al.* (Fontanella et al. 2007).

Vías de administración: subcutánea (sc), intranasal (in) e intragástrica (ig)

Dosis, frecuencia y estrategias: Se probaron distintas dosis de los agentes moduladores (50 µg y 100 µg de Omp16; 10⁷ y 10⁹ bacterias de Gb y Ti), distintas frecuencias de administración (días consecutivos o no) y en distintas etapas del plan (previo, durante y post sensibilización).

2.3 Desafío oral (DO): una vez concluido el plan de inmunización los animales fueron desafiados con el antígeno en cuestión con el fin de analizar los signos clínicos locales y sistémicos inducidos como consecuencia de la sensibilización previa. Para esto se les administró únicamente el antígeno por vía intragástrica. Los síntomas clínicos indicadores de la inducción de reacciones mediadas por IgE aparecen entre 15 y 30 minutos posteriores a la exposición al antígeno y alcanzan un pico aproximadamente 45 minutos después de la aparición del primer síntoma. Los animales fueron observados durante la hora y media siguiente al desafío oral por distintos observadores. Como se describe más adelante a cada signo clínico se le asignó un índice clínico de manera de semi-cuantificar la respuesta clínica al desafío oral.

2.4 Evaluación de la respuesta inmune

2.4.1 Pruebas *in vivo*

2.4.1.a. Evaluación de los signos clínicos inducidos post-DO

Para la evaluación de los signos clínicos, se definió una escala cuantitativa de “índice” de síntomas, asignándole de manera arbitraria un puntaje a cada signo clínico inducido en función de la intensidad de los mismos (**tabla 1**).

Tabla 1. Escala de puntajes utilizada para evaluar la intensidad de los signos clínicos observados luego del desafío oral.

Puntaje	Signos clínicos observados
0	sin síntomas
1	rascado de nariz y cabeza, enrojecimiento alrededor de nariz y cabeza
2	hinchazón alrededor de ojos y boca, pelo erizado, baja actividad general y/o baja actividad con aumento de la frecuencia respiratoria
3	respiración dificultosa, cianosis alrededor de la boca y cola
4	inactividad posterior a un estímulo, convulsiones
5	Muerte

Luego de asignados los índices clínicos se considera el valor más alto alcanzado por cada animal de cada uno de los lotes.

2.4.1.b. Prueba cutánea (PC)

Brevemente, esta prueba evalúa la presencia de IgE específica unida a los receptores de alta afinidad en la superficie de los mastocitos de la piel, para lo cual se inocula el antígeno por vía sc, y Azul de Evans en forma intravenosa (iv). Si el animal sensibilizado tiene anticuerpos IgE específicos en las células, la presencia del Ag específico induce la activación celular con la consiguiente liberación de mediadores pro-inflamatorios pre-formados en los gránulos citoplasmáticos. La zona inflamada se evidencia experimentalmente mediante la extravasación del Azul de Evans al tejido circundante (coloración azul de la piel). Este resultado es indicador de un proceso mediado por IgE sólo si la extravasación del colorante se produce a los minutos de inoculado el Ag sc.

Un día antes de la prueba los ratones fueron afeitados en sus flancos derecho e izquierdo. Posteriormente se inoculó por vía sc 50 µl de la solución del antígeno a evaluar, control negativo (solución fisiológica) o control positivo (histamina). La cantidad de antígeno a utilizar se determinó por titulación, encontrándose que para este modelo 4 mg/ml de PLV y 8mg/ml de SP son las concentraciones óptimas que producen reacción positiva en animales sensibilizados, y negativa en los lotes control. Inmediatamente después de la inyección sc se procedió a la inoculación iv de 100 µl de Azul de Evans. Se evaluaron distintas concentraciones de Azul de Evans (0,5 %; 0,25 %; 0,1 % en solución fisiológica) y se eligió

la de 0,25 % como la óptima para visualizar la reacción inflamatoria (animales del lote sensibilización), sin que se observen falsos positivos en los animales del lote control.

Luego de 15-30 minutos se observó la aparición de una roncha azul en la zona de inoculación que se consideró positiva cuando el tamaño del diámetro fue mayor a 3 mm. En numerosas ocasiones se observó la coloración azul no sólo en la zona de inoculación, sino también en zonas alejadas (orejas, hocico, boca, patas, etc), lo cual sugiere la presencia de una reacción inflamatoria sistémica.

2.4.1.c. Prueba de transferencia cutánea pasiva o Anafilaxia cutánea pasiva (ACP)

Para optimizar este ensayo, y asegurar la reproducibilidad del mismo, se realizaron dos experimentos independientes.

Como control positivo, se utilizó un pool de sueros conteniendo niveles altos de IgE específica contra PLV, provenientes de ratones de la cepa BALB/c sensibilizados con PLV en Al(OH)₃ como adyuvante. Como control negativo se utilizó un pool de suero de ratones sin sensibilizar. Los niveles séricos de IgE se determinaron como se detallará más adelante.

Se inocularon por vía sc ratones de la cepa nude (de la misma manera que se procedió para la prueba cutánea) con 50 µl de distintas diluciones de los sueros control (1:5; 1:10; 1:50 y 1:100). Luego de 24 hs estos animales fueron inoculados iv con 100 µl de una solución del antígeno (100 ó 200 µg/100 µl/ratón) diluido en Azul de Evans al 0,25%. Se observa a los minutos la extravasación del colorante azul.

Empleando sueros provenientes de animales sensibilizados y de animales control, logramos optimizar las condiciones de la ACP: ratones BALB/c sin sensibilizar fueron afeitados en sus flancos derecho e izquierdo, e inoculados por vía sc con 50 µl de suero a testificar diluido 1:5 en solución fisiológica. Este suero proviene de animales sensibilizados contra PLV o de los controles (ratones inoculados solamente con el antígeno o con el adyuvante, o de ratones sin inocular). Luego de 24 horas, se les inyectó por vía iv PLV (200 µg) diluida en Azul de Evans al 0,25 % p/v (volumen final de 100µl). Se observa a los minutos la aparición de color azul en la zona de la piel donde se inoculó el suero.

Una reacción positiva significa que el suero inyectado sc contiene anticuerpos IgE que se unen a los receptores de alta afinidad de los mastocitos cutáneos; posteriormente el Ag inoculado por vía iv junto al colorante alcanza la zona de la piel y si es reconocido por la IgE,

y al mismo tiempo puentes al menos 2 moléculas de IgE, se produce la activación celular, con la liberación del contenido de los gránulos y la consiguiente extravasación del colorante. Si por el contrario se observa una reacción negativa significa que el suero no contiene IgE o el Ag no es específico de la IgE. Como se describió anteriormente en PC también se consideró una prueba positiva si el colorante se extravasó en zonas alejadas a la zona de inoculación del suero, lo cual significa que los anticuerpos inoculados se alcanzan la circulación sanguínea y sensibilizan en otros sitios mastocitos y basófilos.

Cabe aclarar que en el ratón, a diferencia de humanos, además de la IgE, la IgG1 puede participar en la degranulación de los mastocitos cutáneos inducida por el antígeno específico. Para diferenciar que isotipo es el responsable de la reacción, el suero de los ratones se pre-calienta por 2 horas a 56°C para inhibir la capacidad de la IgE de unirse a su receptor específico. De esta manera podemos demostrar *in vivo* la existencia de IgE específica funcional en el suero de un animal cuando la ACP se negativiza por efecto del calentamiento del suero.

2.4.1.d. Prueba de Hipersensibilidad Retardada (DTH)

Los ratones previamente sensibilizados fueron inoculados por vía intradérmica (id) en la almohadilla plantar con 20 µl del antígeno de interés (20 µg de PLV) en una de sus patas traseras y con 20 µl de solución fisiológica en la otra, como control negativo. Pasadas 48/72 hs, mediante un calibre digital (precisión 0,01 mm) se midió el grosor de la palma plantar trasera de cada pata. Se calculó y graficó el incremento del espesor plantar en mm de la pata sensibilizada con PLV respecto al control.

2.4.2. Ensayos *in vitro*:

Evaluación de la respuesta inmune humoral:

Se midieron los niveles séricos de distintos isotipos de anticuerpos específicos para proteínas de leche de vaca (PLV) o de proteínas de soja mediante el empleo de ensayos inmunoenzimáticos desarrollados en nuestro laboratorio (ELISA indirecto), en el suero proveniente de los animales de cada lote. Se optimizó la cantidad de antígeno con la que se sensibiliza la fase sólida y la concentración del anticuerpo secundario conjugado. Como controles negativos se emplearon sueros de animales no sensibilizados, o fosas sin sensibilizar, o se omitió el anticuerpo primario (suero de los animales en este caso).

2.4.2.a. Determinación en suero de IgE específica por EAST

La determinación sérica de anticuerpos IgE específicos se realizó por EAST para lo cual se preparó la fase sólida según Ceska (Ceska 1981).

Activación de papeles con CNBr: se activaron papeles de celulosa como fase sólida para lo cual se sumergieron 20 g de discos de papel de filtro (*Whatman*) de 5 mm de diámetro en una solución conteniendo 20 g de CNBr en 500 ml de agua destilada, bajo campana. Se llevó a pH=10,5 con NaOH 1M. Luego se realizaron lavados sucesivos utilizando las siguientes soluciones: NaHCO₃ 0,005 M, agua destilada, acetona 25 %, acetona 50 %, acetona 75 %, y acetona 100 %. Los discos de papel se secaron a temperatura ambiente y se guardaron a -20°C hasta su utilización.

Reacción inmunológica: para la determinación de la IgE específica en el suero de los ratones, se emplearon los discos de papel activados con CNBr, los cuales fueron sensibilizados con los diferentes extractos proteicos a razón de 1,75 mg/ml de PLV o 0,5 mg/ml de proteínas de soja en buffer 0,1 M carbonato/bicarbonato pH 9.4 según el método de Ceska (Ceska 1981). Se incubaron los papeles con el extracto proteico durante toda la noche a temperatura ambiente, luego estos fueron lavados con buffer de sensibilización (buffer carbonato pH 9.4) y bloqueados con una solución 0.05M de etanolamina durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Los papeles sensibilizados y bloqueados se guardaron en la heladera en PBS con azida sódica hasta su utilización.

Cada disco de celulosa sensibilizado y bloqueado se incubó con 50 µl de suero de ratón sin diluir durante 16 hs a 4°C. Luego de realizar los lavados, los papeles se incubaron con 50 µl del anticuerpo biotinilado anti-IgE de ratón (*BD Pharmigen*), llevado a una concentración de 8 µg/ml con diluyente suero equino 3% en solución fisiológica (SE 3% v/v en SF), durante 5 horas a 4°C. Se lavaron los discos nuevamente y se incubaron con avidina conjugada a fosfatasa alcalina (*SIGMA*, 1:3000) durante 30 minutos a 37°C. Finalmente se agregó la solución de sustrato PNPP, deteniéndose la reacción 20 minutos más tarde con 100 µl de EDTA 0.1 M. Se midió la absorbancia a 405 nm en el lector de ELISA (*Sirio SAECS, Radim Company, Italia*).

2.4.2.b. Determinación en suero de IgG1 e IgG2a específica por ELISA indirecto

Los isotipos de IgG fueron analizados por ELISA, para lo cual se sensibilizaron placas de microelisa de poliestireno (*NUNC, Maxisorp*) con 1 µg/ fosa de PLV o de extracto proteico de soja diluidos en buffer de sensibilización (buffer carbonato pH 9.4). Se bloqueó con suero equino al 5% en SF y se incubó con 100 µl de los sueros diluidos 1:200 en diluyente (1 hora a 37°C). Luego se incubó con el anticuerpo secundario específico correspondiente obtenido en oveja (Dako, 1:2000), durante 1 hora a 37°C. Finalmente se empeló un suero obtenido en cabra específico de gammaglobulina de oveja conjugado a peroxidasa (Jackson, 1:10000) durante 1 hora a 37°C. Se agregaron 100 µl de solución de sustrato/cromógeno para peroxidasa (OPD-H₂O₂). Y se detuvo la reacción a los 15 minutos con 50 µl de H₂SO₄ 2N. Se midió densidad óptica a 492 nm.

2.4.2.c Determinación de IgA específica en materia fecal

A partir de las muestras de materia fecal se prepararon extractos proteicos para aislar inmunoglobulinas, los cuales fueron mantenidos a -20°C hasta su uso. Brevemente, se recolectaron 5 pellets en 500µl de buffer de extracción frío (EDTA 30mM, inhibidor de tripsina de soja 105 µg/ml, solución de albúmina bovina 1%, PBS pH 7,6), se disgregó con ayuda de un palillo, luego se centrifugó a 5000 xg por 5min a 4°C y se guardó el sobrenadante a -20°C hasta su uso.

Al igual que para la determinación de los isotipos específicos de IgG, se sensibilizaron placas de microelisa de poliestireno (*NUNC, Maxisorp*) con 1 µg/ fosa de PLV en buffer de sensibilización (buffer carbonato pH 9.4), las cuales fueron posteriormente bloqueadas e incubadas con 100 µl del extracto de materia fecal dilución 1:10 en SF (18 horas a 4°C). Posteriormente se incubó con un antisuero específico de cadena α de ratón conjugado a fosfatasa alcalina (*SIGMA*, 1:1000), durante 1 hora a 37°C. Finalmente se reveló con 100 µl de solución de sustrato/cromógeno para fosfatasa (PNPP). Después de 15-20 minutos la reacción se detuvo con 50 µl de EDTA 0.1 M y se midió la densidad óptica a 405 nm.

2.4.2.d Determinación de los niveles plasmáticos de histamina por ELISA

Se determinaron los niveles plasmáticos de histamina utilizando un ELISA competitivo directo de origen comercial (Immunotech) siguiendo las instrucciones del fabricante. Treinta minutos después del desafío oral, se recolectó sangre del plexo retro-orbital en tubos conteniendo 20 µl de heparina sódica (5000 U por ml, *Abbott*) diluida 1/5 en solución fisiológica, o 20 µl de EDTA 0.25 M. Para minimizar la degradación de la histamina las muestras se colocaron en baño de hielo inmediatamente después de la extracción, se

separó el plasma de las células por centrifugación 10 min a 900 xg, a 4°C dentro de los 20 min que siguen a la extracción, se recolectó los 2/3 de la parte superior del plasma y se conservó a -80°C hasta su análisis.

Brevemente, el ensayo consiste en mezclar 50 µl de las muestras de plasma diluidas o de los controles (0, 2.5, 5, 10, 20 y 50 ppm de histamina) previamente acilados con el reactivo provisto por el kit para aumentar la estabilidad de la histamina, con 200 µl del conjugado (histamina conjugada con fosfatasa alcalina) en los pocillos sensibilizados con anticuerpos anti-histamina. La placa se incubó toda la noche a 4°C, luego de los lavados correspondientes se agregaron 200 µl del sustrato/cromógeno (PNPP), y se detuvo la reacción a los 30 minutos con NaOH 1N. Se leyó densidad óptica a 405 nm en lector de microelisa. A partir de los valores de DO de los estándares, se construyó una curva de calibración DO 405nm vs. concentración de histamina (nM), que permitió calcular la concentración de histamina en las muestras problema, mediante la aplicación de la función matemática logit (p).

Evaluación de la respuesta inmune celular

2.4.2.e. Dosaje de citoquinas

Se evaluó la inducción de linfocitos T específicos durante la sensibilización mediante ensayos de proliferación celular y secreción de citoquinas a partir de células aisladas de animales provenientes de los distintos lotes. Para tal fin se extrajo el bazo y los ganglios mesentéricos de los ratones del grupo control, del grupo modulado y del grupo de animales sensibilizados, el día posterior al desafío oral con PLV. Los tejidos fueron disgregados, como se describe posteriormente, y se realizó recuento celular empleando Tripan blue para cuantificar células viables. Los cultivos celulares se realizaron en placas de cultivo celular de 48 fosas (*Cell Star*®, *GBO*) y empleando como medio de cultivo RPMI suplementado con suero fetal bovino 5% y antibióticos. Se optimizó para cada tipo de tejido el número de células a incubar, concentración de antígenos y tiempo de cultivo. De esta manera, se colocaron 500 µl de la suspensión celular (4×10^6 células/fosa) y 500 µl de una solución 2X en RPMI de los siguientes estímulos antigénicos: PLV (2000 µg/ml), extracto proteico de soja (2000 µg/ml), β-lactoglobulina (100 µg/ml) o caseínas (800 µg/ml). Para el caso de células mononucleares de ganglios mesentéricos hubo que hacer pool de ganglios para llegar a este número. Como controles del ensayo se empleó Concanavalina A (Con A) (5 µg/ml) como control positivo, o medio RPMI como control negativo.

Luego de 72 hs de incubación a 37°C en atmósfera controlada de CO₂ se cuantificó en el sobrenadante de los cultivos la presencia de citoquinas mediante el empleo de un ELISA de captura indirecto de origen comercial: interferón gamma (*Mouse IFN-γ CytoSet™, BioSource, Invitrogen*), interleuquina-5 (*Mouse IL-5 CytoSet™, Invitrogen*) e interleuquina-13 (*R&D Systems, UK*). Se introdujeron algunas modificaciones técnicas al protocolo indicado por el fabricante para optimizar cada ensayo, en función de las concentraciones de citoquinas presentes en los sobrenadantes de los cultivos. Este inmunoensayo, brevemente, consistió en sensibilizar las placas de ELISA (*NUNC, MaxiSorp*) con 100 µl/fosa del anticuerpo de captura correspondiente a cada citoquina, en una concentración de 1.25 µg/ml para IL-5 e IFN-γ, y 4 µg/ml de IL-13 en buffer de sensibilización pH 9.0, durante toda la noche a 4°C. Luego se realizó el bloqueo con 300 µl/fosa de “Buffer Assay” (PBS con BSA 0.5%, pH 7.4) durante 1 hora a 37°C, y luego de los lavados correspondientes, se incubaron con 100 µl/fosa de sobrenadante de cultivo; paralelamente se procesaron los estándares de citoquinas de cada kit para construir la curva de calibración, junto con 50 µl/fosa del “anticuerpo de detección” (anti-IFN-γ-biotinilado 0.125 µg/ml o anti-IL-5 biotinilado 0.10 µg/ml o anti-IL-13-biotinilado 0.0625 µg/ml), durante toda la noche a 4°C. Finalmente, se realizó una incubación de 1 hora a 37°C con Streptavidin-HRP (0,15 µg/ml). Se empleó OPD-H₂O₂ como sustrato cromógeno y luego de detener la reacción con H₂SO₄ 2N se midió la densidad óptica a 492 nm. La concentración de citoquinas en el sobrenadante de cultivo se obtuvo de la curva de calibración (DO vs. concentración de citoquinas en pg/ml).

2.4.2.f. Marcación intra-citoplasmática

A partir de la suspensión de esplenocitos o células de los ganglios mesentéricos, se realizaron cultivos celulares en placas de 96 fosas (*Cell Star®*, *GBO*), colocando 100 µl de la suspensión celular (2×10^5 células/fosa) y 100 µl de solución 2X en RPMI de PLV (2000 µg/ml). Como controles del ensayo se empleó Con A (5µg/ml) como control positivo, o medio RPMI como control negativo. Las últimas 4hs de incubación se realizaron en presencia de Brefeldina A (inhibidor del transporte de proteínas desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi) a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Pasado este tiempo las células fueron lavadas con buffer staining (PBS, 2mM EDTA, 2% de SFB), se bloquearon los receptores Fc con Fc Block o suero de ratón normal (SRN) durante 15 minutos a 4°C, para luego detectar las proteínas de superficie de interés con los anticuerpos específicos fluoresceinados, durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Las células fueron lavadas y resuspendidas en buffer fijación/permeabilización (*eBioscience*) siguiendo las instrucciones del fabricante del kit

comercial para tinción intra-citoplasmática. Brevemente, una vez fijadas y permeabilizadas las células, se incubaron con el anticuerpo anti-citoquina específico conjugado a un fluorocromo. Las células fueron analizadas por citometría de flujo multiparamétrica empleando un citómetro Becton Dickinson Calibur. Se hizo un gate en la región de los linfocitos y se analizó la presencia de Foxp3, IL-5, IL-13, IL-10 e INF- γ en células CD4⁺ y CD8⁺.

3. Biología Molecular

Se estudió la expresión de genes en líneas celulares establecidas (Caco-2 y A549) y células aisladas de distintos tejidos de ratón (Yeyuno, enterocitos y ganglios mesentéricos).

3.1. Extracción de RNA

Para la obtención de RNA total se homogeneizó mecánicamente el material biológico, al que previamente se lo trató con buffer lisis comercial, mediante el empleo de un triturador UltraTurrax. De esta manera se trataron células o tejidos y se empleó el kit *illustra RNAspin mini isolation kit*, (GE, Healthcare Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células son lisadas en buffer RA1, el cual inactiva las RNAsas y facilita la unión de RNA a la membrana de silica de la columna; el DNA contaminante se elimina utilizando una DNAsa recombinante, aumentando así la pureza de RNA. Luego se realizan lavados para eliminar las sales y los diferentes componentes celulares y por último se eluye el RNA con agua libre de RNAsa.

Para cuantificar y determinar la calidad del RNA extraído se empleó un método espectrofotométrico, en el cual se midió la absorbancia (A) a 260 y a 280 nm. Una relación A_{260}/A_{280} entre 1,7 y 2,0 indica un grado de pureza aceptable, mientras que relaciones menores indican contaminación con proteínas. Para la cuantificación de RNA se midió A_{260} y se consideró una unidad de absorbancia equivalente a 40 μ g/mL de RNA.

$$[\text{RNA}] = 40 \mu\text{g/mL} \times A_{260} \times \text{dilución}$$

3.2. Reacción de transcripción reversa

Esta técnica se basa en la obtención de DNA complementario a partir del RNA mensajero (mRNA) (Mullis, K 1990), utilizando la enzima transcriptasa inversa (M-MLV). Se siguió el siguiente protocolo: se preparó una mezcla de 1 μ g de RNA total con 1 μ l de

random primer, (10 µg/ µl), y agua libre de RNAsa de manera de tener un volumen de 12 µl, la mezcla se incubó 5 minutos a 70°C para desnaturalizar el RNA e inmediatamente se enfrió a 4°C, proceso mediante el cual hibrida el primer. En ese momento se agregó una mezcla que contenía 4 µl de buffer de la transcriptasa inversa, 1.5 µl de DTT 100mM, 0.5 µl de inhibidor de nucleasas de RNA, 1 µl de dNTPs y 1 µl de la enzima SuperScript II (Invitrogen). Las muestras fueron incubadas en el termociclador (Mastercycler® gradient, Eppendorf) a 37°C por 45 minutos, a 70°C durante 15 minutos para terminar la reacción y luego fueron enfriadas a 4°C. El cDNA obtenido fue guardado a -20°C hasta su empleo.

3.3. Real time PCR

Para esta técnica se realizó la clásica sucesión de ciclos de desnaturalización de la doble hebra de ADN, hibridación de los primers al ADN molde, síntesis de la cadena complementaria mediante una polimerasa resistente al calor (Taq polimerasa) y nuevamente desnaturalización del ADN doble cadena para comenzar el ciclo nuevamente.

En cada ciclo la cantidad de ADN se duplica y, en condiciones ideales, en un ciclo dado (n), el número de copias de ADN (N_n) podría calcularse según la ecuación $N_n = N_0 \times 2^n$, donde N_0 es el número de copias inicial. El crecimiento exponencial del número de copias de ADN ocurre hasta que los reactivos se agotan y/o se produce inhibición por producto. La real time PCR se llevó a cabo en un ciclador térmico (iCycler Thermal Cycler 170-8731, BioRad) que tiene acoplado un detector óptico que mide la fluorescencia en cada ciclo y en cada reacción individual. En la técnica empleada en este trabajo, se utilizó el indicador SYBR Green que emite fluorescencia al unirse al ADN doble cadena por lo cual detecta la amplificación en tiempo real. De esta manera, se obtiene para cada reacción individual una curva de amplificación, que se define como la curva de fluorescencia en función del número de ciclos (**figura 9**).

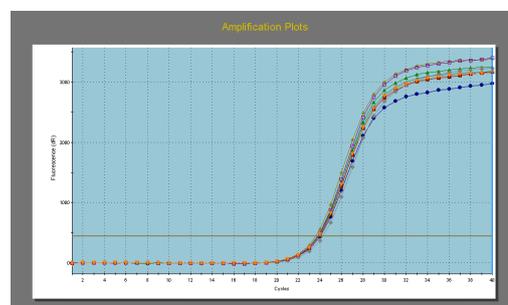


Figura 9. Curva de amplificación obtenido con un sistema SYBR Green para un gen dado en duplicados de una muestra.

En estas curvas se pueden distinguir tres fases: 1) una fase inicial en la que debido a una cantidad aún baja de ADN los cambios de fluorescencia no son detectados por el equipo y por lo tanto la señal es aproximadamente constante; 2) una fase exponencial donde se observa el mayor crecimiento de fluorescencia con el número de ciclos; y 3) una fase de meseta o declinación, en la que la fluorescencia es constante o crece más lentamente. Intuitivamente es posible deducir que cuanto mayor sea la cantidad de ADN inicial, más pronto se observará un aumento significativo de fluorescencia en el curso de la reacción. La fase inicial de la curva de amplificación define una línea de base por encima de la cual se detecta la acumulación del producto de PCR. Al establecer arbitrariamente una línea umbral por encima de esta línea de base, se define el parámetro C_T (ciclo umbral) como el número fraccional de ciclos en el que la fluorescencia intercepta la línea umbral.

Para validar el carácter cuantitativo de la técnica es necesario incluir primers para amplificar un gen endógeno de expresión constante. En este caso se empleó β -actina para estandarizar la cantidad total de cDNA. En la **tabla 2** se describen los genes de interés analizados para ratón, mientras que en la **tabla 3** se incluyen los de humanos. Se graficó el *fold increase* (FI) de los niveles de mRNA ($2^{\Delta C_t}$), el cual fue determinado comparando el C_t del gen de interés con el correspondiente al de β -actina (C_t); y comparando los valores de C_t entre el basal sin tratar y tratado (ΔC_t) para establecer una variación en la expresión.

Los primers para los distintitos genes utilizados en este trabajo fueron diseñados mediante la secuencia específica reportada para cada transcripto en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>. El diseño se realizó por medio del software PerlPrimer v.1.1.20. Dentro de lo posible, los primers fueron diseñados únicamente con regiones exónicas con el fin de evitar una probable inespecífica amplificación de DNA genómico. Para asegurarnos la especificidad del primer se realizó un *BLAST*.

Tabla 2. Oligonucleótidos (primers) empleados para la amplificación de genes murinos expresados en muestras de ratón.

gen	nomenclatura	Secuencia 5' -> 3'
CCL20	Fwd ccl20	GCAGAAGCAGCAAGCAACT
	Rv ccl20	TTCATCGGCCATCTGTCTTG
MCP-1	Fwd mcp-1	CTCACCTGCTGCTACTCATT
	Rv mcp-1	CACAGACCTCTCTCTTGAGC
IL-1 β	Fwd il-1b	TCAACTGTGAAATGCCACCT
	Rv il-1b	TTCATCTTTTGGGGTCCGTC
IL-5	Fwd il-5	TACTCATAAAAATCACCAGC
	Rv il-5	TTATTAATGACAGGTTTTGG
IL-13	Fwd il-13	ACATCACACAAGACCAGACT
	Rv il-13	TTTGTATAAAGTGGGCTAC
IFN- γ	Fwd ifng	TCCTTTGGACCCTCTGACTT
	Rv ifng	ATGCAGTGTGTAGCGTTCAT
GATA-3	Fwd GATA3	TGTCCAGTCAGTAACTTCA
	Rv GATA3	CAGTCACCTGAGTCTTCTCT
T-bet	Fwd T-bet	CTACATGCTCTGTGAATCAG
	Rv T-bet	CATCTTTTCTTATTTTGGTG
IL-10	Fwd IL-10	GGACTTTAAGGGTACTTGG
	Rv IL-10	CAAATGCTCCTTGATTCTG
TGF- β	Fwd TGF- β	GGA ACTCTACCAGAAATATAGC
	Rv TGF- β	TATCTTTGCTGTCACAAGAG

Tabla 3. Oligonucleótidos (primers) empleados para la amplificación de genes humanos expresados en las líneas celulares.

gen	nomenclatura	Secuencia 5' -> 3'
CCL20	Fwd ccl20	CCA AGA GTT TGC TCC TGG CT
	Rv ccl20	TGC TTG CTG CTT CTG ATT CG
IL-8	Fwd il-8	CAC CGG AAG GAA CCA TCT CA
	Rv il-8	GGA AGG CTG CCA AGA GAG C
MCP-1	Fwd mcp-1	CGC CTC CAG CAT GAA AGT CT
	Rv mcp-1	ATG AAG GTG GCT GCT ATG AGC
IL-1 β	Fwd il-1b	AGCTGGAGAGTGTAGATCCC
	Rv il-1b	GGA ACTGGGCAGACTCAAAT
TNF- α	Fwd tnfa	TCG TCT TGG CTG AGA AAG GG
	Rv tnfa	GAG GTG GAA TGG CTC TGG C
IL-6	Fwd il-6	CATGGGCACCTCAGATTGTT
	Rv il-6	AACTGCATAGCCACTTTCCAT

4. Técnicas de cultivo celulares

4.1 Cultivos empleando líneas celulares

Se emplearon las líneas celulares Caco-2 (células epiteliales de carcinoma de colon humano), Caco-luciferasa (Caco-luc) (línea reportera de células Caco-2 transfectadas con el plásmido pcc120 Luc, por lo cual la enzima se encuentra bajo el promotor de NF-κB) (Nempont C 2008) y células epiteliales bronquiales humanas A549. Las células fueron mantenidas en medio Dulbecco's Eagle modificado (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina a 37°C en atmosfera húmeda con 5% de CO₂.

En los cultivos celulares se incluyeron:

-estímulos pro-inflamatorios: lipopolisacárido de *E. coli* 026:B6 (LPS, 1 µg/ml, Sigma, USA), flagelina de *Salmonella typhimurium* (Flic, 1 µg/ml), factor de necrosis tumoral recombinante humano (rhTNF-α 10 ng/ml; R&D, USA), e IL-1β humana (10ng/ml; R&D, USA)

-bacterias inmunomoduladoras: bacterias Gram positivas muertas del género Actinomycetales Gb o Rc (10⁹, 10⁷, 10⁵, 10³ bacterias).

En los ensayos de qPCR a partir de estas células se obtuvo el RNA luego de cada tratamiento y mediante el empleo del buffer lisis como se describió anteriormente.

Para los ensayos de Caco-luc, éstas fueron incubadas con el estímulo por 4 - 6hs, se lavaron las células y posteriormente se lisaron con el buffer lisis (Tris-fosfato 25mM, DTT 2mM, ácido tetra acético 1,2- diaminociclohexan, 10% glicerol y 1% Tritón X-100). Para medir la actividad luciferasa se utilizó el sustrato comercial (Luciferase assay kit, Promega, USA) según las instrucciones del fabricante y se graficó la actividad de luciferasa por medida de la emisión de luz empleando un luminómetro (Luminoscan TL Plus; Labsystem) en células tratadas y células sin tratar.

4.2 Cultivos empleando suspensiones celulares obtenidas de bazo y de ganglios linfático mesentéricos de ratón

El día posterior al desafío oral con PLV se sacrificaron los ratones por dislocación cervical y se extrajo el bazo de los distintos ratones. Se disgregaron mecánicamente hasta obtener una suspensión celular en medio GKN estéril. Se realizó el recuento de células viables con Tripán blue, se centrifugó (5 min a 500 xg) y resuspendió el pellet celular en medio de cultivo RPMI estéril suplementado con suero fetal bovino (SFB) 5% y antibióticos

(estreptomycin, penicilina) a razón de 8×10^6 células/ml (suspensión 2X). Esta suspensión fue cultivada junto a los estímulos proteicos como se menciona en el punto 2.4.2.e.

Los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) extraídos de los distintos animales fueron procesados en RPMI con 1mg/ml de colagenasa tipo IV (*Sigma*). Se disgregaron mecánicamente con la ayuda de de pinza y tijera, se homogeneizó por pasajes a través de aguja y jeringa, y las células se incubaron durante 30 min a 37°C con agitación. Se centrifugó a 500 xg durante 5min a 4°C y las células se resuspendieron en RPMI suplementado. Se realizó un recuento celular como se describió previamente y se sembraron 8×10^6 células/ml para medir citoquinas en los sobrenadantes de cultivo, o 2×10^6 células/ml para el análisis de citoquinas por citometría de flujo intra-citoplasmáticas.

4.3 Cultivos celulares empleando suspensiones celulares obtenidas de intestino de ratón

Para el aislamiento de enterocitos murinos se aplicó la técnica descrita por Dillon con algunas modificaciones (Dillon et al 1984). Brevemente, los animales ayunados durante la noche fueron sacrificados y se extrajo la porción correspondiente al yeyuno. El intestino fue lavado dos veces insuflando PBS o solución fisiológica con ayuda de aguja y jeringa. Se abrió longitudinalmente la porción de intestino manteniéndolo sumergido en una solución de HBSS con 2% de SE y antibióticos. Las piezas de intestino se pasaron a una segunda solución de HBSS completo con 1mM de ditionitrosol (DTT) y 2% SE para eliminar el mucus. Se incubó durante 10 minutos a 4°C y se pasó a medio HBSS 2% SE con 2mM de EDTA para secuestrar calcio y romper las uniones estrechas entre las células epiteliales. Se incubó durante 30 minutos a 37°C con agitación, la solución resultante se filtró y luego se centrifugó (10 minutos a 500 xg a 4°C) para finalmente resuspender en SF. Se realizó recuento celular como se describió anteriormente.

5. Obtención de extractos celulares para inmunoblotting

5.1 Obtención de extracto celular total

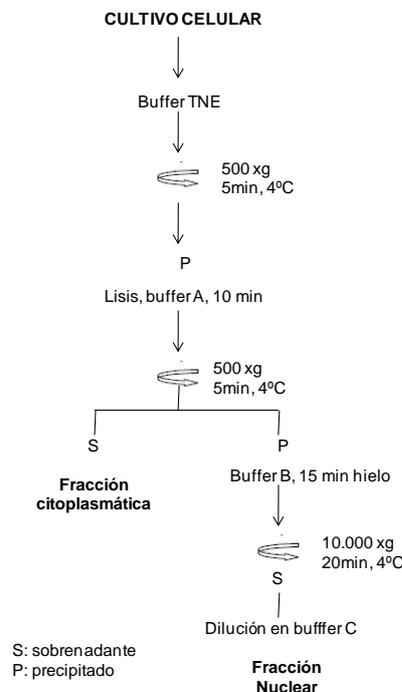
Para la lisis celular se descartó el medio de cultivo y se agregaron 200 μl de buffer lisis (Hepes, EDTA, KCl y Nonidet P40). Se incubó durante 15 minutos a 4°C en la botella de cultivo y se centrifugó a 8000 xg por 30 minutos a 4°C . Se tomó el sobrenadante y se cuantificaron las proteínas totales por BCA. Se alicuotó la solución proteica y se guardó a -80°C hasta su uso.

5.2 Obtención de extracto nuclear y citoplasmático

En la **figura 10** se esquematiza el procedimiento empleado para la obtención de los distintos extractos. A partir de células en suspensión o adheridas se lavaron con PBS frío y luego se agregó buffer TNE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM y NaCl 150mM) frío. Para las células en placa se empleó un scraper para desprenderlas, y la suspensión celular se centrifugó a 500 xg durante 5 min a 4°C. Se resuspendió en solución A (Hepes 10mM, MgCl₂ 1.5mM, KCl 10mM), y se dejó en hielo por 10 minutos. Posteriormente se agregó NP40 0.5%, se agitó suavemente para romper las membranas plasmáticas, pero no las nucleares. Se agitó por inversión unos 2 minutos, se centrifugó a 500 xg a 4°C durante 5 min. El pellet de los núcleos se resuspendió en solución B (Hepes 10mM, MgCl₂ 1.5 mM, EDTA 0.2mM, glicerol 20% y KCl 0.42M) que consiste en un buffer de alta concentración salina por lo que hay que tener la precaución de que quede diluido. Se incubó 15min a 4°C con agitación y se centrifugó a 10.000 xg durante 20 min a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se lo diluyó en 2 volúmenes de solución C (Hepes 10mM, KCl 60mM, glicerol 20%, EDTA 0.25mM y EGTA 0.125mM). Se determinó la concentración de proteína por BCA y se conservó en alícuotas a -80°C.

(A todas las soluciones se les agregó un cocktail de inhibidores de proteasas (*Sigma*) antes de utilizarlas).

Figura 10. Esquematización del procedimiento de **fraccionamiento celular**



5.3 Electroforesis SDS-PAGE e inmunoblotting

Las suspensiones proteicas obtenidas se caracterizaron por SDS-PAGE empleando geles discontinuos al 10% en condiciones desnaturalizantes según Laemmli (Laemmli 1970). De esta manera las proteínas se separan en función de su tamaño o peso molecular relativo.

Las muestras se prepararon a partir de los extractos nucleares y totales en buffer muestra con β -mercaptoetanol al 5%, para establecer condiciones reductoras; y se calentaron a 95°C durante 5 min. Se sembraron volúmenes que contenga entre 5 y 10 μ g de proteínas por calle. Para la preparación de los geles y la electroforesis se emplearon los sistemas Miniprotean III® y Tetracell® de Bio-Rad (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA*). Luego de la corrida electroforética (15 min a corriente constante de 30 mA y 1 hora a corriente de 50 mA), las proteínas fueron electro-transferidas a una membrana de nitrocelulosa (*Schleicher & Schuell Bioscience, Keene, NH, USA*) según Towbin (Towbin, Staehelin, and Gordon 1979) mediante el sistema comercial de *Bio-Rad*, según las indicaciones del fabricante. La electrotransferencia se realizó durante 1 hr a corriente constante (300mA) evaluándose la eficiencia de la transferencia por tinción reversible con el colorante Rojo Ponceau S. Las membranas transferidas se bloquearon con SE al 5% en TBS-T (50mM Tris-HCl; 150mM NaCl; Tween 0.1% pH 7.4) o en una solución de leche descremada al 3% en TBS-T. La incubación se realizó durante 1 hora a 37°C ó durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C y luego de lavar se agrego el anticuerpo secundario conjugado a una enzima o a biotina.

Los distintos lavados de la membrana durante el inmunoblotting se realizaron con TBST 0,1% con agitación durante 3-5 min. Este procedimiento se repitió 3 veces por lavado.

Se emplearon los siguientes anticuerpos en distintos ensayos: antisuero policlonal de conejo específico de p65 humano/ratón (*Santa Cruz*), antisuero policlonal de conejo anti-Histona humano/ratón (*abCam*), anticuerpo de ratón anti-I κ B α humano (*BD*), y anticuerpo de conejo anti- β -actina humano/ratón (*abCam*), antisuero específico para inmunoglobulinas de ratón o de conejo conjugado a peroxidasa (HRP) (*BioRad*).

El revelado de las bandas en la membrana se realizó por quimioluminiscencia empleando Luminol como sustrato emisor de luz para HRP. Se expuso la membrana a placas de rayos X (*GE, Healthcare, Germany*) y posteriormente se realizó el revelado empleando las soluciones comerciales de fijador/desarrollador clásicas.

6. Técnicas de microscopia

6.1.a Microscopia de fluorescencia/confocal

A partir de células sometidas a diferentes tratamientos se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente; se lavaron nuevamente 2 veces con NH₄Cl 50mM en PBS, y se trataron con Tritón X-100 al 1% en PBS durante 10 minutos para permeabilizarlas. Finalmente se lavaron con PBS Tween 20 al 0.5% y se bloquearon con BSA al 2% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células fijadas y permeabilizadas fueron incubadas con el anticuerpo de interés (anti-p65 Alexa488) durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Una vez lavadas, las células fueron incubadas con DAPI 5µg/ml o yoduro de propidio (1mg/ml) por 5 minutos para la visualización de núcleos, y luego de sucesivos lavados se montaron para su observación al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse Ti-U) o al microscopio confocal (Leica SP5).

6.1.b. Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS)

A partir de células Caco-2 crecidas hasta confluencia, en placas de cultivo de 96 aptas para microscopia (NUNC), se realizó una incubación con el sustrato fluorescente: 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCF-DA) que detecta H₂O₂ y radicales libres, en HBSS suplementado con Hepes. Luego se lavaron las células y fueron incubadas con los estímulos a estudiar: Gb, Rc y Ti (10⁷ bacteria/ml) durante 30 min. Como control positivo de fluorescencia se utilizó H₂O₂ y como estado basal se usó medio de cultivo solo (HBBS + Hepes). Se observó la emisión de fluorescencia al microscopio de fluorescencia invertido (Nikon Eclipse Ti-U). Como control de la vía se utilizaron los siguientes inhibidores de la oxidación: N-acetilcisteína (NAC) y 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (TROLOX).

6.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

A partir de células epiteliales crecidas sobre vidrios redondos especiales para cultivos, se realizaron los ensayos *in vitro* de activación y/o modulación durante 2 hs, y luego se procedió a fijar las células con glutaraldehído al 2% en PBS. Se lavaron con PBS y se deshidrataron empleando una secuencia de soluciones de deshidratación: etanol 30 %, 50 %, 70 %, 100 % y acetona. Luego las células fueron sometidas a una **técnica de secado de punto crítico**, la cual permite secar las células sin que éstas colapsen o deformen su estructura original, es decir cuando éstas se encuentran húmedas y frágiles. Las muestras de tejidos o células a medida que las células se secan, la interfase líquido/gas viaja a través de la superficie

Autora: Smaldini Paola Lorena

Directores: Dr. Docena G. y Dr. Fossati C.

de la muestra colapsando las cavidades. En el caso de muestras que contienen líquido, se vuelven huecas durante el secado y esto puede modificar drásticamente la topografía celular o tisular. La técnica de punto crítico evita estos efectos, no permitiendo que se forme la interfase líquido/gas y evitando las fuerzas de tensión de superficie. En un sistema líquido/gas, cuando se está por encima de su temperatura crítica, el sistema será siempre gaseoso y no puede ser licuado por la aplicación de presión. La transición de líquido a gas en el punto crítico ocurre sin una interfase porque las densidades de líquido y gas son iguales en este punto. Por lo tanto, si las células están inmersas en un líquido por debajo de su punto crítico, y el líquido es llevado a una temperatura y presión por encima del mismo, las células estarán inmersas en gas, y secas. Para llevar a cabo este procedimiento a temperatura y presión adecuadas, es conveniente reemplazar el agua (punto crítico muy alto) por otro líquido de menor punto crítico; en nuestro caso se reemplazó el agua por acetona y ésta por CO₂ líquido.

Luego las células fueron recubiertas con un fino baño de oro, para que reflejen los haces de electrones que serán recogidos por el microscopio de barrido electrónico y transformados a una imagen tridimensional. Brevemente, la muestra se colocó sobre una cámara conectada a una fuente de corriente continua conectada por una parte a una tarjeta de oro, y por la otra parte al portaobjeto con la muestra. El conjunto se acopla a una cámara de vacío y se introduce argón. La presencia de este gas provoca que los átomos de argón impacten sobre la tarjeta de oro desprendiendo átomos que son atraídos hacia la muestra.

Se realizaron cortes de 15-20 nm y se observaron en un microscopio Philips SEM 505.

6.3 Microscopia electrónica de Transmisión (MET)

A partir de células activadas y/o tratadas se aplicó un protocolo para tinción negativa: las células fueron pre-fijadas con glutaraldehído al 2% en PBS durante 60 min a 4°C, se lavaron con PBS frío y se fijaron con tetróxido de Osmio al 1% en PBS durante 60 min a 4°C. Se lavaron nuevamente con PBS y deshidrataron con el siguiente “tren de deshidratación”: etanol 30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 %.

Las muestras tratadas fueron incluidas en una resina Epoxi que proporciona una excelente preservación de las mismas y una gran calidad en la realización de los cortes ultrafinos. La inclusión se realiza en estufa (60°C) para que se produzca la polimerización de la resina. Luego las cápsulas con resina fueron talladas y sometidas a cortes semi-finos de 2-3 µm. Estos cortes fueron fijados sobre un portaobjeto y se seleccionaron al microscopio óptico las áreas a realizar los cortes ultrafinos. Los cortes ultrafinos de 60-70nm fueron tratados con

acetato de uranilo y acetato de plomo y recogidos en unas rejillas de cobre para ser analizados en el microscopio de transmisión electrónica (JEM-1200EX Mark II - JEOL).

7. Ensayo de asa ligada intestinal

Ratones BALB/c de 25 á 30gr de peso ayunados durante una noche fueron sometidos a anestesia total (administración intraperitoneal de ketamina-100mg/Kg, y xylacina-5mg/Kg). Se realizó la técnica de asa ligada según lo descrito por Carlson (Carlson et al. 2001). Brevemente, se realizó una incisión abdominal y se realizaron 2 loops por ratón de aproximadamente 2 cm cada uno. En distintos ratones se combinaron las siguientes administraciones intra-intestinales: suspensión bacteriana ($Gb 10^9$ bacterias/150 μ l) en PBS, bacterias junto a Flic (250 μ g), PBS y Flic. Se mantuvieron los animales anestesiados y a las 2 horas los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Se recolectaron los loops intestinales, se lavaron en PBS y homogeneizaron en buffer lisis RA1. Se congelaron a -80°C hasta su extracción de RNA total como se describió previamente.

8. Análisis estadístico

Los gráficos y el análisis de datos de los diferentes ensayos fue realizado mediante el programa GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (San Diego California USA). Los análisis realizados fueron Anova de una y dos vías, seguidos del test de Bonferroni para discriminar las diferencias significativas entre las medias de los diferentes grupos experimentales.

También se aplicó el test de Student pareado, no pareado y no paramétrico (Mann-Whitney) según los datos a analizar.

Capítulo 1

Optimización de un modelo murino de alergia alimentaria a proteínas de leche bovina



I.1 INTRODUCCIÓN

El desarrollo de distintos modelos animales de alergia alimentaria ha permitido estudiar y comprender aspectos moleculares y celulares que gobiernan las reacciones alérgicas, predecir reacciones alérgicas que podrían ser originadas por alimentos potencialmente alergénicos y para el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas (Finkelman et al. 2005). La especie animal más comúnmente empleada en estos modelos es ratón por distintos motivos: conocimiento del genoma, amplia disponibilidad de reactivos específicos (anticuerpos específicos contra distintas proteínas de interés inmunológico, citoquinas, etc), facilidad para su reproducción y mantenimiento, facilidad para su manipulación, existencia de numerosas cepas, y por la posibilidad de su modificación genética (animales transgénicos y knock out para distintos genes relacionados con la fisiología del sistema inmune) (Helm y Burks 2002; Dearman y Kimber 2009; Finotto et al. 2002).

En ratones, la respuesta fisiológica frente a la exposición a un antígeno que ingresa por el tracto gastrointestinal es la inducción de tolerancia inmunológica, con la generación de linfocitos T específicos con actividad regulatoria (Takayama et al. 2007). Esto significa que frente a un Ag que ingresa por vía oral no se produciría una reacción alérgica en forma espontánea. Por esta razón el desarrollo de modelos murinos de alergia implica una fase inicial de sensibilización en la cual en general se emplean adyuvantes. Este hecho implica una marcada diferencia con respecto a la inducción de la patología en humanos. Por lo tanto, la aplicación de estos modelos se ve restringida casi exclusivamente al estudio de la fase efectora de estas enfermedades.

En los últimos años se han producido importantes avances en la obtención de modelos animales de alergia alimentaria en otras especies como en rata, perro o cerdos, y en cada caso se han logrado reproducir diferentes aspectos de la patología observada en humanos (Atkinson y Miller 1994; Kitagawa et al. 1995; Ermel et al. 1997; X. M. Li, Schofield, et al. 1999). Disponer de estos modelos junto a la profundización en el conocimiento de la fisiología del sistema inmune asociado a la mucosa gastrointestinal, ha posibilitado una mejor comprensión de los mecanismos fisiopatogénicos e inmuno-regulatorios que operan en las alergias alimentarias. En consecuencia este caudal de información posibilitó el planteo y estudio de nuevas y prometedoras terapias para el tratamiento de esta patología (Cardoso et al. 2008; M. Akdis y Akdis 2009; Ganeshan et al. 2009; Broide 2009).

Con respecto al uso de adyuvantes, en la fase inductora en la mayoría de los modelos se emplean adyuvantes sistémicos como el hidróxido de aluminio. Este adyuvante se

administra por vía intraperitoneal, e induce el reclutamiento y activación de células dendríticas (Kool, Pétrilli, et al. 2008). Se ha demostrado que el hidróxido de aluminio induce la liberación de ácido úrico el cual es detectado como una señal de estrés por las células dendríticas (Kool, Soullié, et al. 2008; Shi et al. 2003; I. Suzuki et al. 2009), las cuales secretan al medio IL-1 β . Esta citoquina pro-inflamatoria promueve la activación y diferenciación de los LT a un fenotipo Th2, e induce la producción y secreción de IgG1 (Behrens et al. 2008). Sin embargo, nuestro grupo de trabajo ha estudiado previamente el efecto que diferentes adyuvantes, mucosales y sistémicos, ejercen sobre la inmunidad adquirida, y hemos determinado que la toxina colérica, administrada por vía intragástrica, promueve la respuesta inmune que más ajustadamente reproduce la que ocurre en una alergia alimentaria. Por este motivo en este trabajo emplearemos en ratones BALB/c toxina colérica como adyuvante mucosal (Agren et al. 1997), con proteínas de leche bovina como alergenos, para la inducción de una respuesta inmune local y sistémica antígeno-específica y Th2-dependiente. Otros grupos, empleando este adyuvante mucosal lograron inducir una respuesta inmune Th2-dependiente en la cepa C3H/HeJ, en la cual los receptores TLR-4 son no funcionales y por lo tanto desarrollan una respuesta inmune Th1 deficiente (X. M. Li, Schofield, et al. 1999).

La actividad adyuvante de la TC puede ser atribuida a distintos factores:

- La unión de la subunidad B a células epiteliales, células M y APCs entre otras, permite su internalización, y promueve la activación celular a través del aumento de AMP cíclico, aumentando la expresión de moléculas co-estimuladoras y de receptores de quimioquinas (Gagliardi y De Magistris 2003; Eriksson et al. 2003).
- Su estabilidad frente a proteasas determina que sea una potente enterotoxina bacteriana, y aquí radica su importancia como adyuvante mucosal, al administrarla por la vía oral.
- Potencia la presentación de antígenos mediante el aumento de la secreción de IL-1 por APCs (Bromander et al. 1991).
- Moviliza CD_s inmaduras a intestino, mediante el aumento de CCL20/MIP-3 α por las células epiteliales intestinales (Anjuère et al. 2004). Estas células dendríticas promueven una respuesta de perfil Th2 (Eriksson et al. 2003).

Por lo tanto, la TC constituye un excelente adyuvante mucosal para potenciar la inmunogenicidad de la mayoría de los antígenos que son administrados conjugados covalentemente o co-administrados con ella (Elson y Ealding 1984; Yamamoto et al. 1997).

También hemos estudiado el empleo de bicarbonato de sodio previo a las sensibilizaciones con PLV junto a TC. La disminución de la acidez gástrica posibilita una mejor preservación del antígeno en su transporte hasta el intestino delgado. Pero además, se ha demostrado, en pacientes, que las drogas antiácidas (generalmente empleadas en gastritis o infecciones por *Helicobacter pilori*) promueven la producción de IgE. Pacientes con úlceras gástricas en tratamiento desarrollan niveles elevados de IgE específica a determinados alimentos que ingieren (Untersmayr et al. 2005). Resultados similares lograron reproducirse en ratones sensibilizados cuando fueron tratados con supresores de la secreción de ácidos (Schöll et al. 2005). En un principio se atribuyó este efecto adyuvante a los componentes de aluminio presentes en las drogas antiácidas (Brunner et al. 2007). Sin embargo, actualmente se ha aceptado que la neutralización de la acción digestiva gástrica es el principal factor para mantener la capacidad alergénica de las proteínas alimentarias ingeridas. Esto implica que la conformación nativa de los alérgenos es un factor pro-alérgico muy importante (Kufe 2008).

I.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

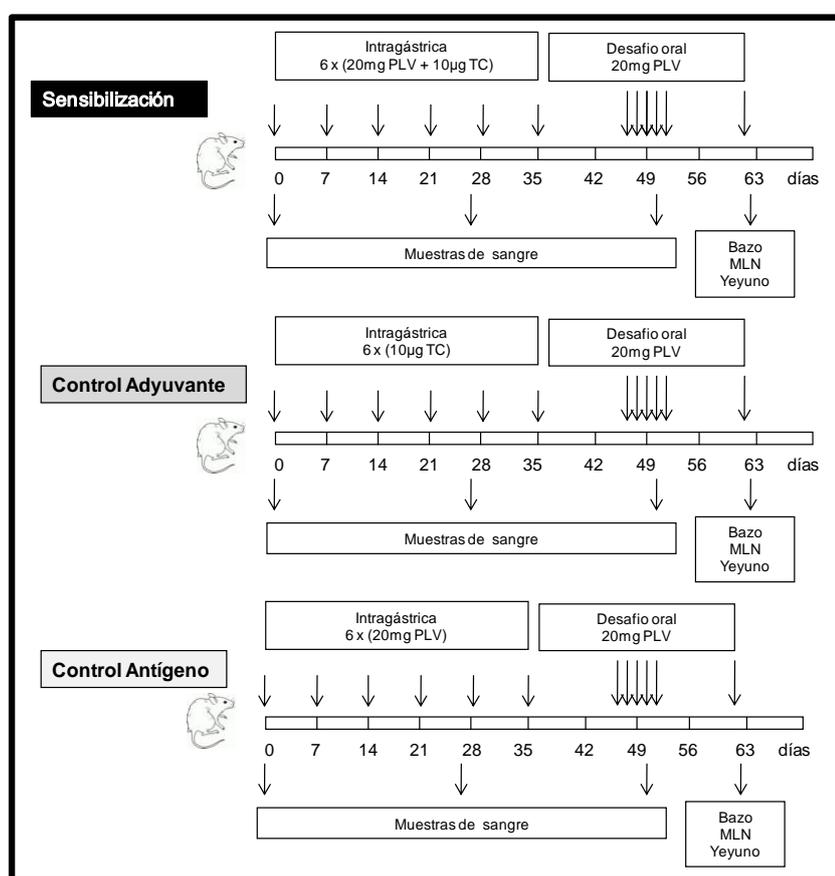
❖ Optimizar el modelo murino de alergia alimentaria a proteínas de leche de vaca, previamente desarrollado, el cual consiste en la sensibilización de ratones BALB/c por vía intragástrica mediante el empleo de bicarbonato de sodio, toxina colérica y proteínas de leche de vaca, con el propósito de inducir una activación del sistema inmune asociado al tracto gastrointestinal.

❖ Caracterizar de la respuesta inmune humoral, celular y mucosal específica a proteínas de leche de vaca.

I.3 RESULTADOS

Se sensibilizaron ratones BALB/c de 5–6 semanas de edad, previamente agrupados en distintos lotes, a saber: grupo sensibilización, grupo control de adyuvante (animales que fueron inoculados solamente con TC) y grupo control de antígeno [ratones a los cuales se le administró proteína de leche de vaca (PLV)].

El protocolo seguido se muestra en el **esquema 1**. La sensibilización se realizó 30 minutos luego de la administración de bicarbonato de sodio mediante la administración por vía intragástrica de 10µg de TC junto a 20mg de PLV empleando una sonda metálica con la que se accede directamente al estómago de los animales. Previamente se probaron 4 ó 6 inoculaciones, semanales, obteniéndose mejores resultados al realizar 6 inoculaciones. A los 10 días de haber terminado la sensibilización se realizaron múltiples desafíos orales únicamente con PLV.



Esquema 1 Protocolos de sensibilización para los distintos lotes

Inoculaciones días 0, 7, 14, 21, 28 y 35:

10 µg de TC + 20 mg de PLV por ratón, para el grupo denominado **Sensibilización (Sens)**.

10 µg de TC por ratón, para el grupo denominado **Control de adyuvante (Ctrl Ady)**.

20 mg de PLV por ratón, para el grupo denominado **Control de antígeno (Ctrl Ag)**.

En todos los lotes se realizaron desafíos orales con 20 mg de PLV.

Evaluación *in vivo* de la respuesta inmune inducida

Luego de los desafíos orales se analizó la aparición de signos clínicos compatibles con un proceso inflamatorio local y sistémico durante los 15-60 minutos posteriores a la última exposición al inmunógeno. En todos los experimentos participaron distintos observadores en forma independiente y desconociendo a qué lote pertenecía cada animal.

En general no se observaron comportamientos atípicos en los animales pertenecientes a los lotes control; mientras que en el lote sensibilización se observó un aumento en el rascado de la nariz y cabeza, enrojecimiento alrededor de la nariz, hinchazón de ojos, y baja actividad con dificultad para respirar, como así también una disminución en la actividad post-estímulo. En la **figura 11a** se muestra el score (índice) de signos clínicos para los animales de cada lote correspondiente a un experimento realizado. Como puede observarse, el grupo de animales sensibilizados presentan un score clínico mayor que los de los grupos control luego del DO con PLV, observándose síntomas compatibles con un proceso inflamatorio local y sistémico. Se incluyeron controles de especificidad, al desafiar con OVA animales sensibilizados con PLV.

Asimismo a otro lote de animales se les recolectó sangre a los 30 minutos posteriores al desafío oral (PLV). Se obtuvo el plasma en frío en forma inmediata y se procedió a congelar a -80°C hasta su procesamiento. Sobre estas muestras se cuantificó el nivel de histamina por ELISA y los resultados se muestran en la **figura 11b**. Como puede observarse se hallaron niveles elevados de histamina plasmática en los animales sensibilizados, lo cual se corresponde con la inducción de signos clínicos locales y sistémicos.

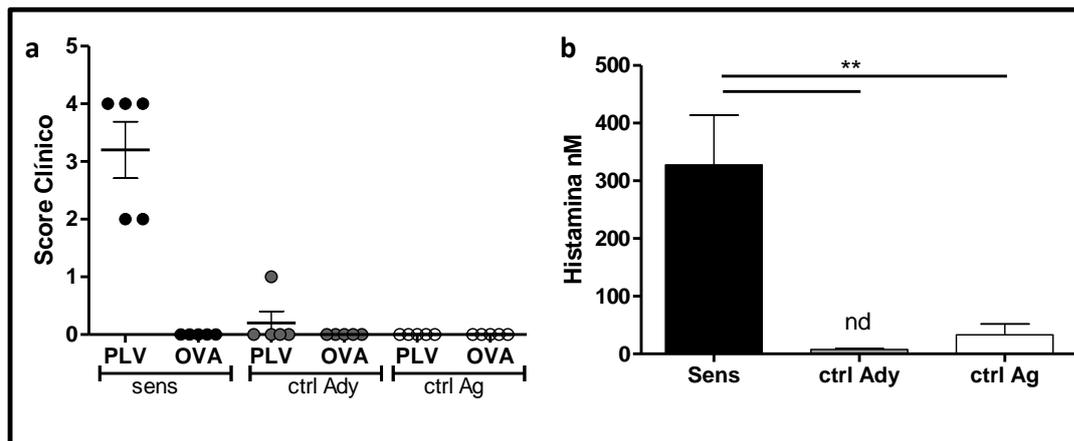


Figura 11. Evaluación de la respuesta alérgica inducida. En **a** se registran los signos clínicos inducidos a los 30 min del DO con 20 mg de PLV o con $100\mu\text{g}$ de OVA. En **b** se midieron los niveles de histamina plasmática por medio de un ELISA competitivo. En el gráfico se muestran las medias \pm SEM para cada uno de los grupos. (** $p < 0.01$; Anova de una vía). Estos resultados corresponden a un experimento representativo. *nd* corresponde a no detectable.

El aumento en los niveles plasmáticos de histamina junto a la aparición de los signos clínicos luego del desafío oral con el alérgeno, reflejan la activación de mastocitos y basófilos como consecuencia de la sensibilización alérgica y posterior exposición al antígeno.

Prueba Cutánea y Anafilaxia Cutánea Pasiva

Para evaluar la presencia de anticuerpos IgE específicos en la superficie de las células se realizó la PC con PLV en todos los animales. En aquellos del grupo sensibilizado se observó una extravasación inmediata (10-20 minutos) del colorante Azul de Evans en la región donde se inoculó subcutáneamente el antígeno. La aparición de color azul en el sitio de inoculación del antígeno a los 15-20 minutos es indicativa de la activación y degranulación de los mastocitos cutáneos, consecuencia del entrecruzamiento de los anticuerpos IgE presentes en la superficie de la célula por parte del antígeno. En algunos animales se observó una extravasación sistémica del colorante, lo cual sólo puede explicarse por la difusión del antígeno inoculado en la piel que activa basófilos en circulación y mastocitos en otras mucosas. Asimismo se inocularon distintos antígenos no relacionados como control del ensayo. De esta manera OVA o BSA no indujeron extravasación del colorante en los animales del lote control o del grupo de animales sensibilizados a PLV. En los ratones de los grupos controles se observaron resultados negativos independientemente del antígeno empleado. Asimismo se inoculó solución fisiológica como control en cada animal (flanco opuesto al de inoculación del antígeno). En la **figura 12** se muestran el resultado de la PC en animales pertenecientes a los distintos lotes.

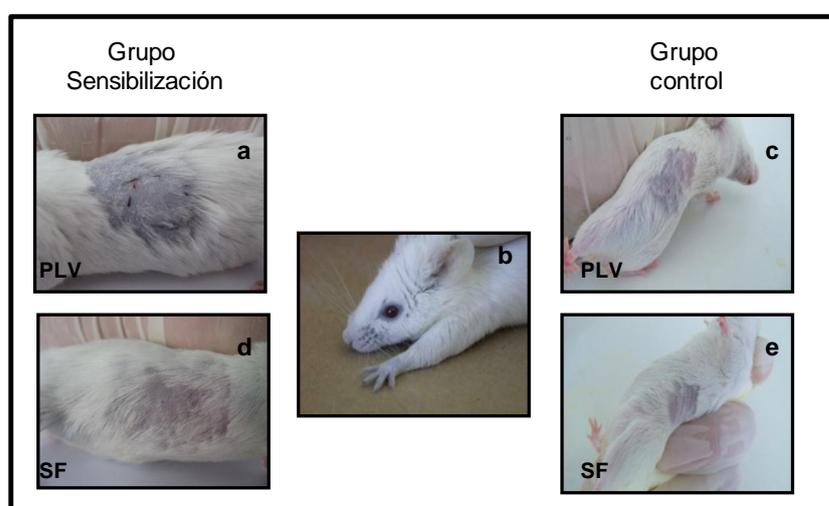


Figura 12. Prueba cutánea. Se muestran los resultados de animales inoculados con PLV pertenecientes al lote sensibilización (a y b) o control (c), y de animales inoculados con SF pertenecientes a los lotes sensibilización y control (d y e respectivamente). Estos resultados corresponden a un experimento representativo.

En la **ACP**, se inoculó por vía *sc* en ratones BALB/c no sensibilizados, suero proveniente de animales perteneciente a los lotes sensibilización, control de antígeno, y control de adyuvante. Luego de 4 horas de inoculado el suero, se inyectó el Ag (PLV) junto al colorante Azul de Evans por vía *iv* y se observó la extravasación del colorante en la zona de inoculación del suero, a los 15-30 minutos. Los resultados obtenidos pueden observarse en la **tabla 4**. Se incluyen los resultados del suero pre-tratado a 56°C por 2 hrs.

Tabla 4. Anafilaxia Cutánea Pasiva

Suero donator Tratamiento	Sens (n=5)	CtrlAdy (n=5)	CtrlAg (n=5)
Sin tratamiento térmico	+	-	-
Con tratamiento térmico 56°C	-	-	-

+ corresponde a la extravasación del colorante a los 30 min de su inoculación junto al antígeno (PLV). Los resultados de esta tabla corresponden a un experimento representativo.

Como se deduce de la **tabla 4**, el suero proveniente de animales sensibilizados es el único que produjo reacción positiva, la cual se negativiza cuando el suero es calentado a 56°C, lo cual sugiere que la extravasación del colorante es un proceso mediado por IgE. También se probó inoculando dos antígenos no relacionados (OVA, BSA) a la LV, obteniéndose reacciones negativas.

De esta manera, mediante dos métodos *in vivo* se demuestra la presencia de inmunoglobulinas **específicas para PLV del isotipo IgE, funcionales**, en el suero de los ratones sensibilizados.

Evaluación *in vitro* de la respuesta inducida

Determinación de anticuerpos séricos

Para caracterizar la inmunidad humoral inducida se analizó el nivel sérico de distintos isotipos de anticuerpos específicos a PLV. De esta manera se evaluó IgE por EAST, e IgG1 e IgG2a por ELISA indirecto. En la **figura 13** se muestran los valores obtenidos para IgE, IgG1 e IgG2a específicas para PLV en animales provenientes de los distintos lotes. Se observa un

aumento significativo en el tiempo de los niveles de IgE e IgG1 en el grupo sensibilizado. Esa diferencia es estadísticamente significativa al comparar los valores del grupo sensibilización con los dos controles para IgE e IgG1 específicas en el día 50 del plan. No se hallaron diferencias significativas en los niveles de IgG2a. Al analizar la cinética de inducción de anticuerpos específicos en los animales de los grupos control no se obtuvieron diferencias significativas.

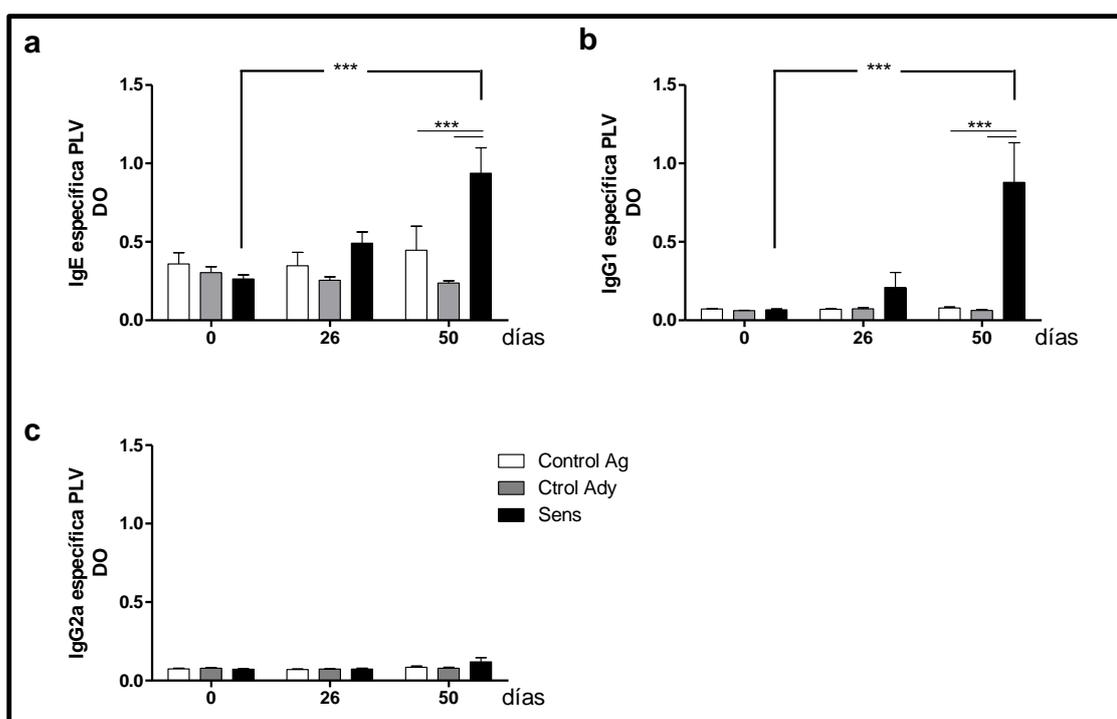


Figura 13. Determinación de IgE, IgG1 e IgG2a sérica específicas para PLV. Valores promedios de $DO \pm SEM$ para cada uno de los grupos, obtenidos a partir de los sueros de los ratones pertenecientes al grupo sensibilizado y de los grupos controles de antígeno y de adyuvante: (a) IgE, (b) IgG1, y (c) IgG2a. (***) $p < 0.001$, Anova de dos vías). Estos resultados corresponden a un experimento representativo.

Claramente puede observarse un aumento durante la sensibilización en los isotipos correspondientes a una inmunidad humoral específica Th2-dependiente.

Cuantificación de citoquinas en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos y células de ganglios mesentéricos

Para analizar la inmunidad celular sistémica se procedió a sacrificar animales de los distintos lotes 24 hs luego del desafío oral. Inmediatamente se aislaron los bazo y los MLN. Estos fueron agrupados en pools de distintos animales pertenecientes a un mismo grupo. Se disgregaron mecánicamente los tejidos y se obtuvo una suspensión celular. Posteriormente se realizaron cultivos en presencia de PLV, β -Lg o caseínas para inducir una estimulación antígeno-específica. Se incluyó un control negativo (medio de cultivo RPMI 1640) y un control positivo (Con A). Se incubó durante 3 días y se cosechó el sobrenadante de cada fosa.

Autora: Smaldini Paola Lorena

Directores: Dr. Docena G. y Dr. Fossati C.

Se midió la concentración de IL-5, IL-13, e IFN- γ por ELISA de captura y los resultados se muestran en la **figura 14**.

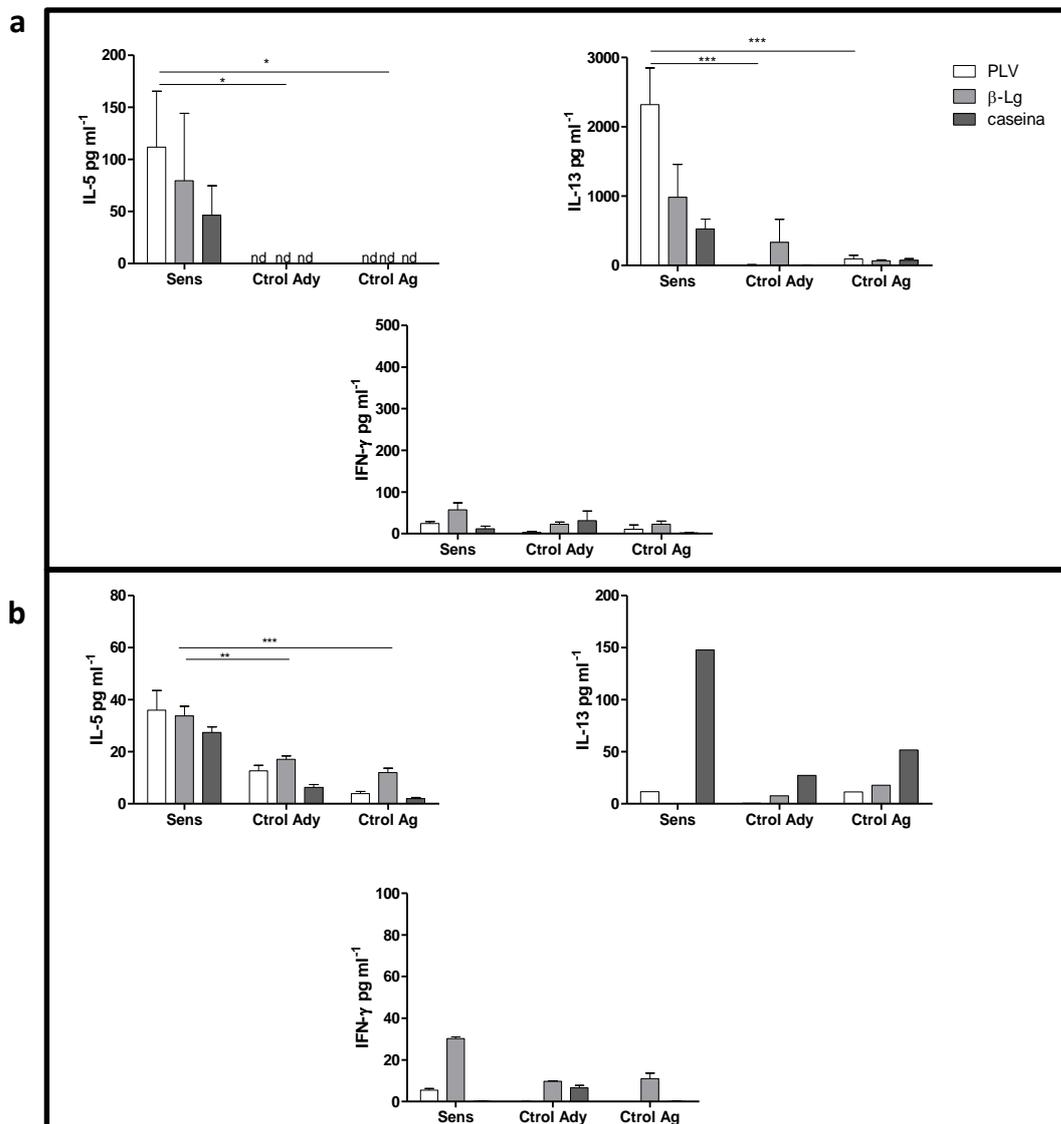


Figura 14. Concentración de citoquinas en sobrenadante de cultivo medidas por ELISA de captura. Concentración de IL-5, IL-13 o IFN- γ en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos (a) o células de ganglios mesentéricos (b) en presencia de PLV, β -Lg o caseínas. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Anova de dos vías). Estos resultados corresponden a un experimento representativo.

Como puede observarse, los niveles de IL-5 e IL-13 fueron significativamente superiores en esplenocitos provenientes de animales del grupo sensibilización, en comparación con los animales de los grupos control, en presencia de PLV. Cuando los cultivos se realizaron en presencia de β -Lg o caseína se observó un pequeño aumento en la secreción de citoquinas por parte de células provenientes de ratones sensibilizados, respecto a los grupos control, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa. Al analizar la

secreción de IFN- γ no se observan diferencias estadísticamente significativas al comparar esplenocitos de los distintos lotes de ratones.

Con el fin de analizar un parámetro que refleje la inmunidad celular a nivel de la mucosa intestinal, se analizó la secreción de citoquinas por células provenientes de los MLN (**figura 14b**). Observamos, un aumento significativo en los niveles de IL-5 para células provenientes de animales del grupo sensibilizado, en comparación con los grupos controles, al estimular con PLV, β -Lg o caseínas. Nuevamente no observamos diferencias significativas en la secreción de IFN- γ al comparar los distintos lotes de animales. En conjunto estos resultados muestran que tanto en la mucosa como a nivel sistémico la sensibilización con TC induce una respuesta Th2-dependiente.

Determinación de la inducción de la respuesta mucosal

Para investigar si los anticuerpos séricos específicos asociados a un perfil de respuesta Th2 se generan como consecuencia de una activación de los linfocitos T en la mucosa gastrointestinal, se analizó la expresión de genes de citoquinas y de factores de transcripción asociados a una respuesta Th1 y Th2, por real time PCR en tejidos provenientes de ratones de los lotes sensibilización y control, 24 hs luego de los desafíos orales. Se extirpó el intestino de los ratones y la primera porción se recibió en buffer lisis RA1. Inmediatamente las piezas fueron homogeneizadas mecánicamente y se procedió a conservar el lisado a -80°C . Posteriormente se extrajo el mRNA total mediante el uso de columnas de sílice. Siguiendo las instrucciones del fabricante se obtuvo el RNA en solución y a través de la medida de absorción al UV, y la relación DO280nm/DO260nm, se estimó la pureza de cada una. Para la obtención del cDNA se utilizó 1 μg de RNA por transcripción reversa. Finalmente se cuantificó la expresión de los genes correspondientes a cada citoquina por qPCR, y se compararon los distintos lotes. Como control interno se analizó la expresión de β -actina la que se utilizó para normalizar la cantidad de DNA. En la **figura 15** se expresan los resultados como variación en la expresión de cada gen en el grupo sensibilización, respecto al grupo control, correspondiente a IFN- γ , IL-5, IL-13, GATA-3 y T-bet

Como puede observarse la sensibilización con TC indujo un aumento en los niveles de mRNA IL-5 e IL-13 en intestino de ratones sensibilizados, el cual se correlaciona con un aumento en los niveles de mRNA para GATA-3, No se observó un aumento en la expresión génica correspondiente a INF- γ y T-bet Estos resultados demuestran que el protocolo de

sensibilización aplicado indujo una activación celular compatible con una diferenciación T hacia un perfil Th2.

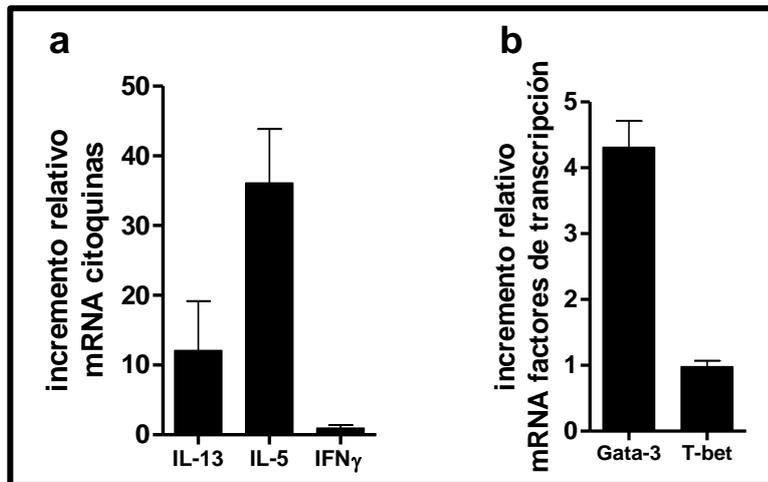


Figura 15. Expresión de mRNA de citoquinas y factores de transcripción por qPCR. Se muestra el incremento de IL-13, IL-5 e IFN- γ (a) y de los factores de transcripción GATA-3 y T-bet (b) en intestino. Las cantidades de DNA se normalizaron a través de β -actina y el incremento se calculó comparando grupo sensibilización con grupo control.

En estas condiciones experimentales podemos concluir que la toxina colérica como adyuvante mucosal junto a PLV indujeron una activación inmunológica específica para PLV. Al caracterizar esta respuesta observamos que tanto los ensayos *in vitro*, como las pruebas *in vivo* indican que se trata de una respuesta compatible con un perfil de activación Th2 específico para PLV. Dichos ensayos revelan respuestas sistémicas y locales tanto en ganglios mesentéricos como en la mucosa intestinal. (Brandt 2006).

I.4 DISCUSIÓN

En este capítulo hemos estudiado las condiciones experimentales para obtener un modelo murino de alergia alimentaria optimizado en la cepa de ratones BALB/c. Aquí la administración oral de TC con el inmunógeno disrumpe la tolerancia oral al antígeno e instaura un proceso inflamatorio en la mucosa intestinal. Este modelo reproduce aceptablemente lo que ocurre en la fase efectora de la patología en humanos, dado que el desafío oral con las PLV induce la aparición inmediata de distintos tipos de síntomas relacionados con reacciones de hipersensibilidad. Concomitantemente evidenciamos niveles elevados de histamina en plasma. Asimismo se detectó un nivel elevado de anticuerpos séricos IgE, y una baja relación de IgG2a/IgG1 específicos del antígeno. Las pruebas cutáneas positivas en los animales sensibilizados demostraron que los anticuerpos IgE inducidos son funcionales. En conjunto estos resultados de la inmunidad humoral indican un fenotipo de activación inmunológica Th2-dependiente (Lycke 2005).

Existen en la literatura numerosos trabajos en los cuales se realiza una sensibilización sistémica con el antígeno, y si bien logran inducir signos clínicos de hipersensibilidad y niveles elevados de IgE, no inducen una activación del sistema inmune asociado a la mucosa gastrointestinal. Este tipo de modelos ha progresado marcadamente en los últimos años y de esta manera Brandt y col. lograron inducir una diarrea alérgica a través de repetidos desafíos orales luego de la sensibilización. Esta inflamación es producto de un infiltrado de mastocitos e incremento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias en el intestino delgado. Estos hallazgos resultan similares a los que se observan en pacientes con alergia alimentaria luego de la exposición al alérgeno (Lin et al. 2002). En nuestro modelo a través de la sensibilización por la vía oral observamos un aumento en la expresión de citoquinas (IL-5 e IL-13) y factores de transcripción (GATA-3) asociados a una activación linfocitaria Th2 en intestino. Cardoso y col. desarrollaron un modelo de alergia alimentaria en ratones C57BL/6 sensibilizados por piel con proteínas de maní e hidróxido de aluminio. El desafío oral con el antígeno indujo en intestino una respuesta inflamatoria y un aumento significativo de IL-4 e IL-13. Sin embargo, este grupo no detectó incrementos en IL-5 e IFN- γ . En nuestro modelo, observamos una cinética de expresión de los genes que codifican para IL-5 e IL-13 en el yeyuno de ratones sensibilizados. Se encontró que luego de 2hs del desafío oral con PLV, la expresión de IL-13 estaba aumentada, mientras que a las 24 hs la expresión de IL-5 era mayor.

A diferencia de otros autores (X. M. Li, Schofield, et al. 1999; X. M. Li et al. 2000; Morafo et al. 2003), hemos demostrado que en ratones BALB/c la administración intragrástica del antígeno junto a toxina colérica induce una respuesta inmune Th2-

dependiente en la mucosa gastrointestinal y sistémica. En estos animales la exposición oral al antígeno promueve una reacción alérgica en forma similar a lo que ocurre en pacientes con alergia alimentaria. El grupo de Sampson y Li ha observado que respuestas de este tipo sólo pueden obtenerse en ratones de la cepa C3H/HeJ. Sin embargo, el grupo de Adel-Patient también ha demostrado que optimizando las cantidades de antígeno y adyuvante a administrar por vía intragástrica es posible inducir un cuadro clínico similar al de una alergia alimentaria con síntomas locales y sistémicos (K Adel-Patient et al. 2003; K Adel-Patient et al. 2005).

En conclusión, en este capítulo se han mostrado los resultados que nos permiten concluir que disponemos de un modelo murino de alergia a LV, con el que se han logrado reproducir las principales características moleculares, celulares y clínicas de la alergia alimentaria en humanos: sensibilización antigénica por vía oral, manifestaciones clínicas locales y sistémicas inmediatamente posterior a la exposición al antígeno, incremento en los niveles plasmáticos de histamina luego del desafío oral, inducción de IgE específica, secreción de citoquinas Th2 y prueba cutánea positiva. Asimismo es importante resaltar que hemos evidenciado experimentalmente la instauración de un proceso Th2-dependiente en la mucosa intestinal, tal como se ha observado en pacientes con alergia alimentaria (Vandezande et al. 1999; Beyer et al. 2002).

Capítulo 2

*Empleo de proteínas recombinantes de *Brucella abortus* como moduladores de la respuesta inmune*



II.1. INTRODUCCION

La mayoría de los estudios sobre inmunoterapia se focalizan en tres objetivos principales: la generación de una respuesta de anticuerpos “protectivos”, la reducción de la respuesta de las células efectoras y cambios en el balance de citoquinas.

La inmunoterapia clásica que se ha venido aplicando desde hace 100 años se fundamenta (y esto se sabe actualmente a partir del conocimiento de los mecanismos celulares y molecular que gobiernan este proceso) en la alteración de la respuesta T específica al alérgeno, a través de un re-direccionamiento de la misma de un perfil Th2 a uno Th1, o a través de la inducción de LT regulatorios dependiendo del tipo de protocolo aplicado. Estos mecanismos permiten generar una respuesta humoral con la inducción de anticuerpos IgG bloqueantes, un descenso en el tiempo en los niveles séricos de IgE, una disminución del reclutamiento de mastocitos y eosinófilos a los tejidos, junto a una disminución en su sensibilización, y la generación de los mecanismos de tolerancia que evitan la instauración de un proceso inflamatorio frente a la exposición natural al alérgeno. Dada la capacidad de la interleuquina 12 (IL-12) de inducir la diferenciación T a un fenotipo Th1, se consideró que esta citoquina juega un rol crítico en la inmunoterapia. De esta manera, la administración de citoquinas recombinantes (S. Y. Lee et al. 2001) o de bacterias productoras de IL-12 (T. Watanabe et al. 2009), inhiben la producción de IgE, disminuye la inflamación y reduce las manifestaciones clínicas luego del desafío con el alérgeno. Estudios más recientes, han demostrado que la administración exógena de IL-21 reduce las reacciones alérgicas en modelos murinos de anafilaxia (T. Kishida et al. 2007) y rinitis alérgica (Hiromura et al. 2007), dado que esta citoquina regula la activación, proliferación y diferenciación de varias células del sistema inmune, entre ellas, los LB (Tamagawa-Mineoka et al. 2011). Suto y col. proponen que IL-21 actúa directamente sobre los LB estimulados por IL-4, inhibiendo el switch a IgE y por ende se observa una reducción en los niveles de IgE (Suto et al. 2002). Además, IL-21 aumenta la apoptosis de células B productoras de IgE que han sido inducidas a través de CD40L junto a IL-4 (Harada et al. 2006). Otra aproximación experimental orientada a alterar la diferenciación de los LT es el empleo de anticuerpos bloqueantes de citoquinas. Dado que estas subpoblaciones de LT están contra-reguladas entre sí a través de citoquinas, el balance de las mismas en el microentorno de activación T es un factor crítico. En general, las terapias que bloquean la acción de ciertas citoquinas son más efectivas que la administración de una cierta citoquina o algún miembro de su familia, dado que las citoquinas ejercen funciones pleiotrópicas, y por lo tanto es común observar la aparición de efectos adversos. Se

ha observado que el bloqueo IL-5 disminuye la eosinofilia en pacientes alérgicos (Corren 2011; Assa'ad et al. 2011), mientras que el bloqueo de IL-13 disminuye las manifestaciones clínicas luego del desafío con el alérgeno (Nicholson et al. 2011).

En general, las terapias que emplean citoquinas y anticuerpos humanizados o quiméricos anti-citoquinas actúan interrumpiendo las señales inflamatorias, y no han mostrado ser eficientes en estas complejas enfermedades, dado que modulan mecanismos del sistema inmune que son necesarios para la defensa frente a microorganismos.

La **hipótesis de la higiene** inicialmente propuesta en 1989 (Strachan 1989) atribuye el marcado incremento de la incidencia de esta patología y de la severidad de sus manifestaciones observadas en las últimas décadas, a una menor exposición a estímulos microbianos durante los primeros años de vida. Este fenómeno, que se manifiesta principalmente en países desarrollados (M Wills-Karp et al. 2001), incide en la activación y diferenciación de los linfocitos T. Una menor exposición principalmente a patógenos intracelulares como consecuencia de un medio ambiente “más limpio” influye en la manera en que las células presentadoras de antígenos, básicamente las células dendríticas, de la inmunidad innata modulan la activación de los LT. Por otro lado la mayor exposición a alérgenos (hábitos de vida domiciliarios, alfombras, muebles, aire acondicionado con recirculación del aire, presencia de mascotas, etc.) determinan una mayor predisposición a la instauración de mecanismos Th2-dependientes. Por lo tanto una menor exposición a diferentes ligandos TLR, o PAMPs, junto a una mayor exposición a alérgenos en individuos susceptibles influyen en la homeostasis inmunológica y en el desarrollo de la alergia o atopía (Shirakawa et al. 1997; Horner 2003). Esta hipótesis ha sido el sustento teórico para el desarrollo de futuras terapias basadas en el empleo de distintos PAMPs activadores de una respuesta innata con predominio de citoquinas inductoras de respuesta Th1, o inhibitoras del fenotipo alérgico o Th2 (E Raz et al. 1996; Xiu-Min Li et al. 2003; Arkwright y David 2001). De esta manera el empleo de adyuvantes pro-Th1 junto al alérgeno ha resultado eficaz en la disminución de la sensibilización alérgica. Un claro ejemplo es el empleo del oligonucleótido CpG (Tversky et al. 2008). Como se ha mencionado en la introducción, este agonista de TLR9 induce una respuesta inmune Th1 (J. Lee et al. 2006).

Sin embargo actualmente la Hipótesis de la higiene ha sido parcialmente desestimada dado que no sólo la incidencia de las patologías Th2-dependientes (enfermedades alérgicas) se ha incrementado en las últimas décadas, sino también las Th1-dependientes (enfermedades

autoinmunes, enfermedades infamatorias gastrointestinales) (Feillet y Bach 2004; Okada et al. 2010). En muchas de estas patologías, incluyendo las alergias, se ha demostrado que la deficiencia es a nivel de los LT regulatorios, por lo cual cualquier subpoblación que se encuentre regulada homeostáticamente por los Treg puede estar aumentada y en determinados individuos generar una patología (McGuirk et al. 2010; Roongrotwattanasiri et al. 2012).

En este capítulo se mostrarán los resultados correspondientes a los trabajos que se han basado en la siguiente ***hipótesis de trabajo: la administración de adyuvantes microbianos junto al alérgeno inducen el re-direccionamiento de la respuesta inmune específica contra antígenos dietarios, en un modelo murino de alergia alimentaria.***

Brucella abortus es una bacteria Gram negativa intracelular facultativa que invade células del sistema fagocítico mononuclear, principalmente macrófagos, para su replicación (Young 1983). Este microorganismo genera una respuesta inflamatoria, e inclusive es capaz de inducir la secreción de IL-10 como elemento inmunomodulatorio que limita el proceso inflamatorio (Zhan et al. 1993). Sus propiedades pro-inflamatorias están originadas principalmente por sus lipoproteínas (Lp) de membrana (Giambartolomei et al. 2004), induciendo la secreción de IL-6 e IL-12 (Aliprantis et al. 1999; Giambartolomei et al. 2002). Se han identificado 3 Lp de membrana (L-Omp-10, L-Omp-16 y L-Omp-19), de las cuales la L-Omp-16 y la L-Omp-19 fueron clonadas y purificadas por el grupo de Dr. Giambartolomei y la Dra. Cassataro. Dichas Lp tiene propiedades auto-adyuvantes (Pasquevich et al. 2009) y han sido estudiadas como adyuvantes vacunales para brucelosis. En un principio se atribuyó a la porción lipídada de estas lipoproteínas el efecto de activar monocitos, con la consiguiente secreción de citoquinas pro-inflamatorias, como TNF- α , IL-6, IL-12, como así también la secreción de IL-10 (Giambartolomei et al. 2004). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que la región proteica de la Omp-16 es la responsable de las propiedades adyuvantes. De esta manera se demostró que la lipoproteína Omp-16 (L-Omp 16) es menos eficiente que la versión des-lipídada (Pasquevich et al. 2009; Pasquevich et al. 2010). Se ha empleado Omp-16 por vía intraperitoneal u oral en ratones para inducir una respuesta inmune celular Th1 específica, caracterizada por un aumento de la secreción de IFN- γ por células CD4⁺, mientras que no se observa secreción de IL-4, IL-5 o IL-10. Además se observó que la Omp-16 activa células dendríticas y macrófagos, tanto *in vitro* como *in vivo*, produciendo altos niveles de TNF- α y de IL-12 (Pasquevich et al. 2010).

Por lo tanto, decidimos emplear esta proteína de membrana (en colaboración con la Dra Cassataro), en su forma recombinante y des-lipidada, como un potencial inmunomodulador Th1 en un modelo murino de alergia alimentaria Th2-dependiente.

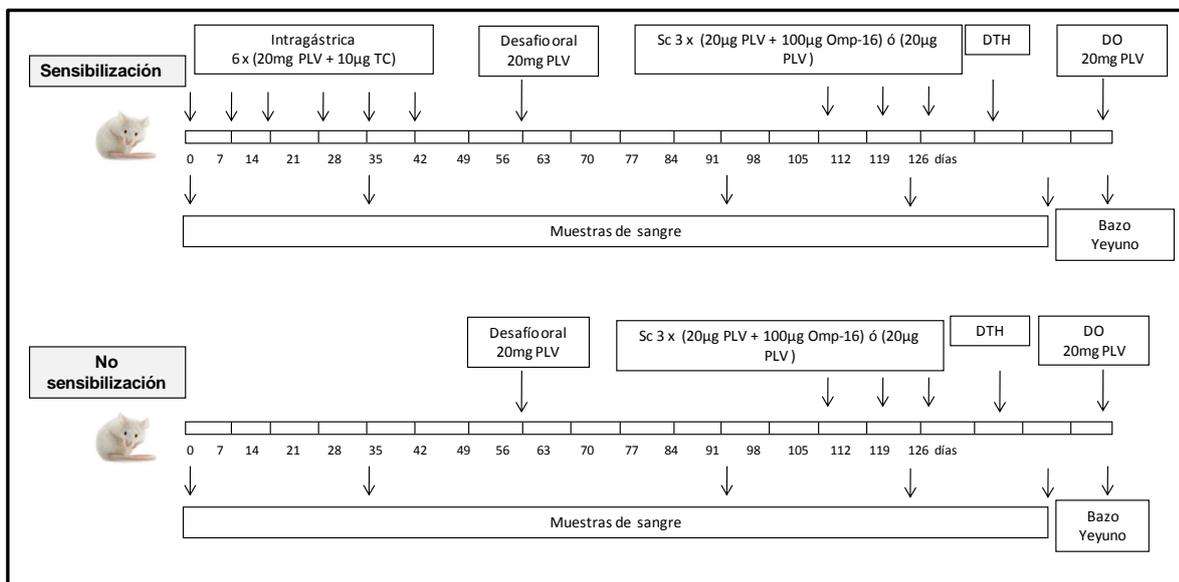
II.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- ❖ Estudiar la capacidad de la proteína recombinante de *B. abortus* Omp-16 como un agente inmunomodulador de la respuesta inmune Th2 en el modelo murino de alergia alimentaria.

II.3. RESULTADOS

II.3.1 Administración de proteínas recombinantes de *Brucella abortus* por vía subcutánea

Ratones de la cepa BALB/c de 5 semanas de edad, se agruparon en 2 lotes. Como se muestra en el **esquema 2** en un grupo (lote sensibilización), los ratones fueron inoculados por vía ig con PLV y TC, como se describió anteriormente, y en el segundo grupo (lote no sensibilización) los animales recibieron únicamente agua y alimento *ad libitum*. Luego del período de sensibilización los animales de ambos lotes fueron desafiados oralmente con el antígeno y posteriormente se los dividió en 2 lotes, uno de los cuales recibió como tratamiento por vía sc Omp-16 junto a PLV, o PLV sola como control.



Esquema 2. Protocolos de sensibilización y modulación con Omp-16
Sensibilización (Sens) Días 0, 7, 14, 21, 28 y 35: se inocularon por ratón:

10 µg de TC + 20 mg de PLV, por vía ig.

No sensibilización (No sens) dieta libre.

Tratamientos

Dependiendo del lote, se inocularon por vía sc, igual número de ratones del grupo sens y del no sens con:

20 µg de PLV + 100 µg de Omp-16, para los grupos denominados **Trat-Omp-16**

20 µg de PLV, para los grupos denominados **Trat-Control Ag**

Desafío oral: administración de 20 mg de PLV por vía ig.

Análisis *in vitro* de la respuesta obtenida:

Detección de anticuerpos séricos

En la **figura 17** se muestran los resultados obtenidos para la IgE específica para PLV, divididos en distintos lotes dependiendo del tratamiento que recibieron. En los dos lotes en los que fueron divididos los animales sensibilizados con TC junto a PLV (**figura 17a**), se observa un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,001$) en los niveles de anticuerpos IgE entre el día 0 y el día 78. Luego se observa que estos grupos siguen la misma tendencia, aumenta la IgE ($p < 0,01$ entre el día 78 y el 103 para los dos grupos). Pero si comparamos el día 78 (antes del inicio del tratamiento) con el día 124 no se observan diferencias estadísticamente significativas para este isotipo. Es decir que el tratamiento subcutáneo con la proteína de *B. abortus* junto a PLV no induce una modulación en los niveles de IgE.

En la **figura 17b**, se muestran los valores de los niveles de IgE en el grupo de ratones que no fue sensibilizado y que recibió el tratamiento con las proteínas.

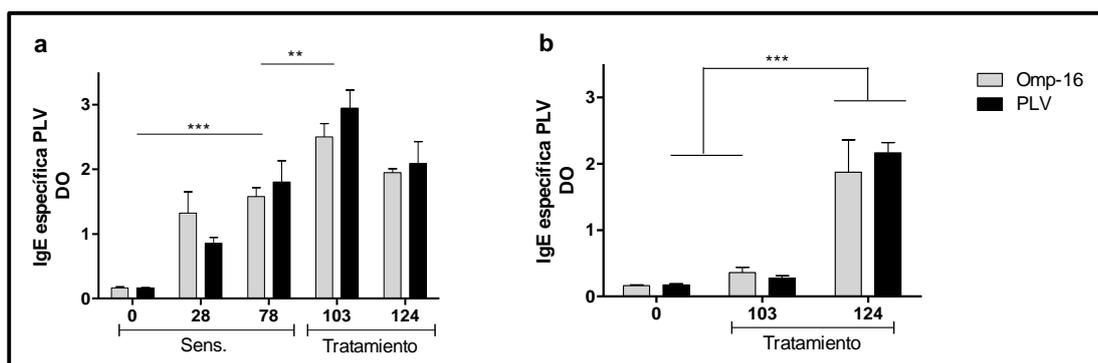


Figura 17. Niveles séricos de IgE específica para PLV por EAST. Se muestran los resultados de los animales sensibilizados (Sens) (a) antes y luego de inoculados por vía sc con los distintos tratamientos. Los ratones no sensibilizados recibieron el mismo tratamiento (b). Se muestran los valores medios de $DO \pm SEM$. (***) $p < 0,001$, (**) $p < 0,01$).

En el día 124 no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de IgE específica cuando comparamos todos los lotes de animales (incluyendo los sensibilizados y tratados, como los que sólo recibieron el tratamiento). Estos resultados nos sugieren que PLV por vía subcutánea induce un aumento en los niveles de IgE específica y que la administración sc de Omp-16 junto a PLV no logra modular la respuesta Th2 inducida.

De la misma manera se midieron los niveles de IgG1 e IgG2a específicos a PLV en suero, los cuales se muestran en la **figura 18** siguiendo el mismo esquema. En la figura se

muestran los resultados obtenidos para la detección de IgG1 (a y b) e IgG2a (c y d) específicas para PLV.

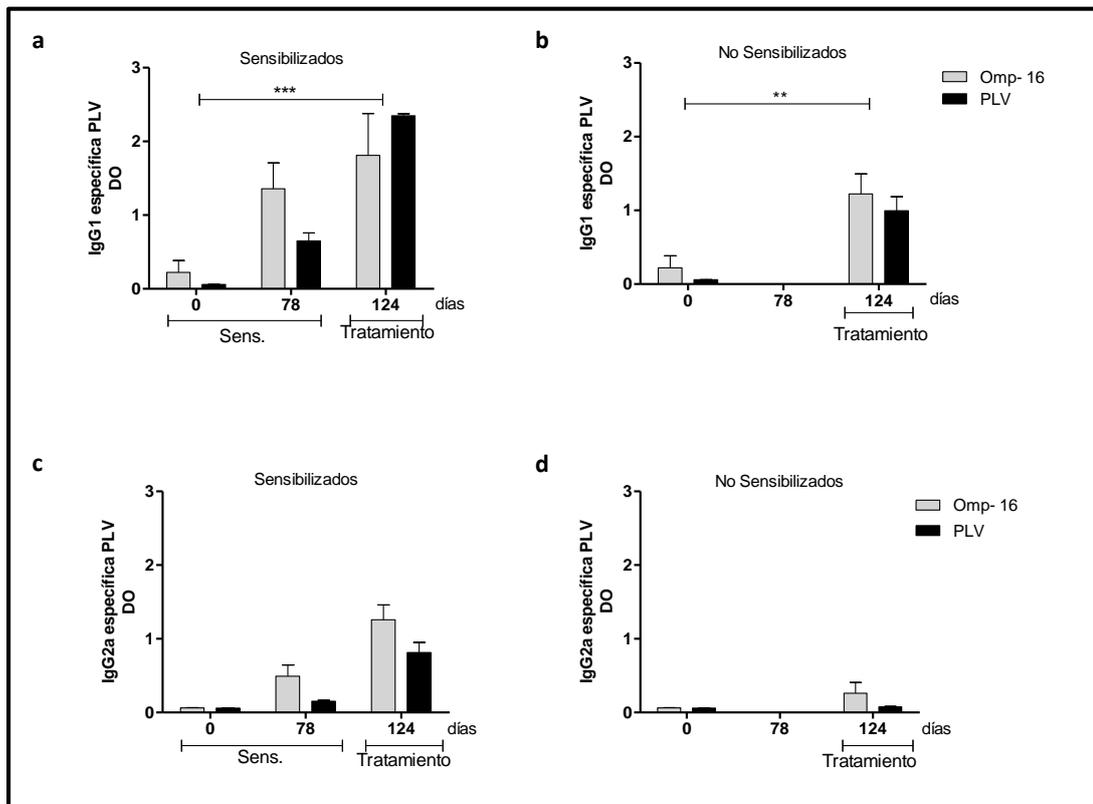


Figura 18. Valores séricos de IgG1 e IgG2a específicos determinados por ELISA indirecto. En a y b se muestran los resultados correspondientes a IgG1 específica; c y d, corresponden a IgG2a específica. Asimismo a y c corresponden a animales sensibilizados (sens) y tratados por vía sc, b y d, a los animales a los cuales solo se les realizó el tratamiento. Los gráficos muestran los valores medios de DO ± SEM (***) $p < 0,001$; **) $p < 0,01$).

En este gráfico se observa que tanto los ratones sensibilizados como los no sensibilizados al ser tratados con la proteína de *Brucella* y PLV, ó con PLV sola, producen un aumento significativo en los niveles de IgG1 (Figura 18 a y b). En los animales sensibilizados se observa un aumento en los niveles de IgG2a específica al inocular Omp junto a PLV. Por lo tanto nuevamente observamos que el tratamiento aplicado indujo un incremento en los niveles de IgG1 lo cual indicaría que la respuesta Th2 específica no fue inhibida, a pesar que se observa un incremento en el isotipo dependiente de una respuesta Th1.

Determinación de citoquinas en cultivos de esplenocitos

Con el fin de estudiar la inmunidad celular se cultivaron esplenocitos de animales sometidos a los distintos tratamientos, y se realizaron estimulaciones con PLV y β -lactoglobulina. Como se observa en la **figura 19**, no se logró modular la secreción de citoquinas Th2. Se observa que hay secreción de IL-5 en los esplenocitos de ratones, tanto sensibilizados como en los no sensibilizados, mientras que no se observa un aumento en los niveles de IFN- γ .

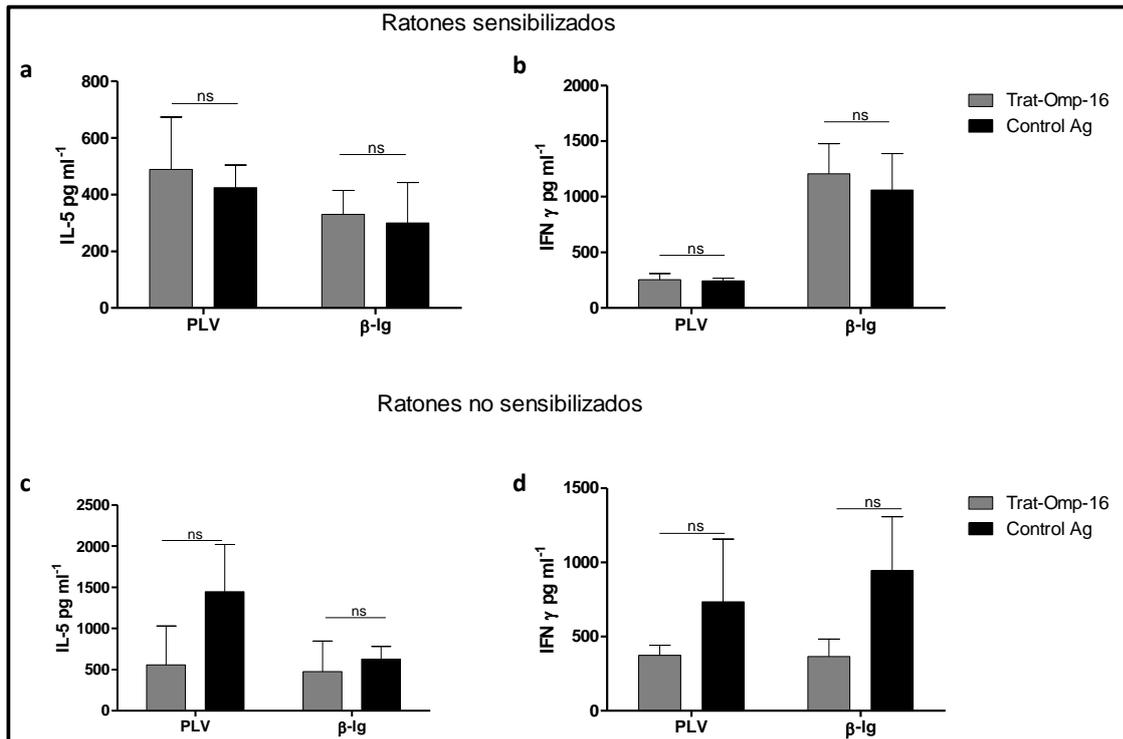


Figura 19. Concentración de citoquinas mediadas por ELISA de captura. Se muestra la concentración de IL-5 e IFN- γ en ratones sensibilizados, (a y b), y en ratones no sensibilizados (c y d). (ns: no significativo; Anova de dos vías, Bonferroni como test posterior).

Como puede observarse, la administración sc de PLV induce un incremento en los niveles de IL-5, superior al inducido por la administración ig de PLV junto a TC. La co-administración de Omp junto a PLV no logra revertir la respuesta Th2 específica inducida.

Determinaciones *in vivo*

Prueba de Hipersensibilidad retardada (DTH)

Luego de 10 días de finalizado el tratamiento por vía sc con Omp-16, se realizó la prueba de DTH, en la cual, los ratones fueron inoculados por vía intradérmica (ID) con PLV en la almohadilla plantar en de una de sus extremidades traseras, y con solución fisiológica en la otra. Pasadas 72 horas, se midió el espesor de la almohadilla plantar y se calculó la

diferencia en la altura entre la pata inoculada con PLV y la pata inyectada con solución fisiológica.

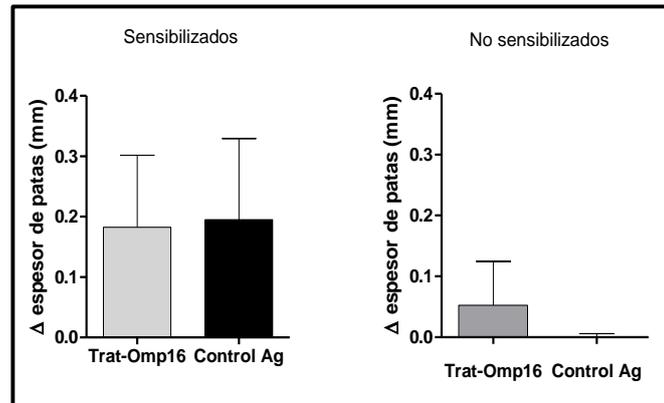


Figura 20. Prueba de DTH. Se grafica la diferencia de grosor entre las patas traseras (espesor de pata inoculada con PLV – espesor de pata inoculada con SF) en animales sensibilizados y no sensibilizados. Se representan los valores medios en mm ± SEM.

Se observa una mayor diferencia entre las patas, en el grupo de animales sensibilizados y tratados respecto de los no sensibilizados.

Todos estos resultados e conjunto nos indican que *la administración de PLV por vía subcutánea induce una fuerte respuesta de perfil Th2, la cual no es posible revertir con el empleo de Omp-16 como adyuvante*. Estos resultados también pueden explicar por qué no se obtuvieron diferencias significativas en las patas de los ratones que no fueron sensibilizados y recibieron el tratamiento.

II.3.2. Tratamiento con proteínas recombinantes de *Brucella abortus* por vía intranasal

Estudio *in vitro* de Omp-16 en células epiteliales de pulmón

Con el objetivo de estudiar si células del epitelio pulmonar son sensibles a Omp-16 se decidió analizar el efecto activador de esta proteína sobre una línea epitelial de pulmón humana (A549), como medida de su efecto inmunomodulador. Por resultados previos de nuestro grupo y del grupo colaborador (Dra. Juliana Cassataro) se concluyó que Omp-16 es un agonista de TLR-2 o TLR-4. Por esta razón incluimos como controles LPS de *E. coli* y el lipopéptido Pam₃CSK₄ (Lp) comerciales. Las células fueron estimuladas por 2hs con los agonistas y luego se midió por qPCR la expresión de mRNA CCL20 como medida de activación celular (**figura 21**).

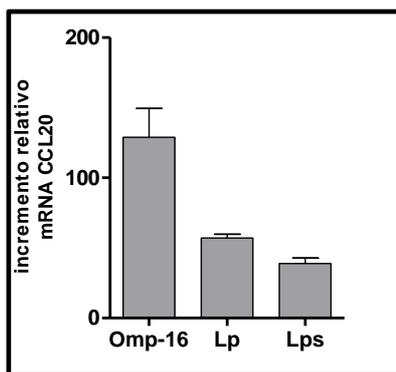


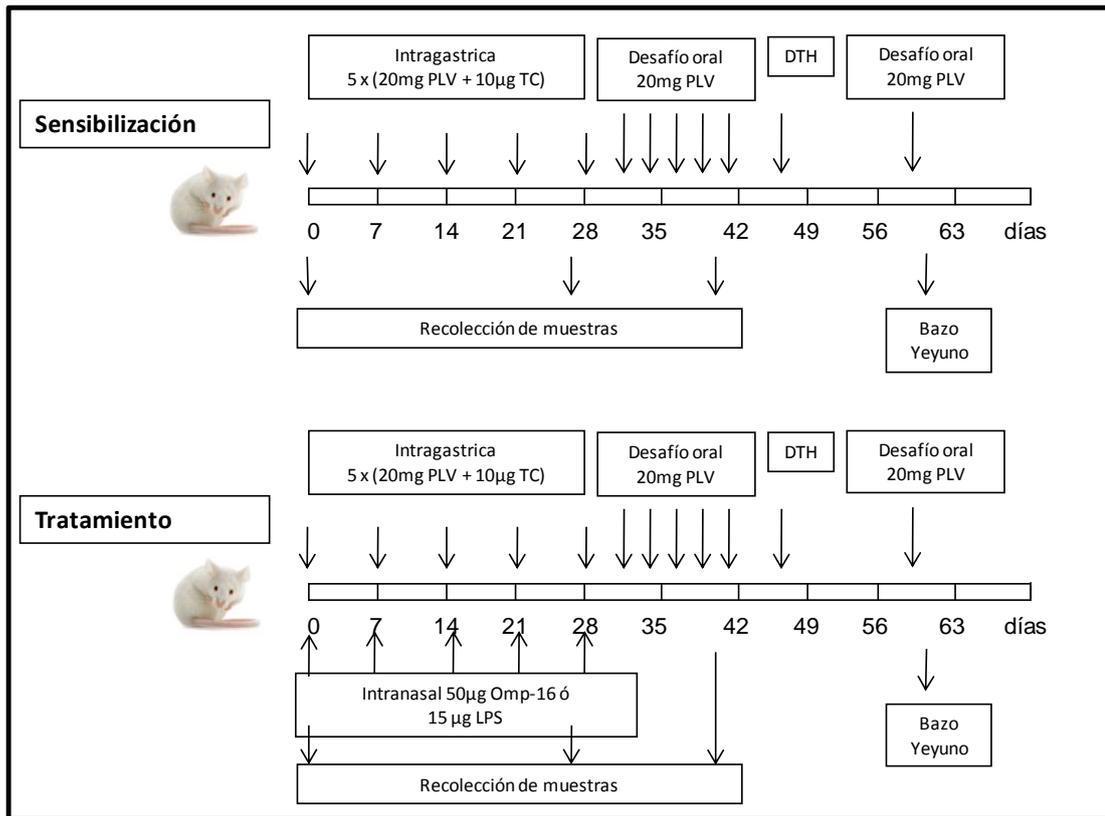
Figura 21. Expresión de CCL20 en A549 por qPCR. Se estudió en células en cultivos estimuladas con los distintos agonistas TLR la inducción de la expresión del gen de CCL20 como medida de la activación celular.

Se puede concluir que las células epiteliales de pulmón, presentan receptores que reconocen a la Omp-16 y que activan las vías intracelulares de señalización. Estos resultados constituyen la base experimental que nos permitió plantear el empleo de Omp-16 como inmunomodulador por vía intranasal en el modelo de alergia alimentaria.

II.3.3 Modulación *in vivo* con proteínas recombinantes de *Brucella abortus* por vía intranasal

Se emplearon ratones BALB/c de 5 semanas de edad, que se agruparon en lotes de 5 animales cada uno. Como se realizó anteriormente todos los animales fueron inoculados por vía ig con PLV y TC para inducir la sensibilización alérgica. Simultáneamente a la sensibilización se realizó el tratamiento inmunomodulador para lo cual los animales fueron divididos en 3 lotes, como puede observarse en el **esquema 3**. Como agente inmunomodulador se administró la proteína recombinante de *Brucella abortus* Omp-16, o LPS de *Escherichia coli* como control de la vía mucosal junto a PLV. A estos lotes de animales se los denominó **Trat-Omp-16**, y **Trat-LPS**. Los animales control que sólo recibieron PBS y PLV se los denominó **Control Ag**.

Por otro lado, se incrementó el número de desafíos orales con el Ag luego del período de sensibilización, con fin de intensificar los signos clínicos de hipersensibilidad. Para analizar si la administración *in* del Ag junto al agente inmunomodulador indujo una alteración en la inmunidad celular en la mucosa intestinal, se analizaron adicionalmente muestras obtenidas de yeyuno.



Esquema 3 Protocolos de sensibilización y modulación con Omp-16

Días 0, 7, 14, 21 y 28: se inocularon por ratón:

10 µg de TC + 20 mg de PLV, por vía ig, para todos los animales del experimento

Dependiendo del lote, se inocularon por vía in

4 µg de PLV + 50 µg de Omp-16, para el grupo denominado **Trat-Omp-16**.

4 µg de PLV, para el grupo denominado **Control Ag**.

4 µg de PLV + 15 µg de LPS, para el grupo denominado **Trat -LPS**.

Desafío oral: administración de 20 mg de PLV por vía ig, los días 32, 34, 36, 40 y 43.

Análisis de la respuesta inmune inducida y modulada

Una vez concluida la sensibilización junto al tratamiento con los inmunomoduladores, los animales fueron desafiados oralmente sólo con el antígeno, y se analizó la inducción de síntomas locales y sistémicos como parámetro clínico.

En la **figura 22a** se muestran los scores clínicos y en la **figura 22b**, se grafican los niveles de IgE sérica específica para PLV para cada uno de los lotes a distintos tiempos a lo largo del plan de inmunización.

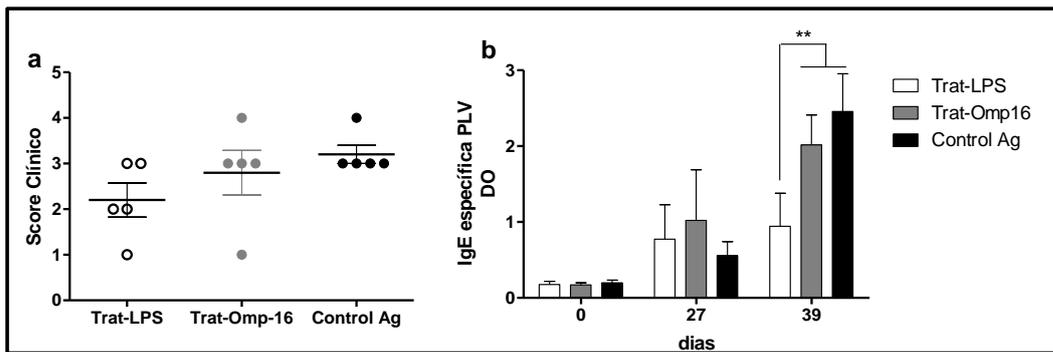


Figura 22. Score de signos clínicos inducidos luego del desafío oral y niveles de IgE sérica específica. En a se muestran los signos desarrollados por el grupo sensibilizado y por los grupos que recibieron los distintos tratamientos. En b, se grafica los valores medios de DO \pm SEM de IgE específica para PLV medida por EAST para los distintos grupos. (** p < 0,01, One way ANOVA, seguido por Test de Bonferroni).

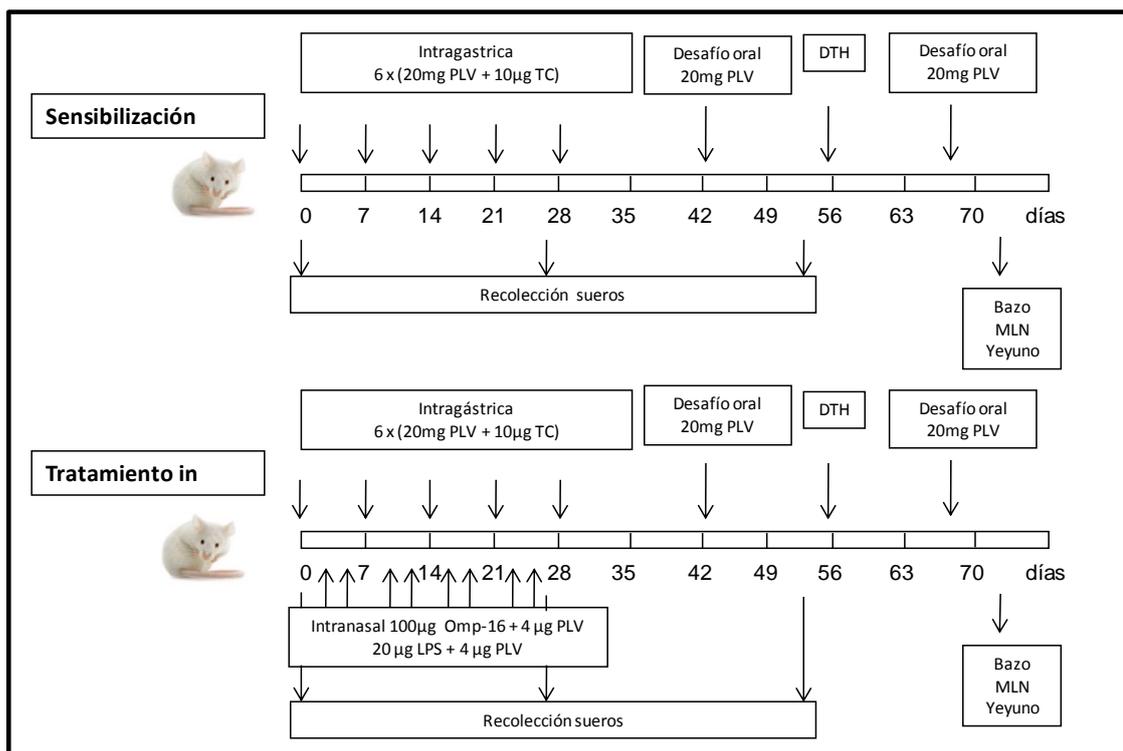
En la **figura 22a** se observa que los animales pertenecientes a los lotes **Control-Ag** y **Trat-Omp-16** presentan signos clínicos muy similares, como aumento del rascado, enrojecimiento e hinchazón alrededor de la nariz y la boca, y en algunos animales aumento de la frecuencia respiratoria, baja actividad general, incluso en algunos casos con inactividad frente a un estímulo. Sin embargo, el menor score clínico obtenido en los animales del lote **Trat-LPS** indica que la vía nasal podría emplearse para modular la activación inmunológica intestinal. Resultados similares se obtuvieron al analizar los niveles séricos de IgE específica (**figura 22b**), Observamos un aumento significativo en los niveles de IgE específica para PLV en los lotes **Control-Ag** y **Trat-Omp-16**, mientras que al día 39 los niveles de IgE específica para el lote **Trat-LPS** se mantiene significativamente menor que en el resto de los lotes (p<0.01). También se midieron los niveles de IgG1 e IgG2a, se cuantificó la concentración de citoquinas en el sobrenadante de esplenocitos en cultivo y se realizó la prueba de DTH, obteniéndose valores similares entre los lotes **Control Ag** y **Trat-Omp-16** (resultados no mostrados).

Con los resultados obtenidos podemos concluir que la administración de la proteína recombinante Omp-16 por vía intranasal en las condiciones experimentales establecidas (dosis y frecuencia) no revierten la activación inmunológica Th2-dependiente inducida por PLV junto a TC administrados por vía ig. Sin embargo, los resultados del grupo **Trat-LPS** indican que el LPS, un potente agonista toll, por vía intranasal inhibe el aumento sérico de los niveles de IgE y modula la aparición de signos clínicos compatibles con un mecanismo de hipersensibilidad. Además, el incremento en los niveles de IgG2a, la disminución de la secreción de IL-5 y una DTH más intensa permiten concluir que el LPS actúa como un inmunomodulador mucosal de la inmunidad Th2 específica. Estos resultados en su conjunto

sugieren que la mucosa nasal podría constituir una potencial vía para modular la activación inmunológica inducida en una mucosa distal (intestino).

II.3.4 Optimización del tratamiento inmunomodulatorio por la vía intranasal

Sobre la base de la información sobre las propiedades aduvantes pro-Th1 de Omp-16 y los resultados mostrados anteriormente, decidimos intensificar el tratamiento a través de la inoculación de una mayor dosis de la proteína de *Brucella* (100µg) y el incremento en el número de administraciones intranasales (2 inoculaciones por semana durante 4 semanas). De esta manera, ratones BALB/c de 5 semanas de edad, fueron agrupados en lotes de 5 animales cada uno, y todos fueron inoculados por vía *ig* con PLV y TC. Para el tratamiento por vía *in*, los animales fueron divididos en 3 lotes como se realizó en la sección II.2.3 (**esquema 4**). Como agentes inmunomoduladores se empleó la proteína recombinante de *Brucella abortus* Omp-16, LPS de *Escherichia coli* como control de la vía, y PBS junto a PLV como control. A estos lotes de animales se los denominó **Trat-Omp-16**, **Trat-LPS** y **Control Ag** respectivamente, manteniendo la nomenclatura empleada con anterioridad.



Esquema 4 Protocolos de sensibilización y modulación con Omp-16

Días 0, 7, 14, 21, 28 y 35: se inocularon por ratón:

10 µg de TC + 20 mg de PLV, por vía *ig*, para todos los animales del experimento

Dependiendo del lote, se inocularon por vía *in*

4 µg de PLV + 100 µg de OMP-16, para el grupo denominado **Trat-OMP-16**.

4 µg de PLV, para el grupo denominado **Control Ag**.

4 µg de PLV + 20 µg de LPS, para el grupo denominado **Trat -LPS**.

Desafío oral: administración de 20 mg de PLV por vía *ig* el día 45.

Caracterización *in vivo* e *in vitro* de la respuesta inmune inducida

Análisis de los signos clínicos desarrollados luego del desafío oral

A los 10 días de terminado el plan de inmunización, se realizó un desafío oral con PLV y se observaron los signos clínicos inducidos inmediatamente. En la **figura 23**, se muestran los scores clínicos de cada ratón correspondientes a un experimento representativo y como puede observarse, este protocolo logró una disminución en la sintomatología de los animales tratados con Omp-16 (Trat-Omp 16) y con LPS (Trat-LPS), con respecto al lote que recibió PLV junto a PBS (Control Ag).

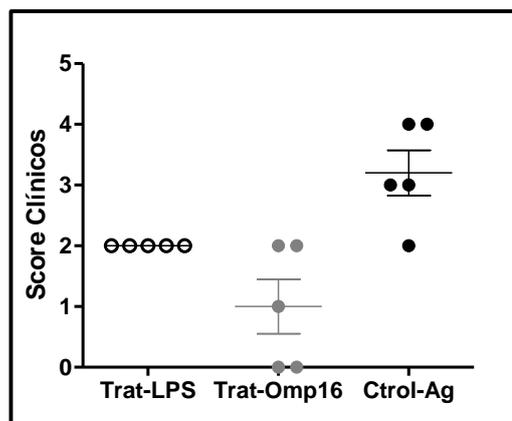


Figura 23. Score clínico en ratones sensibilizados que recibieron distintos tratamientos. Se muestran los signos clínicos desarrollados a los 30 min. del DO con 20 mg de PLV por los ratones de los distintos grupos. (Gráfico representativo de 2 experimentos independientes)

Prueba Cutánea

Se realizó la PC con PLV en animales pertenecientes a los distintos lotes, observándose una extravasación inmediata del colorante azul en la zona de la piel donde se realizó la inoculación del antígeno, y a nivel sistémico en todos los animales del grupo sensibilizado. Mientras que en 9 de 12 ratones sensibilizados y tratados presentan extravasación el colorante sólo en el sitio de inoculación (**figura 24**).

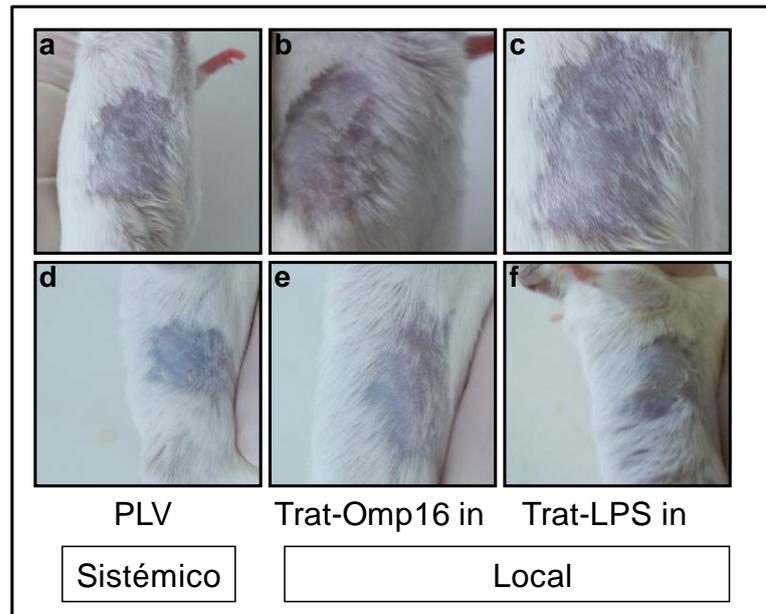


Figura 24. Prueba cutánea en los ratones sensibilizados y tratados. En a, b y c se muestran resultados negativos de extravasación al inocular ratones de los distintos grupos con solución fisiológica. En d, e y f se observa extravasación del Azul de Evans al inocular con PLV los ratones del grupo sensibilizado (d), tratado con Omp-16 (e) y tratado con LPS (f). Resultados representativos de 2 experimentos independientes.

Estos resultados indican que al tiempo que se realizó la PC, la IgE medida fue capaz de sensibilizar macrófagos cutáneos y por lo tanto no es posible discernir si hubo inmunomodulación en esta prueba.

Determinación de anticuerpos séricos

En la **figura 25**, se muestran los resultados de los ELISA a través de los cuales se evaluaron los niveles séricos de los distintos isotipos de anticuerpos específicos para PLV. Se observó un aumento significativo a lo largo del proceso de sensibilización de los niveles de IgE e IgG1 en el grupo sensibilizado. Como puede observarse en la **figura 25** en los ratones tratados con **Omp-16** y con **LPS** la administración intragástrica de PLV junto a TC generó niveles de IgE específicos significativamente menores que el grupo sensibilizado (**control Ag**). En los grupos control y tratado con Omp no se observan diferencias en los niveles de IgG1 (**figura 25b**); mientras que en el grupo de ratones tratados con LPS hay un marcado incremento de IgG1 e IgG2a específicos para PLV. Con respecto a los animales del grupo **Trat Omp16** se observó un leve aumento en los niveles de IgG2a específica, con respecto al grupo control, aunque este aumento no resultó ser estadísticamente significativo (**figura 25c**).

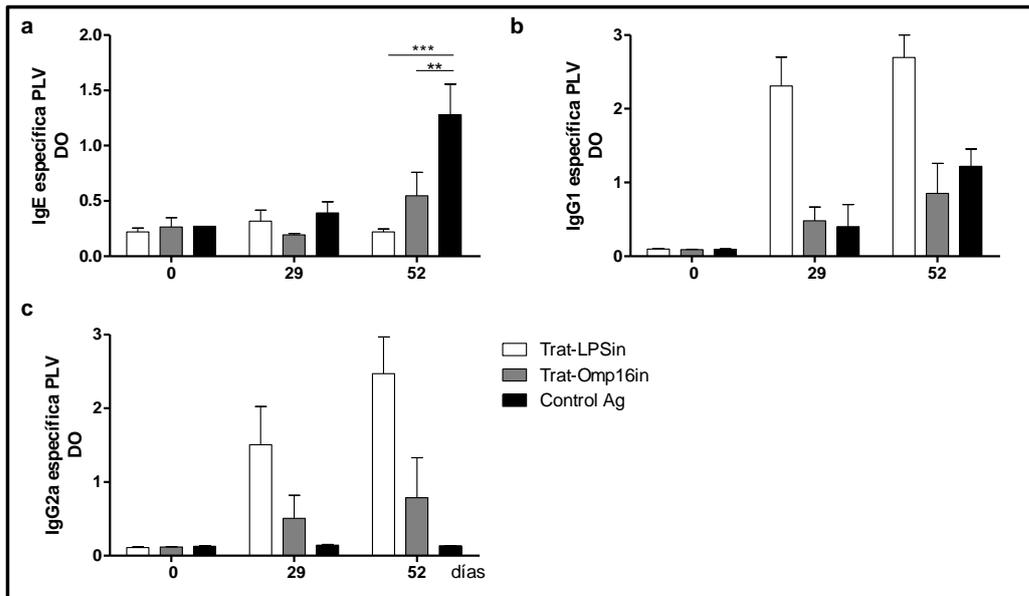


Figura 25. Niveles séricos de isotipos específicos de PLV determinados por EAST y ELISA. Se muestran los valores de DO correspondientes a IgE (a), IgG1 (b) e IgG2a (c) para los ratones sensibilizados y tratados de los distintos grupos. Se grafican los valores promedios de $DO \pm SEM$. Estos resultados corresponden a 2 experimentos representativos. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ obtenidos por Anova two way y como test posterior Bonferroni).

Por lo tanto el análisis de los isotipos específicos indica una modulación de la respuesta Th2 mediante el empleo de LPS y Omp-16.

Prueba de Hipersensibilidad retardada (DTH)

A los 21 días de la última sensibilización, se realizó la prueba de DTH con PLV y SF como se mencionó anteriormente, y a las 72hs se midió el espesor de las patas. Comparando ambas patas se calculó la diferencia de inflamación entre las mismas. En la **figura 26** se muestran los resultados de la DTH y como puede observarse en los ratones tratados con LPS o con Omp-16 se obtuvieron mayores diferencias entre ambas patas, lo cual significa una DTH más intensa, con respecto a los animales que sólo fueron sensibilizados.

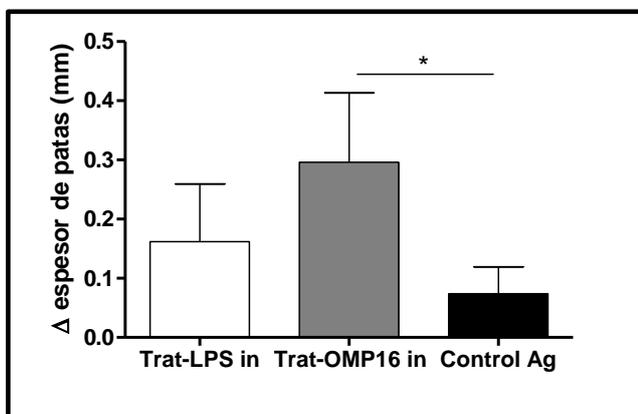


Figura 26. Prueba de DTH. Se representan los valores medios en $mm \pm SEM$ para cada grupo. (* $p < 0.05$, Anova de una vía)

Estos resultados constituyen una evidencia *in vivo* que los tratamientos inmunomoduladores por la vía intranasal generan una respuesta Th1-dependiente que permite modular la sensibilización

alérgica intestinal.

Determinación de citoquinas en cultivos de esplenocitos

A los 10 días de la prueba de DTH, animales de distintos grupos fueron desafiados oralmente con PLV y sacrificados a las 24hs. Se aislaron los bazo y se obtuvieron suspensiones de esplenocitos que se cultivaron en presencia de PLV o caseína. Se incluyó RPMI como control negativo (medio de cultivo RPMI 1640) y Con A como control positivo.

A partir de los sobrenadantes de estos cultivos se midieron los niveles de IL-5, IL-13, e IFN- γ por ELISA de captura. En la **figura 27** se muestran los resultados de la cuantificación de IL-5 e IFN- γ como citoquinas Th2 y Th1, respectivamente. Como puede observarse células de los animales de los 3 grupos tratados secretan cantidades elevadas de IL-5, aunque los del grupo de ratones tratados con LPS muestran valores significativamente menores de esta citoquina Th2. Estos mismos ratones mostraron los mayores niveles de secreción de IFN- γ .

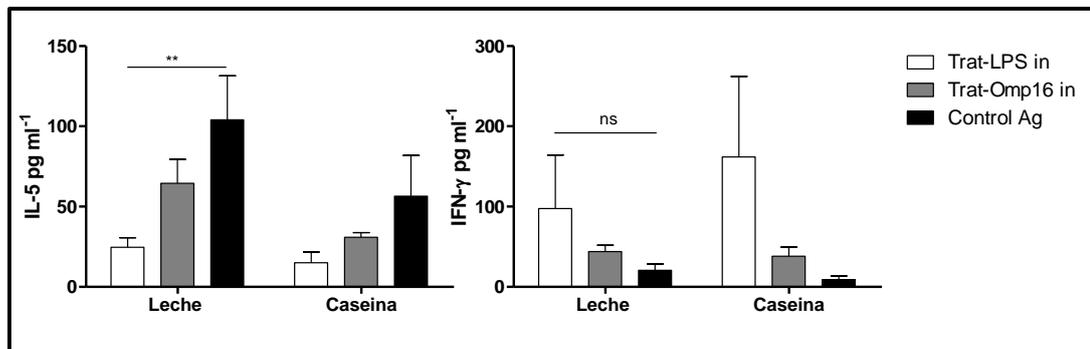


Figura 27. Concentración de citoquinas mediadas por ELISA de captura. Concentración de IL-5 o IFN- γ en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos en presencia de PLV o caseínas. ($p < 0.01$, Anova de dos vías seguido de test de Bonferroni).

Estos resultados reflejan que sólo los animales tratados con LPS muestran, a nivel de células del bazo, una respuesta celular Th1, que podría ser la responsable de modular la secreción de IgE y la inducción de signos clínicos post-desafío oral. Sin embargo, el tratamiento con Omp generó niveles menores de IL-5, y mayores de IFN- γ con respecto a los ratones sensibilizados.

Análisis de la inmunidad inducida en la mucosa intestinal

Se aislaron los intestinos de ratones de los distintos grupos y se procesaron para aislar el RNAm. Las muestras se recibieron en buffer lisis RA1 en frío y se extrajo el mRNA total como se mencionó en el capítulo I. Se obtuvo el cDNA por RT-PCR y se analizó la expresión de citoquinas por qPCR. En la **figura 28** se muestra el incremento en la expresión génica correspondiente a IFN- γ , IL-5 e IL-13 obtenido a partir de la relación entre la expresión de estas citoquinas en los intestinos de los animales de cada lote tratado y la expresión en los

animales del grupo control o no inmunomodulado. A través de la expresión del gen de β -actina, se normalizó la cantidad total de cDNA.

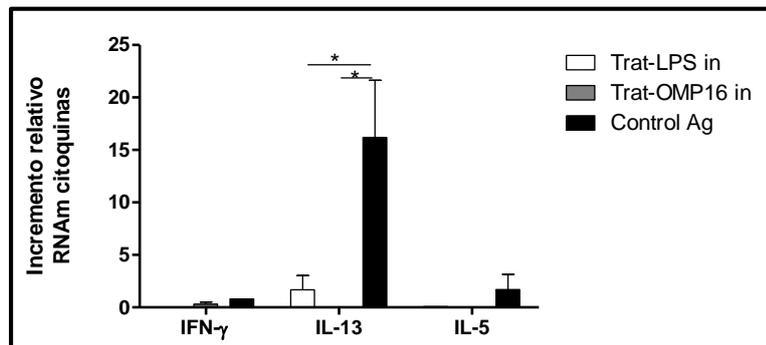


Figura 28. Expresión de mRNA de citoquinas por qPCR. Se muestra el incremento en la expresión de IL-13, IL-5 e IFN- γ en intestino de ratones de los distintos grupos.

En la figura se observa un aumento en la inducción de IL-13 y en menor medida de IL-5 en los ratones sensibilizados, mientras que no se observa la inducción de citoquinas Th2 en el intestino de los ratones tratados. Como puede observarse, resulta llamativo que no se encontró inducción de IFN- γ en los intestinos de ratones tratados por vía intranasal.

En conjunto, los resultados de los signos clínicos post-desafío oral, el descenso en los niveles de IgE específica sérica, el aumento en los niveles de IgG2a, la disminución de la secreción de las citoquinas Th2, y la prueba de DTH nos sugieren que el **LPS y la Omp-16 inducen una respuesta de perfil Th1 específica que es capaz de modular la sensibilización alérgica que se induce en forma simultánea al tratamiento.** Por lo tanto, el protocolo aplicado permitiría emplear LPS y Omp-16 como agentes inmunomoduladores, para redireccionar o inhibir la respuesta Th2 específica.

II.3.5. Tratamiento con proteínas recombinantes de *Brucella abortus* por vía intragástrica.

Estudio *in vitro* de Omp-16 sobre células epiteliales intestinales

Dado que las células epiteliales del tracto gastrointestinal constituyen la primera barrera física que separa el medio interno del contenido del lumen decidimos estudiar si esta proteína de membrana de *Brucella* ejerce algún efecto sobre los enterocitos. Sobre la base de estos resultados decidimos estudiar el empleo de Omp 16 como agente inmunomodulador por la vía intragástrica.

Se empleó la línea celular humana de carcinoma de colon (Caco-2) como blanco de Omp 16. Se emplearon, además, otros agonistas de los TLR (Pam₃CSK₄ comercial y LPS de *E. coli*) como activadores celulares, y como parámetro de respuesta celular se evaluó la

expresión de la quimoquina CCL20, la cual es un mediador de la inmunidad innata que atrae células dendríticas y linfocitos T al foco inflamatorio. Se observó que el cultivo de células Caco-2 en reposo junto a Pam₃CSK₄, LPS y Omp-16 no producen un aumento en la expresión de mRNA CCL20 (**figura 29a**), por lo cual las células serían no respondedoras probablemente por falta de expresión de los receptores específicos. Estudiamos la expresión de distintos TLR en Caco-2 y observamos que los colonocitos sólo expresan TLR5 en condición basal, mientras que al activarlas se induce la expresión de los otros TLRs. Se estudió la expresión del mRNA de los receptores tipo toll en las células Caco-2 al ser estimuladas con TNF- α , y encontramos un aumento de dicha expresión entre las 2 y 6 horas post-estímulo (**figura 29b**).

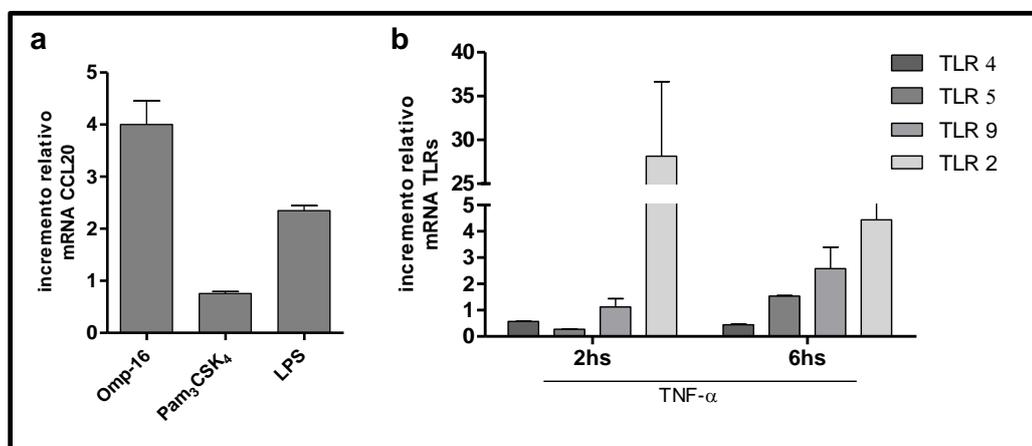


Figura 29. Estudio *in vitro* en Caco-2. (a) Expresión de CCL20 en células estimuladas por ligandos TLR (b) Expresión de mRNA de TLR 2, 4, 5 y 9 en células estimuladas con TNF- α por 2 y 6hs.

En base a estos resultados decidimos estudiar el efecto de los activadores celulares sobre células pre-activadas, para lo cual se realizó una cinética de activación empleando diferentes estímulos pro-inflamatorios (Flic, TNF- α e IL-1 β). Se encontró que a las 2 hs el estímulo con TNF- α induce marcadamente la expresión de CCL20 (**figura 30a**), y luego de 12hs disminuye a valores basales. Por lo tanto, Caco-2 se activan rápidamente frente a TNF- α y la respuesta a los distintos ligandos de TLR podría evaluarse, a través de la expresión de CCL20, a partir de las 12hs de iniciado el estímulo. Asimismo demostramos anteriormente que TNF- α induce la expresión de distintos TLR por lo cual estimulamos la células activadas con Pam₃CSK₄, LPS y Omp-16.

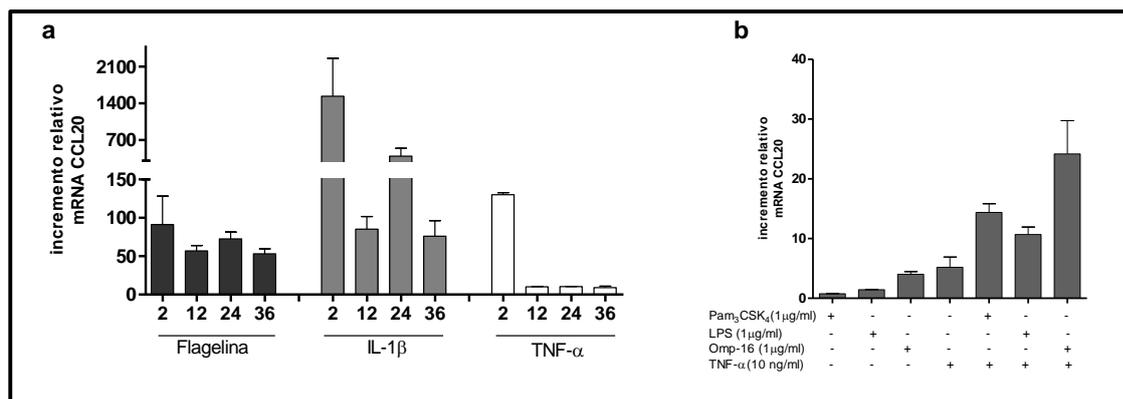


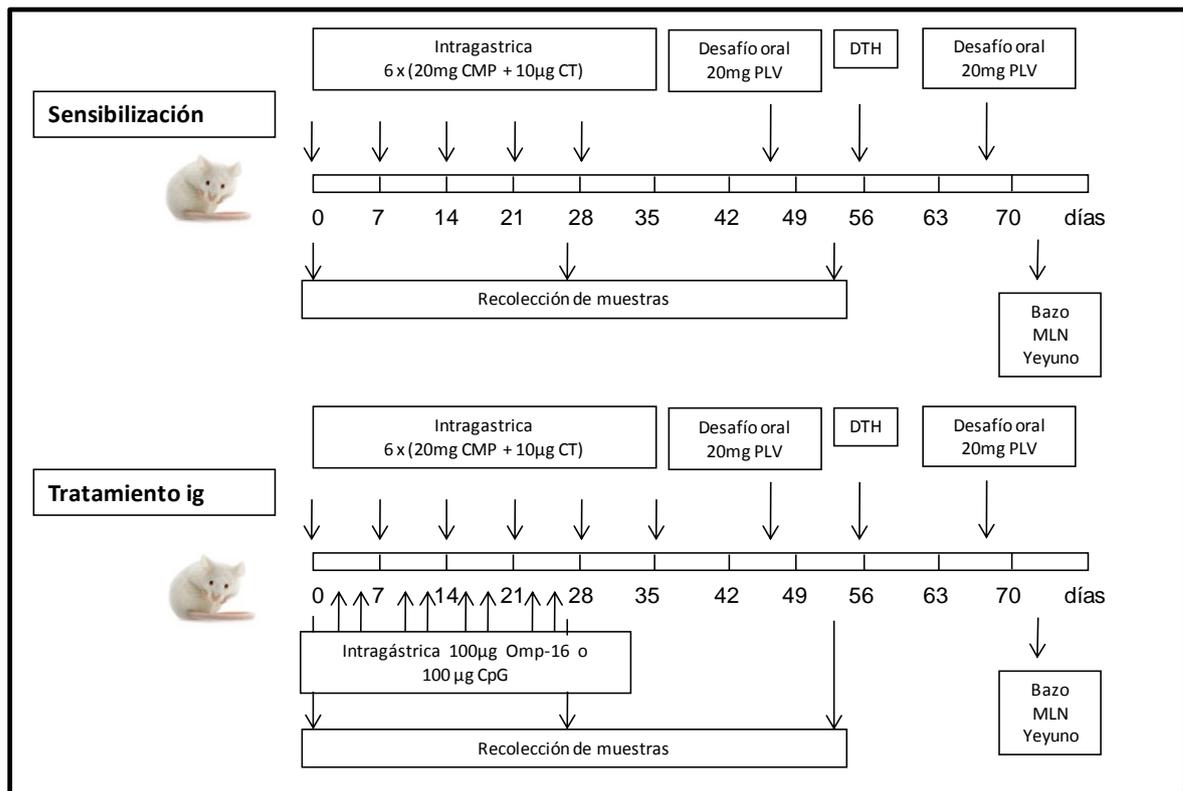
Figura 30. Expresión de mRNA CCL20 en Caco-2. (a) Cinética de expresión de mRNA CCL20 frente a estímulos pro-inflamatorios (Flic, IL-1β, TNF-α). (b) Expresión de mRNA CCL20 frente a Pam₃CSK₄, LPS y Omp-16 en células caco-2 pre-activadas por 12hs con TNF-α.

Como se observa en la **figura 30b**, las células Caco-2 se transforman en respondedoras de LPS, Pam₃CSK₄ y Omp-16 al pre-activarlas con un estímulo pro-inflamatorio.

Por lo tanto, y sobre la base de los resultados mostrados, decidimos emplear Omp-16 como un inmunomodulador oral en animales sensibilizados con PLV y TC.

II.2.6 Tratamiento con Omp-16 por vía intragástrica en el modelo murino de alergia alimentaria

Se emplearon ratones BALB/c de 5 semanas de edad, que se agruparon en lotes de 5 animales cada uno. Todos los animales fueron inoculados por vía ig con PLV y TC. Según el tratamiento administrado por vía ig, los animales fueron divididos en 3 lotes, como se realizó anteriormente (**esquema 5**). Como agentes inmunomoduladores se administró Omp-16, y además se utilizó CpG (ODN 1886, *Sigma*) como control de la vía oral. A estos lotes de animales se los denominó **Trat-Omp-16** y **Trat-CpG**. Se incluyó asimismo el grupo control de antígeno, el cual recibió solamente por vía oral PLV (**Contol Ag**).



Esquema 5 Protocolos de sensibilización y modulación con Omp-16

Días 0, 7, 14, 21, 28 y 35: se inocularon por ratón:

10 µg de TC + 20 mg de PLV, por vía ig, para todos los animales del experimento

Dependiendo del lote, se inocularon por vía ig

4 µg de PLV + 100 µg de Omp-16, para el grupo denominado **Trat-Omp-16**.

4 µg de PLV, para el grupo denominado **Control Ag**.

4 µg de PLV + 100 µg de CpG, para el grupo denominado **Trat-CpG**.

Desafío oral: administración de 20 mg de PLV por vía ig el día 45.

Caracterización *in vivo* e *in vitro* de la respuesta inmune inducida

Análisis de los signos clínicos desarrollados luego del desafío oral

Luego de 10 días de concluido el plan de sensibilización, se realiza un desafío oral con PLV y se observan los signos clínicos desarrollados por los distintos ratones a los minutos. En la **figura 31** se muestran los resultados del score clínico y como puede observarse se logró una disminución en las manifestaciones clínicas desarrolladas por los ratones tratados con Omp-16 y con CpG, con respecto al lote que recibió únicamente PLV. En el grupo control de antígeno, se observó un aumento en el rascado de la nariz y cabeza, enrojecimiento alrededor de la nariz, hinchazón de ojos y baja actividad post-estímulo; mientras que en los grupos tratados, las manifestaciones fueron más leves.

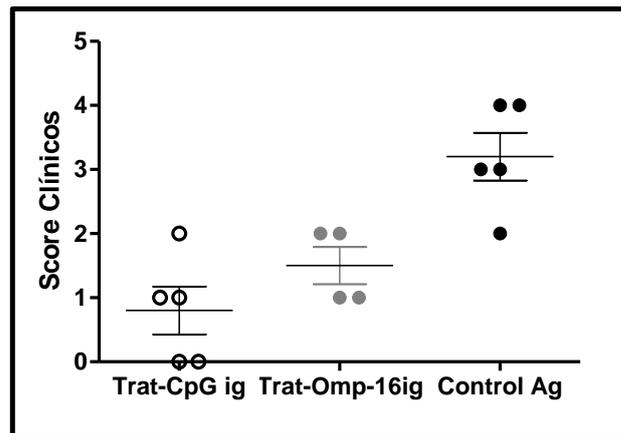


Figura 31. Evaluación in vivo de la respuesta inducida por el desafío oral con PLV. Se muestran los score clínicos correspondientes a los signos clínicos desarrollados a los 30 min del DO con 20 mg de PLV en los ratones de los distintos grupos. Estos resultados corresponden a un experimento representativo.

De la figura podemos concluir que el tratamiento oral con Omp-16 o CpG siguiendo el protocolo detallado, permite disminuir marcadamente los síntomas de hipersensibilidad en los animales alérgicos.

Prueba Cutánea

A los animales pertenecientes a los distintos lotes se les realizó la PC con PLV, observándose una extravasación inmediata del colorante en la piel donde se inoculó PLV en todos los animales del grupo sensibilizado. Inclusive en algunos animales de este grupo se observó una extravasación sistémica. Es de remarcar que en los ratones tratados con Omp-16 o CpG no se observó extravasación del colorante. Únicamente los ratones del grupo control Ag se obtuvo una PC positiva. En todos los casos el flanco inoculado con solución fisiológica dió una PC negativa (**figura 31 a,b,c**).

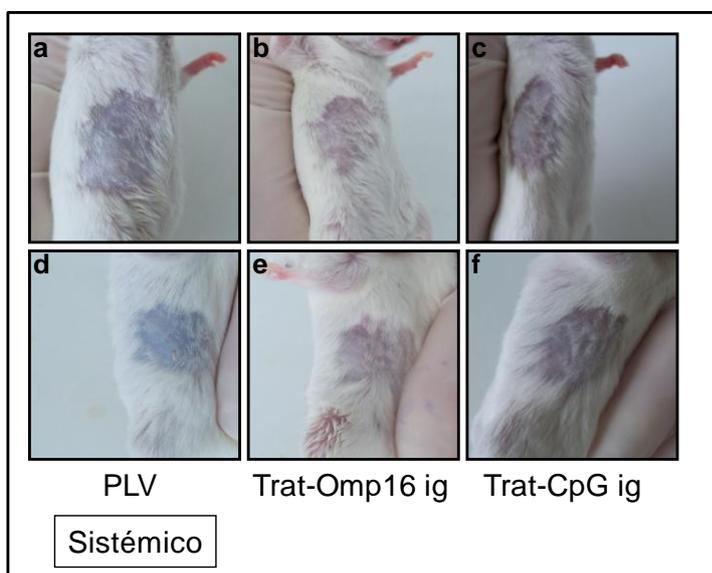


Figura 32. Prueba cutánea con PLV en animales sensibilizados y tratados. En el panel superior se muestran los resultados correspondiente a animales sensibilizados inoculados con SF (a,b,c). En el panel inferior se muestran los resultados de los animales sensibilizados que recibieron cada tratamiento (d,e,f) Sólo se incluye la foto de un animal de cada grupo.

Estos resultados permiten concluir que los tratamientos inmunomoduladores suprimen la producción y secreción de IgE, y por lo tanto la sensibilización de mastocitos cutáneos.

Determinación de anticuerpos séricos

Se estudió la inmunidad humoral a través de los niveles séricos de los distintos isotipos específicos de PLV. En la **figura 33** se muestran los resultados durante el protocolo de sensibilización/tratamiento y como puede observarse se produce un aumento significativo de los niveles de IgE e IgG1 en el grupo de animales sensibilizados. En los ratones tratados con Omp-16 o con CpG se detectaron al día 52 niveles de IgE específicos significativamente menores en comparación al grupo que recibió PLV como tratamiento (control Ag). Llamativamente no se observan diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IgG1 entre el grupo control y los grupos tratados (**figura 33b**). Cabe resaltar el aumento en los niveles de IgG2a de los animales tratados con CpG y Omp-16 con respecto al grupo control. Sin embargo, sólo en los animales Trat-CpG esta diferencia es estadísticamente significativa.

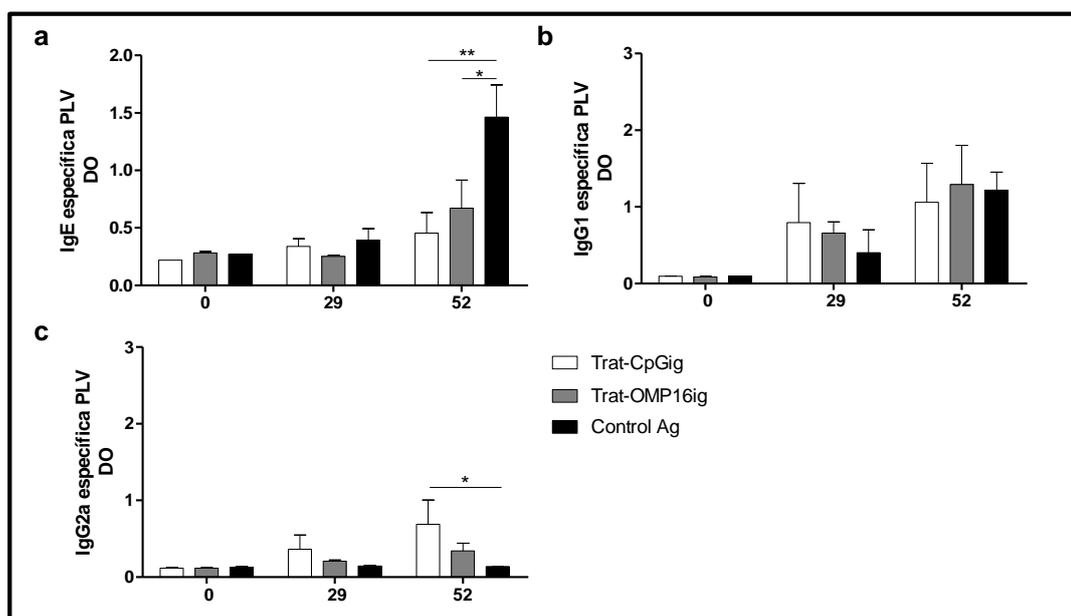


Figura 33. Isotipos específicos a PLV sérico determinados por EAST y ELISA. Cinéticas de producción sérica de IgE (a), IgG1 (b), e IgG2a (c) para los distintos tratamientos. Valores promedios de $DO \pm SEM$ para cada uno de los grupos. Estos resultados son representativos de 2 experimentos independientes. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ obtenidos por Anova two way y como test posterior Bonferroni.

Estos resultados nos permiten que los inmunomoduladores empleados por vía oral logran revertir la síntesis y secreción de isotipos de anticuerpos asociados a una inmunidad Th2 inducida.

Prueba de Hipersensibilidad retardada (DTH)

A los 21 días del desafío oral se realizó la prueba de DTH con PLV, y SF como control. Luego de 72 horas se midió el espesor de cada almohadilla plantar y se calculó la diferencia en la altura entre la pata inoculada con PLV y la pata inyectada con solución fisiológica. En la **figura 34** se muestran los resultados obtenidos para los ratones de los distintos grupos, donde se graficó la diferencia de altura de la pata inoculada con PLV con la inoculada con SF. Como puede observarse se obtuvo un aumento significativo en el tamaño de las patas de los ratones tratados con Omp-16.

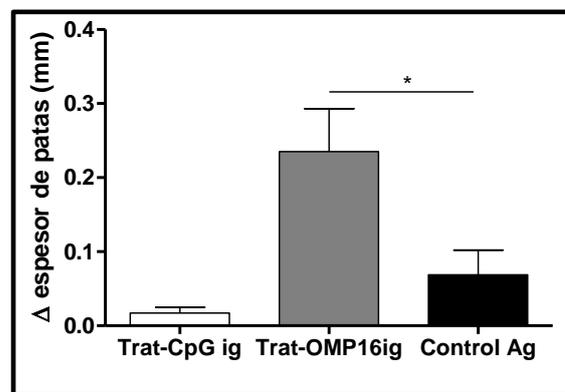


Figura 34. Prueba de DTH con PLV en los ratones sensibilizados y tratados. Se representan los valores medios en mm \pm SEM correspondiente a la diferencia en el espesor de las patas. * $p < 0.05$, Anova de una vía.

Estos resultados nos indican que el tratamiento con **Omp-16** por vía *ig* de manera simultánea a la sensibilización induce mecanismos celulares pro-inflamatorios específicos de PLV Th1-dependientes.

Cuantificación de las citoquinas en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos

Animales de distintos lotes fueron sacrificados 24hs luego del desafío oral, se aislaron los bazos y a partir de la suspensión de esplenocitos se realizaron cultivos en presencia de PLV o caseína. Se incluyó RPMI como control negativo (medio de cultivo RPMI 1640) y Con A como control positivo.

A partir de los sobrenadantes de estos cultivos se midieron los niveles de IL-5, e IFN- γ por ELISA de captura

Como puede verse en la **figura 35**, el grupo que solamente fue sensibilizado (**control Ag**) presenta niveles más altos de IL-5 cuando los esplenocitos son estimulados con PLV o caseínas *in vitro*, con respecto a los animales sensibilizados y tratados.

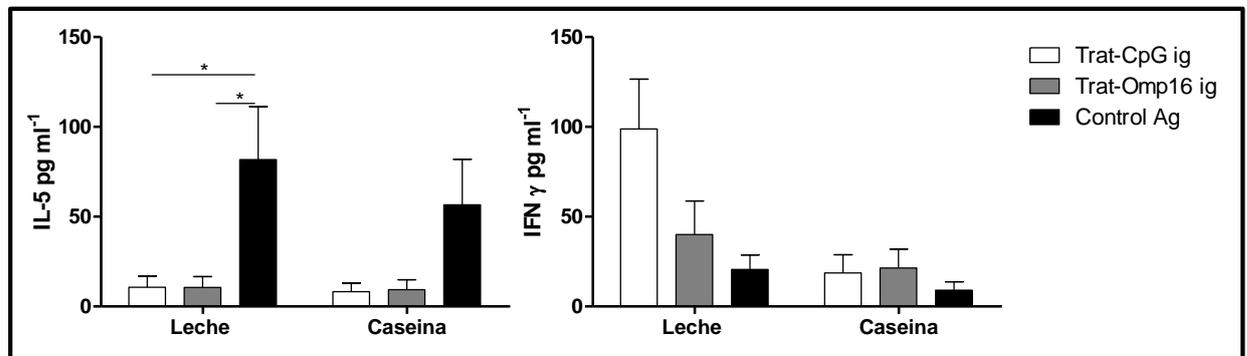


Figura 35. Concentración de citoquinas medidas por ELISA de captura. Concentración de IL-5 o IFN- γ en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos en presencia de PLV o caseínas. (* $p < 0.05$ Anova de dos vías seguido del test de Bonferroni)

Los niveles de IFN- γ en el grupo control de Ag son bajos, notándose un aumento en los grupos tratados, principalmente el grupo tratado con CpG. Si bien no se logran detectar niveles elevados de IFN- γ cuando se trata con Omp-16, el hecho que disminuya la secreción de IL-5 a niveles basales permite inferir que se logra establecer una respuesta Th1 contra-regulatoria de la Th2. Por otro lado, estos resultados sugieren que la respuesta celular en los animales tratados con CpG por vía oral genera niveles más elevados de IFN- γ con respecto al tratamiento con Omp-16.

Análisis de la respuesta inmune inducida en la mucosa intestinal

Con el fin de estudiar si los tratamientos inducen una respuesta Th1-en la mucosa intestinal, se sacrificaron ratones luego del desafío oral y los intestinos fueron recogidos en buffer lisis RA1 para la extracción de mRNA total como se mencionó en el capítulo I. Se obtuvo el cDNA y luego se cuantificó la expresión de citoquinas por qPCR. En la **figura 36** se muestran los resultados del cambio en la expresión de los genes para citoquinas Th1 (IFN- γ) y Th2 (IL-5, IL-13). Se obtuvo esta diferencia a partir de la relación en la expresión de cada gen comparando animales de cada lote tratado con el grupo control. β -actina fue usado para normalizar la cantidad total de cDNA.

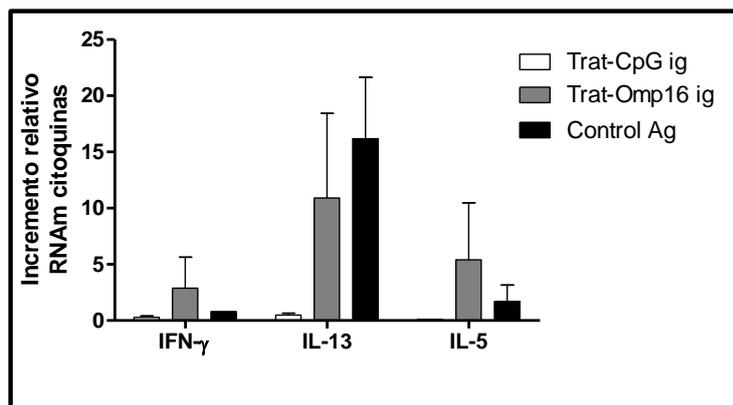


Figura 36. Expresión de mRNA de citoquinas Th1 y Th2 por qPCR. Se muestra el incremento en la expresión de IL-13, IL-5 e IFN- γ en intestino de ratones de los distintos grupos en comparación con el lote control que sólo recibió PLV.

De los resultados de la **figura 36** se puede inferir que a nivel de la mucosa intestinal se logra modular la expresión de citoquinas Th2, principalmente IL-13 cuya expresión está totalmente inhibida cuando los ratones son tratados con CpG.

A partir de los resultados obtenidos en este capítulo, encontramos que al tratar los animales sensibilizados con CpG u Omp-16 por vía oral se logra modular el incremento de IL-5 en bazo. Esto también se refleja tanto en los niveles de IgE específica sérica, como en la PC, DTH y en los signos clínicos luego del desafío oral con PLV. En conjunto estos resultados permiten concluir que los tratamientos inmunomoduladores por vía intragástrica logran revertir las reacciones de hipersensibilidad inducidas durante la etapa de sensibilización.

La vía intranasal, a diferencia de la vía subcutánea, también logra instaurar una inmunidad Th1-dependiente que logra revertir parcialmente la sensibilización alérgica en los ratones sensibilizados e inmunomodulados. Los resultados del capítulo II en conjunto permiten inferir que con los protocolos inmunomoduladores aplicados la administración intragástrica es más eficiente que la intranasal.

II.4. DISCUSION

En este capítulo se ha estudiado una estrategia de modulación basada en la hipótesis del re-direccionamiento de la respuesta Th2 inducida a través de la instauración de mecanismos inmunológicos Th1-dependientes. Para ello empleamos la proteína de membrana externa de *Brucella abortus*-Omp-16, la cual mediante la unión a TLR4 presenta propiedades adyuvantes pro-Th1, y CpG, que a través de su unión a TLR9 es capaz de inducir una inmunidad Th1 a través de la activación de la inmunidad innata.

Para realizar la modulación se eligieron distintas vías de administración: subcutánea, intranasal e intragástrica. Al administrar la Omp-16 por vía subcutánea no se logró inducir una respuesta de perfil Th1, por el contrario en ratones no sensibilizados, los cuales recibieron el tratamiento con PLV junto a Omp-16 o sola, se observó una fuerte respuesta de perfil Th2 en ambos casos. Esto podría deberse a que las proteínas de leche *per se*, inducen una respuesta inmunológica de perfil Th2. Sin embargo, estudios en ratones, muestran que la inflamación alérgica inducida por OVA en un modelo de asma es suprimida por la inoculación de OVA a altas dosis por vía sub-cutánea (Shirinbak et al. 2010; Dioszeghy et al. 2011). En pacientes alérgicos al polen, la inmunoterapia con el alergenó mostró una supresión efectiva de la respuesta alérgica, asociada con una disminución del infiltrado de basófilos, neutrófilos y eosinófilos. Esta supresión estaría relacionada con la inducción de una IgG1 e IgG4 específicos para el alergenó, lo cual impediría la unión del mismo a las IgE unidas a mastocitos (Durham et al. 1999). Sin embargo, las proteínas de leche en nuestro modelo de alergia alimentaria, al igual que lo que ocurre en humanos, inducen una sensibilización cuando son administradas a través de la piel. En este sentido Fox y col. estudiaron que el contacto con antígenos de maní durante la infancia promueve la sensibilización del individuo (Fox et al. 2009). También se ha observado que chicos alérgicos a PLV desarrollaron anafilaxia cuando se aplicaron pomadas que contenían caseínas (Jarmoc y Primack 1987; Tabar et al. 1996; Saloga y Knop 2000). El grupo del Dr. Sampson tiene publicado un trabajo en donde desarrollan un modelo de dermatitis atópica inducida por un alergenó alimentario; en el mismo sensibilizan ratones C3H/HeJ con proteínas de maní o de leche y TC por vía oral y luego inoculan el alergenó por piel y el ratón desarrolla una erupción cutánea que se correlaciona con las manifestaciones observadas en humanos (X. M. Li et al. 2001). Estudios más recientes indican que la exposición cutánea a antígenos alimentarios puede reprogramar en MLN a las células efectoras con receptores de tráfico a intestino a que expresen receptores

de tráfico a piel, provocando las lesiones cutáneas cuando el paciente contacta al alérgeno (Oyoshi et al. 2011).

Otra vía prometedora para inmunoterapia es la intranasal. Hemos estudiado que la inoculación intranasal de PLV con Omp-16 o con LPS en ratones sensibilizados, suprimió la activación de la respuesta Th2, disminuyendo las manifestaciones clínicas luego del desafío oral con el antígeno, los niveles de IgE específica y aumentando los niveles de IgG2a; esto no se observó cuando se administró el antígeno solo. En bibliografía hay pocos trabajos que utilicen la vía intranasal para modular una respuesta en intestino. Cortez Perez y col. describen un tratamiento intranasal con un probiótico modificado, *Lactococcus lactis* productor de β -lactoglobulina, en ratones sensibilizados por vía oral con leche de vaca. Este tratamiento contribuyó a una disminución sérica de IgG1, disminución de IL-4 con aumento de IFN- γ por los esplenocitos estimulados *in vitro* con β -lactoglobulina, sugiriendo que se produjo un switch de la respuesta Th2 hacia una respuesta Th1 (Cortes-Perez et al. 2007).

Finalmente, los ratones modulados por vía intragástrica con Omp-16, mostraron una eficiente respuesta de perfil Th1, disminuyendo el score clínico post-desafío oral con PLV, los niveles séricos de IgE específicos y negativizando la prueba cutánea antígeno específica. Adel-Patient y col. administraron por vía oral *Lactococcus lactis* recombinante la cual expresa β -lactoglobulina bovina a un modelo murino de alergia validado en ratones BALB/c. Encontraron que el pre-tratamiento con la bacteria recombinante produce una respuesta de perfil Th1 específica a β -lactoglobulina, disminuyendo los niveles de IgE específica, mientras que aumenta los niveles de IgG2a y la producción de IFN- γ (K Adel-Patient et al. 2005).

Actualmente la inmunoterapia sublingual resulta el tratamiento más eficaz en pacientes con alergia a distintos alérgenos.

Capítulo 3

Empleo de bacterias del género Actinomycetales como agentes inmunomoduladores de la respuesta inmune



III. 1 INTRODUCCIÓN

El sistema inmune asociado a la mucosa intestinal es el responsable de mantener un fino balance entre la activación inmunológica que genera una respuesta inflamatoria contra patógenos y evitar la inducción de una respuesta inmune frente a la microbiota y otros antígenos presentes en el lumen intestinal. El epitelio intestinal cumple en este escenario una función dual: actúa como barrera física permitiendo la traslocación selectiva del contenido intestinal al medio interno y al mismo tiempo es un componente activo del sistema inmune intestinal a través de interacciones con diversas células del sistema inmune, mecanismos que no han sido aún completamente dilucidados. Las células epiteliales intestinales juegan un rol importante en el “muestreo” y en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Se sabe que muchos mediadores inflamatorios modulan la integridad de la barrera epitelial y la activación de las células epiteliales. El factor de transcripción NF- κ B juega un rol importante en la respuesta inmune frente a diferentes situaciones de stress tanto endógenas como exógenas (Nenci et al. 2007). Diversas señales de stress (antígenos bacterianos o virales, citoquinas, radiaciones UV, etc.) pueden activar esta vía de señalización e inducir la expresión de genes involucrados en un proceso pro-inflamatorio o en el mantenimiento de la homeostasis intestinal (Hayden et al. 2006). Una adecuada respuesta inflamatoria contra bacterias invasoras resulta en la secreción de péptidos antimicrobianos, como así también en la secreción de citoquinas y quimioquinas en el tejido, las cuales reclutan y activan distintos tipos celulares dependiendo de la señal de disparo de los mecanismos de la inmunidad innata (células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, etc.). Por otro lado, se sabe que cambios en la microbiota pueden producir una respuesta inflamatoria severa y de esta manera alterar la homeostasis intestinal. La microbiota es beneficiosa para el huésped ya que ayuda a extraer nutrientes de la dieta, previene la colonización de microorganismos patógenos oportunistas y contribuye al desarrollo de la arquitectura intestinal. La influencia de la microbiota en el desarrollo de la inmunidad adaptativa se ha visto bien ejemplificada en animales libres de gérmenes. Estos animales presentaron falta de maduración en los tejidos linfoides asociados a mucosa intestinal y exhiben diversos defectos en la respuesta inmune humoral (Feng y Elson 2011; Honda y Takeda 2009).

En este capítulo presentaremos los resultados del análisis del rol de distintas **bacterias del orden Actinomycetales** en la modulación de la activación de células epiteliales intestinales y en el proceso inflamatorio mucosal empleando el modelo murino de alergia alimentaria.

El orden Actinomycetales incluye un gran número de géneros, los cuales a su vez contienen distintas especies. Los Actinomycetales son bacterias Gram positivas aeróbicas que se distribuyen ampliamente en ambientes naturales (agua, tierra, etc.). Se las ha estudiado profusamente desde hace varios años, sin embargo no se conocen algunos aspectos relacionados con su composición o propiedades patogénicas. La primera especie en ser estudiada fue el *Mycobacterium vaccae* (Mv); esta especie está relacionada al *M. obuense* y presenta propiedades adyuvantes pro-Th1, por lo cual se las emplea para modular procesos inmunológicos mediados por una respuesta Th2-dependiente. Esta bacteria ha demostrado ser efectiva en modelos animales y en humanos. Varios estudios con *M. vaccae* mostraron tener efectos benéficos en infecciones con *Mycobacterium tuberculosis* (Dlugovitzky et al. 2010), *Mycobacterium leprae* (Truoc et al. 2001), en asma alérgico (Camporota et al. 2003), en enfermedades autoinmunes como la psoriasis (Lehrer et al. 1998) y en cáncer (J. L. Stanford et al. 2008).

En los últimos años, se han estudiado diversas especies de Actinomycetales y se han dilucidado importantes propiedades inmunomodulatorias. Especies como *Gordonia bronchialis* (Gb), *Rhodococcus coprophilus* (Rc) y *Tsukamurella inchonensis* (Ti) han sido estudiadas en varias condiciones naturales y experimentales en animales. Los resultados obtenidos con estas bacterias en modelos experimentales sugieren que presentan al menos dos actividades: una moduladora de la respuesta inmune, y otra de supresión de la inflamación (Bottasso et al. 2009). Se ha demostrado que estas bacterias logran limitar la parasitemia y el desarrollo de miocarditis crónica en un modelo experimental de infección de *Trypanosoma cruzi* en rata (Fontanella et al. 2007; Davila et al. 2011), limitan el desarrollo de hiperplasia de la miointimal en un modelo experimental en rata de daño en la arteria carótida (Hansrani et al. 2010), disminuyen el infiltrado de mastocitos en la mucosa colónica en un modelo en conejo de alergia (Vinuesa, Standfor no publicado), etc. En conjunto estos efectos podrían ser interpretados en base a las propiedades adyuvantes que presentan estas bacterias, combinado con la presencia de proteínas de shock térmico que tienen reactividad cruzada con las proteínas de stress endógeno. Sin embargo, no se puede extender la misma línea de razonamiento para explicar los resultados de un estudio realizado en ratas tratadas con bacterias Actinomycetales que fueron posteriormente desafiadas con parásitos de *T. cruzi*, en las que se encontró que Gb generaba protección en la progenie frente a la infección.

Llamativamente el mismo efecto no se observaba al tratarlas ratas con Rc dado que aumentaba la susceptibilidad a la infección (Davila et al. 2011). También se han observado efectos benéficos empleando Gb y Rc en perros con dermatitis alérgica causada por pulgas (Marro et al. 2011), o con Ti en alergia a dermatofagoides en caballos, o como se mencionó anteriormente, la administración oral de Gb en modelos de alergia a ovoalbúmina bovina en conejos resultó en la negativización de las pruebas cutáneas y reducción del número de eosinófilos y mastocitos en la mucosa rectal. Aunque las enfermedades mediadas por procesos inflamatorios crónicos son más complejas y difíciles de comprender se ha incluido el uso de estas bacterias en un gran número de desórdenes: enfermedades tumorales, intolerancia alimentaria, diabetes mellitus tipo 2, el síndrome metabólico, enfermedades inflamatorias crónica (IBD), etc. (Bottasso et al. 2009). Por lo tanto resta aún mucho camino por recorrer en cuanto al estudio de las propiedades benéficas que ejercen estas bacterias en procesos inflamatorios agudos y crónicos, pero indudablemente representan una interesante alternativa terapéutica para este tipo de patologías.

Encontrar y optimizar un tratamiento seguro y bien tolerado que pueda disminuir la inflamación crónica es un desafío importante para la biomedicina.

En este capítulo presentaremos los resultados que muestran los efectos y posibles mecanismos de acción de bacterias Gb y Rc muertas por calor, sobre células epiteliales colónicas humanas. Posteriormente estudiaremos el efecto inmunomodulatorio sobre el sistema inmune de mucosas en modelos experimentales en ratón.

III.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Caracterizar la activación de células epiteliales intestinales humanas a tiempos cortos frente a distintos estímulos activadores (ligandos de TLR y citoquinas pro-inflamatorias).

- ❖ Estudiar el efecto modulador de bacterias del género Actinomycetales sobre la activación de células epiteliales.

- ❖ Emplear bacterias del género Actinomycetales como agentes inmunomoduladores en el modelo de alergia alimentaria a leche de vaca

III. 3. RESULTADOS

Considerando la información y el conocimiento que se ha logrado en los últimos años con respecto a la administración de bacterias por la vía oral y sus efectos sobre las mucosas decidimos aplicar estas bacterias por vía intragástrica para modular la inflamación alérgica aguda que se induce en ratones de la cepa BALB/c. Dado que, como mencionamos anteriormente, las células epiteliales del intestino son las primeras células con las que se encuentran las bacterias decidimos comenzar nuestros estudios analizando si estos microorganismos ejercen algún efecto sobre las mismas. Existen numerosas y ampliamente caracterizadas líneas celulares de epitelio colónico humano (aisladas de tumores de colon) por lo cual decidimos emplear las mismas como modelo *in vitro*.

Nuestros estudios se basan principalmente en el empleo de Caco-2, células derivadas de carcinoma de colon humano, las cuales en cultivo se diferencian y se polarizan y fenotípicamente se asemejan a los enterocitos del intestino delgado. Estas células presentan receptores TLR y de citoquinas entre otros, y la activación a través de los mismos produce citoquinas y mediadores inflamatorios (Bandyopadhyaya et al. 2007; Romier et al. 2008). Para analizar a modo de screening la activación y modulación celular también empleamos la línea de Caco-2 transformada (Caco-luc) que expresa el gen de la luciferasa cuando la misma se activa. Como ya se mencionó, esta línea celular fue transfectada con un plásmido que contiene el gen de la luciferasa en el promotor NF- κ B de CCL20, por lo cual cuando se activa se induce el gen de luciferasa y de CCL20 (quimioquina que atrae células dendríticas y linfocitos T), a través de la vía de NF- κ B. Ambos tipos celulares (Caco-2 y Caco-luc) presentan el mismo comportamiento en cultivo. Finalmente, y una vez dilucidados los mecanismos activadores e inhibitorios, empleamos ratones de la cepa BALB/c para estudiar el efecto anti-inflamatorio *in vivo*.

Análisis del efecto producido por los estímulos pro-inflamatorios y los Actinomicetales sobre las células Caco-2

Se estudió el efecto activador de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β y TNF- α) y flagelina (ligando de TLR-5) a través de la medida de la actividad de la luciferasa en células Caco-luc en cultivo. Se caracterizó la activación celular por PCR tiempo real para genes que codifican mediadores de inflamación.

Dado que nuestro objetivo es emplear bacterias Actinomicetales como inmunomoduladores en los mecanismos iniciales de la activación inmunológica decidimos estudiar las etapas tempranas de la activación celular. Para tal fin seleccionamos genes que se

expresan a tiempos cortos cuando las células epiteliales son activadas, y que además participan en la quimio-atracción y activación de otras células del sistema inmune para montar una respuesta inmune (IL-1 β , TNF- α , IL-6, CCL20, IL-8 y MCP-1). Por lo tanto se mantuvo a las células bajo activación durante 2 horas a 37°C, y se utilizó medio de cultivo solo (DMEM suplementado con suero fetal bovino y antibióticos) como control negativo. Esta condición fue utilizada como basal para calcular la activación celular. Para la qPCR se normalizó la cantidad de cDNA analizando la expresión del gen de la β -actina. Transcurrida la activación se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS y se lisaron con el buffer respectivo ya sea para medir la actividad luciferasa o para la extracción del RNAm. Para los ensayos de medida de emisión de luz se incubaron las células Caco-luc con los diferentes estímulos durante un tiempo mayor (4 hs) dado que se debe inducir la expresión de la enzima.

Inicialmente se cuantificó a través de qPCR el incremento en la expresión de los genes de distintas citoquinas y quimioquinas como se muestra en la **figura 37**.

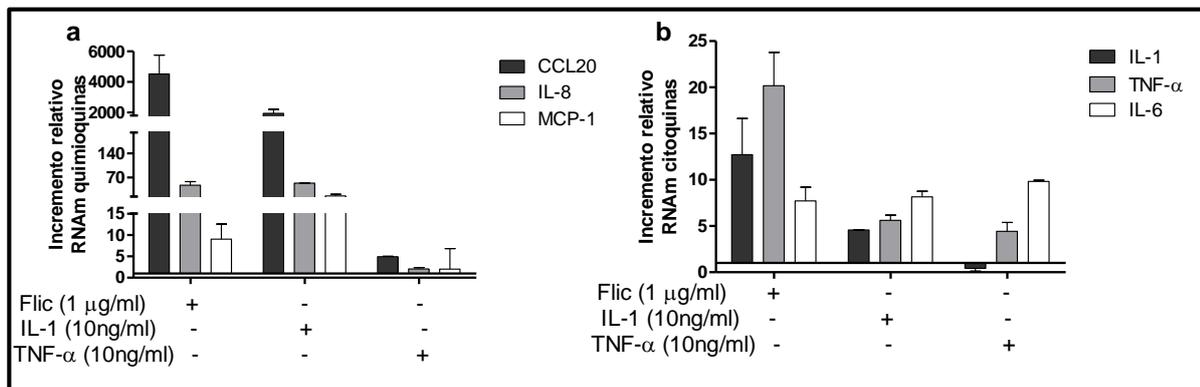


Figura 37. Expresión de RNAm de (a) quimioquinas (IL-8, MCP-1 y CCL20) y de (b) citoquinas (IL-6, TNF- α e IL-1) en Caco-2 frente a diferentes estímulos por 2hs. *Incremento relativo*: corresponde al incremento en la expresión de cada gen en la condición de activación con respecto a la condición basal.

Como se observa en la **figura 37**, las Caco-2 responden más marcadamente a flagelina e IL-1 β , y esto puede explicarse por la mayor expresión en la membrana de sus receptores específicos. Los principales marcadores de activación hallados son TNF- α y CCL20 en las condiciones de cultivo ensayadas. Los demás genes estudiados también son inducidos, aunque en menor medida.

Una vez caracterizada la activación celular de las Caco-2, se procedió a investigar si las bacterias Actinomycetales ejercen algún efecto biológico sobre las células epiteliales intestinales en reposo. Para esto utilizamos las células Caco-luc, y en la **figura 38** se muestran los resultados de los cultivos con distintas bacterias vivas y muertas por calor. Puede observarse que las células responden a flagelina y se activan en presencia de *Salmonella tiphymurium* (*S. tiphymurium*) (de donde se aísla la flagelina) viva o muerta. Sin embargo,

cuando las células fueron incubadas con bacterias muertas de Gb o Rc no se observó inducción de la actividad de luciferasa y por lo tanto no se observó emisión de luz.

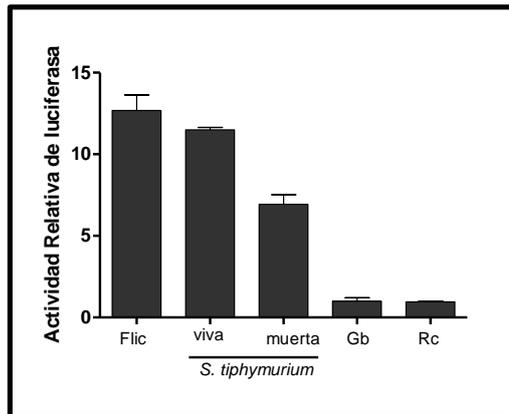


Figura 38. Expresión relativa de luciferasa, en cultivo con flagelina, *Salmonella tiphymurium* (viva y muerta), y bacterias Actinomycetales (Gb y Rc). Flic: flagelina; Gb: *Gordonia bronchialis*; Rc: *Rhodococcus coprophilus*.

Estos resultados nos permiten concluir que las células responden tanto a bacterias vivas como muertas, expresan TLR-5, Gb y Rc muertos, al no tener flagelo, no son capaces de activar las Caco-luc en reposo. Es conocido que la línea celular Caco-luc expresa TLR-5 y es por lo tanto respondedora a flagelina, razón por la cual se incluyó este estímulo como control positivo. Además se incluyó *Salmonella tiphymurium* viva y muerta como control de respuesta de la línea celular frente bacterias muertas o vivas.

A partir de estos resultados se decidió evaluar si los Actinomycetales ejercen algún efecto inhibitorio sobre la activación de las células epiteliales. Para ello, se pre-incubaron las células Caco-luc con Gb o Rc muertas por calor durante 30 minutos y luego se aplicó el estímulo por 4hs. Como se puede observar en la **figura 39** se obtuvo una inhibición estadísticamente significativa de la activación celular con Flic o TNF- α .

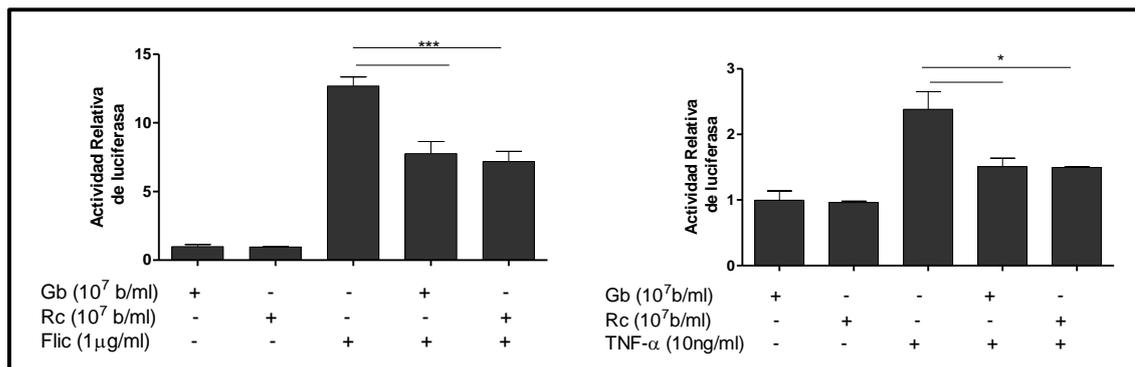


Figura 39. Expresión relativa de luciferasa en células Caco-luc en reposo o activadas. Se trataron 10^6 células con 10^7 Gb o Rc y se activaron con Flic (1 μ g/ml) o TNF- α (10 ng/ml). (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ Test Anova de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni).

Nuevamente observamos que las Caco-luc en reposo no son activadas con los Actinomycetales y que las células se activan más marcadamente con flagelina. Tanto Gb como Rc inhibieron la expresión de luciferasa. Para evaluar si este efecto supresor es

específico, se realizó una inhibición dosis-respuesta incubando las células con distintas cantidades de bacterias. En la **figura 40** se muestran los resultados de la inhibición ejercida por Gb cuando las Caco-luc son activadas con flagelina. Claramente se observa un efecto dosis-respuesta inhibitoria ejercida por distintas cantidades de Gb, con valores estadísticamente significativos para relaciones bacteria: célula de 1000:1 y 10:1.

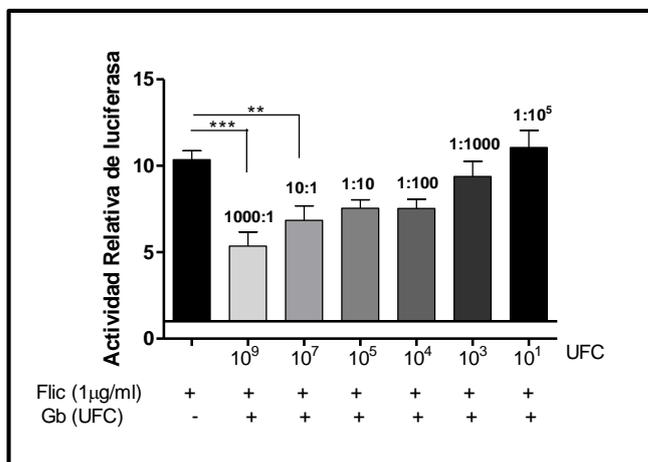


Figura 40. Expresión relativa de luciferasa bajo condiciones de cultivo con distinta relación bacterias: células. Se estimuló con Flic (1 µg/ml) 10⁶ células Caco-luc en cultivo y se inhibió con cantidades decrecientes de Gb. (** p<0.01; *** p<0.001, Anova de una vía seguido de un test de Bonferroni). UFC: unidades formadoras de colonias

Para confirmar estos resultados decidimos evaluar el efecto dosis respuesta a nivel de la secreción de CCL20. Para ello, se realizó nuevamente la inhibición dosis-respuesta incubando las células con distintas cantidades de bacterias y luego de 24hs se midió CCL20 en el sobrenadante. En la **figura 41** se muestran los niveles de CCL20 producidos en presencia de las distintas cantidades de Gb.

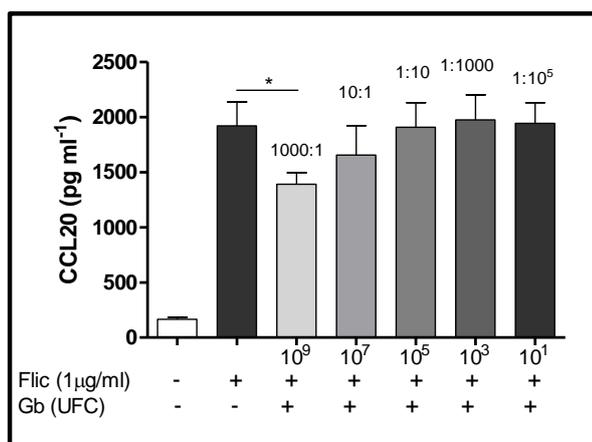


Figura 41. Producción de CCL20 bajo condiciones de cultivo con distinta relación bacterias: células. Se estimuló con Flic (1 µg/ml) 10⁶ células Caco-2 en cultivo y se inhibió con cantidades decrecientes de Gb. (* p<0.05; Anova de una vía seguido de un test de Bonferroni). UFC: unidades formadoras de colonias

Por lo tanto, estamos en condiciones de concluir que las células epiteliales reconocen a las bacterias Actinomycetales, y que por algún mecanismo aún desconocido inhiben la activación celular a través de la supresión de la vía de NF-κB. Estos resultados nos llevaron a

emplear las Caco-luc activadas como ensayo de screening para estudiar el poder inhibitorio de un panel de 10 especies distintas de Actinomycetales. Estos estudios nos permitieron seleccionar una especie adicional con propiedades inhibitorias sobre la expresión de luciferasa y por lo tanto de la activación celular: *Tsukamurella inchonensis* (Ti).

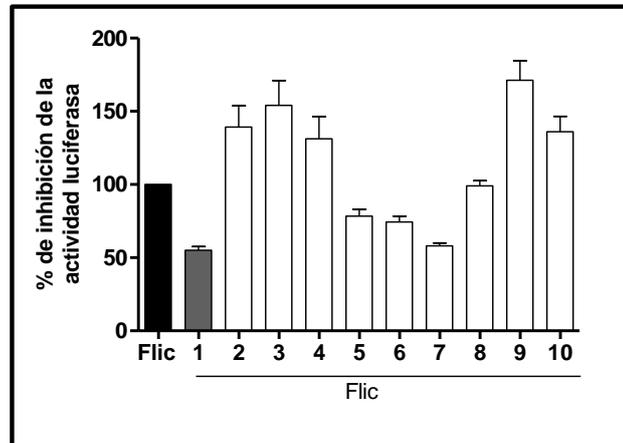


Figura 42. Expresión relativa de luciferasa frente a un panel de 10 especies distintas de Actinomycetales. Se estimuló con Flic (1 µg/ml) 10^6 células Caco-luc en cultivo y se inhibió con distintas especies de Actinomycetales (numeradas del 1 al 10, las cuales corresponden a: (1) *T. inchonensis*; (2) *T. paurometabola*; (3) *R. rhodnii*; (4) *A. globiformis*; (5) *Dietzia maris*; (6) *R. coprophillus*; (7) *G. Bronchialis*; (8) *R859R*; (9) *G. amarae*; (10) *G. terrae*.

Una vez confirmado el poder supresor de Gb y Rc decidimos cuantificar el mismo mediante qPCR para CCL20 y otras citoquinas y quimioquinas frente a distintos estímulos en células Caco-2. Este análisis nos permite evaluar más detalladamente las vías de señalización y los genes que son inhibidos por estas bacterias en las condiciones de activación definidas. En la **figura 43** se muestra la expresión relativa de las 3 quimioquinas pro-inflamatorias antes mencionadas en células Caco-2 activadas y activadas/inhibidas con respecto a las células en reposo. Claramente CCL20 es el gen que más intensamente se expresa en Caco-2 frente a ambos estímulos

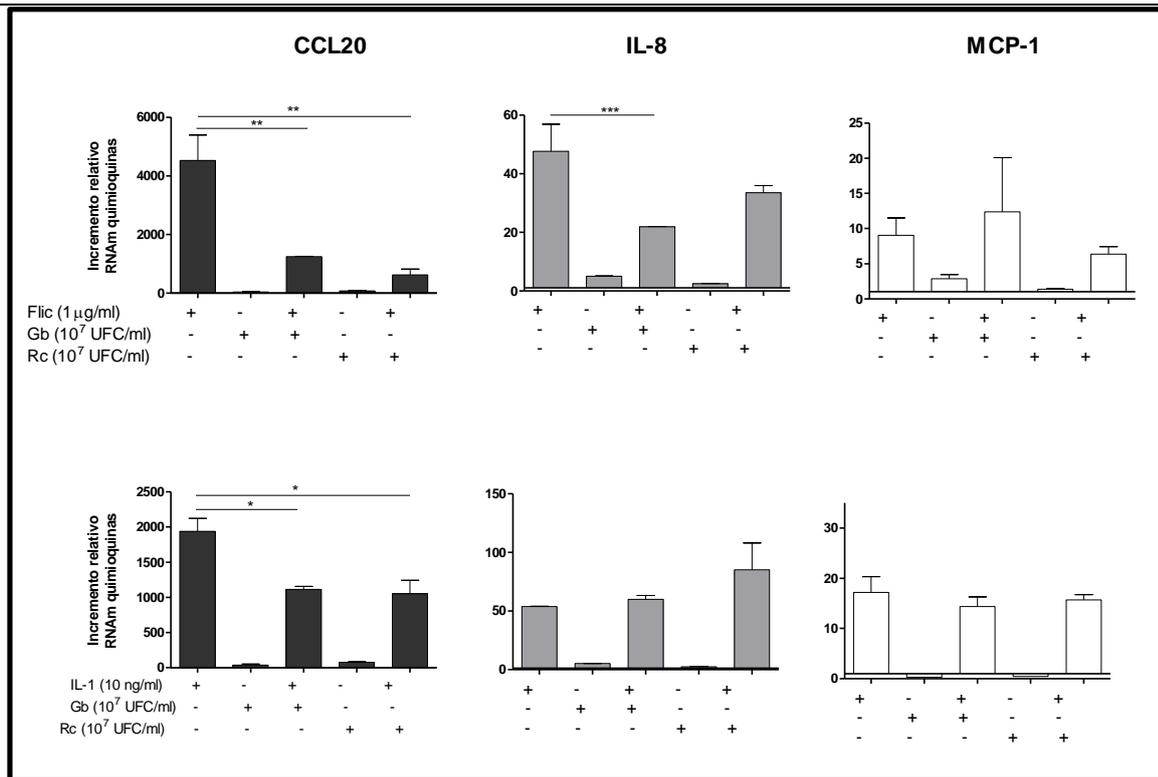


Figura 43. Expresión relativa de quimioquinas pro-inflamatorias en Caco-2 activadas e incubadas con bacterias Actinomycetales. Se evaluó la expresión de los genes de CCL20, IL-8 y MCP-1 en células activadas con Flic (panel superior) e IL-1 β (panel inferior) e incubadas con Gb o Rc (10^7 bacterias/ml). Los resultados se expresan como la media del incremento de la expresión de RNAm \pm SEM y son representativos de 3 ensayos independientes. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Test Anova de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni).

Estos ensayos nos permiten concluir que la expresión de RNAm CCL20 e IL-8 en células estimuladas con flagelina es inhibida en forma significativa tanto con Gb como con Rc. Sin embargo, cuando las células son estimuladas con IL-1 β sólo la expresión de CCL20 es suprimida. Es importante resaltar el potente poder inhibitorio de Gb y Rc sobre la expresión de CCL20.

En la **figura 44** se muestran los resultados correspondientes a la cuantificación por qPCR de la expresión de las 3 citoquinas pro-inflamatorias antes mencionadas. Como se mostró anteriormente se induce principalmente la expresión temprana de IL-1 β y TNF- α bajo las condiciones de estimulación definidas. Como puede observarse, para ambos estímulos encontramos que sólo Gb y Rc inhiben la expresión de TNF- α cuando las células son activadas con IL-1 β .

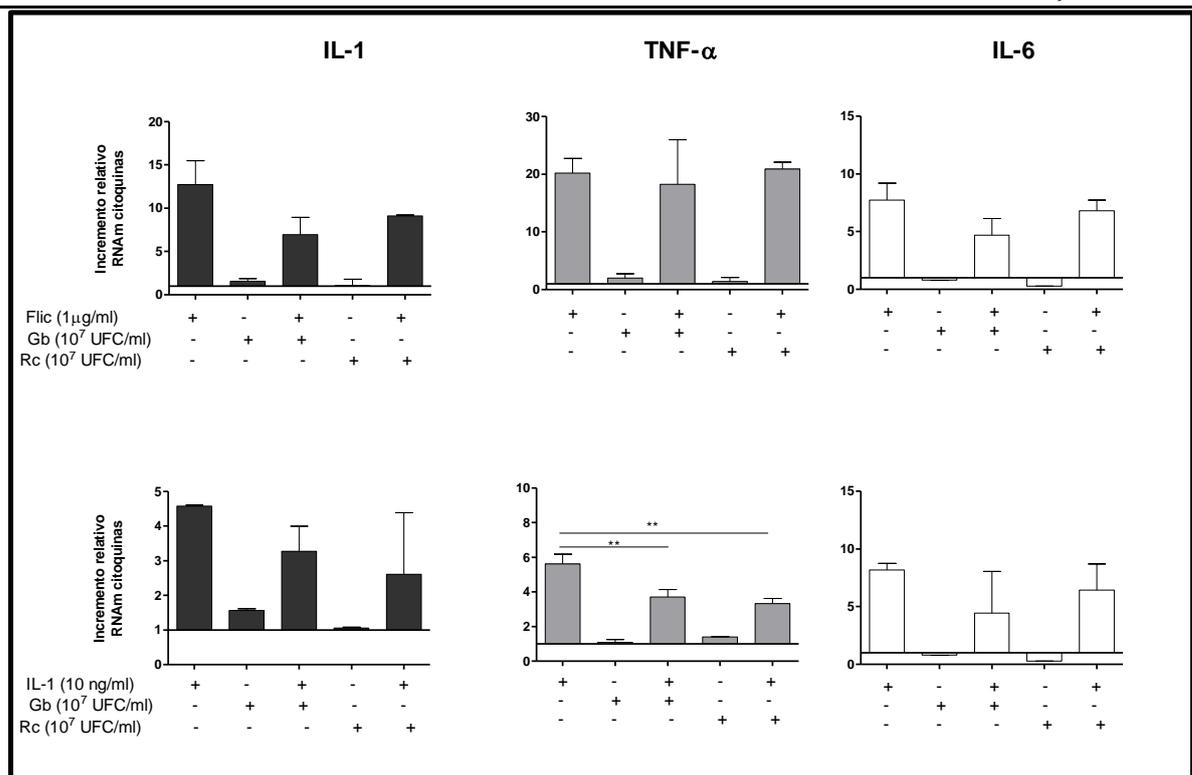


Figura 44. Expresión relativa de citoquinas pro-inflamatorias en Caco-2 activadas e incubadas con bacterias Actinomycetales. Se evaluó la expresión de los genes de IL-1 β , TNF- α e IL-6 en células activadas con Flic (panel superior) e IL-1 β (panel inferior) e incubadas con Gb o Rc (10^7 bacterias /ml). Los resultados se expresan como media de incremento de la expresión de RNAm \pm SEM y son representativos de 3 ensayos independientes. (** $p < 0.001$ Test Anova de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni).

Por lo tanto, los resultados presentados en esta sección nos permiten concluir que las bacterias muertas de Gb y Rc presentan propiedades inhibitorias sobre los eventos moleculares tempranos que se inducen en la activación de las células epiteliales en diferentes situaciones de activación.

Análisis de los mecanismos inhibitorios ejercidos por las bacterias Actinomycetales sobre las células Caco-2

Los resultados antes mostrados de las células Caco-luc, las cuales han sido transfectadas con una construcción reportera que utiliza el promotor de CCL20 permiten suponer *a priori* que la vía involucrada en la supresión es la vía de señalización intracelular NF- κ B.

Para confirmar esta hipótesis decidimos analizar la inducción e inhibición de la vía de NF- κ B empleando distintas estrategias. Por inmunoblotting estudiamos la traslocación del componente p65 de la vía canónica de NF- κ B del citosol al núcleo. Este mecanismo es inducido, como se mencionó en la introducción, mediante la unión de un ligando extracelular o intracelular (en nuestro caso se trata de ligandos extracelulares) a un receptor acoplado a

Autora: Smaldini Paola Lorena

Directores: Dr. Docena G. y Dr. Fossati C.

una quinasa que fosforila IκB. Por lo tanto, adicionalmente estudiaremos la fosforilación de este inhibidor como parámetro de inhibición de la vía. Para tal fin se obtuvieron extractos nucleares y citoplasmáticos a partir de cultivos celulares, estimulados y tratados con las bacterias, con los que se estudió la presencia de p65 en el núcleo y fosfo-IκB (p-IκB) en el citosol por inmunoblotting, empleando los respectivos anticuerpos específicos. Como control de carga proteica en cada ensayo se analizó la presencia de histona (extracto nuclear) y de β-actina (extracto citosólico). Como se muestra la **figura 45a**, y comparando con los niveles de histona y β-actina, se produce una disminución de la traslocación de p65 al núcleo cuando las células activadas fueron pre-incubadas con Gb, con respecto a las células tratadas con flagelina. Asimismo se observa en la fracción citoplasmática una disminución de p-IκB (**figura 45b**).

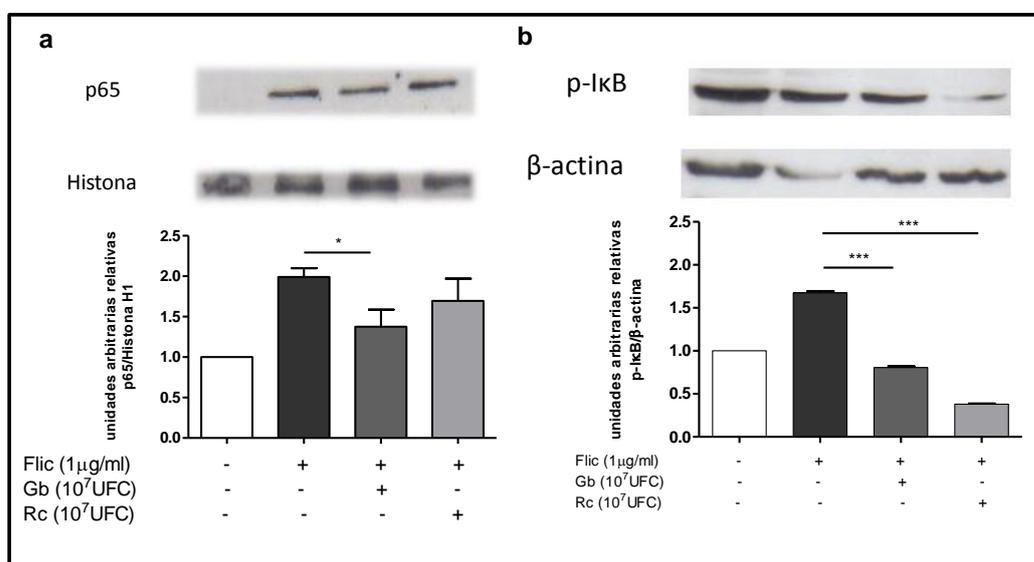


Figura 45. Inmunoblotting de componentes de la vía de señalización de NF-κB en células Caco-2 tratadas con flagelina y co-incubadas con Gb o Rc. Se muestra (a) p65 e histona en los extractos nucleares, (b) p-IκB y β-actina en los extractos citosólicos. En el panel superior se muestran los resultados de un inmunoblotting representativo de 3 experimentos. En el panel inferior se muestra la cuantificación de las bandas en unidades arbitrarias, con respecto a las proteínas control, correspondiente a 3 experimentos (*p<0.05, ***p<0.001, Anova de una vía, seguido del test de Tukey).

Estos resultados nos permiten concluir que las 2 especies de Actinomycetales presentan una capacidad inhibitoria de la vía de señalización intracelular de NF-κB, hipótesis de la cual partimos, a través de la supresión de la fosforilación de IκB y el posterior bloqueo de la traslocación de p65 al núcleo.

Para avanzar con los estudios y confirmar los eventos de señalización involucrados en la modulación por Gb, decidimos estudiarlos por inmunofluorescencia.

Para analizar la localización celular de p65 estudiamos por microscopía de fluorescencia células Caco-2 en cultivo con flagelina o flagelina y Gb. De esta manera evaluamos la localización citosólica y nuclear de este intermediario de la vía. En la **figura 46** se muestra una imagen obtenida de las células en reposo (estado basal) en la cual la fluorescencia verde localizada en el citoplasma corresponde a p65 (formando complejos con $\text{I}\kappa\text{B}$). En la condición de activación con flagelina durante 45min se observa un aumento de la fluorescencia en el núcleo, indicando la traslocación del p65 desde el citosol como consecuencia de la activación de la vía. Al co-incubar la células activadas con flagelina junto a Gb observamos que los núcleos tienen una fluorescencia menor que la correspondiente a las células activadas, mientras que los citoplasmas resultaron con mayor fluorescencia. Estos resultados nos confirman que Gb bloquea la traslocación de p65 al núcleo como consecuencia de la inhibición de la activación de la vía de NF- κB inducida por flagelina.

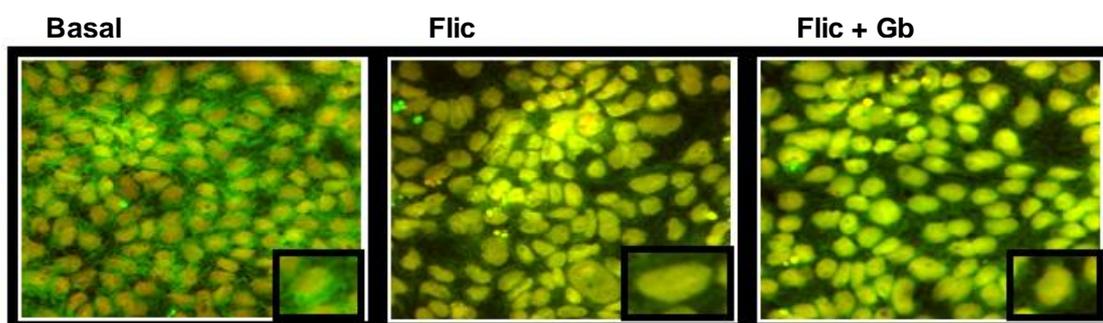


Figura 46. Inmunofluorescencia de células Caco-2 activadas y tratadas con Gb. Las imágenes corresponden a células sin tratar (basal), activadas con Flic o activadas y tratadas con Gb. Se reveló la presencia de p65 con el anticuerpo específico anti-p65Alexa 488 e yoduro de propidio para marcar los núcleos. Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes. (Aumento x400)

Para profundizar los estudios sobre los mecanismos inhibitorios ejercidos por los Actinomycetales analizamos la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células Caco-2 por microscopía de fluorescencia. En primera instancia se incubaron las células en presencia del sustrato fluorescente (CM-H₂ DCF-DA) que detecta H₂O₂ y radicales libres. Luego se lavan las células y se las incuban con los estímulos a estudiar: Gb, Rc y Ti durante 30 min. En la **figura 47** se muestra la fluorescencia emitida por las células y la cuantificación de la misma. Puede observarse que las células en reposo responden a la presencia de las bacterias muertas y generan ROS en cantidades equivalentes al control positivo de H₂O₂.

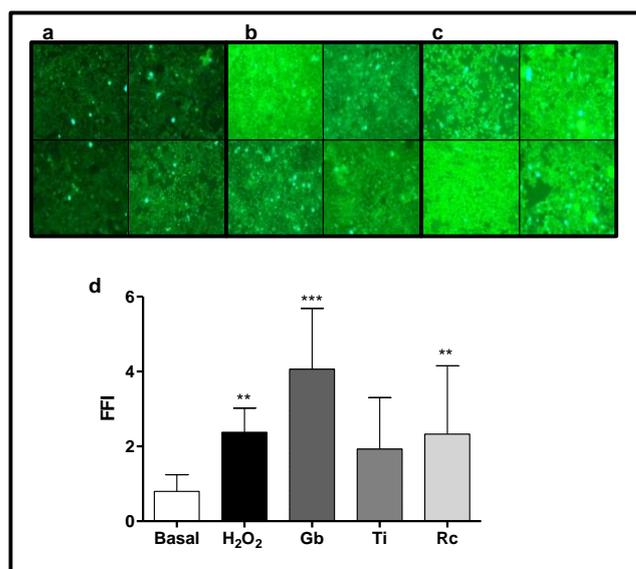


Figura 47. Generación de ROS en células Caco-2 por microscopía de fluorescencia. En el panel superior se muestran imágenes de las células en condición (a) basal, (b) en presencia de H₂O₂ como control positivo y (c) en cultivo con Gb. En el panel inferior (d) se muestra la cuantificación de las distintas condiciones incluyendo los cultivos de Caco-2 con Rc o Ti (aumento x100). FFI: incremento relativo de fluorescencia (**p<0.01, ***p<0.001 Anova de una vía seguido del test de Nonferroni).

Posteriormente incluimos en los ensayos 2 compuestos con propiedades anti-oxidantes: N-acetilcisteína (NAC) y TROLOX, y como puede observarse en la **figura 48** confirmamos que Gb induce en Caco-2 en reposo el metabolismo oxidativo, el cual es bloqueado al emplear drogas inhibitorias de la generación de ROS.

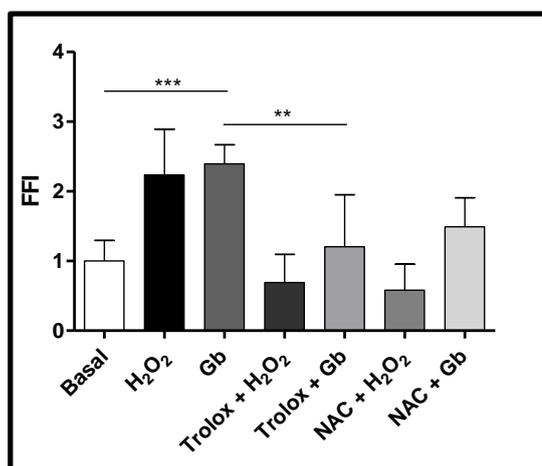


Figura 48. Generación de ROS en células Caco-2 en presencia de anti-oxidantes por microscopía de fluorescencia. Se muestra la cuantificación de las distintas condiciones utilizando NAC y Trolox como antioxidantes. FFI: incremento relativo de fluorescencia (**p<0.01, ***p<0.001 Anova de una vía seguido del test de Nonferroni).

Como se mencionó anteriormente la activación de la vía del NF-κB está controlada por la degradación regulada de moléculas inhibitorias IκB. Para inducir la activación de la vía es necesario fosforilar IκB, el cual posteriormente se ubiquitina por un complejo enzimático y

finalmente es degradado por el proteosoma (Spencer 1999). Consecuentemente los componentes de NF- κ B asociados se liberan, se fosforilan y traslocan al núcleo para activar la transcripción génica. En este proceso la activación de la vía de ROS inhibe al complejo enzimático (Ub ligasa, E3-SCF^{b-TrCP}) encargado de ubiquitinar las proteínas, bloqueando por lo tanto la degradación de I κ B (Collier-Hyams LS, 2005). Nuestros resultados indican que los Actinomycetales inducen la síntesis de ROS por lo cual impedirían la ubiquitinación de p-I κ B, disminuyendo así su degradación por medio del proteosoma, e inhibiendo la fosforilación de más I κ B. Finalmente este mecanismo bloquea la activación de p65 y su traslocación al núcleo.

Los resultados mostrados en esta sección nos permiten concluir que las bacterias muertas de Actinomycetales inhiben la vía de NF- κ B y que células epiteliales en reposo presentan receptores de membrana capaces de detectar la presencia de las bacterias. También podemos inferir que el mecanismo inhibitorio podría estar mediado por la generación de especies reactivas de oxígeno a través del bloqueo de la degradación de I κ B.

Análisis por microscopía de la interacción de células Caco-2 con Gb

Para intentar comprender cómo se produce la interacción entre las células epiteliales y las bacterias muertas e inducir el efecto inhibitorio descrito, estudiamos la adherencia de Gb a las células Caco-2 por métodos microscópicos. Se utilizó microscopia de transmisión de electrones y de barrido sobre células pre-tratadas con Gb y activadas o no con Flic; luego de la incubación la células fueron lavadas para eliminar las bacterias no adheridas. En la **figura 49** se muestran las imágenes de células en reposo y activadas con Flic en presencia de bacterias muertas. Puede observarse un mayor número de bacterias unidas a la superficie en las células activadas en comparación con células en reposo. Es importante resaltar que en ninguna imagen se observaron bacterias dentro de las células, lo que nos da indicio que el efecto de Gb es independiente de la fagocitosis y sólo depende de la interacción célula - bacteria.

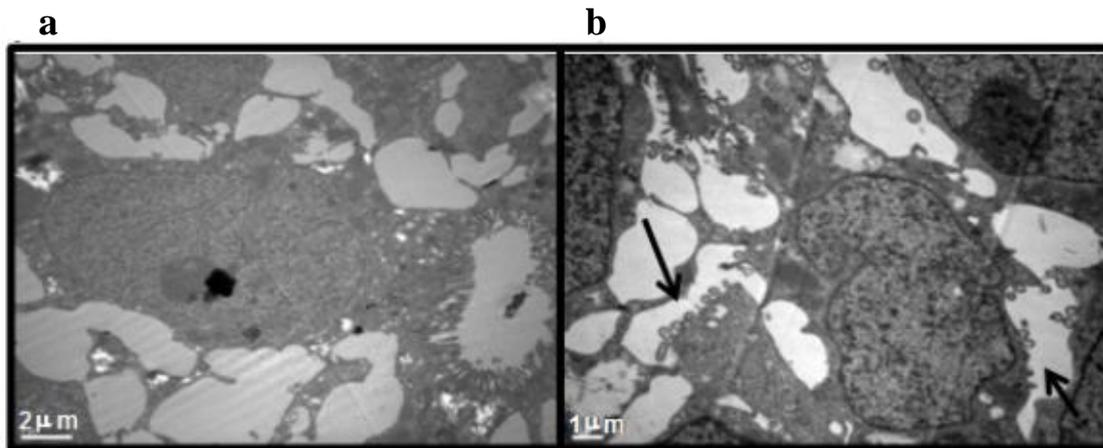


Figura 49. Microscopía electrónica correspondiente a células Caco-2 en presencia de Gb. Bacterias muertas de Gb (10^7 bacterias/fosa) fueron incubadas con Caco-2 (10^6 células/fosa) (a) en reposo, (b) o pre-activadas con flagelina. Las flechas muestran las bacterias sobre la superficie. (Aumento $\times 12000$)

Aplicando la técnica de microscopía electrónica de barrido observamos la morfología de las bacterias (**figura 50a**), y mediante la técnica de punto crítico pudimos observar que las células muertas se adhieren a la superficie de células Caco-2 activadas en forma aislada, y en acúmulos (**figura 50b y c**). En la imagen **b** puede observarse claramente que la superficie celular protruye para unir el cúmulo de bacterias. Nuevamente no se observaron bacterias siendo fagocitadas por las células.

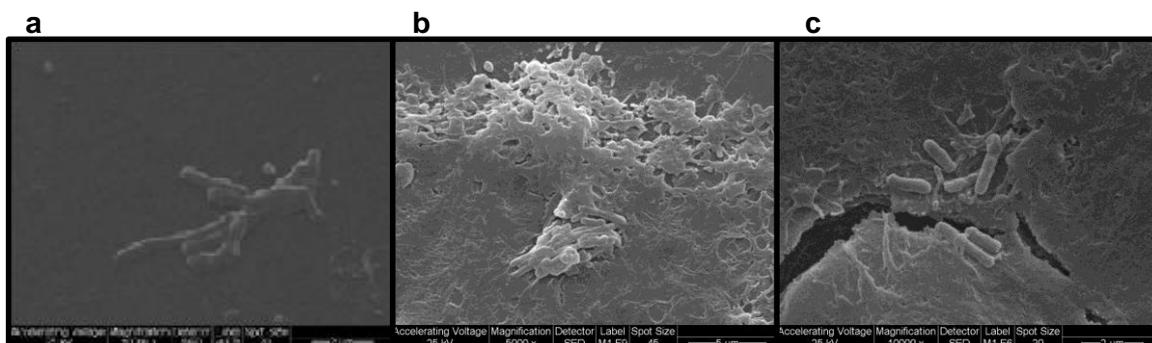


Figura 50. Microscopía de barrido electrónico de células Caco-2 activadas con flagelina en presencia de Gb. Se muestran las bacterias unidas a la superficie celular (a, $\times 10000$), y la interacción bacteria-célula (b, $\times 5000$; c, $\times 10000$).

En conclusión, la interacción entre Gb y las células colónicas epiteliales no depende de su viabilidad, ni de la presencia de componentes secretados por las bacterias, ni de la internalización de la misma. Es necesario el contacto entre las bacterias y las células epiteliales, éstas emiten prolongaciones que las retienen en su superficie y se observan las bacterias en acúmulos en las células activadas.

Análisis *in vivo* del efecto inhibitorio de Gb sobre la expresión de genes en ratones de la cepa BALB/c

Con el objetivo de analizar si las propiedades inhibitorias ejercidas por las especies de Actinomycetales sobre células epiteliales intestinales *in vitro* son ejercidas *in vivo* decidimos realizar experimentos de asa ligada en el intestino delgado de ratones de la cepa BALB/c. En animales bajo anestesia se realizaron distintos loops intestinales a los cuales se les inyectó Flic (control positivo de activación celular), Flic y Gb (modulación) o solución fisiológica (control basal). Los animales fueron mantenidos vivos por 2hs bajo anestesia y luego se analizó la inducción de RNAm CCL20 por qPCR. Para ello los ratones fueron sacrificados, se extrajeron los loops intestinales, que fueron procesados para obtener RNA total y luego el cDNA como se explicó anteriormente. En la **figura 51** se muestran los resultados correspondientes al incremento en la expresión de la quimioquina pro-inflamatoria CCL20 en cada condición. Como puede observarse Gb por sí solo no induce incremento en la transcripción mientras que si se lo administra junto a Flic es capaz de inhibir la expresión de CCL20.

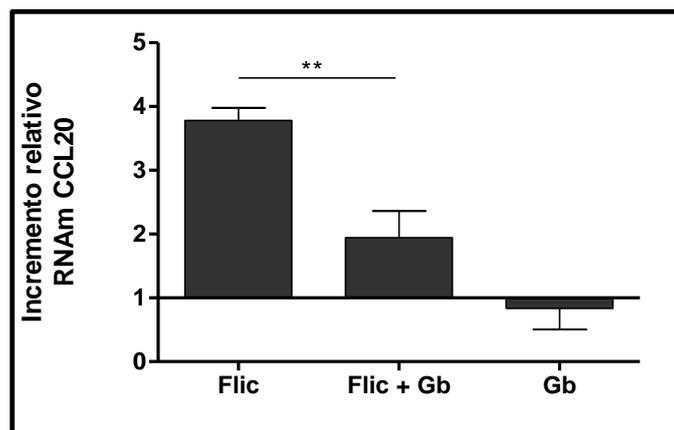


Figura 51. Expresión de RNAm CCL20 en loops intestinales en ratones BALB/c. Los loops fueron inyectados con Flic, Flic junto a Gb y con Gb. Estos resultados corresponden a un experimento representativo de 2 ensayos independientes. (** $p < 0.01$, test no paramétrico de Mann-Whitney).

Por lo tanto estos experimentos demuestran que las propiedades inhibitorias de Gb caracterizadas *in vitro* sobre células Caco-2 también se producen *in vivo* en la mucosa duodenal.

Dada la inhibición selectiva que estas bacterias promueven a nivel de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, estudiamos la modulación del proceso inflamatorio en otro escenario biológico. Dado que la toxina colérica es un potente adyuvante mucosal que si se administra por vía oral es capaz de activar al sistema inmune de la mucosa intestinal, decidimos administrar 10^7 bacterias/200 μ l por vía intragástrica diariamente durante ocho días.

Los últimos 3 días los animales recibieron además una dosis diaria de toxina colérica (10 µg/dosis) y posteriormente fueron sacrificados para evaluar la expresión de CCL20, MCP-1 e IL-1β en intestino y en enterocitos.

Como se observa en la **figura 52**, la inflamación inducida por la TC en el intestino produce un aumento en la expresión de RNAm de CCL20 tanto en enterocitos como en el yeyuno de los animales tratados; mientras que MCP-1 solamente se encontró aumentada su expresión en el tejido de yeyuno completo. Sin embargo, cuando los ratones fueron tratados con Gb, se observó una inhibición más marcada de la expresión de CCL20 en enterocitos que en yeyuno, y no hubo modulación de la expresión génica de MCP-1, respecto a lo observado en los ratones tratados con TC. No se observó aumento de la expresión de IL-1β al administrar la TC en los tiempos estudiados.

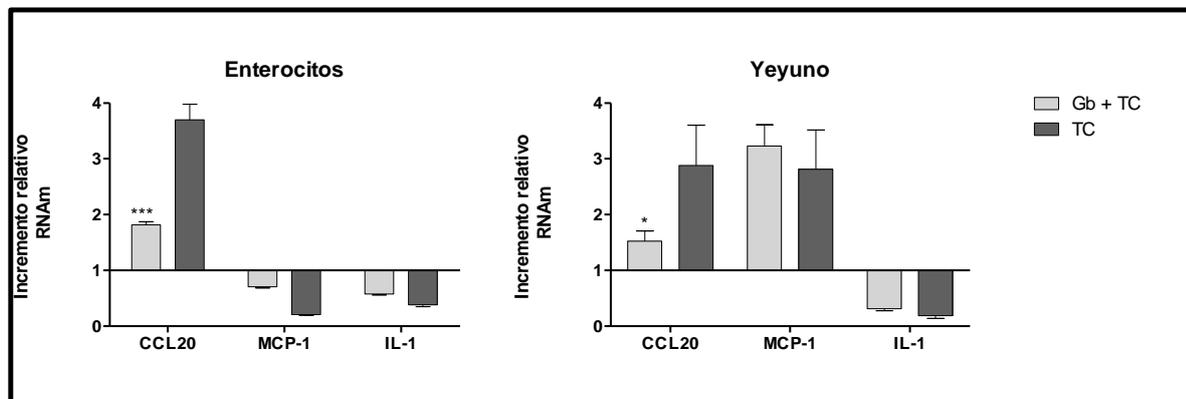


Figura 52. Expresión y modulación de quimioquinas y citoquinas en intestino delgado de ratón. Expresión de RNAm de CCL20, MCP-1 e IL-1β en enterocitos y en yeyuno. (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ Anova two way y posteriormente test de Bonferroni).

El mismo experimento se realizó pre-tratando los animales con Rc y observamos un efecto modulador únicamente a nivel de CCL20. Como observamos anteriormente *in vitro* se obtuvieron mejores resultados de modulación de la respuesta inmune con Gb que con Rc (**figura 53**).

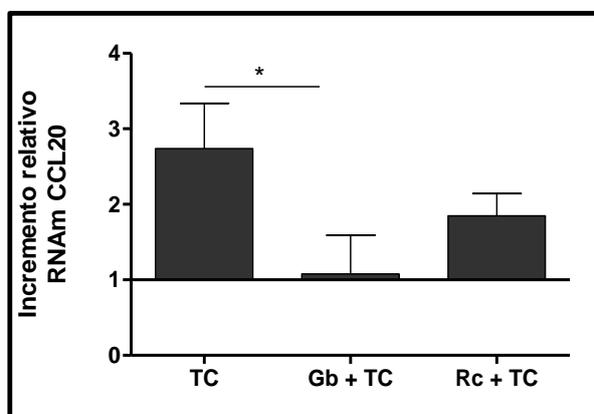


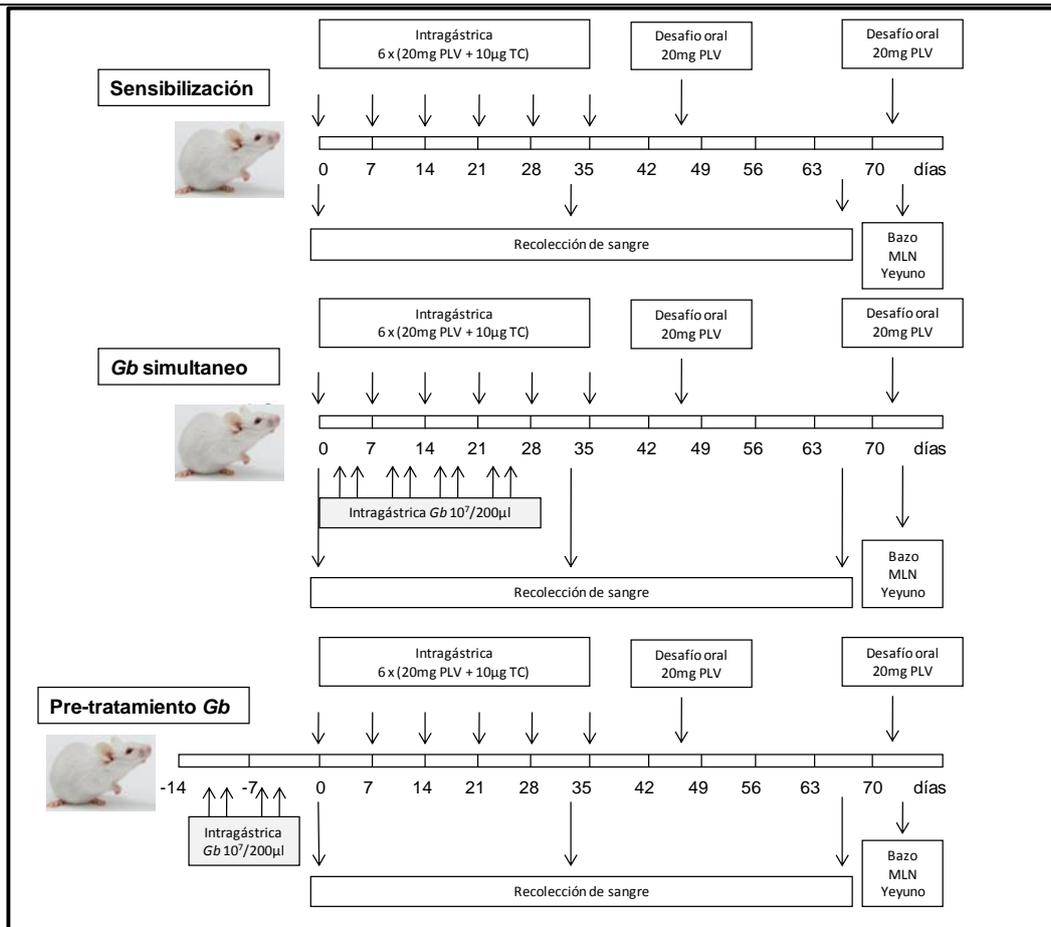
Figura 53. Expresión de RNAm CCL20 en el intestino de animales tratados con Gb y Rc que luego recibieron por vía oral toxina colérica. (* $p < 0.05$, Anova de una vía, Test de Tukey)

En conjunto estos resultados indican que las propiedades anti-inflamatorias de Gb son más intensas que las de Rc, y permiten modular la activación celular en la mucosa gastrointestinal. Por esta razón decidimos continuar con los estudios biológicos de Gb muerta como agente anti-inflamatorio.

Evaluación del efecto inmunomodulatorio de Gb en el modelo murino de alergia alimentaria a leche de vaca.

Protocolo de sensibilización/modulación

Para evaluar las propiedades inmunomodulatorias de Gb en condiciones pro-inflamatorias en un escenario biológico en el cual esté afectada la mucosa gastrointestinal, y que a la vez represente una patología de humanos, decidimos estudiar la influencia de la administración oral de Gb en el modelo murino de alergia alimentaria a proteínas de leche de vaca. El protocolo de sensibilización fue el que se presentó en el capítulo I, que genera una respuesta inmune Th2-dependiente específica de PLV. Como tratamiento inmunomodulatorios se plantearon dos esquemas de modulación: un pre-tratamiento en el que se administra oralmente las bacterias (10^7 bacterias Gb/dosis) previo a la sensibilización Th2, y un tratamiento simultáneo por vía oral (10^7 bacterias Gb/dosis) conjuntamente con la sensibilización alérgica. Como se mencionó anteriormente, previo a recibir TC los animales recibieron por vía oral bicarbonato para neutralizar la acidez gástrica y de esta manera proteger al inmunógeno (PLV). En el **esquema 6** se muestran los protocolos experimentales aplicados en ratones BALB/c.



Esquema 6 Protocolos de sensibilización y modulación con Gb

Sensibilización (Sens) Días 0, 7, 14, 21, 28 y 35: se inocularon por ratón: 10 µg de TC + 20 mg de PLV, por vía ig.

Tratamientos

Dependiendo del lote, se administró por vía ig:

10⁷ bacterias, para los grupos denominados **Pre-Trat Gb**

10⁷ bacterias, para los grupos denominados **Trat-sim Gb**

Bicarbonato de sodio, para los grupos denominados **Control-Trat.**

Desafío oral: administración de 20 mg de PLV por vía ig.

Caracterización *in vivo* e *in vitro* de la respuesta inmune inducida

Análisis de los signos clínicos desarrollados luego del desafío oral

Luego de la sensibilización alérgica se realizó, a los 10 días, el desafío oral con PLV como se ha descripto en capítulos anteriores. Se evaluó a los minutos de administrado el antígeno la aparición de signos clínicos locales y sistémicos asociados a una hipersensibilidad inmediata. En la **figura 54** se muestran los resultados del score clínico adjudicado a cada ratón por distintos observadores en forma independiente y desconociendo a qué lote pertenece cada animal. Puede observarse una disminución en el score clínico promedio en el lote de animales tratados simultáneamente con la sensibilización alérgica. No se han observado diferencias en los animales que fueron sensibilizados (control tratamiento) y los que recibieron Gb previamente a la sensibilización.

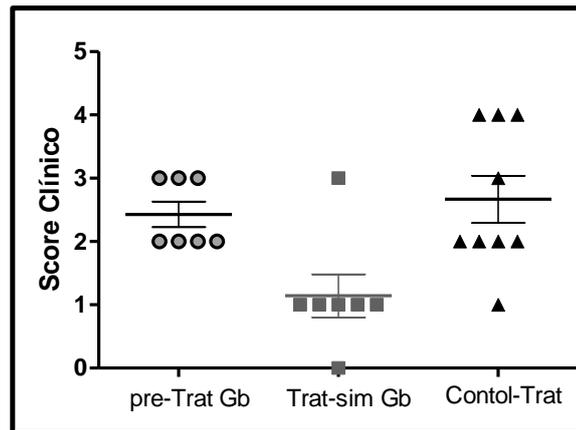


Figura 54. Score clínico posterior al desafío oral en los animales que fueron sensibilizados y tratados. Se muestran los signos clínicos desarrollados a los 30 min del DO con 20 mg de PLV por los ratones de los distintos grupos. Gráfico representativo de 2 experimentos independientes.

Por lo tanto la administración de Gb en forma simultánea al adyuvante mucosal permite aliviar la aparición de síntomas de hipersensibilidad en animales que reciben PLV por vía oral.

Análisis de la inducción en la secreción de anticuerpos séricos específicos

Para evaluar si el efecto modulador observado clínicamente puede deberse a alteraciones a nivel de la inmunidad humoral se cuantificó el nivel de distintos isotipos séricos de inmunoglobulinas. Como se observa en la **figura 55**, el nivel de IgE específica sérica fue menor en los animales tratados simultáneamente a la sensibilización alérgica, en comparación con los ratones sensibilizados. Sorpresivamente, no se observó el mismo efecto con el isotipo IgG1 específico, mientras que IgG2a no se induce durante el protocolo de sensibilización.

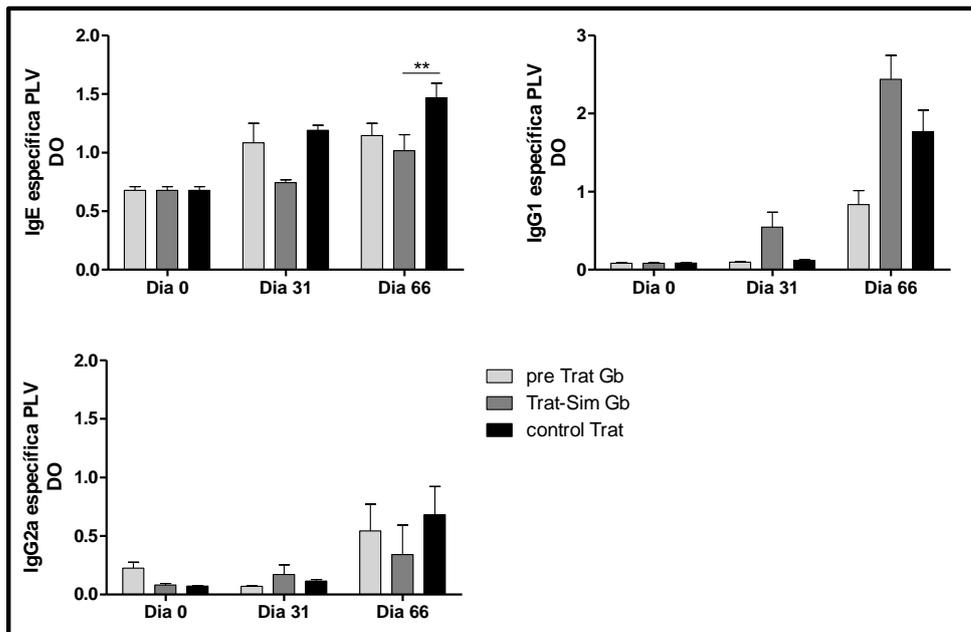


Figura 55. Niveles de isotipos específicos a PLV séricos determinados por EAST y ELISA. Valores promedios de $DO \pm SEM$ para cada uno de los grupos. Se evaluaron IgE (a), IgG1 (b), e IgG2a (c). Estos resultados son representativos de 2 experimentos independientes. (** $p < 0.01$, obtenido por Anova two way y como test posterior Bonferroni).

Por lo tanto la administración simultánea de Gb a la de TC junto a PLV permitió la modulación de la producción de IgE específica.

Determinación de IgA específica a PLV en materia fecal

A distintos tiempos del protocolo se tomaron muestras de materia fecal y se realizó la extracción de IgA como se describe en materiales y métodos. Se determinó en los extractos por ELISA la IgA específica a PLV.

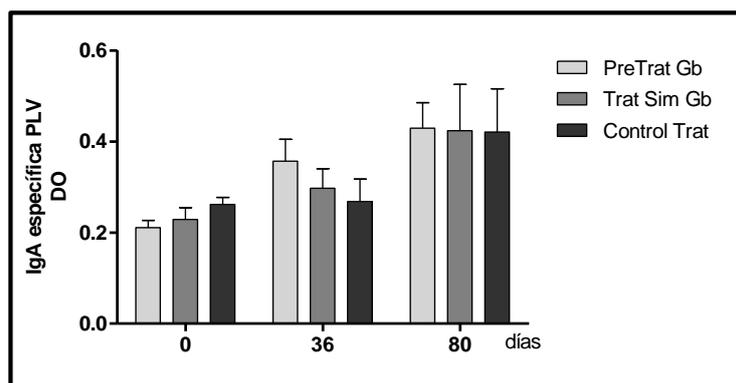


Figura 56. Niveles de IgA específica a PLV en materia fecal determinada por ELISA. Valores promedios de $DO \pm SEM$ para cada uno de los grupos. Estos resultados son representativos de 2 experimentos independientes. ($p > 0.05$ obtenido por Anova two way y como test posterior Bonferroni).

Como puede observarse en la **figura 56** no se hallaron diferencias significativas al comparar los distintos grupos de animales.

Análisis de la producción de citoquinas por esplenocitos

Para una mejor caracterización de la inmunidad celular que permita comprender más acabadamente la modulación observada de la inmunidad humoral y de la sintomatología al administrar Gb decidimos evaluar parámetros asociados a la activación de los LT en bazo. Luego de 10 días de la prueba de DTH, animales de distintos grupos fueron desafiados oralmente con PLV, se sacrificaron y se aislaron los bazos. A partir de la suspensión de esplenocitos se realizaron cultivos en presencia de PLV y sus principales fracciones proteicas para expandir los linfocitos T específicos. Se incluyó RPMI como control negativo (medio de cultivo RPMI 1640) y ConA como control positivo.

A partir de los sobrenadantes de estos cultivos se midieron los niveles de IL-5 e IL-13 como citoquinas Th2, e IFN- γ como citoquina Th1 por ELISA. En la **figura 57**, se muestran los resultados de los niveles de estas citoquinas en los sobrenadantes de cultivo. Como puede observarse los esplenocitos de los ratones sensibilizados (control tratamiento), producen niveles más elevados de IL-5 e IL-13 en comparación con las células provenientes de animales tratados con Gb. Los grupos pre-tratados o tratados simultáneamente producen niveles estadísticamente menores de estas citoquinas Th2. Los tratamientos aplicados no producen secreción de IFN- γ por los esplenocitos. Los niveles de esta citoquina en los animales sensibilizados no representan valores elevados.

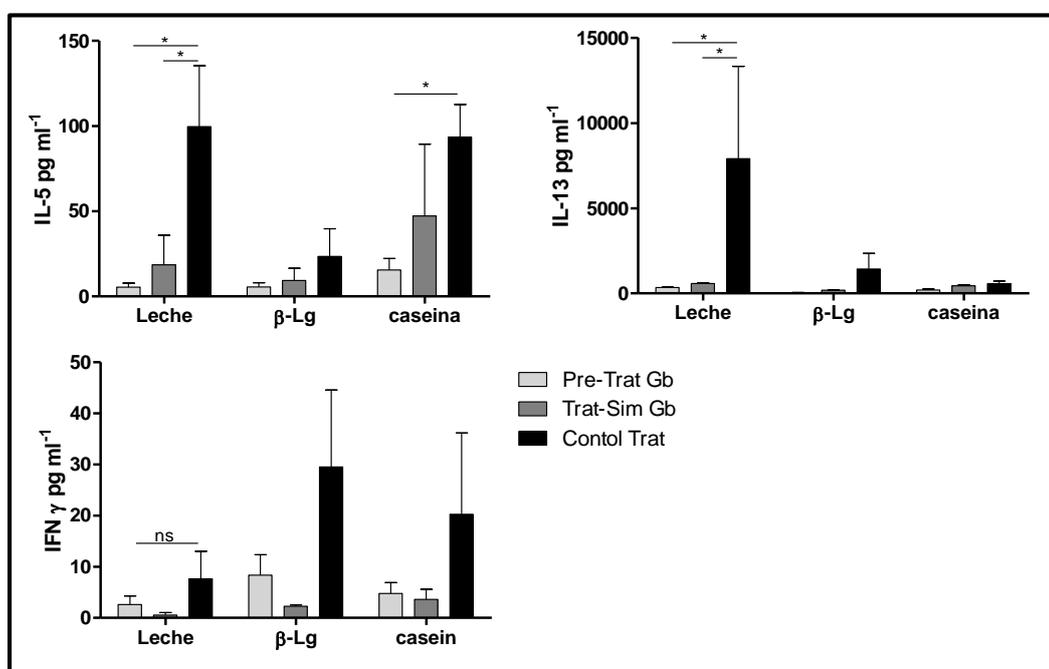


Figura 57. Concentración de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos medidas por ELISA. Se evaluaron los niveles de IL-5, IL-13 e IFN- γ en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos en presencia de PLV, β -Lg o caseínas. (* p <0.05, Anova de dos vías, seguido de Bonferroni como test posterior)

Por lo tanto, y corroborando resultados anteriores, los tratamientos con Gb no inducen una inmunidad Th1-dependiente, y cabe resaltar que logran inhibir la producción de las 2 citoquinas marcadoras de una inmunidad Th2. Estos resultados indican que Gb es capaz de modular tanto la secreción de IgE como la inducción de reacciones de hipersensibilidad frente a la exposición oral del antígeno.

Evaluación de la respuesta inmune en la mucosa gastrointestinal

Una vez caracterizados en forma sistémica los mecanismos inmunológicos que nos permite comprender la sintomatología observada en los distintos ratones, decidimos evaluar si en la mucosa gastrointestinal los distintos tratamientos inducen cambios celulares que reflejan lo hallado a nivel sistémico.

En primera instancia estudiamos las células aisladas de los ganglios mesentéricos, para lo cual luego del desafío oral se sacrificaron los ratones y se aislaron los ganglios regionales. Se prepararon pools de ganglios dada la menor cantidad de células mononucleares que se puede recuperar de los mismos. Se trataron 10^6 células con buffer RA1 para la extracción de RNA y el posterior análisis de la expresión de RNAm de citoquinas por qPCR. Como se observa en la **figura 58**, a nivel de RNAm no se observa un efecto modulador ejercido por los tratamientos con Gb

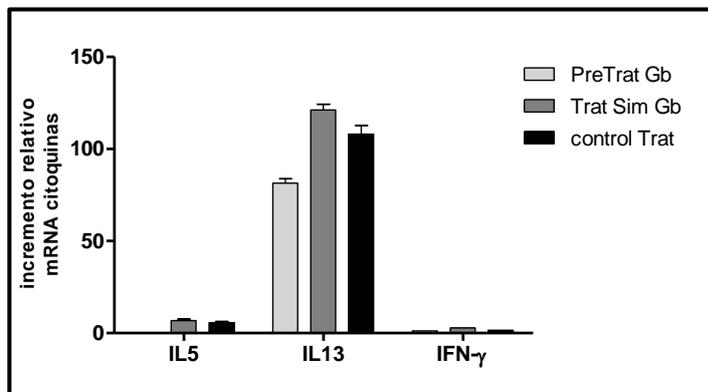


Figura 58. Expresión de RNAm de citoquinas por qPCR. Se muestra el fold increase de IL-13, IL-5 e IFN-γ en MLN, entre ratones de cada grupo y ratones sin tratamiento.

Sin embargo se cuantificó la producción de citoquinas por células de ganglios expandidas en cultivo con PLV y sus principales fracciones proteicas. Se incluyó RPMI como control negativo (medio de cultivo RPMI 1640) y ConA como control positivo. Estos resultados se muestran en la **figura 59** y como puede observarse el tratamiento simultáneo con Gb logró inhibir la producción de IL-5 e IL-13. Llamativamente los niveles de IL-5 no

son modulados cuando se tratan los animales previo a la sensibilización. En ninguno de los grupos se observó un incremento en los niveles de IFN- γ .

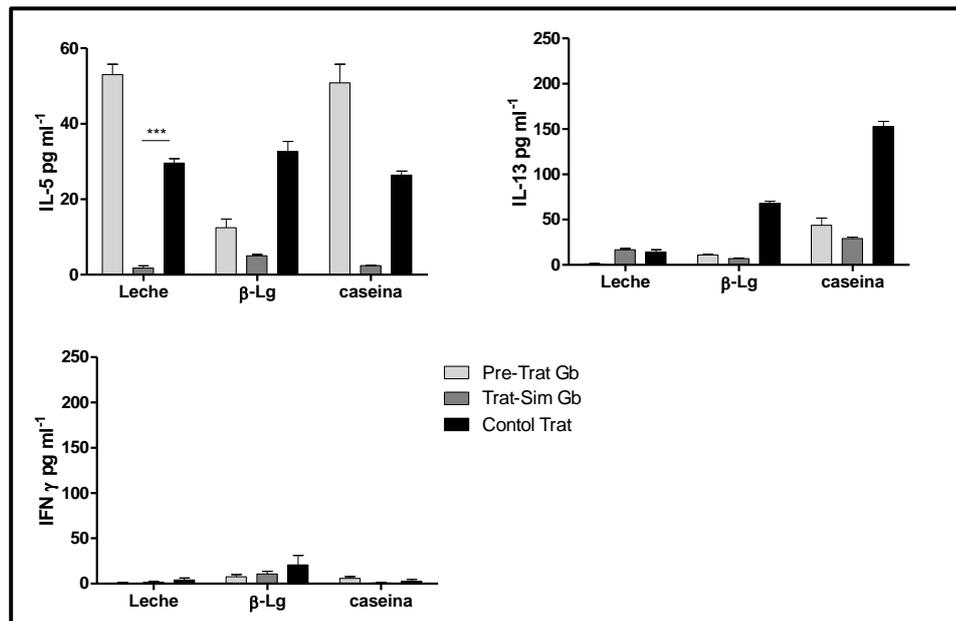


Figura 59. Concentración de citoquinas medidas por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de células mononucleares aisladas de ganglios mesentéricos. Se evaluaron los niveles de IL-5, IL-13 e IFN- γ en los sobrenadantes de cultivo ganglios linfáticos mesentéricos en cultivo con PLV, β -Lg o caseínas. (***) $p < 0.001$, Anova de dos vías, seguido de Bonferroni como test posterior)

Expresión de RNAm citoquinas en células de lámina propia

Para estudiar los mecanismos inmunológicos en los sitios efectores extraíjimos los intestinos de los ratones y se extirparon las Placas de Peyer. Se colocó el tejido en buffer RA1 para la extracción de RNA y el posterior análisis de la expresión de RNAm de citoquinas. En la **figura 60** se muestran los resultados de las qPCR. Observamos modulación en la expresión de IL-5, pero no observamos modulación en la expresión de IL-13 ni de IFN- γ en los animales tratados con Gb.

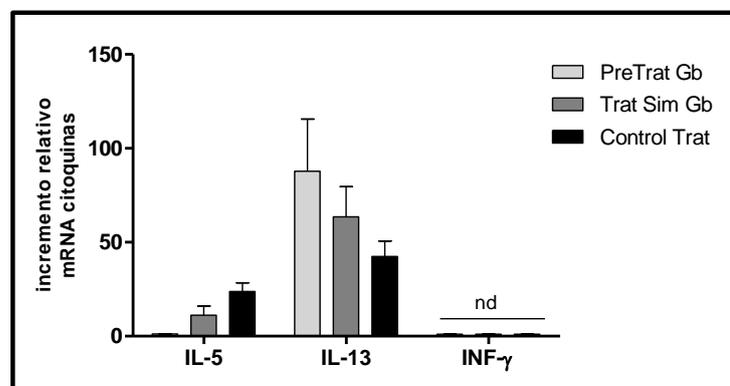


Figura 60. Expresión de RNAm de citoquinas por qPCR en células de Lámina propia. Se muestra el incremento en la expresión de los genes correspondientes a IL-13, IL-5 e IFN- γ en intestino, entre ratones de cada grupo y ratones sin tratamiento.

Prueba de Hipersensibilidad retardada

Para evaluar la inmunidad celular *in vivo* se realizó la prueba de DTH a los 21 días de la última sensibilización. Se inoculó en una almohadilla plantar PLV (20µl de una solución 1µg/µl) y en la otra solución fisiológica; a las 72hs se evaluó el proceso inflamatorio a través de la medida del espesor de las patas y luego se calculó la diferencia entre ambas patas. En la **figura 61** se muestran las diferencias y como puede observarse se indujo un leve aumento del tamaño de las patas tanto en los ratones pre-tratados como en los tratados simultáneamente con Gb. Sin embargo este aumento es sólo una tendencia dado que no resultó ser estadísticamente significativo.

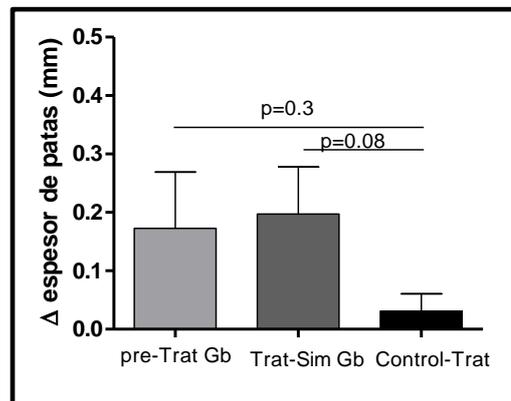


Figura 61. Resultado de las pruebas de DTH. Se representan los valores medios en mm ± SEM para cada grupo, correspondiente a la diferencia en el espesor de las patas en cada ratón. (Test no paramétrico Mann-Whitney).

Estos resultados podrían correlacionarse con los de los isotipos específicos y citoquinas dado que la DTH refleja una respuesta inmune Th1-dependiente, y como se mostró anteriormente, el tratamiento con Gb no induce un incremento en los niveles del isotipo (IgG2a) ni de la citoquina (IFN-γ) asociadas a esta respuesta.

Dado que *T. inchonensis* produjo inhibición en de la actividad de luciferasa, y es otra especie candidata como agente inmunomodulador, se decidió estudiarla en el modelo de alergia a PLV. Se realizó el mismo protocolo mencionado anteriormente, y luego del desafío oral con el antígeno se observó una disminución de las manifestaciones clínicas en los grupos tratados con Ti respecto al grupo sensibilización (control Trat). En la **figura 62a** se muestran los resultados de los scores clínicos obtenidos. También se evaluó la respuesta inmune humoral, encontrándose una disminución en los niveles séricos de IgE y de IgG1 específica mientras que no aumenta los niveles de IgG2a. Con respecto a la IgA específica en intestino, se observó un aumento en el grupo tratado simultáneamente. En la **figura 62b** se muestran los niveles de los distintos isotipos de anticuerpos al día 66 del protocolo de sensibilización. Al

III. 4. DISCUSIÓN

En este capítulo se muestran los resultados de los experimentos *in vitro* e *in vivo* en los que se emplearon bacterias del orden Actinomycetales.

Las células intestinales epiteliales forman parte del sistema inmune de mucosa. Estas células expresan receptores que reconocen estructuras específicas de microorganismos, los cuales activan diferentes vías de señalización intracelular que modulan la expresión de genes de citoquinas y quimioquinas tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias. En este caso trabajamos con una línea celular humana de carcinoma de colon, Caco-2, para estudiar el efecto inhibitorio que distintas especies de Actinomycetales (*Gordonia bronchialis*, *Rodococcus coprophilus* y *Tsukamurella inchonensis*) ejercen. Se analizó la expresión de RNAm de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias asociadas a la activación inmediata de la inmunidad innata (IL-1 β , TNF- α , IL-6, CCL20, IL-8 y MCP-1) cuando las células fueron expuestas en cultivo a distintos estímulos pro-inflamatorios. Los estímulos fueron: flagelina, citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β y TNF- α) y toxina colérica. El primero es un potente activador de células epiteliales (a través de TLR-5 y la vía de NF- κ B) y además constituye un marcador de infecciones por microorganismos flagelados y de patologías inflamatorias como la Enfermedad de Crohn (Vijay-Kumar y Gewirtz 2009; Sitaraman et al. 2005), en la que la respuesta inmune a la microbiota está marcadamente dirigida a este componente bacteriano. Las dos citoquinas mencionadas participan en numerosos escenarios fisiológicos y patológicos que involucran la instauración de procesos inflamatorios vinculados a una inmunidad Th1-dependiente, que de sostenerse en el tiempo generan patología, como en las enfermedades inflamatorias gastrointestinales (Bouma y Strober 2003). Finalmente la toxina colérica se empleó como un estímulo mucosal que genera una respuesta Th2 en intestino. Por lo tanto, decidimos estudiar el rol inmunomodulador de estas bacterias en distintos escenarios inflamatorios sobre la base de su acción regulatoria sobre células epiteliales. A pesar que las células Caco-2 muestran una expresión constitutiva de IL-8, MCP-1 e IL-1 β (Bandyopadhaya et al. 2007) observamos que los distintos estímulos inducen, aunque en forma diferencial, la expresión de distintas citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias. Sin embargo, un mecanismo común en todas estas activaciones celulares es el incremento en la expresión de CCL20, quimioquina encargada del reclutamiento de células dendríticas y linfocitos T. Por lo tanto, enfocamos nuestro análisis al empleo de Actinomycetales como agente modulador de la expresión génica de CCL20 en las células epiteliales activadas. En todas las situaciones experimentales ensayadas (*in vitro* e *in vivo*), observamos que con los protocolos aplicados

Gb, Rc y Ti modulan la expresión de este mediador temprano de inflamación. Además, usando la línea reportera caco-luciferasa se observó que la inhibición resultaba del bloqueo de la vía de NF- κ B. Resultados similares fueron publicados por otros grupos empleando la línea celular de enterocitos HT-29 y probióticos (O'Hara et al. 2006; Sibartie et al. 2009). Dado que es ampliamente conocido que la expresión de mediadores pro-inflamatorios es dependiente de la activación de la vía de señalización de NF- κ B estudiamos la acción de estas bacterias sobre la expresión de los mismos. Cuando las células son pre-incubadas con Gb o Rc, y luego estimuladas con flagelina o IL-1 β , se observa un efecto modulador de la expresión de RNAm CCL20 (estimuladas con flic o IL-1 β) y de RNAm IL-8 (estimuladas con Flic), diferencia que podría deberse a la intensidad de la interacción de NF- κ B con el DNA. Se ha observado que en Caco-2 estimuladas con flagelina se induce un fuerte aumento en la unión NF- κ B – DNA, mientras que si las células son activadas con IL-1 β , sólo se observa un leve aumento en la unión de NF- κ B – DNA (Bambou et al. 2004).

NF- κ B es un factor de transcripción central en la respuesta inflamatoria (Barnes y Karin 1997). Está ampliamente caracterizado que la unión de TNF- α , IL-1 β y otros estímulos a sus receptores específicos de membrana producen la activación de esta vía, a través de la fosforilación de I κ B para su posterior degradación, y de p65 para su traslocación al núcleo. Aquí p65 reconoce secuencias específicas de DNA dependiendo de estructuras diferenciales de la cromatina. Esta compleja interacción gobierna el reconocimiento de los promotores de los genes, lo cual finalmente va a generar una adecuada expresión de mediadores de la respuesta inmune. Vale decir que dependiendo del estímulo inicial será finalmente el remodelamiento de la cromatina lo que regule la activación de los genes blanco (Chariot 2006; Smale 2011). En este capítulo mostramos los resultados en los que bacterias muertas de Actinomycetales inhiben *in vitro* e *in vivo* la activación de la vía de NF- κ B, y consecuentemente la expresión y secreción de CCL20. Además mostramos que estas bacterias son capaces de inducir la secreción de especies reactivas del oxígeno, las cuales inhiben al complejo enzimático responsable de la ubiquitinización de I κ B, lo cual mantiene a la vía reprimida. A pesar que aún no hemos demostrado la relación directa entre la inducción de ROS y la menor fosforilación de I κ B, estos resultados preliminares sugieren que los Actinomycetales, a través de la modulación del metabolismo oxidativo de la célula, regulan su estado de activación. Efectos similares se han descrito para probióticos (Iyer et al. 2008) y diversas bacterias de la microbiota intestinal (Collier-Hyams et al. 2005; Kumar et al. 2007). En todos estos casos el efecto modulador sobre la vía de NF- κ B, y la de MAPK, es

dependiente de la viabilidad de las bacterias. En este sentido es importante resaltar que los Actinomycetales muertos son reconocidos por componentes de la membrana de células epiteliales y son capaces de modular la vía conservada de NF- κ B que gobierna numerosos procesos biológicos. Esta interacción célula-bacteria la caracterizamos experimentalmente por microscopía electrónica y, remarcablemente, observamos que las bacterias muertas no son fagocitadas por las células epiteliales. Existe un contacto muy estrecho entre la membrana plasmática celular y la pared bacteriana, interacción que se acentúa cuando la célula se encuentra activada. Inclusive en esta condición las bacterias se asocian entre sí, formando acúmulos, y con la superficie celular. Por lo tanto estamos en condiciones de afirmar que el efecto inhibitorio ejercido por los Actinomycetales muertos lo ejercen desde afuera de la superficie externa de la célula y que estaría mediado por uno o más receptores que se exponen una vez que la célula epitelial es activada por diversos factores, o por un entorno pro-inflamatorio. Sospechamos que existirían distintos tipos de interacciones célula epitelial:bacteria, y que estaría mediada por complejos del tipo receptor:ligando, dado que las distintas especies de Actinomycetales ejercen efectos regulatorios diferenciales sobre la misma célula. Observamos además por microscopía electrónica que células en reposo tienen unida en su superficie bacterias aisladas. Por otro lado, observamos, mediante los experimentos de ROS, que la célula sin activar es capaz de interactuar con las bacterias para inducir la expresión de los radicales libres de oxígeno. Este hallazgo implica que existen receptores constitutivos en la cara externa de la membrana celular que de alguna manera reconocen estructuras en la pared bacteriana. Desconocemos aún la naturaleza del ligando bacteriano y del receptor. Hasta el momento lo único que se conoce de Gb es que en su membrana presenta un lipoglicano del tipo lipoarabinomanano (Garton y Sutcliffe 2006). Por otro lado, cuando la célula es activada se observa un número marcadamente superior de contactos con las bacterias, e inclusive, como ya mencionamos, las bacterias se asocian en acúmulos. En esta condición la célula emite protrusiones y este contacto es el que inicia el o los mecanismos inhibitorios que modularán en forma muy rápida la activación celular. Dado que 30 minutos de activación celular son suficientes para que podamos observar un efecto supresor estamos en condiciones de asegurar que no se requiere de síntesis proteica *de novo* para que se expresen los receptores en la superficie de los colonocitos, y que los mismos existen preformados en el citosol aguardando el estímulo adecuado. Si bien resta aún mucho trabajo por realizar para comprender acabadamente cómo se produce la interacción célula:bacteria, y los detalles moleculares del mecanismo inhibitorio ejercido por estas bacterias muertas, consideramos que estos resultados son muy promisorios. Inclusive hemos

observado que las distintas especies de Actinomycetales promueven una supresión diferencial de los mecanismos que se disparan inmediatamente a la activación celular. Es probable que más de un mecanismo se ponga en juego dependiendo de la especie bacteriana, aunque todos dirigidos al mismo blanco intracelular: componentes de la vía de señalización NF- κ B.

Finalmente los resultados *in vivo* demostraron que escenarios inflamatorios más complejos (inducidos por la presencia en el lumen intestinal de flagelina o de toxina colérica) también pueden ser modulados por acción de estas bacterias muertas. Nuevamente vamos a resaltar un aspecto muy importante a considerar en la elección de estos microorganismos para el tratamiento de distintas patologías (alergia, cáncer, diabetes, stress, alergias, etc.), y que amplía indudablemente el abanico de posibilidades en cuanto al tipo de patologías en las que pueden aplicarse: **no es condición necesaria mantener la viabilidad de las bacterias para que ejerzan su efecto inmunomodulatorio.** Esto los diferencia marcadamente de los probióticos.

En este trabajo hemos abordado dos modelos *in vivo* en los cuales observamos que Gb inhibe las etapas tempranas de los mecanismos de inmunidad innata, o, lo que es similar, de la inflamación aguda. En uno hemos administrado intraluminalmente flagelina, situación que refleja una infección intestinal por *Salmonella* o *Shigella*, o inclusive una enfermedad de Crohn, en la que se considera que este agonista de TLR-5 es un marcador de la patología. En estos casos la respuesta innata inducida genera una inmunidad adaptativa Th1-dependiente. En el otro modelo murino indujimos una inflamación intestinal mediante el empleo por vía oral de toxina colérica junto a leche de vaca. Esta situación refleja lo que ocurre en una alergia alimentaria a leche bovina. Aquí logramos disminuir los signos clínicos que reflejan la inducción de mecanismos de hipersensibilidad cuando el animal es expuesto a proteínas de leche bovina, logramos inducir un descenso de los niveles de IgE, y de la producción de citoquinas Th2 en esplenocitos y células de ganglios mesentéricos. Estos resultados en conjunto nos permiten concluir que Gb es capaz de modular la inducción de una respuesta inmune Th2-dependiente. A partir de resultados preliminares empleando Ti en el modelo murino de alergia también demostramos que estas bacterias son efectivas cuando se administró en forma simultánea la bacteria por vía oral y la toxina colérica junto al inmunógeno. Sin embargo, no nos resulta claro interpretar los resultados cuando las bacterias muertas se administran previamente a la sensibilización alérgica. Estudios similares se han realizado empleando probióticos donde se ha logrado prevenir la alergia alimentaria inducida en un modelo murino de alergia a OVA (Peng et al. 2007). Sin embargo, en humanos aún es

controversial y poco se sabe sobre la eficacia y la seguridad de la administración de probióticos en pacientes con alergia alimentaria. Ciertos estudios muestran que la administración de probióticos es altamente beneficiosa en pacientes alérgicos (Majamaa y Isolauri 1997). Niños que recibieron fórmulas suplementadas con probióticos han presentado una importante disminución de los síntomas gastrointestinales (Isolauri 2000). En modelos animales también se ha logrado disminuir las manifestaciones clínicas mediante la administración oral de probióticos (Di Felice et al. 2008; Shida et al. 2002). Sin embargo, existen estudios donde muestran que la suplementación de las fórmulas con probióticos no acelera la inducción de tolerancia en niños alérgicos (Hol et al. 2008). Varios trabajos muestran que los probióticos no tienen ningún efecto en la protección contra la alergia en la infancia (Boyle et al. 2009; A. L. Taylor et al. 2007; Soh et al. 2009). Algunos autores han demostrado que los probióticos son seguros en individuos inmunocompetentes, y que no son recomendables en pacientes inmunodeficientes por el elevado riesgo de producir sepsis (Ledoux et al. 2006; Gronbach et al. 2010).

Por lo tanto el empleo de bacterias muertas junto al alérgeno en inmunoterapia abre un abanico de posibilidades terapéuticas en diferentes patologías inflamatorias agudas. Su administración por vía oral no produjo efectos adversos, y se observan diferentes resultados si se administran, previa o simultáneamente a la sensibilización alérgica. Estos resultados nos alientan a seguir profundizando los estudios sobre los mecanismos anti-inflamatorios que las diferentes especies ejercen, y en particular, a su empleo en protocolos de desensibilización empleando el modelo murino de alergia alimentaria.

Capítulo 4

Empleo de proteínas de soja en inmunoterapia tolerogénica aplicando el modelo murino de alergia a proteínas de leche bovina



IV.1. INTRODUCCIÓN

Actualmente la soja es la principal fuente de proteínas y aceite vegetal del mundo, y alimentos a base de soja se emplean principalmente como alimento para el ganado. Sin embargo, el alto valor biológico de sus proteínas y sus propiedades funcionales (texturizante, emulsificante, etc) ha determinado que los alimentos con soja y derivados de la soja sean también intensamente consumidos por el hombre en una amplia variedad de alimentos procesados. Desde la década del 80, y como consecuencia del mayor consumo de estas proteínas en productos alimenticios, la alergia a la soja ha sido documentada y actualmente las autoridades regulatorias han incluido a la soja, y a sus derivados, entre los 8 alimentos principalmente responsables de producir alergias alimentarias. Si bien la prevalencia de la alergia alimentaria a soja es baja, esta condición parece ser importante en casos de sensibilización primaria a otros alérgenos de reactividad cruzada. Las primeras evidencias de la existencia de *reactividad cruzada* entre alérgenos se originaron a partir de las observaciones clínicas en la década del 80 donde se observó que pacientes alérgicos al polen de abedul presentaban manifestaciones clínicas a ciertas frutas (Lahti et al. 1980; Halmepuro et al. 1984).

Al hablar de reactividad cruzada es importante distinguir la misma de sensibilización, con la consiguiente inducción de signos clínicos. En general los anticuerpos IgE están involucrados en la aparición de una reacción alérgica y son los responsables de ambos mecanismos. Por lo tanto, los estudios serológicos suelen brindar información relevante, aunque se debe tener en cuenta que la reactividad cruzada serológica puede ser más amplia que la reactividad cruzada clínica, y aquí entran en juego numerosos factores (flora del tracto gastrointestinal, madurez intestinal, grado de procesamiento de los alérgenos en el tracto gastrointestinal, grado de sensibilización de los mastocitos y basófilos, preparación del alimento, etc.), muchos de los cuales tienen que ver con aspectos individuales (van Ree 2004). También es importante resaltar que la reactividad cruzada puede ser consecuencia del reconocimiento por parte de los linfocitos T, y no involucrar a los anticuerpos específicos. En este último aspecto se basa nuestra estrategia que será presentada en este capítulo.

Se ha detectado reactividad cruzada a alérgenos de la soja en pacientes primariamente sensibilizados al polen de abedul (Mittag et al. 2004), al maní (Sicherer y Sampson 2006) y a la leche de vaca (Rozenfeld et al. 2002; Curciarello et al. 2008). Nuestro grupo ha participado

activamente en los últimos años en la descripción de la última reactividad cruzada mencionada, entre proteínas de leche bovina y de soja. Clínicamente la sensibilización primaria a alérgenos de soja es responsable de generar síntomas más severos, mientras que en pacientes alérgicos al abedul que presentan IgE específica contra alérgenos de soja la probabilidad de reacciones sistémicas es menor (Ballmer-Weber et al. 2007), aunque existe un trabajo que muestra reacciones anafilácticas en estos pacientes (Kleine-Tebbe et al. 2002). También se han reportado casos fatales por reacciones anafilácticas con asma severa causadas por soja en jóvenes alérgicos al maní, que no presentaban historia previa de alergia a soja (Foucard y Malmheden Yman 1999).

En los últimos años la inducción de ***tolerancia inmunológica*** ha sido uno de los objetivos a estudiar como estrategia para la prevención y el tratamiento de muchas enfermedades, donde la desregulación del sistema inmunológico juega un rol importante (M. Akdis y Akdis 2007; M. Akdis et al. 2006; Larché 2006; Durham et al. 1999). El papel fundamental de los linfocitos T regulatorios en inducir y mantener la tolerancia se ha demostrado en los últimos años mediante estudios de transferencia adoptiva de linfocitos T, depletados de subpoblaciones efectoras, en modelos animales, en los que se logra prevenir o curar diferentes enfermedades mediadas por células T, como ocurre por ejemplo en la inflamación alérgica (M. Akdis y Akdis 2009). Se ha identificado a la citoquina TGF- β como el principal mediador soluble para mantener la tolerancia (Letterio y Roberts 1998), debido a que induce la conversión de células T CD4⁺CD25⁻, por medio de la inducción del factor de transcripción Foxp3, a LT CD4⁺ CD25⁺ (W. Chen et al. 2003; Xu et al. 2010) con capacidad inmunosupresora sobre distintas células (Huber et al. 2004; Presser et al. 2008).

Retomando el concepto antes mencionado de la reactividad cruzada, se sabe actualmente que este fenómeno involucra proteínas, además de hidratos de carbono, y por lo tanto la identificación de epitopes de reactividad cruzada en distintos sistemas alérgicos ha significado un importante aporte desde el punto de vista del reconocimiento inmunológico de los alérgenos, del diagnóstico y del tratamiento de las alergias alimentarias. De esta manera los tratamientos actuales de inmunoterapia se basan justamente en la inducción de tolerancia en las mucosas administrando el mismo alérgeno que induce una reacción de hipersensibilidad. En este caso en particular aplicaremos ambos conceptos (reactividad cruzada e inmunoterapia tolerogénica) con el fin de aliviar o eliminar los signos clínicos, cuando en el modelo murino los animales sensibilizados son desafiados oralmente con el

alergeno alimentario. Por lo tanto aquí, se pone en juego el concepto de los epitopes T de reactividad cruzada. Es decir que no sólo existen epitopes B conservados entre alergenios responsables de la reactividad cruzada humoral, sino que además son necesarios los epitopes T para posibilitar la generación de anticuerpos IgE y linfocitos T regulatorios. La disponibilidad de información sobre epitopes T en alergenios alimentarios es más restringida en la actualidad que la de epitopes B, entre otros factores, por limitaciones metodológicas para evidenciar los epitopes T y porque se han descrito desde hace relativamente poco tiempo. Sin embargo, los avances logrados en la clonación de linfocitos T específicos de alergenios ha permitido en muchos sistemas una completa caracterización de epitopes B y T (B Bohle et al. 2005; Jahn-Schmid et al. 2010). Esta información es la base teórica que permitirá postular la inducción de linfocitos T regulatorios en la inmunoterapia antígeno-específica, a través de la administración de alergenios relacionados o modificados por distintas vías mucosales (Gerstmayr et al. 2007; Knittelfelder et al. 2009; Rosa et al. 2010; Yang et al. 2010; Jahn-Schmid et al. 2012).

A pesar del desarrollo en los últimos años de modelos de alergia, no es frecuente encontrar en la literatura trabajos sobre su aplicación al estudio de la reactividad cruzada entre alergenios. Una aproximación de esta índole se ha descrito en modelos murinos de alergia a maní sobre los cuales se ha estudiado la modulación de la respuesta alérgica a maní por inmunización con extracto proteico de soja por vía intraperitoneal (Pons et al. 2004), o productos fermentados de soja (Zhang et al. 2008), basándose en la homología existente entre alergenios de soja y maní (vicilinas y leguminas). En ambos casos la inmunoterapia alergeno específica con alergenios de maní presentaba efectos adversos y su reemplazo por proteínas de soja demostró una efectiva desensibilización o disminución en la intensidad de la respuesta inmune a proteínas de maní.

En este capítulo analizaremos la reactividad cruzada entre las proteínas de leche y las proteínas de soja *in vivo*, para lo cual hemos empleado el modelo de alergia a PLV en la cepa de ratones BALB/c como una herramienta *in vivo* para confirmar la reactividad cruzada inmunoquímica descrita anteriormente por Curciarello et al. (Curciarello et al. 2008).

Por otra parte, y aprovechando este fenómeno estudiaremos la inducción de tolerancia a proteínas de leche de vaca mediante la administración oral de proteínas de soja.

IV.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

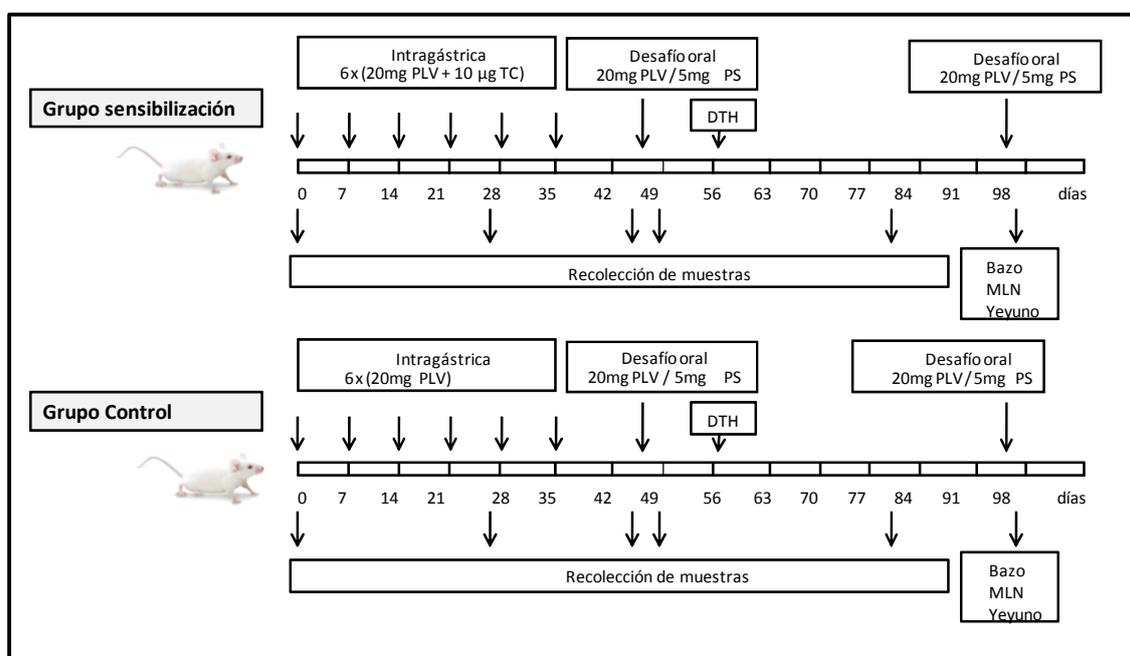
❖ Analizar la inducción de componentes inmunológicos específicos para proteínas de leche bovina (anticuerpos y linfocitos T), y de signos clínicos compatibles con reacciones de hipersensibilidad, luego del desafío oral con proteínas de soja en el modelo murino de alergia a PLV.

❖ Inducción de tolerancia oral a proteínas de leche de vaca, mediante el empleo de proteínas de soja en el modelo murino de alergia alimentaria.

IV.3. RESULTADOS

Habiéndose descrito y caracterizado en trabajos previos del grupo la reactividad cruzada *in vitro* entre PLV y proteínas de soja (naturales y recombinantes) (Docena et al. 2002; Rozenfeld et al. 2002; Curciarello et al. 2008) se planteó la aplicación del modelo murino de alergia alimentaria a PLV para estudiar la reactividad cruzada con las proteínas de soja *in vivo*. Para ello, se realizó el plan de sensibilización como se describió en el capítulo I y se evaluó la reactividad cruzada *in vivo* luego del desafío oral con un extracto de proteínas de soja (PS).

Plan de sensibilización



Esquema 7 Protocolo de sensibilización

Sensibilización (Sens) Días 0, 7, 14, 21, 28 y 35: se inocularon por ratón:

10 µg de TC + 20 mg de PLV, para el grupo denominado **Sensibilización (Sens)**.

20 mg de PLV, para el grupo denominado **Control de antígeno (grupo control)**.

Desafío oral: administración de 20 mg de PLV o 5 mg de PS por vía ig.

Luego de 15 días de la última inmunización, se realizó un desafío oral, administrando PLV o PS en buffer bicarbonato. Los scores clínicos asignados luego de la observación (a través de observadores independientes), entre los 30 y 45 minutos posteriores a la exposición oral, se muestran en la **figura 63**. Además, como parámetro experimental que refleja la inducción de los signos clínicos sistémicos se cuantificó la concentración de histamina plasmática luego del desafío oral con leche o con soja.

Autora: Smaldini Paola Lorena

Directores: Dr. Docena G. y Dr. Fossati C.

Como puede deducirse del gráfico, los ratones sensibilizados mostraron signos clínicos compatibles con una alergia alimentaria al ser desafiados con PLV o PS, mientras que los ratones del lote control no mostraron signos clínicos luego del DO. La mayoría de los animales sensibilizados presentó rascado, agitación, dificultad en la respiración, disminución de la actividad o falta de respuesta al ser tocados. No se indujeron signos graves como convulsiones o muerte (**figura 63a**). Como puede observarse en la **figura 63b**, en los animales del lote sensibilizado los niveles de histamina plasmática son superiores a los de los ratones del lote control. Estos resultados reflejan la inducción de un proceso inflamatorio local (mucosa gastrointestinal) y sistémico (en circulación) frente a una nueva exposición al antígeno por vía oral en los animales “alérgicos”. Los ratones sensibilizados y controles que fueron desafiados con una proteína no relacionada (OVA o BSA), no desarrollaron signos clínicos, ni tuvieron aumentos en los niveles de histamina plasmática.

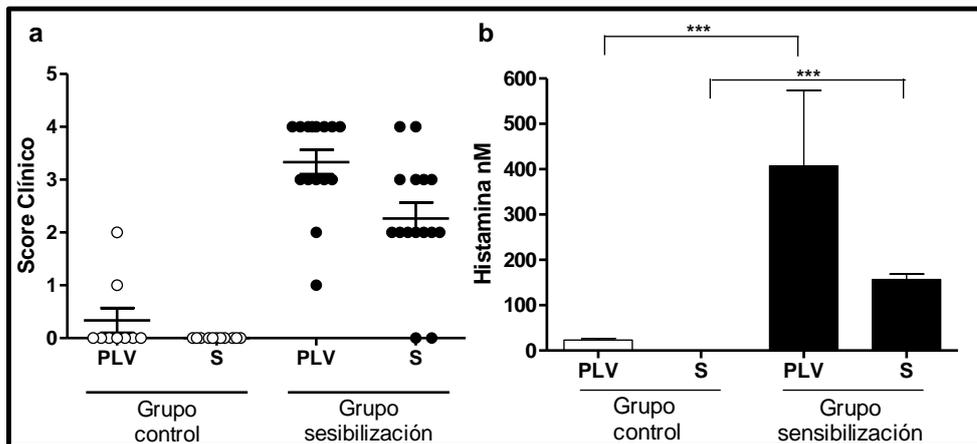


Figura 63. Evaluación *in vivo* de la respuesta inducida. En a se muestran los scores clínicos desarrollados a los 30 min del DO con 20 mg de PLV o 5 mg PS. En b se midieron los niveles de histamina plasmática por medio de un ELISA competitivo. En el gráfico se muestran las medias \pm SEM para cada uno de los grupos. (***) $p < 0.001$). Estos resultados corresponden a un experimento representativo.

Por lo tanto podemos concluir que ratones sensibilizados a PLV desarrollan signos clínicos de hipersensibilidad cuando son desafiados oralmente con PS, efecto que también se refleja a nivel de la concentración de histamina plasmática.

Determinación de la respuesta inmune humoral

Se evaluó la presencia de anticuerpos séricos específicos en muestras obtenidas durante el plan de sensibilización. En la **figura 64** se presentan los resultados de los niveles séricos de los distintos isotipos.

En el **panel A** se muestran los valores obtenidos para IgE, IgG1 e IgG2a específicas para PLV en animales provenientes de los distintos lotes. Como puede observarse, durante la sensibilización se produjeron anticuerpos IgE específicos de PLV (**figura 64a**). Los ratones del lote control mostraron niveles basales de IgE específica que no se incrementaron con el tiempo. La presencia de anticuerpos de isotipo IgG específicos fue analizada por ELISA indirecto en los sueros obtenidos durante el plan de inmunización. En la **figura 64b** se muestran los resultados de **IgG1** específica a PLV, puede observarse que se indujo un aumento en el tiempo de IgG1 específicos a PLV. Por el contrario, no se observó inducción en la producción de anticuerpos de isotipo **IgG2a** específicos a PLV.

En el **panel B** se muestran los valores obtenidos para IgE, IgG1 e IgG2a específicas para PS en animales provenientes de los distintos lotes. En **figura 64d** se muestran los niveles de **IgE** específica que reconocen PS, como puede verse hay un aumento en el tiempo de dicho isotipo. De igual manera se observa un aumento en los niveles de **IgG1** en el tiempo, mientras que los animales del lote control mantuvieron niveles basales (**figura 64e**), y tampoco hay aumento en los niveles de **IgG2a** (**figura 64f**).

Si se comparan los valores de DO para los anticuerpos específicos de soja y de PLV pueden apreciarse valores inferiores para el caso de IgE específica de soja. Deben considerarse dos aspectos que influyen en estas diferencias: por un lado, la concentración de proteínas de soja en fase sólida debió reducirse respecto de la de PLV en 3,5 veces para lograr una sensibilidad del ensayo tal que permitiera diferenciar la respuesta de ambos lotes de animales, y por otro lado, en el ensayo de la **figura 64a** se observa la reactividad de anticuerpos IgE específicos de PLV frente al Ag identidad (PLV), mientras que en el ensayo de la **figura 64d**, se identifican aquellos anticuerpos IgE específicos de PLV que presentan reactividad cruzada contra epitopes presentes en soja.

Cabe destacar además que la aparición de IgG1 específica en el suero es posterior a la de IgE.

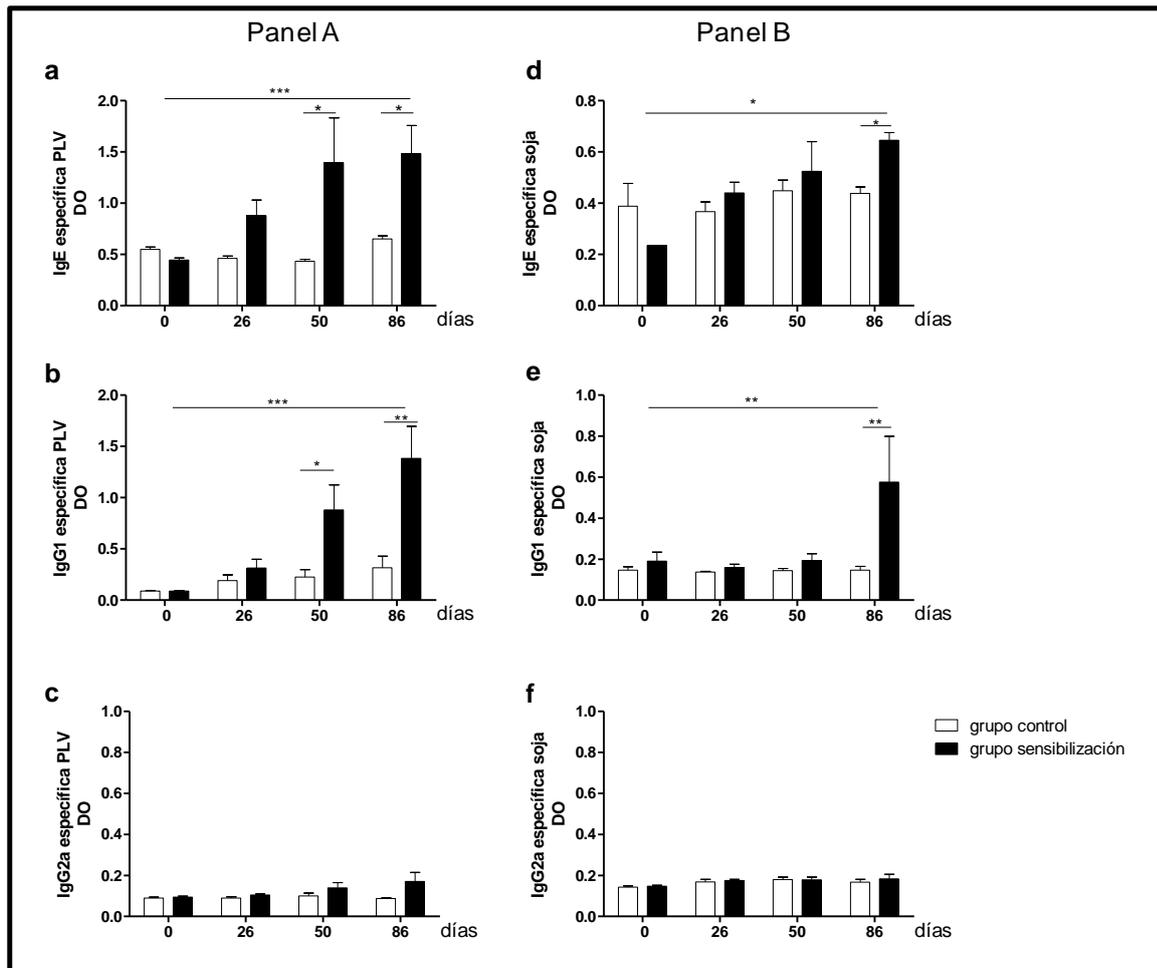


Figura 64. Isotipos específicos a PLV o PS sérico determinados por EAST y ELISA. Valores promedio de $DO \pm SEM$ para cada uno de los grupos, obtenidos a partir de los sueros de los ratones pertenecientes al grupo sensibilizado y grupo control. En Panel A, isotipos específicos a PLV (a) IgE, en (b) IgG1, y en (c) IgG2a; en panel B, isotipos de reactividad cruzada con PS (d) IgE, en (e) IgG1, y en (f) IgG2a. (** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ Anova de dos vías seguido del test de Bonferroni).

Estos resultados claramente indican que la administración intragástrica de TC junto a PLV induce la síntesis de isotipos asociados a una respuesta Th2. La aparición de IgE e IgG1 específicos de proteínas de soja sólo puede explicarse por reactividad cruzada entre ambos sistemas proteicos dado que los animales sólo fueron sensibilizados con PLV. En el caso que el alimento contenga proteínas de soja (información desconocida) la respuesta de los ratones sería la de inducción de tolerancia oral, por lo cual no se incrementarían los isotipos asociados a una respuesta Th2.

Producción de citoquinas en cultivo de esplenocitos y MLN

A las 24 hs del desafío oral algunos animales fueron sacrificados (lote control y lote sensibilizados), se extrajo el bazo y los ganglios mesentéricos. Se prepararon suspensiones de células mononucleares y se realizó un ensayo de proliferación antígeno-específico con PLV o PS, medio RPMI (control negativo) y Con A (control positivo). En el sobrenadante de los cultivos se determinó la presencia de citoquinas Th1 (IFN- γ) y Th2 (IL-5, IL-13) como marcadores de una respuesta inmune humoral local Th1 o Th2 respectivamente, como se mencionó previamente.

La producción de las distintas citoquinas se muestra en la **figura 65**. En los ratones sensibilizados con PLV y TC se indujo la producción de IL-13 y de IL-5 tanto en esplenocitos cultivados con PLV, como con proteínas de soja. Estos resultados reflejan la presencia de LT Th2 específicos de PLV que también reconocen, por reactividad cruzada, péptidos presentados provenientes de proteínas de soja.

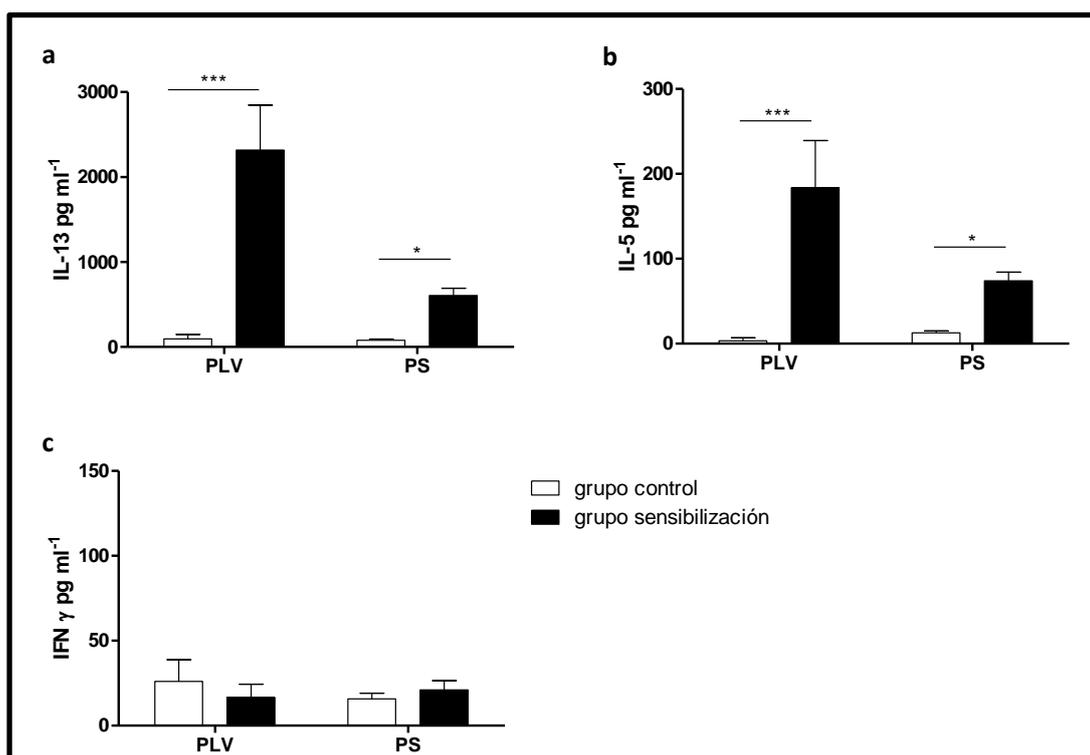


Figura 65. Concentración de citoquinas en sobrenadante de cultivo de esplenocitos mediadas por ELISA de captura. Concentración de (a) IL-13, (b) IL-5 y (c) IFN- γ en presencia de PLV o PS. (***) $p < 0.001$; *) $p < 0.05$ Anova de dos vías seguido del test de Bonferroni).

La respuesta de citoquinas fue mayor cuando las células fueron estimuladas con PLV que aquellas estimuladas con PS *in vitro*. Estos resultados nos dan indicios que sólo una población restringida de LT específicos a PLV es activada por epitopes T de proteínas de soja presentadas por APCs.

Como era de esperar, la secreción de IFN- γ no fue estadísticamente diferente entre los grupos.

De igual manera se realizaron cultivos de pools de células mononucleares de MLN de ratones de los distintos grupos y se midieron las citoquinas secretadas en el sobrenadante.

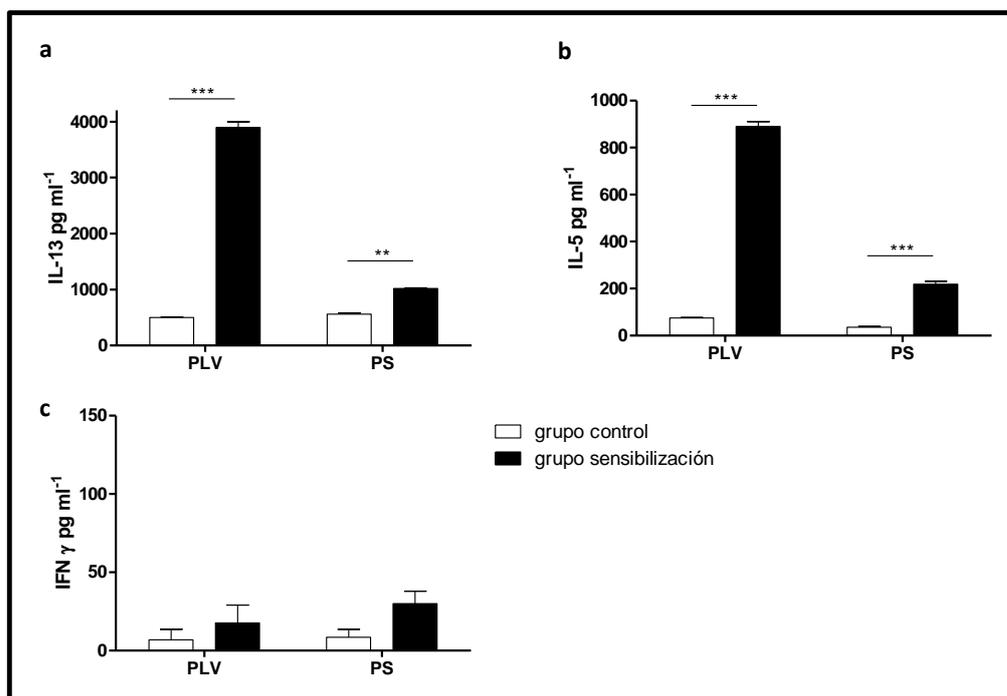


Figura 66. Concentración de citoquinas en sobrenadante de cultivo de MLN mediadas por ELISA de captura. Concentración de (a) IL-13, (b) IL-5 y (c) IFN- γ en presencia de PLV o SP. (***) $p < 0.001$; **) $p < 0.01$ Anova de dos vías seguido del test de Bonferroni).

Corroborando los resultados obtenidos en bazo, en MLN se obtuvo un aumento estadísticamente significativo en los niveles de IL-13 e IL-5 cuando las células fueron estimuladas *in vitro* con PLV o con PS, mientras que no hubo aumento en los niveles de IFN- γ . Estos resultados indican que la administración intragástrica de PLV con TC induce la activación de LT y su diferenciación a LT Th2 directamente en la mucosa intestinal. Dado que los animales no fueron sensibilizados con proteínas de soja, los resultados hallados con este antígeno sólo pueden explicarse por reactividad cruzada entre las distintas proteínas. Por

lo tanto, nuevamente la reactividad cruzada se refleja a nivel T, además de B, tanto en forma sistémica como en la mucosa intestinal.

Caracterización *in vivo* de la respuesta inmune inducida

Para evidenciar la inducción de anticuerpos de isotipo IgE específicos de PLV se estudió la presencia de mastocitos sensibilizados en piel frente a la administración de distintos antígenos. Para ello se realizó **prueba cutánea** en ratones pertenecientes a los lotes control y sensibilizado. Las fotos de la **figura 67** muestran los resultados de las pruebas cutáneas realizadas con PLV (**fig.67a**) y con proteínas de soja (**fig.67b**). Como pruebas control se realizaron los mismos ensayos en ratones de los lotes control (**fig.67 c y d**) y prueba cutánea con antígenos no relacionados con PLV (arroz, OVA) en los ratones sensibilizados con PLV (resultados no mostrados).

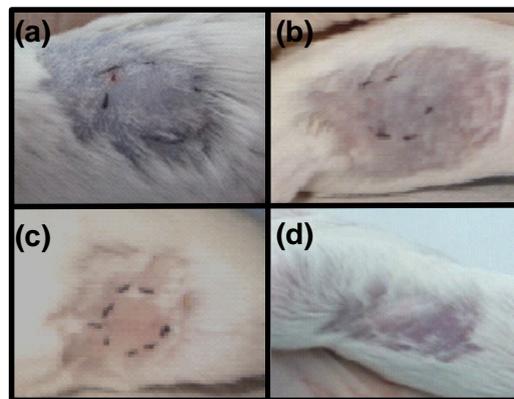


Figura 67. Prueba Cutánea. En las fotos de arriba se muestran resultados positivos con extravasación del Azul de Evans al inocular con (a) PLV o (b) SP ratones del grupo sensibilizado. No se observa extravasación en ratones del grupo control inoculados con (c) PLV o (d) SP.

Por lo tanto estos resultados también confirman que el plan de sensibilización aplicado induce la síntesis de anticuerpos IgE específicos de PLV y de reactividad cruzada con SP capaces de unirse a su receptor específico en la superficie de los mastocitos. Éstos, al contactar el antígeno se activan, desgranulan e inducen un proceso inflamatorio local y sistémico, similar al que se produce en humanos cuando se desafía la piel de un paciente alérgico a la leche bovina con el alergeno específico.

Para investigar *in vivo* la presencia de células Th1 antígeno específicas, se realizó la prueba de DTH a los 21 días de terminada la sensibilización. Para ello a un grupo de ratones se les inyectó PLV y a otro grupo PS en una almohadilla plantar y en la opuesta, SF. A las 48/72hs se midió el espesor de las patas. En la **figura 68** se muestra la diferencia en el espesor entre la pata con el Ag y la de SF. Como se observa, no hay un aumento estadísticamente

significativo de la diferencia calculada entre la pata inoculada con PLV o PS y la inoculada con SF.

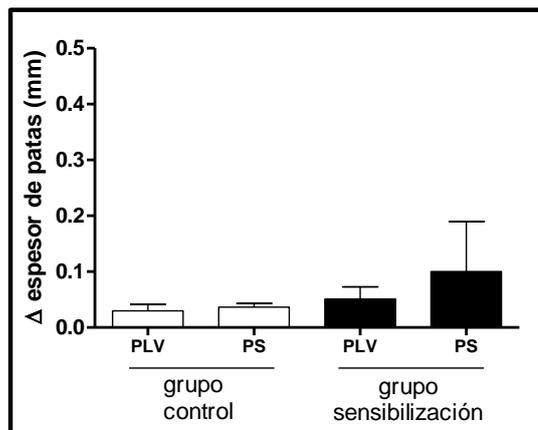


Figura 68. Prueba de DTH. Se grafica la diferencia de espesor entre las patas traseras siguiendo la siguiente fórmula: espesor de pata inoculada con el antígeno – espesor de pata inoculada con SF, medidas a las 72hs de la inoculación. Se representan los valores medios en mm \pm SEM.

Estos resultados demuestran la ausencia de células Th1 antígeno específicas a las 48/72hs de desafiado con el Ag. De esta manera, solo logramos evidenciar la reactividad cruzada *in vivo* a nivel celular por medio de la detección de la presencia de anticuerpos IgE antígeno específica unida a células.

Estos resultados en conjunto confirman la reactividad cruzada *in vivo* a nivel B y T entre los sistemas proteicos de leche de vaca y soja, lo cual nos permitió avanzar en el estudio de estrategias terapéuticas tolerogénicas.

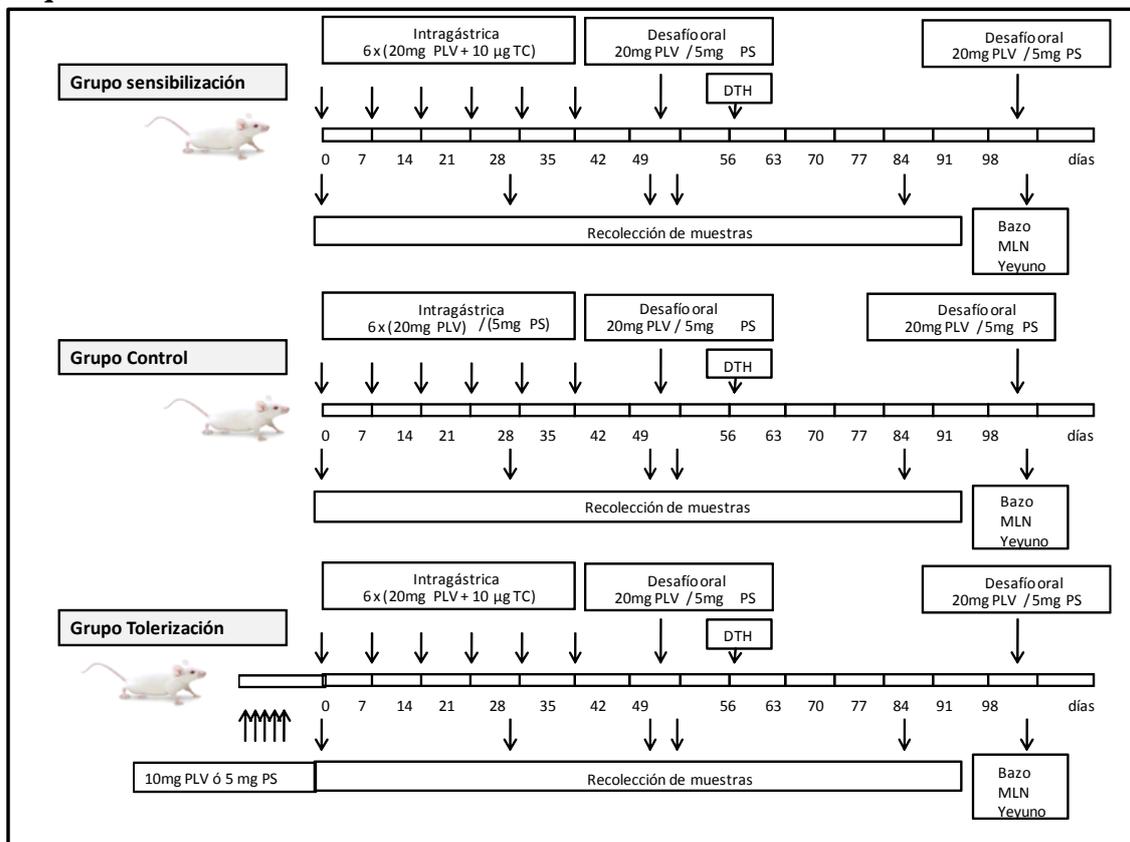
Inmunoterapia empleando proteínas de soja en el modelo murino de alergia a leche de vaca

La alergia a leche de vaca tiene gran importancia en la población pediátrica, y la falta de un tratamiento efectivo, lleva a que la inmunoterapia alérgeno-específica sea una opción para estudiar. Sobre la base de los resultados obtenidos previamente, se decidió emplear esta capacidad de reactividad cruzada *in vivo*, para implementar una inmunoterapia oral basada en la inducción de tolerancia y de esta manera disminuir la respuesta alérgica a PLV. Para ello, se administró dosis bajas del antígeno (PLV o PS), previo al plan de sensibilización (PLV + TC) con el objetivo de inducir tolerancia oral antígeno específico y de reactividad cruzada.

Como se mencionó anteriormente se trabajó con ratones BALB/c de 5 semanas los cuales fueron agrupados en cinco lotes de 6 animales cada uno según el tratamiento a recibir como se describe en el **esquema 8**. Los lotes controles solo recibieron PLV o PS (**grupo**

control), el lote que solo recibió PLV con TC se lo denominó (**grupo sensibilización**), y los lotes tolerizados, es decir que recibieron una semana previa a la sensibilización PLV o PS y luego se les administró PLV con TC, se los llamó **Tol PLV** y **Tol PS** respectivamente.

Esquema de sensibilización/tolerización



Esquema 8 Protocolos de sensibilización y tolerización

Sensibilización (Sens) Días 0, 7, 14, 21, 28 y 35: se inocularon por ratón:

10 µg de TC + 20 mg de PLV, para el grupo denominado **Sensibilización (Sens)**.

20 mg de PLV o 5mg PS, para el grupo denominado **Control de antígeno (Control)**.

10mg PLV diarios por 1 semana, luego 10 µg de TC + 20 mg de PLV, para el grupo denominado (**Tol PLV**)

5mg PS diarios por 1 semana, luego 10 µg de TC + 20 mg de PLV, para el grupo denominado (**Tol PS**)

Desafío oral: administración de 20 mg de PLV o 5 mg de PS por vía ig.

Caracterización *in vivo* e *in vitro* de la respuesta inmune inducida

Análisis de los signos clínicos desarrollados luego del desafío oral

Una vez concluida la etapa de sensibilización intragástrica, se realizó un desafío oral y se analizaron los signos clínicos comparando los animales sensibilizados con los tolerizados. En la **figura 69**, se muestran los scores clínicos de cada ratón correspondiente a un experimento representativo. Como puede observarse, este protocolo logró una disminución en la sintomatología de los animales tolerizados con proteínas de soja (**Tol PS**), y tolerizados con

Determinación de anticuerpos séricos

La inmunidad humoral fue estudiada a través de los niveles séricos de los distintos isotipos de anticuerpos específicos de PLV. En la **figura 71** se muestran los resultados de los niveles séricos de IgE e IgG1 específicos a PLV para los distintos grupos. Se observó que en el grupo **sensibilización**, los niveles de ambos anticuerpos aumentan durante el plan de sensibilización, mientras que en los ratones de los grupos **Tol PS** y **Tol PLV** se encontró que los niveles de dichos anticuerpos son significativamente menores.

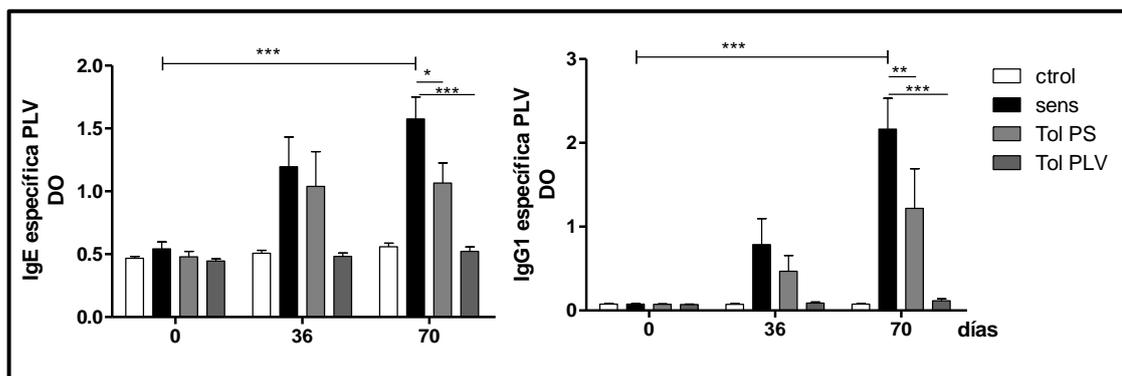


Figura 71. Isotipos específicos a PLV sérico determinados por EAST y ELISA. Cinéticas de producción sérica de IgE, e IgG1 para los distintos tratamientos. Valores promedios de $DO \pm SEM$ para cada uno de los grupos. Estos resultados son representativos de 2 experimentos independientes. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ obtenidos por Anova two way y como test posterior Bonferroni.

A nivel de mucosa se decidió medir los niveles de IgA específica a PLV en materia fecal, para evaluar si la disminución de los signos clínicos y de los niveles de IgE específicos en los grupos tolerizados estaban relacionados con un aumento en los niveles de IgA mucosal. En la **figura 72** se muestran los valores obtenidos durante el plan de sensibilización y puede apreciarse que no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los niveles de dicho isotipo.

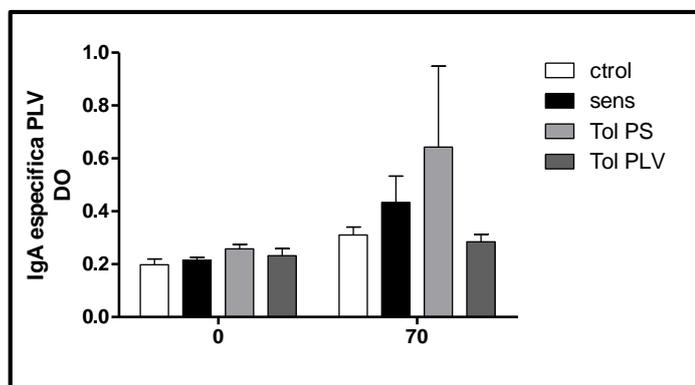


Figura 72. Determinación de IgA específica de PLV en materia fecal. Cinética de producción para los distintos tratamientos. Valores promedios de $DO \pm SEM$ para cada uno de los grupos. Estos resultados son representativos de 2 experimentos independientes. $p > 0.05$ obtenido por Anova de dos vías y como test posterior Bonferroni.

Cuantificación de las citoquinas en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos

Animales de distintos lotes fueron sacrificados 24hs luego del desafío oral, se aislaron los bazos; y a partir de la suspensión de esplenocitos se realizaron cultivos en presencia de PLV. Al igual que en experimentos anteriores, se incluyó RPMI como control negativo (medio de cultivo RPMI 1640) y ConA como control positivo. A partir de los sobrenadantes de estos cultivos se midieron los niveles de IL-5, IL-13, e IFN- γ por ELISA de captura

Como puede verse en la **figura 73**, el grupo sensibilización (**Sens**) presentó niveles altos de IL-5 e IL-13 cuando los esplenocitos fueron estimulados con PLV *in vitro*; mientras que los grupos tolerizados (**Tol PS** y **Tol PLV**) mostraron niveles significativamente menores con respecto a los obtenidos en ratones del grupo sensibilización. Los niveles de IFN- γ fueron bajos en todos los grupos y no se encuentran diferencias entre los mismos.

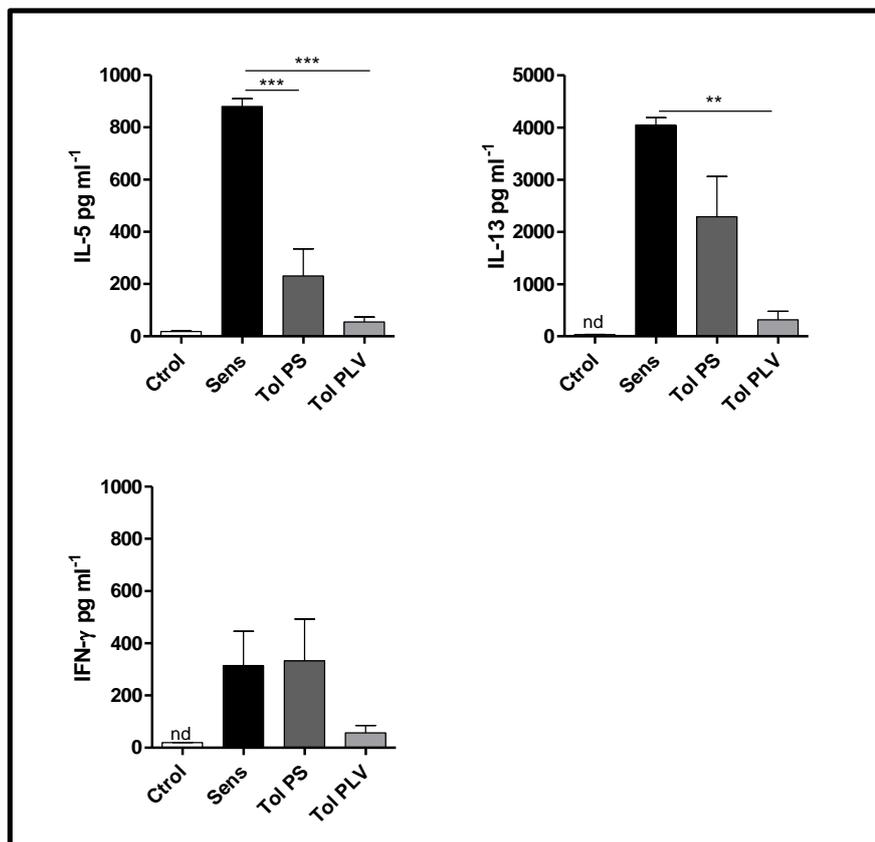


Figura 73. Concentración de citoquinas medidas por ELISA de captura. Concentración de IL-5, IL-13 e IFN- γ en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos en presencia de PLV. (***) $p < 0.001$; **) $p < 0.01$; Anova de dos vías seguido del test de Bonferroni; nd: no detectable).

En conclusión, hemos encontrado una disminución de las manifestaciones clínicas inducidas por la exposición al alérgeno, una disminución en los niveles de IgE específica a PLV y una disminución en la secreción de IL-5 e IL-13 en los ratones de los grupos tolerizados (**Tol PS** y **Tol PLV**) respecto del lote sensibilización (**Sens**). Estos resultados nos

permiten concluir que la administración previa a la sensibilización tanto del antígeno de identidad, como del de reactividad cruzada, con el protocolo mostrado logran disminuir las reacciones de hipersensibilidad, la inmunidad humoral y celular Th2-específica de PLV, como así también negativizar las pruebas cutáneas.

Se sabe que las células T regulatorias son producidas naturalmente en el timo (nTreg) o son inducidas en tejidos periféricos (iTreg). La secreción de ácido retinóico por las CD⁺103 en lámina propia del intestino delgado facilita la diferenciación de células T naïve a células T Foxp⁺3 (Coombes y Powrie 2008) y estas células específicas de antígeno administrado por vía oral pueden luego circular y establecer una tolerancia sistémica. Por este motivo se decidió estudiar en la mucosa si los linfocitos T regulatorios estaban involucradas en el proceso inmunomodulatorio. Para ello estudiamos por citometría de flujo la inducción de células Foxp⁺3 en el gate correspondiente a los linfocitos de lámina propia, de PP y de MLN de los distintos lotes luego de la administración oral de antígeno. En la **figura 74** se muestran los resultados correspondientes a LT CD⁺3 CD⁺4 Foxp⁺3, en suspensiones celulares provenientes de MLN, LP y PP.

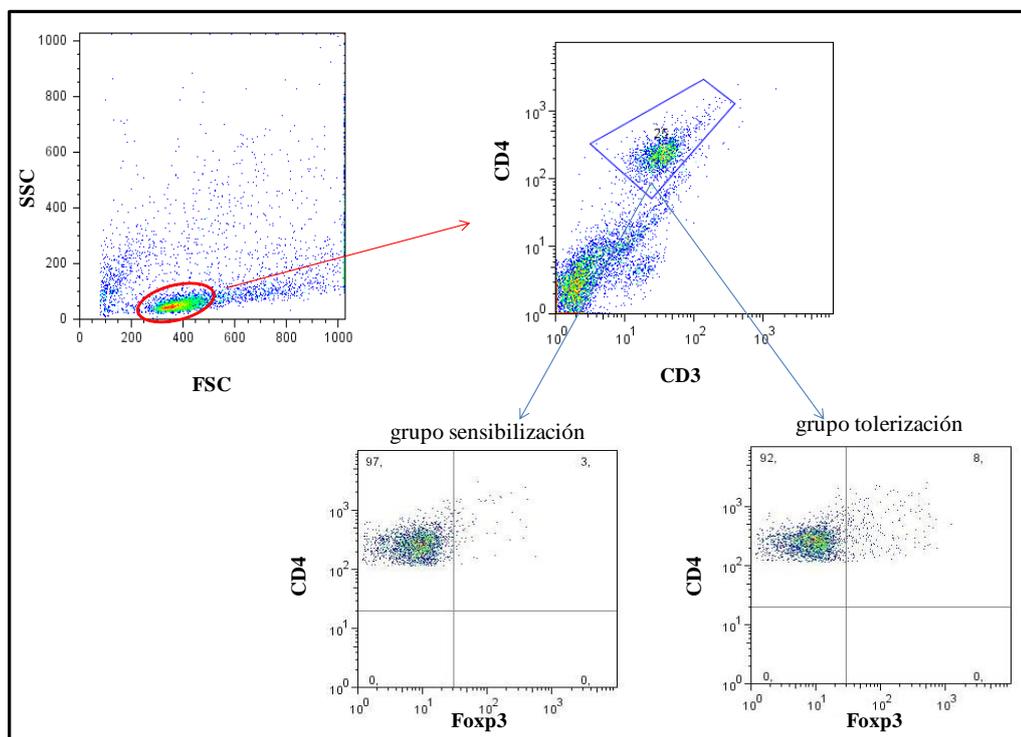


Figura 74. Expresión de Foxp3 por citometría, en linfocitos T CD⁺4 de los distintos grupos.

A partir de los gráficos de dot blot se evaluaron las intensidades de fluorescencia medias (MFI) de Foxp3 las cuales se grafican en la **figura 75**.

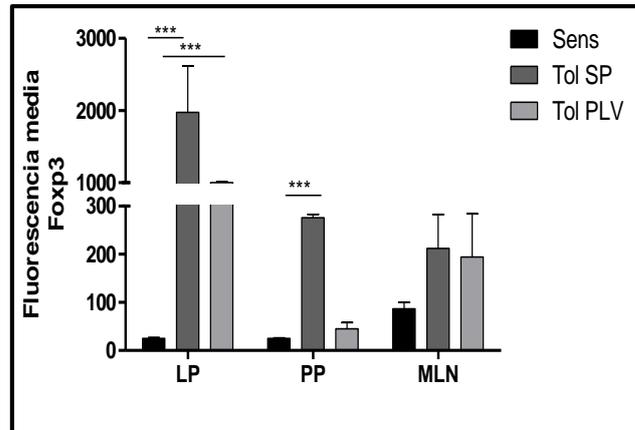


Figura 75. Intensidad de fluorescencia media (MFI) de Foxp3 en linfocitos de LP, PP y MLN en los distintos grupos. (***) $p < 0.001$, Anova de una vía).

Se encontró un aumento en la expresión de fluorescencia media de Foxp3 en los LT de LP, PP y MLN de los grupos tolerizados, respecto de los grupos sensibilización, lo cual es indicativo de la inducción de Treg en la mucosa de los animales pre-tratados.

Además se estudió la expresión de citoquinas en el intestino y en la **figura 76** se muestran los incrementos relativos de las distintas citoquinas estudiadas (IL-5, IL-13 e IFN- γ) para cada lote respecto del grupo control.

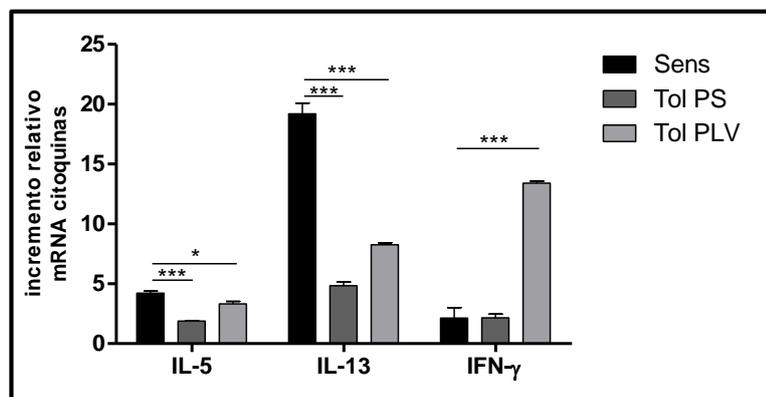


Figura 76. Expresión de RNAm de citoquinas. Se muestra el incremento relativo de IL-5, IL-13 e IFN- γ en lámina propia de intestino. (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; Anova de dos vías seguido del test Bonferroni)

Al igual que lo observado a nivel sistémico, se encuentra una disminución de la expresión de RNAm de IL-5 e IL-13 en los ratones de los grupos tolerizados, con respecto al grupo sensibilización. Observamos un incremento en los niveles de RNAm correspondiente a IFN- γ en el grupo de animales tolerizados con PLV que no se corresponde con los resultados anteriores.

A partir de los resultados previos, donde observamos un aumento en la expresión de Foxp3 en los LT de mucosa, decidimos estudiar la expresión de citoquinas regulatorias (RNAm IL-10 y TGF- β) en la mucosa intestinal. En la **figura 77** se muestran los resultados obtenidos, y como puede observarse en los grupos tolerizados se obtuvo una mayor expresión de RNAm IL-10, con respecto a los ratones del grupo sensibilización. En cuanto a TGF- β hay un leve aumento en su expresión, pero estadísticamente significativo sólo en los ratones del grupo tolerizado con PLV.

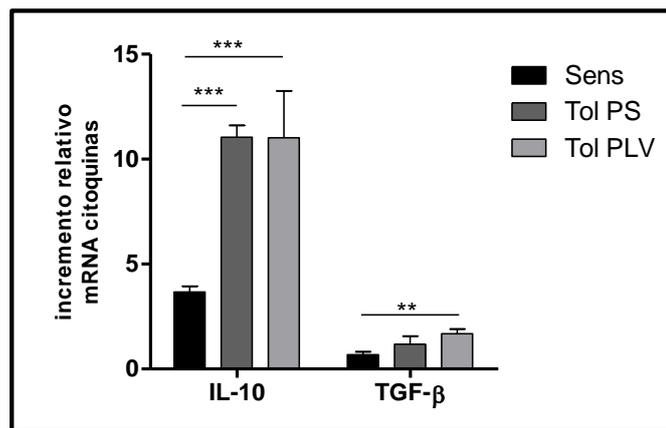


Figura 77. Expresión de RNAm de citoquinas. Se muestra el incremento relativo de IL-10 y TGF- β en intestino. (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; Anova de dos vías seguido del test Bonferroni).

Estos resultados nos permiten concluir que el proceso de inmunomodulación que permite disminuir los signos clínicos de alergia en los animales sensibilizados expuestos al alérgeno, es mediado por la inducción de Treg a través de la producción de IL-10. Aunque estos resultados son preliminares nos alientan a continuar con los estudios de este tipo de inmunoterapia tendiente a corregir el sistema inmune gastrointestinal, cuya activación produce los signos clínicos de hipersensibilidad cuando los animales son expuestos oralmente al alérgeno alimentario. El empleo de un antígeno de reactividad cruzada nos permite controlar la activación inmunológica frente a dos sistemas antigénicos muy diferentes (animal y vegetal). Cabe resaltar que no hemos observado reacciones adversas a PS cuando son administradas oralmente en ratones sensibilizados a PLV, dado que no es menor al momento de considerar una inmunoterapia tolerizante.

IV.4. DISCUSIÓN

A pesar de que se cree que las reacciones alérgicas a las leguminosas en general se producen por sensibilización primaria a través del tracto gastrointestinal, la alergia a soja parece ser más común como una alergia secundaria. En este sentido el estudio de los alérgenos de reactividad cruzada ha cobrado especial importancia a partir de la clonación de numerosos alérgenos, con la consiguiente identificación y caracterización de los epítopes responsables de dicha reactividad cruzada. Para el caso de alergia a soja es importante estudiar a los pacientes con alergia al polen de abedul, al maní y más recientemente a la leche bovina (Mittag et al. 2004; Kattan et al. 2011; Curciarello et al. 2008; Smaldini et al. 2011).

En numerosas ocasiones se dificulta el estudio de la reactividad cruzada en pacientes porque no es fácil determinar cuál es la sensibilización primaria, dato que únicamente puede aportar la historia clínica, con la subjetividad que ello presenta. Como ya hemos mencionado, la presencia de epítopes conservados entre proteínas de leche de vaca y proteínas de soja ha sido estudiada *in vitro* previamente por el grupo (Rozenfeld et al. 2002; Curciarello et al. 2008). Los resultados mostrados en este capítulo constituyen las bases experimentales para entender la intolerancia desarrollada por pacientes alérgicos a proteínas bovinas, solamente sensibilizados a PLV, que son tratados con fórmulas a base de soja. Se sabe que la sola presencia de IgE en suero no es suficiente para producir una respuesta clínica a la exposición con el alérgeno (Aalberse y Van Ree 2000; Ferreira et al. 2004). Por este motivo los modelos murinos aportan una herramienta biológica muy útil para estudios celulares y clínicos de la reactividad cruzada.

En la primer parte del capítulo demostramos experimentalmente la existencia de reactividad cruzada *in vivo* entre PLV y PS, dos sistemas proteicos que no guardan relación filogenética. Hemos encontrado que ratones sensibilizados a PLV, que no fueron previamente expuestos o sensibilizados a PS, desarrollaron síntomas relacionados a mecanismos de hipersensibilidad luego del desafío oral tanto con PLV o PS. Esto es indicativo de una respuesta de fase temprana IgE mediada producida por las proteínas de soja, y de la presencia de componentes específicos a PLV que reconocen alérgenos de soja. Por otro lado, la detección de IgE e IgG1 específicas para soja, la activación de esplenocitos al cultivarlos con el extracto de soja y la inducción de prueba cutánea con proteínas de soja, indican la existencia de una reactividad cruzada entre las proteínas de leche de vaca y los componentes

de soja, confirmando la existencia de epitopes B (epitopes G y E) y T en las proteínas de soja, y la existencia de al menos dos epitopes iguales o distintos en cada molécula del alérgeno (condición necesaria para inducir la activación de mastocitos y basófilos en forma IgE-dependiente). Para el caso del extracto proteico obtenido a partir de soja estos resultados son fáciles de explicar ya que las proteínas de soja se asocian entre sí formando trímeros o hexámeros, por lo cual en un mismo complejo una molécula con al menos un epítopo es suficiente para entrecruzar al menos dos moléculas de IgE en la superficie de los mastocitos. Sin embargo, estudios del grupo han demostrado que existe más de un epítopo inmunodominante en estas moléculas (resultados que no son parte de este trabajo de Tesis).

Por otro lado, observamos que los anticuerpos IgE e IgG1 capaces de reconocer componentes de soja son aquellos que producen la reacción anti-PLV más intensa en los inmunoensayos. Esto significa que sólo una población restringida de anticuerpos específicos a PLV son los que reconocen epitopes B en los alérgenos de soja. Esta observación estaría relacionada con cuestiones de afinidad relativa por uno u otro alérgeno. Estos estudios también se están llevando a cabo por otros integrantes de nuestro grupo y no forman parte de este trabajo de Tesis.

La presencia de manifestaciones anafilácticas sistémicas refleja que las macromoléculas no son completamente hidrolizadas o clivadas durante su transporte gastrointestinal hacia la mucosa duodenal, y que son capaces de atravesar la barrera mucosal en forma nativa (Chirido et al. 1998). De esta manera a través de la circulación sanguínea o linfática pueden llegar a los órganos y tejidos donde se encuentran las células sensibilizadas, activarlas y generar las manifestaciones clínicas que observamos, como el distress respiratorio, edema de ojos y hocico, etc. Para ello, evaluamos la presencia de caseínas no hidrolizadas en circulación utilizando un ELISA con anticuerpos monoclonales específicos. Se encontró que el pico de concentración en el suero de los animales se produjo a los 45 min. posteriores a la administración oral (0.791 µg/ml). Estos resultados confirman la presencia en circulación de epitopes nativos de las caseínas. Lo mismo estaría ocurriendo con las proteínas de soja.

En conclusión, hemos demostrado que los ratones sensibilizados a PLV experimentan reacciones anafilácticas a las proteínas de soja, las cuales fueron consistente con un aumento en los niveles de IgE e IgG1 específicas, y de citoquinas pro- Th2, en comparación con los resultados hallados en los ratones no sensibilizados o de los lotes control.

Estos resultados de reactividad cruzada *in vivo* obtenidos con el modelo murino fueron relevantes para iniciar los estudios de inmunoterapia basada en la inducción de tolerancia mucosal para prevenir reacciones alérgicas.

La inducción de tolerancia a proteínas alimentarias ha sido extensamente estudiada en varios modelos animales. La más estudiada fue la inducción de tolerancia oral inducida por OVA en ratones DO11.11 (animales transgénicos para TCR α/β específico del péptido 323-339 de OVA en I-A^d) (Thorstenson y Khoruts 2001; Hauet-Broere et al. 2003; Zhang et al. 2001). β -lactoglobulina también ha sido estudiada como proteína tolerogénica; Frossard y col. demostraron que la administración oral de β -Lg en el agua de bebida por 4 semanas prevenía efectivamente la posterior sensibilización intraperitoneal de los ratones C3H/HeOuJ (Frossard et al. 2004). Por otra parte, Pecquet y col. demostraron que la tolerancia oral a β -Lg también era eficiente en ratones de la cepa BALB/c mediante una única administración oral de 60 mg de proteína (Pecquet et al. 1999). Por otro lado, Patient y col. lograron una eficiente inducción de tolerancia sistémica mediante la administración de 2mg de β -Lg por 6 días, disminuyendo la posterior sensibilización intraperitoneal con β -lg e Al(OH)₃. En nuestro trabajo, estudiamos la inducción de tolerancia con un extracto de proteínas bovinas, ya que además de la β -Lg, las caseínas también son alérgenos importantes de la leche de vaca (Docena et al. 1996); y aprovechando la característica de reactividad cruzada entre la PLV y la PS, también estudiamos la inducción de tolerancia a PLV mediante la **administración oral de proteínas de soja**. En ambos casos logramos inducir una tolerancia sistémica (disminución de las manifestaciones clínicas luego del DO, disminución de los niveles séricos de IgE específicos, disminución de la secreción de citoquinas de perfil Th2 en bazo) e inducción de tolerancia a nivel de mucosa intestinal (aumento de L Treg CD4⁺ Foxp3⁺, disminución de la expresión de citoquinas de perfil Th2 y aumento de citoquinas regulatorias, principalmente IL-10). Estos resultados en conjunto nos indican que la aplicación de los protocolos diseñados logró prevenir la sensibilización oral a PLV con TC, mediante la inducción de tolerancia oral.

A pesar de los avances logrados en inmunoterapia durante los últimos años, aún queda mucho por estudiar antes de poder utilizarla como terapia en humanos. Un estudio realizado en España, por Keet y col, en el cual a un grupo de pacientes alérgicos a leche de vaca se los trató mediante inmunoterapia oral (OIT), y a otro grupo por inmunoterapia sublingual (SLIT); encontraron que OIT era más eficiente que SLIT ya que aumentó el umbral de desafío con el alérgeno por vía oral. Sin embargo, cuando se les retiró el tratamiento, un alto porcentaje de pacientes en ambos grupos rápidamente perdieron la desensibilización no pudiendo volver a

tolerar las dosis mínimas del antígeno. Además, observaron que los síntomas orales y cutáneos no variaron entre los grupos. Sin embargo, observaron la aparición de síntomas multisistémicos, y del tracto respiratorio superior e inferior, durante la inmunoterapia oral, a diferencia de la sublingual (Keet et al. 2011). Por lo tanto resta aún mucho camino por recorrer para optimizar estos procedimientos y evitar las reacciones adversas en pacientes alérgicos. En este sentido los modelos animales pueden realizar aportes valiosos al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas correctivas del sistema inmune.

Discusión y conclusiones finales



En el presente trabajo de tesis se logró optimizar un modelo murino de alergia alimentaria a proteínas de leche de vaca, mediante el empleo de un adyuvante mucosal que permite la activación de la respuesta inmune directamente en el intestino, aproximándose de esta manera a las alergias alimentarias observadas en humanos.

Por otro lado estudiamos las propiedades de diferentes agentes inmunomoduladores para ser empleados en potenciales estrategias terapéuticas. Además se estudió la reactividad cruzada *in vivo* entre dos sistemas evolutivamente no relacionados, como lo son las proteínas de leche de vaca y las proteínas de soja; y se empleó el modelo murino para evaluar un protocolo experimental de inmunoterapia tolerizante.

Como hemos mencionado anteriormente, el desarrollo de distintos modelos animales de alergia alimentaria ha permitido estudiar y comprender aspectos moleculares y celulares que gobiernan las reacciones alérgicas y para el desarrollo de nuevas terapias. Para este trabajo elegimos la cepa de ratones BALB/c ya que es sabido que su base genética los hace propensos a desarrollar respuestas humorales con un perfil Th2, con producción básicamente de IgG1, cuando son inmunizados con macromoléculas por vía sistémica (Gizzarelli et al. 2006). Actualmente se sabe que el cambio de isotipo secuencial de IgG1 a IgE, genera anticuerpos IgE de alta afinidad (Huizhong Xiong et al. 2012). Con el propósito de asemejar el cuadro observado en pacientes alérgicos, en los cuales en un 60-80% se observa este isotipo, decidimos emplear esta especie y esta cepa con la idea de inducir anticuerpos IgE a través de sensibilizaciones por vía intragástrica con proteínas de leche de vaca y toxina colérica como adyuvante. Dado que en ratones las alergias no se producen en forma espontánea, es necesario incluir adyuvantes en los protocolos de sensibilización. Encontramos que el protocolo estudiado indujo un aumento en los niveles séricos de IgE e IgG1 específicas (pero no de IgG2a); indujo un aumento en la secreción de IL-5 e IL-13 (pero no de IFN- γ), tanto en cultivo de esplenocitos y de células mononucleares aisladas de ganglios mesentéricos al ser estimulados con PLV *in vitro*, como en la mucosa intestinal luego del desafío oral. De manera similar, Cardoso y col. obtuvieron un modelo de alergia a proteínas de maní desarrollado en ratones C57BL/6, en el que por medio de una sensibilización por piel con proteínas de maní e Al(OH)₃ indujeron una inflamación intestinal al desafiar oralmente los ratones con el alérgeno. La aplicación de este protocolo generó un aumento de IL-4 e IL-13,

sin incremento de IL-5, ni de IFN- γ (Cardoso et al. 2008). A diferencia de otros modelos donde emplean adyuvantes por vía sistémica (hidróxido de aluminio), en nuestro modelo se induce una activación de células del sistema inmune en la mucosa gastrointestinal, tal como ocurre en pacientes con alergia alimentaria (Beyer et al. 2002), por lo cual consideramos que nuestro modelo se asemeja en forma mas ajustada a lo que ocurre en humanos.

En una segunda etapa utilizamos el modelo murino de alergia alimentaria a PLV para estudiar el efecto de distintos *agentes inmunomoduladores* con la idea de desviar la respuesta inmune Th2 inducida, responsable de los signos clínicos de hipersensibilidad.

Una estrategia consistió en evaluar la capacidad inmunomoduladora de una *proteína recombinante de membrana externa de Brucella abortus (Omp-16)*. La administración intranasal de Omp-16 de manera simultánea a la sensibilización mostró la modulación de la respuesta Th2 induciendo una respuesta de perfil Th1 específica, la cual fue demostrada por pruebas *in vitro* y ensayos *in vivo*. Los resultados obtenidos muestran la eficacia del empleo de la vía intranasal para modular al sistema inmune activado en la mucosa intestinal. Estos resultados derivaron de la hipótesis de que reacciones alérgicas en una mucosa puede producir respuestas similares en otra mucosa distante (Brandt et al. 2006). Es muy frecuente observar en pacientes con alergias alimentarias la inducción de reacciones respiratorias como broncoconstricción, asma o rinitis (Rhodes et al. 2001).

De igual manera la administración intragástrica de Omp-16 logró modular la respuesta Th2, demostrando un efecto adyuvante Th1 de la proteína recombinante en el sitio efector de la respuesta inmune.

De los resultados obtenidos podemos concluir que la Omp-16 presenta una propiedad adyuvante de perfil Th1 capaz de modular la respuesta Th2 inducida, tanto cuando se inocula por vía intranasal como oral.

Por otro lado, hemos encontrado que la administración subcutánea de Omp-16 con PLV no logró inmunomodular la respuesta Th2 previamente inducida. Esto se debe a que nuestro antígeno, las proteínas de leche de vaca, induce *per se* una respuesta inmune de perfil Th2 al ser inoculadas por vía sc. Trabajos posteriores han mostrado que la exposición transdérmica con PLV induce una respuesta Th2 específica (Gonipeta et al. 2010). Esto demuestra que los mecanismos regulatorios que operan en las distintas mucosas son completamente diferentes. A pesar de que existe escasa evidencia experimental de que la

sensibilización cutánea es posible, recientemente varios grupos de investigación han observado que la exposición transdérmica a alérgenos alimentarios, como los de avellanas, castañas de cajú y semillas de sésamo pueden inducir en modelos animales una reacción de hipersensibilidad inmediata, incluso en algunos casos con evidencias de anafilaxia sistémica (Birmingham et al. 2007; Parvataneni et al. 2009), y existe un estudio donde han logrado aislar linfocitos T antígeno-específicos de las lesiones de la piel (van Reijssen et al. 1998). Tampoco se descarta que en los niños con alergia alimentaria a leche de vaca la sensibilización se produzca a través de las proteínas lácteas presentes en cremas y aceites que frecuentemente se emplean desde edades muy tempranas.

Una alternativa terapéutica aquí estudiada fue el empleo de ***bacterias del género Actinomycetales muertas por calor***. De los resultados obtenidos se puede concluir que estas bacterias tienen un efecto inmunomodulador sobre la inmunidad innata, específicamente sobre la inducción de una quimioquina pro-inflamatoria temprana, CCL20, en las células epiteliales activadas, la cual es capaz de atraer al foco inflamatorio células dendríticas en primera instancia y linfocitos T más tardíamente. Es ampliamente conocido que en la inducción de la inmunidad innata el sistema inmune define la impronta de la inmunidad adaptativa que posteriormente se inducirá. Por esta razón estudiamos el efecto que 3 especies de bacterias del género Actinomycetales (*Gordonia bronchialis*, *Rhodococcus coprophillus* y *Tsukamurella inchonensis*) ejercen *in vitro* e *in vivo* sobre el proceso inflamatorio, y sobre las reacciones alérgicas.

Además hemos demostrado que la inhibición en la expresión de CCL20 ejercida por las bacterias Actinomycetales es consecuencia de la inhibición de la vía de NF- κ B. Este efecto inhibitorio sería inducido por el contacto entre la cubierta de las bacterias muertas y la superficie de las células epiteliales, sin la necesidad de la traslocación de la bacteria al citosol de la célula. Para el caso de *Gordonia bronchialis* hemos demostrado experimentalmente que la inhibición de la traslocación de p65 al núcleo de la célula que se está activando, estaría vinculado a un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno. Los Actinomycetales ejercen este efecto inhibitorio a través de uno o más receptores que se encuentran presentes en la membrana de la célula tanto en estado de reposo como en estado activado. Desconocemos al momento la naturaleza del mismo.

La caracterización *in vitro* de las propiedades supresoras de las bacterias Actinomycetales fue complementada *in vivo*, a través del estudio del efecto anti-inflamatorio

de estas bacterias empleando el modelo murino de alergia alimentaria. De esta manera la administración oral de las bacterias logró disminuir las manifestaciones clínicas asociadas a procesos de hipersensibilidad, desarrollados cuando los animales “alérgicos” fueron expuestos a proteínas de leche bovina. Asimismo observamos una disminución en la expresión intestinal de CCL20, en los niveles séricos de IgE y en la producción de citoquinas Th2. Estos resultados demuestran el poder inmunomodulatorio que ejercen estas bacterias sobre la inmunidad innata y adaptativa, y lo que es más importante, sobre los síntomas. Estos resultados podrían constituir la base experimental que permita comprender los efectos anti-inflamatorios e inmunomoduladores obtenidos al aplicar las distintas especies de Actinomycetales en humanos y en distintas especies animales, en enfermedades inflamatorias y asociadas a procesos de stress.

Como último objetivo, en este trabajo hemos demostrado que la **reactividad cruzada** entre proteínas de leche de vaca y proteínas de soja detectada *in vitro* puede tener una expresión clínica *in vivo*. Estos hallazgos permiten comprender la intolerancia a alergenos de soja desarrollados por pacientes alérgicos a PLV que son tratados con fórmulas a base de soja durante la restricción dietaria. A pesar que los epitopes B inmunogénicos pueden ser postulados a través de herramientas bioinformáticas, es necesario realizar ensayos *in vivo* para estudiar su relevancia clínica, dado que la sola presencia de anticuerpos IgE séricos no es suficiente para producir una respuesta clínica frente a la exposición al alergeno (F Ferreira et al. 2004). En nuestro modelo encontramos que los ratones sensibilizados a proteínas de leche bovina, que no han sido previamente expuestos a proteínas de soja, desarrollaron síntomas de hipersensibilidad luego del desafío oral con proteínas de soja. A través de los resultados de las pruebas cutáneas podemos afirmar que los epitopes presentes en los alergenos de soja son capaces de producir el entrecruzamiento de al menos dos receptores Fcε RI de las células sensibilizadas que poseen en su superficie IgE específica a PLV, con la consecuente respuesta inflamatoria. Estos resultados además brindan importante información sobre las características inmunogénicas y antigénicas de los alergenos de reactividad cruzada. Por otro lado, los ensayos de proliferación antígeno específico confirman la existencia de epitopes T. Por lo tanto hemos demostrado, empleando como herramienta biológica al modelo murino de alergia alimentaria a leche de vaca, que los alergenos de soja que ingresan por el tracto gastrointestinal son capaces de atravesar la barrera epitelial, se encuentran en circulación y

mantienen una conformación en la cual los epitopes B y T están accesibles a los distintos componentes del sistema inmune de las mucosas y sistémico.

A partir de estos resultados, nos propusimos emplear el modelo murino para estudiar protocolos y condiciones de inducción de *tolerancia oral* antígeno-específica, como una potencial inmunoterapia a aplicar en enfermedades alérgicas. De esta manera logramos, a través de la administración oral de PLV o PS, inducir mecanismos de tolerancia oral a nivel de la mucosa intestinal, previniendo la posterior sensibilización intragástrica con PLV y TC, y lo que es más relevante la inducción de signos clínicos asociados a reacciones de hipersensibilidad cuando los animales sensibilizados fueron expuestos al alergeno por la vía oral.

Los resultados preliminares que nos permitieron comprender las bases moleculares y celulares de los mecanismos inducidos demostraron que la administración previa de los alergenos por vía oral indujo la presencia de linfocitos T CD4⁺ Foxp3⁺ en GALT (Treg inducibles), células que estarían involucradas en la inhibición de la reacción alérgica. Estos resultados preliminares son alentadores para continuar estudiando la optimización de una posible terapia tolerogénica empleando alergenos de reactividad cruzada, lo cual nos permitirá la desensibilización conjunta a 2 sistemas alérgicos que producen patología, principalmente en la población pediátrica, con una alta incidencia. La inmunoterapia alérgico-específica empleando alergenos intactos ha sido estudiada en modelos animales y en pacientes, sin embargo este tipo de terapia presenta el riesgo de la inducción de efectos adversos dado que se enfrenta al paciente sensibilizado con el alergeno nocivo (Rolland, Gardner, y O’Hehir 2009; Pajno 2011; Kopac et al. 2012).

Desde el punto de vista terapéutico, la detección de epitopes T antígeno-específicos y de reactividad cruzada es más relevante que los anticuerpos. La inmunoterapia con péptidos de leche o soja que contienen epitopes T puede ser usada para modular la respuesta inmune celular por medio de la generación de LT regulatorios que pueden modular la respuesta Th2 sistémica y mucosal específica (Verhoef et al. 2005; J. D. Campbell et al. 2009). Por lo tanto, la identificación de péptidos conteniendo epitopes T arroja importante información a ser aplicada en el desarrollo de “vacunas T”. La administración por distintas vías mucosales constituye en la actualidad una forma segura y efectiva de vacunación en comparación con las vías sistémicas que se han empleado desde hace muchos años. El empleo de modelos animales para probar la eficacia de estas vacunas puede sentar las bases experimentales para la inducción de tolerancia inmune antígeno-específica. Por lo tanto la optimización de

protocolos en los que el antígeno sea expuesto directamente en la mucosa, puede tener un importante impacto en el desarrollo de nuevas terapias inmunomodulatorias a aplicar en humanos. Estudios de este tipo se han probado con éxito en modelos animales de enfermedades autoinmunes (Whitacre et al. 2004), alergias respiratorias (Takagi et al. 2005) y alergias alimentarias (K Adel-Patient et al. 2011; Rupa y Mine 2012). En humanos en los últimos años la inmunoterapia oral o sublingual ha resultado ser eficaz en distintos sistemas, y se observa que los pacientes logran tolerar cantidades crecientes de alergenos (Takaiwa 2007; Domon et al. 2009; Kopac et al. 2012). Estos resultados han sido eficientes en un rango de situaciones que van desde evitar reacciones alérgicas frente a contactos accidentales con el alergen, hasta tolerar totalmente la exposición natural al mismo (Buchanan et al. 2007; Staden et al. 2007; Keet et al. 2011). El trabajo de Staden (Staden et al. 2007) fue el primer ensayo clínico controlado con alergen de huevo. Para alergia a leche de vaca se ha observado en los últimos años que en estos pacientes la tolerancia natural se alcanza a edades más tardías, presenta una mayor tendencia a ser persistente y suele ocasionar anafilaxia (S Allan Bock, Muñoz-Furlong, y Sampson 2007; Pumphrey y Gowland 2007). Por lo tanto resulta altamente deseable desarrollar u optimizar nuevas terapias para intervenir en esta patología. Se han realizado estudios empleando leche de vaca en distintas dosis, doble ciego y con placebo, en pacientes mayores de 5 años (G. Longo et al. 2008; Skripak et al. 2008; Pajno 2011), lográndose un incremento en el umbral de contacto con el alergen para inducir una reacción alérgica, con un incremento en los niveles séricos de IgG4. Sin embargo, el hecho que en estos estudios se observe la aparición de reacciones adversas impulsa al desarrollo de nuevos estudios para mejorar la seguridad y la eficacia de este tipo de inmunointervenciones (Keet et al.2011).

A partir de los resultados presentados en el presente trabajo de Tesis se desprenden las siguientes *conclusiones finales*:

- ✓ La sensibilización de ratones de la cepa BALB/c con proteínas de leche de vaca y toxina colérica por vía oral, genera una activación Th2 antígeno-específica a nivel humoral, celular y de la mucosa intestinal, lo que se asemeja a la patología observada en humanos.

- ✓ Validación del modelo murino como herramienta biológica:
 - La vía subcutánea para el tratamiento con proteínas de leche de vaca no es útil, ya que genera un estado de sensibilización y una activación del sistema inmune a través de una respuesta Th2 específica.

 - El tratamiento intranasal e intragástrico con Omp-16 permitió modular la respuesta Th2, a través de la inducción de una respuesta Th1 específica y la disminución de los signos clínicos asociados a mecanismos de hipersensibilidad.

 - Las bacterias del género Actinomycetales modulan *in vivo* e *in vitro* la inflamación intestinal inhibiendo la vía de NF-κB en enterocitos y en el modelo murino de alergia alimentaria. En este caso la administración oral de estas bacterias indujo la reducción en la secreción de IgE específica, la producción de citoquinas Th2 y disminuyó la aparición de signos clínicos asociados a mecanismos de hipersensibilidad.

 - El modelo murino de alergia alimentaria a proteínas de leche bovina permitió caracterizar *in vivo* de la reactividad cruzada entre proteínas de leche de vaca y proteínas de soja previamente descripta *in vitro*.

 - Mediante la administración oral de alérgenos de leche de vaca o de soja, y empleando el modelo murino de alergia alimentaria, logramos inducir mecanismos de tolerancia cruzada a nivel de intestino que posibilitaron la

Conclusiones finales

disminución de los signos clínicos asociados a reacciones alérgicas al exponer a los animales a alergenos de leche bovina

Por lo tanto, consideramos que los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo de Tesis serán de utilidad para los próximos estudios que permitan sentar las bases experimentales de potenciales terapias inmunomodulatorias o tolerogénicas a aplicar en enfermedades alérgicas.

Bibliografía



- Aalberse, R C, y R Van Ree. 2000. «Monoclonal antibody assays for allergens: pick your antibodies with care!» *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 106 (4) (Octubre): 625-626. doi:10.1067/mai.2000.110226.
- Adel-Patient, K, S Ah-Leung, C Creminon, S Nouaille, J-M Chatel, P Langella, y J-M Wal. 2005. «Oral administration of recombinant *Lactococcus lactis* expressing bovine beta-lactoglobulin partially prevents mice from sensitization». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 35 (4) (Abril): 539-546. doi:10.1111/j.1365-2222.2005.02225.x.
- Adel-Patient, K, M-A Nahori, B Proust, J R Lapa e Silva, C Créminon, J-M Wal, y B B Vargaftig. 2003. «Elicitation of the allergic reaction in beta-lactoglobulin-sensitized Balb/c mice: biochemical and clinical manifestations differ according to the structure of the allergen used for challenge». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 33 (3) (Marzo): 376-385.
- Adel-Patient, K, S Wavrin, H Bernard, N Meziti, S Ah-Leung, y J-M Wal. 2011. «Oral tolerance and Treg cells are induced in BALB/c mice after gavage with bovine β -lactoglobulin». *Allergy* 66 (10) (Octubre): 1312-1321. doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02653.x.
- Adel-Patient, Karine, Sandrine Ah-Leung, Hervé Bernard, Coralie Durieux-Alexandrenne, Christophe Créminon, y Jean-Michel Wal. 2007. «Oral sensitization to peanut is highly enhanced by application of peanut extracts to intact skin, but is prevented when CpG and cholera toxin are added». *International Archives of Allergy and Immunology* 143 (1): 10-20. doi:10.1159/000098221.
- Agren, L C, L Ekman, B Löwenadler, y N Y Lycke. 1997. «Genetically engineered nontoxic vaccine adjuvant that combines B cell targeting with immunomodulation by cholera toxin A1 subunit». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 158 (8) (Abril 15): 3936-3946.
- Akdis, Mübeccel, Kurt Blaser, y Cezmi A Akdis. 2006. «T regulatory cells in allergy». *Chemical Immunology and Allergy* 91: 159-173. doi:10.1159/000090279.
- Akdis, Mübeccel, y Cezmi A Akdis. 2007. «Mechanisms of allergen-specific immunotherapy». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119 (4) (Abril): 780-791. doi:10.1016/j.jaci.2007.01.022.
- . 2009. «Therapeutic manipulation of immune tolerance in allergic disease». *Nature Reviews. Drug Discovery* 8 (8) (Agosto): 645-660. doi:10.1038/nrd2653.
- Aliprantis, A O, R B Yang, M R Mark, S Suggett, B Devaux, J D Radolf, G R Klimpel, P Godowski, y A Zychlinsky. 1999. «Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2». *Science (New York, N.Y.)* 285 (5428) (Julio 30): 736-739.
- Al-Shami, Amin, Rosanne Spolski, John Kelly, Andrea Keane-Myers, y Warren J Leonard. 2005. «A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model». *The Journal of Experimental Medicine* 202 (6) (Septiembre 19): 829-839. doi:10.1084/jem.20050199.
- Alvarez, David, Janine L Arkinson, Jiangfeng Sun, Ramzi Fattouh, Tina Walker, y Manel Jordana. 2007. «Th2 differentiation in distinct lymph nodes influences the site of mucosal Th2 immune-inflammatory responses». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (5) (Septiembre 1): 3287-3296.
- Anjuère, Fabienne, Carmelo Luci, Michael Lebens, Déborah Rousseau, Catherine Hervouet, Geneviève Milon, Jan Holmgren, Carlos Ardavin, y Cecil Czerkinsky. 2004. «In vivo adjuvant-induced mobilization and maturation of gut dendritic cells after oral administration of cholera toxin». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173 (8) (Octubre 15): 5103-5111.
- Arkwright, P D, y T J David. 2001. «Intradermal administration of a killed *Mycobacterium vaccae* suspension (SRL 172) is associated with improvement in atopic dermatitis in children with moderate-to-severe disease». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 107 (3) (Marzo): 531-534. doi:10.1067/mai.2001.113081.
- Asero, R, L Antonicelli, A Arena, L Bommarito, B Caruso, G Colombo, M Crivellaro, et al. 2009. «Causes of food-induced anaphylaxis in Italian adults: a multi-centre study». *International Archives of Allergy and Immunology* 150 (3): 271-277. doi:10.1159/000222679.
- Asero, Riccardo, Barbara K Ballmer-Weber, Kirsten Beyer, Amedeo Conti, Ruta Dubakiene, Montserrat Fernandez-Rivas, Karin Hoffmann-Sommergruber, et al. 2007. «IgE-mediated food allergy diagnosis: Current status and new perspectives». *Molecular Nutrition & Food Research* 51 (1) (Enero): 135-147. doi:10.1002/mnfr.200600132.

- Assa'ad, Amal H, Sandeep K Gupta, Margaret H Collins, Mike Thomson, Amy T Heath, Deborah A Smith, Teresa L Perschy, Cynthia H Jurgensen, Hector G Ortega, y Seema S Aceves. 2011. «An antibody against IL-5 reduces numbers of esophageal intraepithelial eosinophils in children with eosinophilic esophagitis». *Gastroenterology* 141 (5) (Noviembre): 1593-1604. doi:10.1053/j.gastro.2011.07.044.
- Atkinson, H A, y K Miller. 1994. «Assessment [correction of Assessment] of the brown Norway rat as a suitable model for the investigation of food allergy». *Toxicology* 91 (3) (Agosto 12): 281-288.
- Ballmer-Weber, Barbara K, Thomas Holzhauser, Joseph Scibilia, Diana Mittag, Guliana Zisa, Claudio Ortolani, Morten Oesterballe, Lars K Poulsen, Stefan Vieths, y Carsten Bindslev-Jensen. 2007. «Clinical characteristics of soybean allergy in Europe: a double-blind, placebo-controlled food challenge study». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119 (6) (Junio): 1489-1496. doi:10.1016/j.jaci.2007.01.049.
- Bambou, Jean-Christophe, Antoine Giraud, Sandrine Menard, Bernadette Begue, Sabine Rakotobe, Martine Heyman, François Taddei, Nadine Cerf-Bensussan, y Valérie Gaboriau-Routhiau. 2004. «In vitro and ex vivo activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal Escherichia coli strain». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (41) (Octubre 8): 42984-42992. doi:10.1074/jbc.
- Bandyopadhyaya, Arunava, Madhubanti Sarkar, y Keya Chaudhuri. 2007. «Transcriptional upregulation of inflammatory cytokines in human intestinal epithelial cells following Vibrio cholerae infection». *The FEBS Journal* 274 (17) (Septiembre): 4631-4642. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05991.x.
- Bannon, G A, G Cockrell, C Connaughton, C M West, R Helm, J S Stanley, N King, P Rabjohn, H A Sampson, y A W Burks. 2001. «Engineering, characterization and in vitro efficacy of the major peanut allergens for use in immunotherapy». *International Archives of Allergy and Immunology* 124 (1-3) (Marzo): 70-72.
- Barnes, P J, y M Karin. 1997. «Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases». *The New England Journal of Medicine* 336 (15) (Abril 10): 1066-1071. doi:10.1056/NEJM199704103361506.
- Bauer, A, S Ekanayake Mudiyansele, W Wigger-Alberti, y P Elsner. 1999. «Oral rush desensitization to milk». *Allergy* 54 (8) (Agosto): 894-895.
- Behrens, Marshall D, Wolfgang M Wagner, Christopher J Krco, Courtney L Erskine, Kimberly R Kalli, James Krempski, Ekram A Gad, Mary L Disis, y Keith L Knutson. 2008. «The endogenous danger signal, crystalline uric acid, signals for enhanced antibody immunity». *Blood* 111 (3) (Febrero 1): 1472-1479. doi:10.1182/blood-2007-10-117184.
- Benhamou, Avigael H, Michela G Schäppi Tempia, Dominique C Belli, y Philippe A Eigenmann. 2009. «An overview of cow's milk allergy in children». *Swiss Medical Weekly* 139 (21-22) (Mayo 30): 300-307. doi:smw-12258.
- Berin, M C, y L Mayer. 2009. «Immunophysiology of experimental food allergy». *Mucosal Immunology* 2 (1) (Enero): 24-32. doi:10.1038/mi.2008.72.
- Berin, M Cecilia, y Wayne G Shreffler. 2008. «T(H)2 adjuvants: implications for food allergy». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121 (6) (Junio): 1311-1320; quiz 1321-1322. doi:10.1016/j.jaci.2008.04.023.
- Beyer, Kirsten, Russell Castro, Audrey Birnbaum, Keith Benkov, Nanci Pittman, y Hugh A Sampson. 2002. «Human milk-specific mucosal lymphocytes of the gastrointestinal tract display a TH2 cytokine profile». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 109 (4) (Abril): 707-713.
- Birmingham, Neil Patrick, Sitaram Parvataneni, Hanem M Ahmed Hassan, Jack Harkema, Sridhar Samineni, Lalitha Navuluri, Caleb James Kelly, y Venu Gangur. 2007. «An adjuvant-free mouse model of tree nut allergy using hazelnut as a model tree nut». *International Archives of Allergy and Immunology* 144 (3): 203-210. doi:10.1159/000103993.
- Bock, S A, W Y Lee, L Remigio, A Holst, y C D May. 1978. «Appraisal of skin tests with food extracts for diagnosis of food hypersensitivity». *Clinical Allergy* 8 (6) (Noviembre): 559-564.
- Bock, S Allan, Anne Muñoz-Furlong, y Hugh A Sampson. 2007. «Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food, 2001-2006». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119 (4) (Abril): 1016-1018. doi:10.1016/j.jaci.2006.12.622.
- Bohle, B, A Radakovics, D Lüttkopf, B Jahn-Schmid, S Vieths, y C Ebner. 2005. «Characterization of the T cell response to the major hazelnut allergen, Cor a 1.04: evidence for a relevant T cell epitope not cross-reactive with homologous pollen allergens». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 35 (10) (Octubre): 1392-1399. doi:10.1111/j.1365-2222.2005.02332.x.

- Bottasso, O, G Docena, J L Stanford, y J M Grange. 2009. «Chronic inflammation as a manifestation of defects in immunoregulatory networks: implications for novel therapies based on microbial products». *Inflammopharmacology* 17 (4) (Agosto): 193-203. doi:10.1007/s10787-009-0008-x.
- Bouma, Gerd, y Warren Strober. 2003. «The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease». *Nature Reviews. Immunology* 3 (7) (Julio): 521-533. doi:10.1038/nri1132.
- Boumiza, Radhia, Anne-Lise Debard, y Guillaume Monneret. 2005. «The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives». *Clinical and molecular allergy: CMA* 3 (Junio 30): 9. doi:10.1186/1476-7961-3-9.
- Boyano-Martínez, Teresa, Carmen García-Ara, José María Díaz-Pena, y Manuel Martín-Esteban. 2002. «Prediction of tolerance on the basis of quantification of egg white-specific IgE antibodies in children with egg allergy». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 110 (Agosto): 304-309. doi:10.1067/mai.2002.126081.
- Boyle, R J, F J Bath-Hextall, J Leonardi-Bee, D F Murrell, y M L-K Tang. 2009. «Probiotics for the treatment of eczema: a systematic review». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 39 (8) (Agosto): 1117-1127. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03305.x.
- Bradford, M M. 1976. «A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding». *Analytical Biochemistry* 72 (Mayo 7): 248-254.
- Brandt, Eric B, Troy A Scribner, Hiroko Saito Akei, y Marc E Rothenberg. 2006. «Experimental gastrointestinal allergy enhances pulmonary responses to specific and unrelated allergens». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 118 (2) (Agosto): 420-427. doi:10.1016/j.jaci.2006.06.009.
- Brandtzaeg, P E R. 2002. «Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy». *Annals of the New York Academy of Sciences* 964 (Mayo): 13-45.
- Branum, Amy M, y Susan L Lukacs. 2009. «Food allergy among children in the United States». *Pediatrics* 124 (6) (Diciembre): 1549-1555. doi:10.1542/peds.2009-1210.
- Brewer, James M. 2006. «(How) do aluminium adjuvants work?» *Immunology Letters* 102 (1) (Enero 15): 10-15. doi:10.1016/j.imlet.2005.08.002.
- Briner, T J, M C Kuo, K M Keating, B L Rogers, y J L Greenstein. 1993. «Peripheral T-cell tolerance induced in naive and primed mice by subcutaneous injection of peptides from the major cat allergen Fel d 1». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (16) (Agosto 15): 7608-7612.
- Broide, David H. 2009. «Immunomodulation of allergic disease». *Annual Review of Medicine* 60: 279-291. doi:10.1146/annurev.med.60.041807.123524.
- Bromander, A, J Holmgren, y N Lycke. 1991. «Cholera toxin stimulates IL-1 production and enhances antigen presentation by macrophages in vitro». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 146 (9) (Mayo 1): 2908-2914.
- Brunner, R, J Wallmann, K Szalai, P Karagiannis, T Kopp, O Scheiner, E Jensen-Jarolim, y I Pali-Schöll. 2007. «The impact of aluminium in acid-suppressing drugs on the immune response of BALB/c mice». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 37 (10) (Octubre): 1566-1573. doi:10.1111/j.1365-2222.2007.02813.x.
- Buchanan, Ariana D, Todd D Green, Stacie M Jones, Amy M Scurlock, Lynn Christie, Karen A Althage, Pamela H Steele, et al. 2007. «Egg oral immunotherapy in nonanaphylactic children with egg allergy». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119 (1) (Enero): 199-205. doi:10.1016/j.jaci.2006.09.016.
- Campbell, J J, C E Brightling, F A Symon, S Qin, K E Murphy, M Hodge, D P Andrew, L Wu, E C Butcher, y A J Wardlaw. 2001. «Expression of chemokine receptors by lung T cells from normal and asthmatic subjects». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 166 (4) (Febrero 15): 2842-2848.
- Campbell, John D, Karen F Buckland, Sarah J McMillan, Jennifer Kearley, William L G Oldfield, Lawrence J Stern, Hans Grönlund, et al. 2009. «Peptide immunotherapy in allergic asthma generates IL-10-dependent immunological tolerance associated with linked epitope suppression». *The Journal of Experimental Medicine* 206 (7) (Julio 6): 1535-1547. doi:10.1084/jem.20082901.
- Camporota, L, A Corkhill, H Long, J Lordan, L Stanciu, N Tuckwell, A Cross, et al. 2003. «The effects of Mycobacterium vaccae on allergen-induced airway responses in atopic asthma». *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 21 (2) (Febrero): 287-293.

- Cardoso, C R, P R Provinciatio, D F Godoi, T S Vieira, B R Ferreira, G Teixeira, M A Rossi, F Q Cunha, y J S Silva. 2008. «B cells are involved in the modulation of pathogenic gut immune response in food-allergic enteropathy». *Clinical and Experimental Immunology* 154 (2) (Noviembre): 153-161. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03748.x.
- Carlson, S A, D K Meyerholz, T J Stabel, y B D Jones. 2001. «Secretion of a putative cytotoxin in multiple antibiotic resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT104». *Microbial Pathogenesis* 31 (4) (Octubre): 201-204. doi:10.1006/mpat.2001.0461.
- Ceska, M. 1981. «Radioimmunoassay of IgE using paper disks». *Methods in Enzymology* 73 (Pt B): 646-656.
- Chariot, Alain. 2006. «20 years of NF-kappaB». *Biochemical Pharmacology* 72 (9) (Octubre 30): 1051-1053. doi:10.1016/j.bcp.2006.08.023.
- Chen, WanJun, Wenwen Jin, Neil Hardegen, Ke-Jian Lei, Li Li, Nancy Marinos, George McGrady, y Sharon M Wahl. 2003. «Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3». *The Journal of Experimental Medicine* 198 (12) (Diciembre 15): 1875-1886. doi:10.1084/jem.20030152.
- Chen, Xiao-Wei, Ken Wan-Keung Lau, Fan Yang, Samuel Sai-Ming Sun, y Ming-Chiu Fung. 2011. «An adjuvant free mouse model of oral allergenic sensitization to rice seeds protein». *BMC Gastroenterology* 11 (Mayo 23): 62. doi:10.1186/1471-230X-11-62.
- Chirido, F G, M Rumbo, M C Añón, y C A Fossati. 1998. «Presence of high levels of non-degraded gliadin in breast milk from healthy mothers». *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 33 (11) (Noviembre): 1186-1192.
- Cianferoni, Antonella, y Antonella Muraro. 2012. «Food-induced anaphylaxis». *Immunology and Allergy Clinics of North America* 32 (1) (Febrero): 165-195. doi:10.1016/j.iac.2011.10.002.
- Cianferoni, Antonella, y Jonathan M Spergel. 2009. «Food allergy: review, classification and diagnosis». *Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology* 58 (4) (Diciembre): 457-466. doi:10.2332/allergolint.09-RAI-0138.
- Cochrane, S, K Beyer, M Clausen, M Wjst, R Hiller, C Nicoletti, Z Szepefalusi, et al. 2009. «Factors influencing the incidence and prevalence of food allergy». *Allergy* 64 (9) (Septiembre): 1246-1255. doi:10.1111/j.1398-9995.2009.02128.x.
- Collier-Hyams, Lauren S., Valerie Sloane, Brigid C. Batten, y Andrew S. Neish. 2005. «Cutting Edge: Bacterial Modulation of Epithelial Signaling via Changes in Neddylation of Cullin-1». *The Journal of Immunology* 175 (7) (Octubre 1): 4194-4198.
- Comstock, Sarah S, Laurel J Gershwin, y Suzanne S Teuber. 2010. «Effect of walnut (*Juglans regia*) polyphenolic compounds on ovalbumin-specific IgE induction in female BALB/c mice». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1190 (Marzo): 58-69. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05274.x.
- Coombes, Janine L, y Fiona Powrie. 2008. «Dendritic cells in intestinal immune regulation». *Nature Reviews. Immunology* 8 (6) (Junio): 435-446. doi:10.1038/nri2335.
- Corren, Jonathan. 2011. «Anti-interleukin-5 antibody therapy in asthma and allergies». *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 11 (6) (Diciembre): 565-570. doi:10.1097/ACI.0b013e32834c3d30.
- Corrigan, C J, A Jayaratnam, Y Wang, Y Liu, R de Waal Malefyt, Q Meng, A B Kay, S Phipps, T H Lee, y S Ying. 2009. «Early production of thymic stromal lymphopoietin precedes infiltration of dendritic cells expressing its receptor in allergen-induced late phase cutaneous responses in atopic subjects». *Allergy* 64 (7) (Julio): 1014-1022. doi:10.1111/j.1398-9995.2009.01947.x.
- Cortes-Perez, Naima G, Sandrine Ah-Leung, Luis G Bermúdez-Humarán, Gérard Corthier, Jean-Michel Wal, Philippe Langella, y Karine Adel-Patient. 2007. «Intranasal coadministration of live lactococci producing interleukin-12 and a major cow's milk allergen inhibits allergic reaction in mice». *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 14 (3) (Marzo): 226-233. doi:10.1128/CVI.00299-06.
- Curciarello, R, J F Lareu, C A Fossati, G H Docena, y S Petrucci. 2008. «Immunochemical characterization of Glycine max L. Merr. var Raiden, as a possible hypoallergenic substitute for cow's milk-allergic patients». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 38 (9) (Septiembre): 1559-1565. doi:10.1111/j.1365-2222.2008.03062.x.
- Curotto de Lafaille, M A, S Muriglian, M J Sunshine, Y Lei, N Kutchukhidze, G C Furtado, A K Wensky, D Olivares-Villagómez, y J J Lafaille. 2001. «Hyper immunoglobulin E response in mice with monoclonal populations of B and T lymphocytes». *The Journal of Experimental Medicine* 194 (9) (Noviembre 5): 1349-1359.

- Curotto de Lafaille, Maria A, Nino Kutchukhidze, Shiqian Shen, Yi Ding, Herman Yee, y Juan J Lafaille. 2008. «Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation». *Immunity* 29 (1) (Julio 18): 114-126. doi:10.1016/j.immuni.2008.05.010.
- Dahlin, Joakim S, Martin A Ivarsson, Birgitta Heyman, y Jenny Hallgren. 2011. «IgE immune complexes stimulate an increase in lung mast cell progenitors in a mouse model of allergic airway inflammation». *PloS One* 6 (5): e20261. doi:10.1371/journal.pone.0020261.
- Davila, Hector, Griselda Didoli, Oscar Bottasso, y John Stanford. 2011. «Maternal immunization with actinomycetales immunomodulators reduces parasitemias in offspring challenged with *Trypanosoma cruzi*». *Immunotherapy* 3 (4) (Abril): 577-583. doi:10.2217/imt.11.14.
- Dearman, R J, y I Kimber. 2009. «Animal models of protein allergenicity: potential benefits, pitfalls and challenges». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 39 (4) (Abril): 458-468. doi:10.1111/j.1365-2222.2008.03194.x.
- Dioszeghy, Vincent, Lucie Mondoulet, Véronique Dhelft, Mélanie Ligouis, Emilie Puteaux, Pierre-Henri Benhamou, y Christophe Dupont. 2011. «Epicutaneous immunotherapy results in rapid allergen uptake by dendritic cells through intact skin and downregulates the allergen-specific response in sensitized mice». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186 (10) (Mayo 15): 5629-5637. doi:10.4049/jimmunol.1003134.
- Dlugovitzky, Diana, Rodolfo Notario, Diego Martinel-Lamas, Gladys Fiorenza, Miguel Farroni, Christina Bogue, Cynthia Stanford, y John Stanford. 2010. «Immunotherapy with oral, heat-killed, *Mycobacterium vaccae* in patients with moderate to advanced pulmonary tuberculosis». *Immunotherapy* 2 (2) (Marzo): 159-169. doi:10.2217/imt.09.90.
- Docena, G H, R Fernandez, F G Chirido, y C A Fossati. 1996. «Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk». *Allergy* 51 (6) (Junio): 412-416.
- Docena, G, P Rozenfeld, R Fernández, y C A Fossati. 2002. «Evaluation of the residual antigenicity and allergenicity of cow's milk substitutes by in vitro tests». *Allergy* 57 (2) (Febrero): 83-91.
- Domon, Eiji, Hidenori Takagi, Sakiko Hirose, Koichi Sugita, Saori Kasahara, Hiroyasu Ebinuma, y Fumio Takaiwa. 2009. «26-Week oral safety study in macaques for transgenic rice containing major human T-cell epitope peptides from Japanese cedar pollen allergens». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (12) (Junio 24): 5633-5638. doi:10.1021/jf900371u.
- Durham, S R, V A Varney, M Gaga, M R Jacobson, E M Varga, A J Frew, y A B Kay. 1999. «Grass pollen immunotherapy decreases the number of mast cells in the skin». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 29 (11) (Noviembre): 1490-1496.
- Elson, C O, y W Ealding. 1984. «Generalized systemic and mucosal immunity in mice after mucosal stimulation with cholera toxin». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 132 (6) (Junio): 2736-2741.
- Enrique, Ernesto, Fernando Pineda, Tamim Malek, Joan Bartra, María Basagaña, Raquel Tella, José Vicente Castelló, et al. 2005. «Sublingual immunotherapy for hazelnut food allergy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study with a standardized hazelnut extract». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 116 (5) (Noviembre): 1073-1079. doi:10.1016/j.jaci.2005.08.027.
- Eriksson, Kristina, Margareta Fredriksson, Inger Nordström, y Jan Holmgren. 2003. «Cholera toxin and its B subunit promote dendritic cell vaccination with different influences on Th1 and Th2 development». *Infection and Immunity* 71 (4) (Abril): 1740-1747.
- Ermel, R W, M Kock, S M Griffey, G A Reinhart, y O L Frick. 1997. «The atopic dog: a model for food allergy». *Laboratory Animal Science* 47 (1) (Febrero): 40-49.
- Feillet, Héléne, y Jean-François Bach. 2004. «Increased incidence of inflammatory bowel disease: the price of the decline of infectious burden?». *Current Opinion in Gastroenterology* 20 (6) (Noviembre): 560-564.
- Di Felice, Gabriella, Bianca Barletta, Cinzia Buteroni, Silvia Corinti, Raffaella Tinghino, Paolo Colombo, y Monica Boirivant. 2008. «Use of probiotic bacteria for prevention and therapy of allergic diseases: studies in mouse model of allergic sensitization». *Journal of Clinical Gastroenterology* 42 Suppl 3 Pt 1 (Septiembre): S130-132. doi:10.1097/MCG.0b013e318169c463.
- Feng, T, y C O Elson. 2011. «Adaptive immunity in the host-microbiota dialog». *Mucosal Immunol* 4 (1) (Enero): 15-21.

- Fernández-Rivas, M, S Garrido Fernández, J A Nadal, M D Alonso Díaz de Durana, B E García, E González-Mancebo, S Martín, D Barber, P Rico, y A I Tabar. 2009. «Randomized double-blind, placebo-controlled trial of sublingual immunotherapy with a Pru p 3 quantified peach extract». *Allergy* 64 (6) (Junio): 876-883. doi:10.1111/j.1398-9995.2008.01921.x.
- Ferreira, F, T Hawranek, P Gruber, N Wopfner, y A Mari. 2004. «Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic». *Allergy* 59 (3) (Marzo): 243-267. doi:10.1046/j.1398-9995.2003.00407.x.
- Finkelman, Fred D, Marc E Rothenberg, Eric B Brandt, Suzanne C Morris, y Richard T Strait. 2005. «Molecular mechanisms of anaphylaxis: lessons from studies with murine models». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115 (3) (Marzo): 449-457; quiz 458. doi:10.1016/j.jaci.2004.12.1125.
- Finkelman, Fred D, y Marsha Wills-Karp. 2008. «Usefulness and optimization of mouse models of allergic airway disease». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121 (3) (Marzo): 603-606. doi:10.1016/j.jaci.2008.01.008.
- Finotto, Susetta, Markus F Neurath, Jonathan N Glickman, Shixin Qin, Hans A Lehr, Francis H Y Green, Kate Ackerman, et al. 2002. «Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet». *Science (New York, N.Y.)* 295 (5553) (Enero 11): 336-338. doi:10.1126/science.1065544.
- Fitzsimmons, Colin M, y David W Dunne. 2009. «Survival of the fittest: allergology or parasitology?» *Trends in Parasitology* 25 (10) (Octubre): 447-451. doi:10.1016/j.pt.2009.07.004.
- Fontanella, G H, M F Pascutti, L Daurelio, A R Perez, A L Nocito, D Wojdyla, O Bottasso, S S Revelli, y J L Stanford. 2007. «Improved outcome of *Trypanosoma cruzi* infection in rats following treatment in early life with suspensions of heat-killed environmental Actinomycetales». *Vaccine* 25 (17) (Abril 30): 3492-3500. doi:10.1016/j.vaccine.2006.11.062.
- Foucard, T, y I Malmheden Yman. 1999. «A study on severe food reactions in Sweden--is soy protein an underestimated cause of food anaphylaxis?» *Allergy* 54 (3) (Marzo): 261-265.
- Fox, Adam T, Peter Sasieni, George du Toit, Huma Syed, y Gideon Lack. 2009. «Household peanut consumption as a risk factor for the development of peanut allergy». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123 (2) (Febrero): 417-423. doi:10.1016/j.jaci.2008.12.014.
- Frossard, Christophe P, Laurence Tropia, Conrad Hauser, y Philippe A Eigenmann. 2004. «Lymphocytes in Peyer patches regulate clinical tolerance in a murine model of food allergy». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113 (5) (Mayo): 958-964. doi:10.1016/j.jaci.2003.12.017.
- Gagliardi, Maria Cristina, y Maria Teresa De Magistris. 2003. «Maturation of human dendritic cells induced by the adjuvant cholera toxin: role of cAMP on chemokine receptor expression». *Vaccine* 21 (9-10) (Febrero 14): 856-861.
- Ganeshan, Kirthana, Colleen V Neilsen, April Hadsaitong, Robert P Schleimer, Xunrong Luo, y Paul J Bryce. 2009. «Impairing oral tolerance promotes allergy and anaphylaxis: a new murine food allergy model». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123 (1) (Enero): 231-238.e4. doi:10.1016/j.jaci.2008.10.011.
- Garton, Natalie J, y Iain C Sutcliffe. 2006. «Identification of a lipoarabinomannan-like lipoglycan in the actinomycete *Gordonia bronchialis*». *Archives of Microbiology* 184 (6) (Febrero): 425-427. doi:10.1007/s00203-005-0050-z.
- Gavin, Amanda L, Kasper Hoebe, Bao Duong, Takayuki Ota, Christopher Martin, Bruce Beutler, y David Nemazee. 2006. «Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling». *Science (New York, N.Y.)* 314 (5807) (Diciembre 22): 1936-1938. doi:10.1126/science.1135299.
- Gell PGH, Coombs RRA. 1963. *Clinical Aspects of Immunology*. 1o ed. Oxford, England: Blackwell.
- Gerstmayr, Marianne, Nicola Ilk, Irma Schabussova, Beatrice Jahn-Schmid, Eva M Egelseer, Uwe B Sleytr, Christof Ebner, y Barbara Bohle. 2007. «A novel approach to specific allergy treatment: the recombinant allergen-S-layer fusion protein rSbsC-Bet v 1 matures dendritic cells that prime Th0/Th1 and IL-10-producing regulatory T cells». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (11) (Diciembre 1): 7270-7275.
- Giambartolomei, Guillermo H, M Victoria Delpino, Mariela E Cahanovich, Jorge C Wallach, Pablo C Baldi, Carlos A Velikovskiy, y Carlos A Fossati. 2002. «Diminished production of T helper 1 cytokines correlates with T cell unresponsiveness to *Brucella* cytoplasmic proteins in chronic human brucellosis». *The Journal of Infectious Diseases* 186 (2) (Julio 15): 252-259. doi:10.1086/341449.
- Giambartolomei, Guillermo H, Astrid Zwerdling, Juliana Cassataro, Laura Bruno, Carlos A Fossati, y Mario T Philipp. 2004. «Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173 (7) (Octubre 1): 4635-4642.

- Gizzarelli, F, S Corinti, B Barletta, P Iacovacci, B Brunetto, C Butteroni, C Afferni, et al. 2006. «Evaluation of allergenicity of genetically modified soybean protein extract in a murine model of oral allergen-specific sensitization». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 36 (2) (Febrero): 238-248. doi:10.1111/j.1365-2222.2005.02415.x.
- Gonipeta, Babu, Sitaram Parvataneni, Pranati Paruchuri, y Venu Gangur. 2010. «Long-term characteristics of hazelnut allergy in an adjuvant-free mouse model». *International Archives of Allergy and Immunology* 152 (3): 219-225. doi:10.1159/000283028.
- Grindebacke, H, K Wing, A-C Andersson, E Suri-Payer, S Rak, y A Rudin. 2004. «Defective suppression of Th2 cytokines by CD4CD25 regulatory T cells in birch allergics during birch pollen season». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 34 (9) (Septiembre): 1364-1372. doi:10.1111/j.1365-2222.2004.02067.x.
- Gronbach, Kerstin, Ute Eberle, Martina Müller, Tobias A Olschläger, Ulrich Dobrindt, Frank Leithäuser, Jan Hendrik Niess, et al. 2010. «Safety of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 depends on intestinal microbiota and adaptive immunity of the host». *Infection and Immunity* 78 (7) (Julio): 3036-3046. doi:10.1128/IAI.00218-10.
- Halmepuro, L, K Vuontela, K Kalimo, y F Björkstén. 1984. «Cross-reactivity of IgE antibodies with allergens in birch pollen, fruits and vegetables». *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 74 (3): 235-240.
- van Halteren, A G, M J van der Cammen, J Biewenga, H F Savelkoul, y G Kraal. 1997. «IgE and mast cell response on intestinal allergen exposure: a murine model to study the onset of food allergy». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 99 (1 Pt 1) (Enero): 94-99.
- Hansrani, Monica, John Stanford, Graham McIntyre, Oscar Bottasso, y Gerard Stansby. 2010. «Immunotherapy for the prevention of myointimal hyperplasia after experimental balloon injury of the rat carotid artery». *Angiology* 61 (5) (Julio): 437-442. doi:10.1177/0003319710366128.
- Harada, Michishige, Kumiko Magara-Koyanagi, Hiroshi Watarai, Yuko Nagata, Yasuyuki Ishii, Satoshi Kojo, Shigetoshi Horiguchi, et al. 2006. «IL-21-induced Bepsilon cell apoptosis mediated by natural killer T cells suppresses IgE responses». *The Journal of Experimental Medicine* 203 (13) (Diciembre 25): 2929-2937. doi:10.1084/jem.20062206.
- Hauet-Broere, Femke, Wendy W J Unger, Johan Garssen, Maarten A Hoijs, Georg Kraal, y Janneke N Samsom. 2003. «Functional CD25- and CD25+ mucosal regulatory T cells are induced in gut-draining lymphoid tissue within 48 h after oral antigen application». *European Journal of Immunology* 33 (10) (Octubre): 2801-2810. doi:10.1002/eji.200324115.
- Hayden, M S, A P West, y S Ghosh. 2006. «NF-kappaB and the immune response». *Oncogene* 25 (51) (Octubre 30): 6758-6780. doi:10.1038/sj.onc.1209943.
- He, F, A C Ouwehand, E Isolauri, H Hashimoto, Y Benno, y S Salminen. 2001. «Comparison of mucosal adhesion and species identification of bifidobacteria isolated from healthy and allergic infants». *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 30 (1) (Febrero): 43-47.
- He, Rui, Michiko K Oyoshi, Lilit Garibyan, Lalit Kumar, Steven F Ziegler, y Raif S Geha. 2008. «TSLP acts on infiltrating effector T cells to drive allergic skin inflammation». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (33) (Agosto 19): 11875-11880. doi:10.1073/pnas.0801532105.
- Helm, Ricki M, y A Wesley Burks. 2002. «Animal models of food allergy». *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2 (6) (Diciembre): 541-546. doi:10.1097/01.all.0000044541.45448.bb.
- Hershberg, R M, y L F Mayer. 2000. «Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity». *Immunology Today* 21 (3) (Marzo): 123-128.
- van den Heuvel, M M, D D Vanhee, P E Postmus, E C Hoefsmit, y R H Beelen. 1998. «Functional and phenotypic differences of monocyte-derived dendritic cells from allergic and nonallergic patients». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 101 (1 Pt 1) (Enero): 90-95. doi:10.1016/S0091-6749(98)70198-8.
- Hiromura, Yayoi, Tsunao Kishida, Hiroshi Nakano, Takemitsu Hama, Jiro Imanishi, Yasuo Hisa, y Osam Mazda. 2007. «IL-21 administration into the nostril alleviates murine allergic rhinitis». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (10) (Noviembre 15): 7157-7165.

- Hol, Jeroen, Eduard H G van Leer, Beatrix E E Elink Schuurman, Lilian F de Ruiter, Janneke N Samsom, Wim Hop, Herman J Neijens, Johan C de Jongste, y Edward E S Nieuwenhuis. 2008. «The acquisition of tolerance toward cow's milk through probiotic supplementation: a randomized, controlled trial». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121 (6) (Junio): 1448-1454. doi:10.1016/j.jaci.2008.03.018.
- Honda, K, y K Takeda. 2009. «Regulatory mechanisms of immune responses to intestinal bacteria». *Mucosal Immunology* 2 (3) (Mayo): 187-196. doi:10.1038/mi.2009.8.
- Horner, W Elliott. 2003. «Assessment of the indoor environment: evaluation of mold growth indoors». *Immunology and Allergy Clinics of North America* 23 (3) (Agosto): 519-531.
- Høst, Arne, Susanne Halken, Hans P Jacobsen, Anne E Christensen, Anne M Herskind, y Karin Plesner. 2002. «Clinical course of cow's milk protein allergy/intolerance and atopic diseases in childhood». *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 13 Suppl 15: 23-28.
- Huber, Samuel, Christoph Schramm, Hans A Lehr, Amrit Mann, Steffen Schmitt, Christoph Becker, Martina Protschka, Peter R Galle, Markus F Neurath, y Manfred Blessing. 2004. «Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173 (11) (Diciembre 1): 6526-6531.
- Hunninghake, Gary M, Jessica Lasky-Su, Manuel E Soto-Quirós, Lydiana Avila, Catherine Liang, Stephen L Lake, Thomas J Hudson, et al. 2008. «Sex-stratified linkage analysis identifies a female-specific locus for IgE to cockroach in Costa Ricans». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 177 (8) (Abril 15): 830-836. doi:10.1164/rccm.200711-1697OC.
- Isolauri, E. 2000. «The use of probiotics in paediatrics». *Hospital Medicine (London, England: 1998)* 61 (1) (Enero): 6-7.
- Iwakura, Yoichiro, y Harumichi Ishigame. 2006. «The IL-23/IL-17 axis in inflammation». *Journal of Clinical Investigation* 116 (5) (Mayo 1): 1218-1222. doi:10.1172/JCI28508.
- Iyer, Chandra, Astrid Kosters, Gautam Sethi, Ajaikumar B Kunnumakkara, Bharat B Aggarwal, y James Versalovic. 2008. «Probiotic *Lactobacillus reuteri* promotes TNF-induced apoptosis in human myeloid leukemia-derived cells by modulation of NF-kappaB and MAPK signalling». *Cellular Microbiology* 10 (7) (Julio): 1442-1452. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01137.x.
- Jaffar, Zeina, Thamayanthi Sivakuru, y Kevan Roberts. 2004. «CD4+CD25+ T cells regulate airway eosinophilic inflammation by modulating the Th2 cell phenotype». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172 (6) (Marzo 15): 3842-3849.
- Jahn-Schmid, Beatrice, Michael Hauser, Nicole Wopfner, Peter Briza, Uwe E Berger, Riccardo Asero, Christof Ebner, Fatima Ferreira, y Barbara Bohle. 2012. «Humoral and Cellular Cross-Reactivity between Amb a 1, the Major Ragweed Pollen Allergen, and Its Mugwort Homolog Art v 6». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 188 (3) (Febrero 1): 1559-1567. doi:10.4049/jimmunol.1102445.
- Jahn-Schmid, Beatrice, Nicole Wopfner, Gudrun Hubinger, Riccardo Asero, Christof Ebner, Fatima Ferreira, y Barbara Bohle. 2010. «The T-cell response to Amb a 1 is characterized by 3 dominant epitopes and multiple MHC restriction elements». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 126 (5) (Noviembre): 1068-1071, 1071.e1-2. doi:10.1016/j.jaci.2010.05.038.
- Jarmoc, L M, y W A Primack. 1987. «Anaphylaxis to cutaneous exposure to milk protein in a diaper rash ointment». *Clinical Pediatrics* 26 (3) (Marzo): 154-155.
- Järvinen, K. -M, K. Beyer, L. Vila, L. Bardina, M. Mishoe, y H. A Sampson. 2007. «Specificity of IgE antibodies to sequential epitopes of hen's egg ovomucoid as a marker for persistence of egg allergy». *Allergy* 62 (7) (Julio 1): 758-765. doi:10.1111/j.1398-9995.2007.01332.x.
- Järvinen, Kirsi M. 2011. «Food-induced anaphylaxis». *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 11 (3) (Junio): 255-261. doi:10.1097/ACI.0b013e32834694d8.
- Johansson, S.G.O, Thomas Bieber, Ronald Dahl, Peter S Friedmann, Bobby Q Lanier, Richard F Lockey, Cassim Motala, Jose A Ortega Martell, Thomas A.E Platts-Mills, y Johannes Ring. 2004. «Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113 (Mayo): 832-836. doi:10.1016/j.jaci.2003.12.591.

- Karlsson, Malin R, Jarle Rugtveit, y Per Brandtzaeg. 2004. «Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy». *The Journal of Experimental Medicine* 199 (12) (Junio 21): 1679-1688. doi:10.1084/jem.20032121.
- Kashyap, Mohit, Yrina Rochman, Rosanne Spolski, Leigh Samsel, y Warren J Leonard. 2011. «Thymic stromal lymphopoietin is produced by dendritic cells». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 187 (3) (Agosto 1): 1207-1211. doi:10.4049/jimmunol.1100355.
- Kattan, Jacob D, Renata R Cocco, y Kirsi M Järvinen. 2011. «Milk and soy allergy». *Pediatric Clinics of North America* 58 (2) (Abril): 407-426, x. doi:10.1016/j.pcl.2011.02.005.
- Kay, A B. 1988. «Leucocytes in asthma». *Immunological Investigations* 17 (8-9) (Diciembre): 679-705.
- Keet, Corinne A., Pamela A. Frischmeyer-Guerrero, Ananth Thyagarajan, John T. Schroeder, Robert G. Hamilton, Stephen Boden, Pamela Steele, Sarah Driggers, A. Wesley Burks, y Robert A. Wood. «The safety and efficacy of sublingual and oral immunotherapy for milk allergy». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (0). doi:10.1016/j.jaci.2011.10.023. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674911016551>.
- King, Nina, Ricki Helm, J Steven Stanley, Stefan Vieths, Dirk Lüttkopf, Lina Hatahet, Hugh Sampson, Laurent Pons, Wesley Burks, y Gary A Bannon. 2005. «Allergenic characteristics of a modified peanut allergen». *Molecular Nutrition & Food Research* 49 (10) (Octubre): 963-971. doi:10.1002/mnfr.200500073.
- Kishida, Tsunao, Yayoi Hiramura, Masaharu Shin-Ya, Hidetsugu Asada, Hiroko Kuriyama, Manabu Sugai, Akira Shimizu, et al. 2007. «IL-21 induces inhibitor of differentiation 2 and leads to complete abrogation of anaphylaxis in mice». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (12) (Diciembre 15): 8554-8561.
- Kitagawa, S, S Zhang, Y Harari, y G A Castro. 1995. «Relative allergenicity of cow's milk and cow's milk-based formulas in an animal model». *The American Journal of the Medical Sciences* 310 (5) (Noviembre): 183-187.
- Kitajima, Masayuki, Hai-Chon Lee, Toshinori Nakayama, y Steven F Ziegler. 2011. «TSLP enhances the function of helper type 2 cells». *European Journal of Immunology* 41 (7) (Julio): 1862-1871. doi:10.1002/eji.201041195.
- Kleine-Tebbe, Jörg, Lothar Vogel, Dring N Crowell, Uwe-Frithjof Haustein, y Stefan Vieths. 2002. «Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a Bet v 1- related PR-10 protein in soybean, SAM22». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 110 (5) (Noviembre): 797-804.
- Klemola, Timo, Kirsti Kalimo, Tuija Poussa, Kaisu Juntunen-Backman, Riitta Korpela, Erkkä Valovirta, y Timo Vanto. 2005. «Feeding a soy formula to children with cow's milk allergy: the development of immunoglobulin E-mediated allergy to soy and peanuts». *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 16 (8) (Diciembre): 641-646. doi:10.1111/j.1399-3038.2005.00326.x.
- Klemola, Timo, Timo Vanto, Kaisu Juntunen-Backman, Kirsti Kalimo, Riitta Korpela, y Elina Varjonen. 2002. «Allergy to soy formula and to extensively hydrolyzed whey formula in infants with cow's milk allergy: a prospective, randomized study with a follow-up to the age of 2 years». *The Journal of Pediatrics* 140 (2) (Febrero): 219-224. doi:10.1067/mpd.2002.121935.
- Kneepkens, C M Frank, y Yolanda Meijer. 2009. «Clinical practice. Diagnosis and treatment of cow's milk allergy». *European Journal of Pediatrics* 168 (8) (Agosto): 891-896. doi:10.1007/s00431-009-0955-7.
- Knittelfelder, Regina, Angelika B Riemer, y Erika Jensen-Jarolim. 2009. «Mimotope vaccination--from allergy to cancer». *Expert Opinion on Biological Therapy* 9 (4) (Abril): 493-506. doi:10.1517/14712590902870386.
- Kool, Mirjam, Virginie Pétrilli, Thibaut De Smedt, Aline Rolaz, Hamida Hammad, Menno van Nimwegen, Ingrid M Bergen, Rosa Castillo, Bart N Lambrecht, y Jürg Tschopp. 2008. «Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181 (6) (Septiembre 15): 3755-3759.
- Kool, Mirjam, Thomas Soullié, Menno van Nimwegen, Monique A M Willart, Femke Muskens, Steffen Jung, Henk C Hoogsteden, Hamida Hammad, y Bart N Lambrecht. 2008. «Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells». *The Journal of Experimental Medicine* 205 (4) (Abril 14): 869-882. doi:10.1084/jem.20071087.
- Kopac, P, M Rudin, T Gentinetta, R Gerber, Ch Pichler, O Hausmann, B Schnyder, y W J Pichler. 2012. «Continuous apple consumption induces oral tolerance in birch-pollen-associated apple allergy». *Allergy* 67 (2) (Febrero): 280-285. doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02744.x.

- Kosma, Paraskevi, Sigrid Sjölander, Eva Landgren, Magnus P Borres, y Gunilla Hedlin. 2011. «Severe reactions after the intake of soy drink in birch pollen-allergic children sensitized to Gly m 4». *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)* 100 (2) (Febrero): 305-306. doi:10.1111/j.1651-2227.2010.02049.x.
- Krug, A, A Towarowski, S Britsch, S Rothenfusser, V Hornung, R Bals, T Giese, et al. 2001. «Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12». *European Journal of Immunology* 31 (10) (Octubre): 3026-3037. doi:10.1002/1521-4141(200110)31:10<#60;3026::AID-IMMU3026>#62;3.0.CO;2-H.
- Kufe, Donald W. 2008. «Targeting the human MUC1 oncoprotein: a tale of two proteins». *Cancer Biology & Therapy* 7 (1) (Enero): 81-84.
- Kumar, Amrita, Huixia Wu, Lauren S Collier-Hyams, Jason M Hansen, Tengguo Li, Kosj Yamoah, Zhen-Qiang Pan, Dean P Jones, y Andrew S Neish. 2007. «Commensal bacteria modulate cullin-dependent signaling via generation of reactive oxygen species». *The EMBO Journal* 26 (21) (Octubre 31): 4457-4466. doi:10.1038/sj.emboj.7601867.
- Kwissa, Marcin, Sudhir Pai Kasturi, y Bali Pulendran. 2007. «The science of adjuvants». *Expert Review of Vaccines* 6 (5) (Octubre): 673-684. doi:10.1586/14760584.6.5.673.
- Laemmli, U K. 1970. «Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4». *Nature* 227 (5259) (Agosto 15): 680-685.
- Lahti, A, F Björkstén, y M Hannuksela. 1980. «Allergy to birch pollen and apple, and cross-reactivity of the allergens studied with the RAST». *Allergy* 35 (4) (Junio): 297-300.
- Lambrecht, Bart N, Mirjam Kool, Monique A M Willart, y Hamida Hammad. 2009. «Mechanism of action of clinically approved adjuvants». *Current Opinion in Immunology* 21 (1) (Febrero): 23-29. doi:10.1016/j.coi.2009.01.004.
- Larché, Mark. 2006. «Peptide immunotherapy». *Immunology and Allergy Clinics of North America* 26 (2) (Mayo): 321-332, viii. doi:10.1016/j.iac.2006.02.005.
- Ledoux, David, Vincent J Labombardi, y Dennis Karter. 2006. «Lactobacillus acidophilus bacteraemia after use of a probiotic in a patient with AIDS and Hodgkin's disease». *International Journal of STD & AIDS* 17 (4) (Abril): 280-282. doi:10.1258/095646206776253507.
- Lee, D J, H Tighe, M Corr, M Roman, D A Carson, H L Spiegelberg, y E Raz. 1997. «Inhibition of IgE antibody formation by plasmid DNA immunization is mediated by both CD4+ and CD8+ T cells». *International Archives of Allergy and Immunology* 113 (1-3) (Julio): 227-230.
- Lee, Hai-Chon, y Steven F Ziegler. 2007. «Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by NFkappaB». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (3) (Enero 16): 914-919. doi:10.1073/pnas.0607305104.
- Lee, Jongdae, Ji-Hun Mo, Kyoko Katakura, Irit Alkalay, Adam N Rucker, Yu-Tsueng Liu, Hyun-Ku Lee, et al. 2006. «Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells». *Nature Cell Biology* 8 (12) (Diciembre): 1327-1336. doi:10.1038/ncb1500.
- Lee, S Y, C K Huang, T F Zhang, B H Schofield, A W Burks, G A Bannon, H A Sampson, y X M Li. 2001. «Oral administration of IL-12 suppresses anaphylactic reactions in a murine model of peanut hypersensitivity». *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 101 (2) (Noviembre): 220-228. doi:10.1006/clim.2001.5122.
- Lehrer, A, A Bressanelli, V Wachsmann, O Bottasso, M L Bay, M Singh, C Stanford, y J Stanford. 1998. «Immunotherapy with Mycobacterium vaccae in the treatment of psoriasis». *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 21 (1) (Mayo): 71-77.
- Letterio, J J, y A B Roberts. 1998. «Regulation of immune responses by TGF-beta». *Annual Review of Immunology* 16: 137-161. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.137.
- Li, Hongxing, Mirna Chegade, Weicheng Liu, Huabao Xiong, Lloyd Mayer, y M Cecilia Berin. 2007. «Allergen-IgE complexes trigger CD23-dependent CCL20 release from human intestinal epithelial cells». *Gastroenterology* 133 (6) (Diciembre): 1905-1915. doi:10.1053/j.gastro.2007.09.024.
- Li, X M, G Kleiner, C K Huang, S Y Lee, B Schofield, N A Soter, y H A Sampson. 2001. «Murine model of atopic dermatitis associated with food hypersensitivity». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 107 (4) (Abril): 693-702. doi:10.1067/mai.2001.114110.

- Li, X M, B H Schofield, C K Huang, G I Kleiner, y H A Sampson. 1999. «A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 103 (2 Pt 1) (Febrero): 206-214.
- Li, X M, D Serebrisky, S Y Lee, C K Huang, L Bardina, B H Schofield, J S Stanley, A W Burks, G A Bannon, y H A Sampson. 2000. «A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 106 (1 Pt 1) (Julio): 150-158. doi:10.1067/mai.2000.107395.
- Li, X M, T F Zhang, C K Huang, K Srivastava, A A Teper, L Zhang, B H Schofield, y H A Sampson. 2001. «Food Allergy Herbal Formula-1 (FAHF-1) blocks peanut-induced anaphylaxis in a murine model». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 108 (4) (Octubre): 639-646. doi:10.1067/mai.2001.118787.
- Li, Xiu-Min, Kamal Srivastava, Alexander Grishin, Chih-Kang Huang, Brian Schofield, Wesley Burks, y Hugh A Sampson. 2003. «Persistent protective effect of heat-killed *Escherichia coli* producing "engineered," recombinant peanut proteins in a murine model of peanut allergy». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 112 (1) (Julio): 159-167.
- Lin, Xiao Ping, Jenny Magnusson, Staffan Ahlstedt, Anna Dahlman-Höglund, Lars A Hanson L, Olle Magnusson, Ulf Bengtsson, y Esbjörn Telemo. 2002. «Local allergic reaction in food-hypersensitive adults despite a lack of systemic food-specific IgE». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 109 (5) (Mayo): 879-887.
- Ling, Eleanor M, Trevor Smith, X Dao Nguyen, Carol Pridgeon, Margaret Dallman, Justine Arbery, Victoria A Carr, y Douglas S Robinson. 2004. «Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease». *Lancet* 363 (9409) (Febrero 21): 608-615. doi:10.1016/S0140-6736(04)15592-X.
- Londres, Maria Isabela, Filipe W Sarinho, Paulo J Miranda, Dirceu Solé, y Emanuel Sarinho. 2011. «Allergy to cockroaches: challenges in diagnosis». *Clinical Laboratory* 57 (11-12): 969-974.
- Longo, Giorgio, Egidio Barbi, Irene Berti, Rosanna Meneghetti, Angela Pittalis, Luca Ronfani, y Alessandro Ventura. 2008. «Specific oral tolerance induction in children with very severe cow's milk-induced reactions». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121 (2) (Febrero): 343-347. doi:10.1016/j.jaci.2007.10.029.
- Lycke, Nils. 2005. «From toxin to adjuvant: basic mechanisms for the control of mucosal IgA immunity and tolerance». *Immunology Letters* 97 (2) (Marzo 15): 193-198. doi:10.1016/j.imlet.2004.12.008.
- Macdonald, Thomas T, y Giovanni Monteleone. 2005. «Immunity, inflammation, and allergy in the gut». *Science (New York, N.Y.)* 307 (5717) (Marzo 25): 1920-1925. doi:10.1126/science.1106442.
- MacDonald, Thomas T, y Antonio Di Sabatino. 2009. «The immunologic basis for gastrointestinal food allergy». *Current Opinion in Gastroenterology* 25 (6) (Noviembre): 521-526. doi:10.1097/MOG.0b013e3283306236.
- Maecker, H T, G Hansen, D M Walter, R H DeKruyff, S Levy, y D T Umetsu. 2001. «Vaccination with allergen-IL-18 fusion DNA protects against, and reverses established, airway hyperreactivity in a murine asthma model». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 166 (2) (Enero 15): 959-965.
- Majamaa, H, y E Isolauri. 1997. «Probiotics: a novel approach in the management of food allergy». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 99 (2) (Febrero): 179-185.
- Maldonado-López, R, y M Moser. 2001. «Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses». *Seminars in Immunology* 13 (5) (Octubre): 275-282. doi:10.1006/smim.2001.0323.
- Marcondes Rezende, M, I Hassing, M Bol-Schoenmakers, R Bleumink, L Boon, J van Bilsen, y R Pieters. 2011. «CD4(+) CD25(+) T regulatory cells do not transfer oral tolerance to peanut allergens in a mouse model of peanut allergy». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 41 (9) (Septiembre): 1324-1333. doi:10.1111/j.1365-2222.2010.03662.x.
- Mari, A, P Ooievaar-de Heer, E Scala, M Giani, L Pirrotta, L Zuidmeer, D Bethell, y R van Ree. 2008. «Evaluation by double-blind placebo-controlled oral challenge of the clinical relevance of IgE antibodies against plant glycans». *Allergy* 63 (7) (Julio): 891-896. doi:10.1111/j.1398-9995.2008.01703.x.
- Marro, Alicia, Mónica Pirles, Laura Schiaffino, Liliana Bin, Héctor Dávila, Oscar A Bottasso, Graham McIntyre, Paul R Ripley, Cynthia A Stanford, y John L Stanford. 2011. «Successful immunotherapy of canine flea allergy with injected Actinomycetales preparations». *Immunotherapy* 3 (8) (Agosto): 971-978. doi:10.2217/imt.11.93.

- Mayer, Lloyd. 2003. «Mucosal immunity». *Pediatrics* 111 (6 Pt 3) (Junio): 1595-1600.
- Mayorga, C, M L Sanz, P M Gamboa, B E García, M T Caballero, J M García, M Labrador, et al. 2010. «In vitro diagnosis of immediate allergic reactions to drugs: an update». *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology: Official Organ of the International Association of Asthmology (INTERASMA) and Sociedad Latinoamericana De Alergia E Inmunología* 20 (2): 103-109.
- McClain, Scott, y Gary A Bannon. 2006. «Animal models of food allergy: opportunities and barriers». *Current Allergy and Asthma Reports* 6 (2) (Marzo): 141-144.
- McGuirk, Peter, Sarah C Higgins, y Kingston H G Mills. 2010. «The role of regulatory T cells in respiratory infections and allergy and asthma». *Current Allergy and Asthma Reports* 10 (1) (Enero): 21-28. doi:10.1007/s11882-009-0078-2.
- Meglio, Paolo, Paolo G Giampietro, Simona Gianni, y Elena Galli. 2008. «Oral desensitization in children with immunoglobulin E-mediated cow's milk allergy--follow-up at 4 yr and 8 months». *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 19 (5) (Agosto): 412-419. doi:10.1111/j.1399-3038.2007.00670.x.
- Mempel, Thorsten R, Sarah E Henrickson, y Ulrich H Von Andrian. 2004. «T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases». *Nature* 427 (6970) (Enero 8): 154-159. doi:10.1038/nature02238.
- Milgrom, H, R B Fick Jr, J Q Su, J D Reimann, R K Bush, M L Watrous, y W J Metzger. 1999. «Treatment of allergic asthma with monoclonal anti-IgE antibody. rhuMAb-E25 Study Group». *The New England Journal of Medicine* 341 (26) (Diciembre 23): 1966-1973. doi:10.1056/NEJM199912233412603.
- Mittag, Diana, Jaap Akkerdaas, Barbara K Ballmer-Weber, Lothar Vogel, Marjolein Wensing, Wolf-Meinhard Becker, Stef J Koppelman, et al. 2004. «Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114 (6) (Diciembre): 1410-1417. doi:10.1016/j.jaci.2004.09.014.
- Mittag, Diana, Stefan Vieths, Lothar Vogel, Wolf-Meinhard Becker, Hans-Peter Rihs, Arthur Helbling, Brunello Wüthrich, y Barbara K Ballmer-Weber. 2004. «Soybean allergy in patients allergic to birch pollen: clinical investigation and molecular characterization of allergens». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113 (1) (Enero): 148-154. doi:10.1016/j.jaci.2003.09.030.
- Mohapatra, Shyam S, Momina Qazi, y Gary Hellermann. 2010. «Immunotherapy for allergies and asthma: present and future». *Current Opinion in Pharmacology* 10 (3) (Junio): 276-288. doi:10.1016/j.coph.2010.05.012.
- Morafo, Vivian, Kamal Srivastava, Chih-Kang Huang, Gary Kleiner, Soo-Young Lee, Hugh A Sampson, y AndXiu-Min Li. 2003. «Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential TH2-TH1 responses in C3H/HeJ and BALB/c mice». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111 (5) (Mayo): 1122-1128.
- Morisset, M, D A Moneret-Vautrin, L Guenard, J M Cuny, P Frenzt, R Hatahet, Ch Hanss, E Beaudouin, N Petit, y G Kanny. 2007. «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». *European Annals of Allergy and Clinical Immunology* 39 (1) (Enero): 12-19.
- Morjaria, Jaymin B, Gnanasekaran Gnanakumaran, y Kesavan Suresh Babu. 2007. «Anti-IgE in allergic asthma and rhinitis: an update». *Expert Opinion on Biological Therapy* 7 (11) (Noviembre): 1739-1747. doi:10.1517/14712598.7.11.1739.
- Moser, M, y K M Murphy. 2000. «Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development». *Nature Immunology* 1 (3) (Septiembre): 199-205. doi:10.1038/79734.
- Mosmann, T R, H Cherwinski, M W Bond, M A Giedlin, y R L Coffman. 1986. «Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 136 (7) (Abril 1): 2348-2357.
- Mowat, Allan McI, Anne M Donachie, Lucy A Parker, Neil C Robson, Helen Beacock-Sharp, Lindsay J McIntyre, Owain Millington, y Fernando Chirido. 2003. «The role of dendritic cells in regulating mucosal immunity and tolerance». *Novartis Foundation Symposium* 252: 291-302; discussion 302-305.
- Mucida, Daniel, Nino Kutchukhidze, Agustin Erazo, Momtchilo Russo, Juan J Lafaille, y Maria A Curotto de Lafaille. 2005. «Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs». *The Journal of Clinical Investigation* 115 (7) (Julio): 1923-1933. doi:10.1172/JCI24487.

- Nelson, H S, J Lahr, R Rule, A Bock, y D Leung. 1997. «Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 99 (6 Pt 1) (Junio): 744-751.
- Nenci, Arianna, Christoph Becker, Andy Wullaert, Ralph Gareus, Geert van Loo, Silvio Danese, Marion Huth, et al. 2007. «Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation». *Nature* 446 (7135) (Marzo 29): 557-561. doi:10.1038/nature05698.
- Nicholson, Grant C, Harsha H Kariyawasam, Andrew J Tan, Jens M Hohlfeld, Deborah Quinn, Christoph Walker, David Rodman, et al. 2011. «The effects of an anti-IL-13 mAb on cytokine levels and nasal symptoms following nasal allergen challenge». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 128 (4) (Octubre): 800-807.e9. doi:10.1016/j.jaci.2011.05.013.
- Niggemann, B, U Staden, C Rolinck-Werninghaus, y K Beyer. 2006. «Specific oral tolerance induction in food allergy». *Allergy* 61 (7) (Julio): 808-811. doi:10.1111/j.1398-9995.2006.01066.x.
- Nowak-Wegrzyn, Anna. 2003. «Future approaches to food allergy». *Pediatrics* 111 (6 Pt 3) (Junio): 1672-1680.
- O'Hara, Ann M, Pdraig O'Regan, Aine Fanning, Caitlin O'Mahony, John Macsharry, Anne Lyons, John Bienenstock, Liam O'Mahony, y Fergus Shanahan. 2006. «Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*». *Immunology* 118 (2) (Junio): 202-215. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02358.x.
- Oberhuber, Christina, Yan Ma, Justin Marsh, Neil Rigby, Ursula Smole, Christian Radauer, Stefano Alessandri, et al. 2008. «Purification and characterisation of relevant natural and recombinant apple allergens». *Molecular Nutrition & Food Research* 52 Suppl 2 (Noviembre): S208-219. doi:10.1002/mnfr.200700522.
- Ocmant, A, S Mulier, L Hanssens, M Goldman, G Casimir, F Mascart, y L Schandené. 2009. «Basophil activation tests for the diagnosis of food allergy in children». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 39 (8) (Agosto): 1234-1245. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03292.x.
- Okada, H, C Kuhn, H Feillet, y J-F Bach. 2010. «The “hygiene hypothesis” for autoimmune and allergic diseases: an update». *Clinical and Experimental Immunology* 160 (1) (Abril): 1-9. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04139.x.
- Omori, Miyuki, y Steven Ziegler. 2007. «Induction of IL-4 expression in CD4(+) T cells by thymic stromal lymphopoietin». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178 (3) (Febrero 1): 1396-1404.
- Oppenheimer, J J, H S Nelson, S A Bock, F Christensen, y D Y Leung. 1992. «Treatment of peanut allergy with rush immunotherapy». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 90 (2) (Agosto): 256-262.
- Osborn, D A, y J Sinn. 2004. «Soy formula for prevention of allergy and food intolerance in infants». *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)* (3): CD003741. doi:10.1002/14651858.CD003741.pub2.
- . 2006. «Soy formula for prevention of allergy and food intolerance in infants». *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)* (4): CD003741. doi:10.1002/14651858.CD003741.pub4.
- Oyoshi, Michiko K, Abdallah Elkhail, Jordan E Scott, Marc-Andre Wurbel, Jason L Hornick, James J Campbell, y Raif S Geha. 2011. «Epicutaneous challenge of orally immunized mice redirects antigen-specific gut-homing T cells to the skin». *The Journal of Clinical Investigation* 121 (6) (Junio 1): 2210-2220. doi:10.1172/JCI43586.
- Pajno, Giovanni B. 2011. «Oral desensitization for milk allergy in children: state of the art». *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 11 (6) (Diciembre): 560-564. doi:10.1097/ACI.0b013e32834cd298.
- Palmer, Kricia, y Wesley Burks. 2006. «Current developments in peanut allergy». *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 6 (3) (Junio): 202-206. doi:10.1097/01.all.0000225161.60274.31.
- Parvataneni, Sitaram, Babu Gonipeta, Robert J Tempelman, y Venu Gangur. 2009. «Development of an adjuvant-free cashew nut allergy mouse model». *International Archives of Allergy and Immunology* 149 (4): 299-304. doi:10.1159/000205575.
- Pascual, Cristina Y, Marta Reche, Ana Fiandor, Teresa Valbuena, Teresa Cuevas, y Manuel Martin Esteban. 2008. «Fish allergy in childhood». *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 19 (7) (Noviembre): 573-579. doi:10.1111/j.1399-3038.2008.00822.x.

- Pasquevich, Karina A, Silvia M Estein, Clara García Samartino, Clara García Samartino, Astrid Zwerdling, Lorena M Coria, Paula Barrionuevo, Carlos A Fossati, Guillermo H Giambartolomei, y Juliana Cassataro. 2009. «Immunization with recombinant *Brucella* species outer membrane protein Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD4+ and CD8+ T cells as well as systemic and oral protection against *Brucella abortus* infection». *Infection and Immunity* 77 (1) (Enero): 436-445. doi:10.1128/IAI.01151-08.
- Pasquevich, Karina A, Clara García Samartino, Lorena M Coria, Silvia M Estein, Astrid Zwerdling, Andrés E Ibañez, Paula Barrionuevo, et al. 2010. «The protein moiety of *Brucella abortus* outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells in vivo, induces a Th1 immune response, and is a promising self-adjuncting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184 (9) (Mayo 1): 5200-5212. doi:10.4049/jimmunol.0902209.
- Patriarca, G, E Nucera, C Roncallo, E Pollastrini, F Bartolozzi, T De Pasquale, A Buonomo, G Gasbarrini, C Di Campli, y D Schiavino. 2003. «Oral desensitizing treatment in food allergy: clinical and immunological results». *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 17 (3) (Febrero): 459-465.
- Patriarca, G, D Schiavino, E Nucera, G Schinco, A Milani, y G B Gasbarrini. 1998. «Food allergy in children: results of a standardized protocol for oral desensitization». *Hepato-Gastroenterology* 45 (19) (Febrero): 52-58.
- Pecquet, S, A Pfeifer, S Gaudie, y R Fritsché. 1999. «Immunoglobulin E suppression and cytokine modulation in mice orally tolerized to beta-lactoglobulin». *Immunology* 96 (2) (Febrero): 278-285.
- Peng, Sandy, Jin-Yuarn Lin, y Meei-Yn Lin. 2007. «Antiallergic effect of milk fermented with lactic acid bacteria in a murine animal model». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (13) (Junio 27): 5092-5096. doi:10.1021/jf062869s.
- Perrigoue, Jacqueline G, Steven A Saenz, Mark C Siracusa, Eric J Allenspach, Betsy C Taylor, Paul R Giacomin, Meera G Nair, et al. 2009. «MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity». *Nature Immunology* 10 (7) (Julio): 697-705. doi:10.1038/ni.1740.
- Perry, Tamara T, Elizabeth C Matsui, Mary K Conover-Walker, y Robert A Wood. 2004. «Risk of oral food challenges». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114 (5) (Noviembre): 1164-1168. doi:10.1016/j.jaci.2004.07.063.
- Pons, Laurent, Usha Ponnappan, Renée A Hall, Pippa Simpson, Gael Cockrell, C Michael West, Hugh A Sampson, Ricki M Helm, y A Wesley Burks. 2004. «Soy immunotherapy for peanut-allergic mice: modulation of the peanut-allergic response». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114 (4) (Octubre): 915-921. doi:10.1016/j.jaci.2004.06.049.
- Préfontaine, D, A-A Banville-Langelier, P-O Fiset, J Guay, J An, M Mazer, Q Hamid, y B D Mazer. 2010. «Children with atopic histories exhibit impaired lipopolysaccharide-induced Toll-like receptor-4 signalling in peripheral monocytes». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 40 (11) (Noviembre): 1648-1657. doi:10.1111/j.1365-2222.2010.03570.x.
- Presser, Katrin, Dorothee Schwinge, Michael Wegmann, Samuel Huber, Steffen Schmitt, Alexander Quaas, Joachim H Maxeiner, et al. 2008. «Coexpression of TGF-beta1 and IL-10 enables regulatory T cells to completely suppress airway hyperreactivity». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181 (11) (Diciembre 1): 7751-7758.
- Pumphrey, Richard S H, y M Hazel Gowland. 2007. «Further fatal allergic reactions to food in the United Kingdom, 1999-2006». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119 (4) (Abril): 1018-1019. doi:10.1016/j.jaci.2007.01.021.
- Rabe, K F, W J Calhoun, N Smith, y P Jimenez. 2011. «Can anti-IgE therapy prevent airway remodeling in allergic asthma?». *Allergy* 66 (9) (Septiembre): 1142-1151. doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02617.x.
- Raz, E, H Tighe, Y Sato, M Corr, J A Dudler, M Roman, S L Swain, H L Spiegelberg, y D A Carson. 1996. «Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (10) (Mayo 14): 5141-5145.
- van Ree, Ronald. 2004. «Clinical importance of cross-reactivity in food allergy». *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 4 (3) (Junio): 235-240.
- van Reijsen, F C, A Felius, E A Wauters, C A Buijnzeel-Koomen, y S J Koppelman. 1998. «T-cell reactivity for a peanut-derived epitope in the skin of a young infant with atopic dermatitis». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 101 (2 Pt 1) (Febrero): 207-209.

- Rhodes, H L, R Sporik, P Thomas, S T Holgate, y J J Cogswell. 2001. «Early life risk factors for adult asthma: a birth cohort study of subjects at risk». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 108 (5) (Noviembre): 720-725. doi:10.1067/mai.2001.119151.
- Riffelmann, F. 2008. «[Anti IgE therapy (off label use) in severe peanut allergy with recurrent anaphylaxis]». *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 62 (6) (Junio): 337-339. doi:10.1055/s-2008-1038114.
- Rimoldi, Monica, Marcello Chieppa, Valentina Salucci, Francesca Avogadri, Angelica Sonzogni, Gianluca M Sampietro, Angelo Nespoli, Giuseppe Viale, Paola Allavena, y Maria Rescigno. 2005. «Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells». *Nature Immunology* 6 (5) (Mayo): 507-514. doi:10.1038/ni1192.
- Rolinck-Werninghaus, C, M Kopp, C Liebke, J Lange, U Wahn, y B Niggemann. 2005. «Lack of detectable alterations in immune responses during sublingual immunotherapy in children with seasonal allergic rhinoconjunctivitis to grass pollen». *International Archives of Allergy and Immunology* 136 (2) (Febrero): 134-141. doi:10.1159/000083320.
- Rolland, Jennifer M, Leanne M Gardner, y Robyn E O'Hehir. 2009. «Allergen-related approaches to immunotherapy». *Pharmacology & Therapeutics* 121 (3) (Marzo): 273-284. doi:10.1016/j.pharmthera.2008.11.007.
- Romier, Béatrice, Jacqueline Van De Walle, Alexandrine During, Yvan Larondelle, y Yves-Jacques Schneider. 2008. «Modulation of signalling nuclear factor-kappaB activation pathway by polyphenols in human intestinal Caco-2 cells». *The British Journal of Nutrition* 100 (3) (Septiembre): 542-551. doi:10.1017/S0007114508966666.
- Rona, Roberto J, Thomas Keil, Colin Summers, David Gislason, Laurian Zuidmeer, Eva Sodergren, Sigurveig T Sigurdardottir, et al. 2007. «The prevalence of food allergy: a meta-analysis». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120 (3) (Septiembre): 638-646. doi:10.1016/j.jaci.2007.05.026.
- Roongrotwattanasiri, Kannika, Ruby Pawankar, Satoko Kimura, Sachiko Mori, Manabu Nonaka, y Toshiaki Yagi. 2012. «Decreased Expression of FOXP3 in Nasal Polyposis». *Allergy, Asthma & Immunology Research* 4 (1) (Enero): 24-30. doi:10.4168/aaair.2012.4.1.24.
- Rosa, Daniela Santoro, Susan Pereira Ribeiro, y Edecio Cunha-Neto. 2010. «CD4+ T cell epitope discovery and rational vaccine design». *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis* 58 (2) (Abril): 121-130. doi:10.1007/s00005-010-0067-0.
- Rosen, J P, J E Selcow, L M Mendelson, M P Grodofsky, J M Factor, y H A Sampson. 1994. «Skin testing with natural foods in patients suspected of having food allergies: is it a necessity?» *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 93 (6) (Junio): 1068-1070.
- Roux, Kenneth H, Suzanne S Teuber, y Shridhar K Sathe. 2003. «Tree nut allergens». *International Archives of Allergy and Immunology* 131 (4) (Agosto): 234-244. doi:10.1159/000072135.
- Rozenfeld, P, G H Docena, M C Añón, y C A Fossati. 2002a. «Detection and identification of a soy protein component that cross-reacts with caseins from cow's milk». *Clinical and Experimental Immunology* 130 (1) (Octubre): 49-58.
- . 2002b. «Detection and identification of a soy protein component that cross-reacts with caseins from cow's milk». *Clinical and Experimental Immunology* 130 (1) (Octubre): 49-58.
- Rubio, A., M. Vivinus-Nébot, T. Bourrier, B. Saggio, M. Albertini, y A. Bernard. 2011. «Benefit of the basophil activation test in deciding when to reintroduce cow's milk in allergic children». *Allergy* 66 (1) (Enero 1): 92-100. doi:10.1111/j.1398-9995.2010.02432.x.
- Rupa, P, y Y Mine. 2012. «Oral immunotherapy with immunodominant T-cell epitope peptides alleviates allergic reactions in a Balb/c mouse model of egg allergy». *Allergy* 67 (1) (Enero): 74-82. doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02724.x.
- Saarinen, Kristiina M, Anna S Pelkonen, Mika J Mäkelä, y Erkki Savilahti. 2005. «Clinical course and prognosis of cow's milk allergy are dependent on milk-specific IgE status». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 116 (4) (Octubre): 869-875. doi:10.1016/j.jaci.2005.06.018.
- Saloga, J., y J. Knop. 2000. «Does sensitization through the skin occur?» *Allergy* 55 (10) (Octubre 1): 905-909. doi:10.1034/j.1398-9995.2000.00126.x.
- Sampson, H A. 1999. «Food allergy. Part 2: diagnosis and management». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 103 (6) (Junio): 981-989.

- Sampson, H A, y R Albergo. 1984. «Comparison of results of skin tests, RAST, and double-blind, placebo-controlled food challenges in children with atopic dermatitis». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 74 (1) (Julio): 26-33.
- Sampson, H A, y D G Ho. 1997. «Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 100 (4) (Octubre): 444-451.
- Santiago, Helton C., Sasisekhar Bennuru, Alexis Boyd, Mark Eberhard, y Thomas B. Nutman. 2011. «Structural and immunologic cross-reactivity among filarial and mite tropomyosin: Implications for the hygiene hypothesis». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127 (2) (Febrero): 479-486. doi:10.1016/j.jaci.2010.11.007.
- Savilahti, Emma M, Ville Rantanen, Jing S Lin, Sirkku Karinen, Kristiina M Saarinen, Marina Goldis, Mika J Mäkelä, Sampsa Hautaniemi, Erkki Savilahti, y Hugh A Sampson. 2010. «Early recovery from cow's milk allergy is associated with decreasing IgE and increasing IgG4 binding to cow's milk epitopes». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (6) (Junio): 1315-1321.e9. doi:10.1016/j.jaci.2010.03.025.
- Schaub, Bianca, Roger Lauener, y Erika von Mutius. 2006. «The many faces of the hygiene hypothesis». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117 (5) (Mayo): 969-977; quiz 978. doi:10.1016/j.jaci.2006.03.003.
- Schöll, Isabella, Eva Untersmayr, Noémi Bakos, Franziska Roth-Walter, Andreas Gleiss, George Boltz-Nitulescu, Otto Scheiner, y Erika Jensen-Jarolim. 2005. «Antiulcer drugs promote oral sensitization and hypersensitivity to hazelnut allergens in BALB/c mice and humans». *The American Journal of Clinical Nutrition* 81 (1) (Enero): 154-160.
- SEAIC. 2009. Metodología diagnóstica en la alergia a los alimentos. *Comité de reacciones adversas a alimentos*. <http://www.seaic.org/>.
- Semlali, Abdelhabib, Eric Jacques, Latifa Koussih, Abdelilah S Gounni, y Jamila Chakir. 2010. «Thymic stromal lymphopoietin-induced human asthmatic airway epithelial cell proliferation through an IL-13-dependent pathway». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (4) (Abril): 844-850. doi:10.1016/j.jaci.2010.01.044.
- Shi, Yan, James E Evans, y Kenneth L Rock. 2003. «Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells». *Nature* 425 (6957) (Octubre 2): 516-521. doi:10.1038/nature01991.
- Shida, K, R Takahashi, E Iwadata, K Takamizawa, H Yasui, T Sato, S Habu, S Hachimura, y S Kaminogawa. 2002. «Lactobacillus casei strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 32 (4) (Abril): 563-570.
- Shirakawa, T, T Enomoto, S Shimazu, y J M Hopkin. 1997. «The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder». *Science (New York, N.Y.)* 275 (5296) (Enero 3): 77-79.
- Shirinbak, Soheila, Yousef A Taher, Hadi Maazi, Renée Gras, Betty C A M van Esch, Paul A J Henricks, Janneke N Samsom, et al. 2010. «Suppression of Th2-driven airway inflammation by allergen immunotherapy is independent of B cell and Ig responses in mice». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (7) (Octubre 1): 3857-3865. doi:10.4049/jimmunol.0903909.
- Sibartie, Shomik, Ann M O'Hara, Jude Ryan, Aine Fanning, Jim O'Mahony, Shaun O'Neill, Barbara Sheil, Liam O'Mahony, y Fergus Shanahan. 2009. «Modulation of pathogen-induced CCL20 secretion from HT-29 human intestinal epithelial cells by commensal bacteria». *BMC Immunology* 10: 54. doi:10.1186/1471-2172-10-54.
- Sicherer, Scott H, y Hugh A Sampson. 2006. «9. Food allergy». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117 (2 Suppl Mini-Primer) (Febrero): S470-475. doi:10.1016/j.jaci.2005.05.048.
- . 2010. «Food allergy». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (2 Suppl 2) (Febrero): S116-125. doi:10.1016/j.jaci.2009.08.028.
- Sidhapuriwala, J N, S P Sivalingam, J Lu, y S M Moochhala. 2006. «Immunomodulation of Japanese encephalitis vaccine through CpG oligodeoxynucleotides in mice». *Scandinavian Journal of Immunology* 64 (4) (Octubre): 370-375. doi:10.1111/j.1365-3083.2006.01793.x.
- Silva, R, E Gomes, L Cunha, y H Falcão. 2011. «Anaphylaxis in children: A nine years retrospective study (2001-2009)». *Allergologia Et Immunopathologia* (Abril 13). doi:10.1016/j.aller.2010.12.012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21497010>.

- Simpson, A, y F D Martinez. 2010. «The role of lipopolysaccharide in the development of atopy in humans». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 40 (2) (Febrero): 209-223. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03391.x.
- Sitaraman, Shanthi V, Jan-Michael Klapproth, Daniel A Moore 3rd, Carol Landers, Stephan Targan, Ifor R Williams, y Andrew T Gewirtz. 2005. «Elevated flagellin-specific immunoglobulins in Crohn's disease». *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 288 (2) (Febrero): G403-406. doi:10.1152/ajpgi.00357.2004.
- Skrindo, I, L Farkas, E O Kvale, F-E Johansen, y F L Jahnsen. 2008. «Depletion of CD4+CD25+CD127lo regulatory T cells does not increase allergen-driven T cell activation». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 38 (11) (Noviembre): 1752-1759. doi:10.1111/j.1365-2222.2008.03081.x.
- Skripak, Justin M, Scott D Nash, Hannah Rowley, Nga H Brereton, Susan Oh, Robert G Hamilton, Elizabeth C Matsui, A Wesley Burks, y Robert A Wood. 2008. «A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 122 (6) (Diciembre): 1154-1160. doi:10.1016/j.jaci.2008.09.030.
- Slater, J E, y A Colberg-Poley. 1997. «A DNA vaccine for allergen immunotherapy using the latex allergen Hev b 5». *Arbeiten Aus Dem Paul-Ehrlich-Institut (Bundesamt Für Sera Und Impfstoffe) Zu Frankfurt a.M* (91): 230-235; discussion 235-236.
- Smaldini, Paola, Renata Curciarello, Angela Candreva, Maria A Rey,, Carlos A Fossati, Silvana Petruccielli, y Guillermo H Docena. 2011. «In vivo evidence of cross-reactivity between cow's milk and soybean proteins in a mouse model of food allergy». *International Archives of Allergy and Immunology*. doi:10.1159/000333562.
- Smale, Stephen T. 2011. «Hierarchies of NF-κB target-gene regulation». *Nature Immunology* 12 (8) (Agosto): 689-694. doi:10.1038/ni.2070.
- Smarr, Charles B, Chia-Lin Hsu, Adam J Byrne, Stephen D Miller, y Paul J Bryce. 2011. «Antigen-fixed leukocytes tolerize Th2 responses in mouse models of allergy». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 187 (10) (Noviembre 15): 5090-5098. doi:10.4049/jimmunol.1100608.
- Soh, S E, M Aw, I Gerez, Y S Chong, M Rauff, Y P M Ng, H B Wong, N Pai, B W Lee, y L P-C Shek. 2009. «Probiotic supplementation in the first 6 months of life in at risk Asian infants--effects on eczema and atopic sensitization at the age of 1 year». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 39 (4) (Abril): 571-578. doi:10.1111/j.1365-2222.2008.03133.x.
- Sokol, Caroline L, Gregory M Barton, Andrew G Farr, y Ruslan Medzhitov. 2008. «A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses». *Nature Immunology* 9 (3) (Marzo): 310-318. doi:10.1038/ni1558.
- Solinas, C, M Corpino, R Maccioni, y U Pelosi. 2010. «Cow's milk protein allergy». *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians* 23 Suppl 3 (Octubre): 76-79. doi:10.3109/14767058.2010.512103.
- Soumelis, Vassili, Pedro A Reche, Holger Kanzler, Wei Yuan, Gina Edward, Bernhart Homey, Michel Gilliet, et al. 2002. «Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP». *Nature Immunology* 3 (7) (Julio): 673-680. doi:10.1038/ni805.
- Staden, U, C Rolinck-Werninghaus, F Brewe, U Wahn, B Niggemann, y K Beyer. 2007. «Specific oral tolerance induction in food allergy in children: efficacy and clinical patterns of reaction». *Allergy* 62 (11) (Noviembre): 1261-1269. doi:10.1111/j.1398-9995.2007.01501.x.
- Stanford, J L, C A Stanford, M E R O'Brien, y J M Grange. 2008. «Successful immunotherapy with Mycobacterium vaccae in the treatment of adenocarcinoma of the lung». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 44 (2) (Enero): 224-227. doi:10.1016/j.ejca.2007.08.021.
- Stone, K D, y C Prussin. 2008. «Immunomodulatory therapy of eosinophil-associated gastrointestinal diseases». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 38 (12) (Diciembre): 1858-1865. doi:10.1111/j.1365-2222.2008.03122.x.
- Strachan, D P. 1989. «Hay fever, hygiene, and household size». *BMJ (Clinical Research Ed.)* 299 (6710) (Noviembre 18): 1259-1260.

- Strid, Jessica, Melanie Thomson, Jonathan Hourihane, Ian Kimber, y Stephan Strobel. 2004. «A novel model of sensitization and oral tolerance to peanut protein». *Immunology* 113 (3) (Noviembre): 293-303. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01989.x.
- Sudo, N, S Sawamura, K Tanaka, Y Aiba, C Kubo, y Y Koga. 1997. «The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 159 (4) (Agosto 15): 1739-1745.
- Suto, Akira, Hiroshi Nakajima, Koichi Hirose, Kotaro Suzuki, Shin-ichiro Kagami, Yohei Seto, Aihiro Hoshimoto, Yasushi Saito, Donald C Foster, y Itsuo Iwamoto. 2002. «Interleukin 21 prevents antigen-induced IgE production by inhibiting germ line C(epsilon) transcription of IL-4-stimulated B cells». *Blood* 100 (13) (Diciembre 15): 4565-4573. doi:10.1182/blood-2002-04-1115.
- Sutton, B J, y H J Gould. 1993. «The human IgE network». *Nature* 366 (6454) (Diciembre 2): 421-428. doi:10.1038/366421a0.
- Suzuki, Iwao, Takayuki Yamauchi, Masahiro Onuma, y Shigeo Nozaki. 2009. «Allopurinol, an inhibitor of uric acid synthesis--can it be used for the treatment of metabolic syndrome and related disorders?» *Drugs of Today (Barcelona, Spain: 1998)* 45 (5) (Mayo): 363-378. doi:10.1358/dot.2009.45.5.1370460.
- Suzuki, Keiichiro, Shimpei Kawamoto, Mikako Maruya, y Sidonia Fagarasan. 2010. «GALT: organization and dynamics leading to IgA synthesis». *Advances in Immunology* 107: 153-185. doi:10.1016/B978-0-12-381300-8.00006-X.
- De Swert, Liliane F A, Romy Gadisseur, Sigrid Sjölander, Marc Raes, Jasmine Leus, y Erna Van Hoeyveld. 2011. «Secondary soy allergy in children with birch pollen allergy may cause both chronic and acute symptoms». *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* (Octubre 21). doi:10.1111/j.1399-3038.2011.01218.x. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22017341>.
- Tabar, A I, M J Alvarez, S Echechipsa, S Acero, B E Garcia, y J M Olaguibel. 1996. «Anaphylaxis from cow's milk casein». *Allergy* 51 (5) (Mayo): 343-345.
- Takagi, Hidenori, Saburo Saito, Lijun Yang, Seiji Nagasaka, Naoko Nishizawa, y Fumio Takaiwa. 2005. «Oral immunotherapy against a pollen allergy using a seed-based peptide vaccine». *Plant Biotechnology Journal* 3 (5) (Septiembre): 521-533. doi:10.1111/j.1467-7652.2005.00143.x.
- Takaiwa, Fumio. 2007. «A rice-based edible vaccine expressing multiple T-cell epitopes to induce oral tolerance and inhibit allergy». *Immunology and Allergy Clinics of North America* 27 (1) (Febrero): 129-139. doi:10.1016/j.iac.2006.11.001.
- Takayama, Naoko, Osamu Igarashi, Mi-Na Kweon, y Hiroshi Kiyono. 2007. «Regulatory role of Peyer's patches for the inhibition of OVA-induced allergic diarrhea». *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 123 (2) (Mayo): 199-208. doi:10.1016/j.clim.2007.01.007.
- Takeda, Katsuyuki, y Erwin W Gelfand. 2009. «Mouse models of allergic diseases». *Current Opinion in Immunology* 21 (6) (Diciembre): 660-665. doi:10.1016/j.coi.2009.09.005.
- Tamagawa-Mineoka, Risa, Tsunao Kishida, Osam Mazda, y Norito Katoh. 2011. «IL-21 reduces immediate hypersensitivity reactions in mouse skin by suppressing mast cell activation or IgE production». *The Journal of Investigative Dermatology* 131 (7) (Julio): 1513-1520. doi:10.1038/jid.2011.73.
- Tanaka, Junya, Kazuyuki Saga, Masahiro Kido, Hisayo Nishiura, Takuji Akamatsu, Tsutomu Chiba, y Norihiko Watanabe. 2010. «Proinflammatory Th2 cytokines induce production of thymic stromal lymphopoietin in human colonic epithelial cells». *Digestive Diseases and Sciences* 55 (7) (Julio): 1896-1904. doi:10.1007/s10620-009-0979-x.
- Taylor, Angie L, Janet A Dunstan, y Susan L Prescott. 2007. «Probiotic supplementation for the first 6 months of life fails to reduce the risk of atopic dermatitis and increases the risk of allergen sensitization in high-risk children: a randomized controlled trial». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119 (1) (Enero): 184-191. doi:10.1016/j.jaci.2006.08.036.
- Taylor, Betsy C, Colby Zaph, Amy E Troy, Yurong Du, Katherine J Guild, Michael R Comeau, y David Artis. 2009. «TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis». *The Journal of Experimental Medicine* 206 (3) (Marzo 16): 655-667. doi:10.1084/jem.20081499.

- Thorntenson, K M, y A Khoruts. 2001. «Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25+CD4 T cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 167 (1) (Julio 1): 188-195.
- Truoc, L V, H M Ly, N K Thuy, D D Trach, C A Stanford, y J L Stanford. 2001. «Vaccination against leprosy at Ben San Leprosy Centre, Ho Chi Minh City, Vietnam». *Vaccine* 19 (25-26) (Mayo 14): 3451-3458.
- Tsuji, Masayuki, Noriko Komatsu, Shimpei Kawamoto, Keiichiro Suzuki, Osami Kanagawa, Tasuku Honjo, Shohei Hori, y Sidonia Fagarasan. 2009. «Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches». *Science (New York, N.Y.)* 323 (5920) (Marzo 13): 1488-1492. doi:10.1126/science.1169152.
- Turcanu, Victor, Soheila J Maleki, y Gideon Lack. 2003. «Characterization of lymphocyte responses to peanuts in normal children, peanut-allergic children, and allergic children who acquired tolerance to peanuts». *The Journal of Clinical Investigation* 111 (7) (Abril): 1065-1072. doi:10.1172/JCI16142.
- Tversky, J R, T V Le, A P Bieneman, K L Chichester, R G Hamilton, y J T Schroeder. 2008. «Human blood dendritic cells from allergic subjects have impaired capacity to produce interferon-alpha via Toll-like receptor 9». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 38 (5) (Mayo): 781-788. doi:10.1111/j.1365-2222.2008.02954.x.
- Untersmayr, Eva, Noémi Bakos, Isabella Schöll, Michael Kundi, Franziska Roth-Walter, Krisztina Szalai, Angelika B Riemer, et al. 2005. «Anti-ulcer drugs promote IgE formation toward dietary antigens in adult patients». *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (6) (Abril): 656-658. doi:10.1096/fj.04-3170fje.
- Vandezande, L M, B Wallaert, P Desreumaux, A Tsicopoulos, C Lamblin, A B Tonnel, y A Janin. 1999. «Interleukin-5 immunoreactivity and mRNA expression in gut mucosa from patients with food allergy». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 29 (5) (Mayo): 652-659.
- Verhoef, Adrienne, Clare Alexander, A Barry Kay, y Mark Larché. 2005. «T cell epitope immunotherapy induces a CD4+ T cell population with regulatory activity». *PLoS Medicine* 2 (3) (Marzo): e78. doi:10.1371/journal.pmed.0020078.
- Vichyanond, Pakit. 2011. «Omalizumab in allergic diseases, a recent review». *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology / Launched by the Allergy and Immunology Society of Thailand* 29 (3) (Septiembre): 209-219.
- Vijay-Kumar, Matam, y Andrew T Gewirtz. 2009. «Role of flagellin in Crohn's disease: emblematic of the progress and enigmas in understanding inflammatory bowel disease». *Inflammatory Bowel Diseases* 15 (5) (Mayo): 789-795. doi:10.1002/ibd.20734.
- Walley, A J, S Wiltshire, C M Ellis, y W O Cookson. 2001. «Linkage and allelic association of chromosome 5 cytokine cluster genetic markers with atopy and asthma associated traits». *Genomics* 72 (1) (Febrero 15): 15-20. doi:10.1006/geno.2000.6435.
- Wang, Julie, y Hugh A Sampson. 2007. «Food anaphylaxis». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 37 (5) (Mayo): 651-660. doi:10.1111/j.1365-2222.2007.02682.x.
- . 2011. «Food allergy». *The Journal of Clinical Investigation* 121 (3) (Marzo 1): 827-835. doi:10.1172/JCI45434.
- Wang, Yui-Hsi, Tomoki Ito, Yi-Hong Wang, Bernhard Homey, Norihiko Watanabe, Rachel Martin, Christopher J Barnes, et al. 2006. «Maintenance and polarization of human TH2 central memory T cells by thymic stromal lymphopoietin-activated dendritic cells». *Immunity* 24 (6) (Junio): 827-838. doi:10.1016/j.immuni.2006.03.019.
- Wangorsch, Andrea, Barbara K Ballmer-Weber, Paul Rösch, Thomas Holzhauser, y Stefan Vieths. 2007. «Mutational epitope analysis and cross-reactivity of two isoforms of Api g 1, the major celery allergen». *Molecular Immunology* 44 (10) (Abril): 2518-2527. doi:10.1016/j.molimm.2006.12.023.
- Wannemuehler, M J, H Kiyono, J L Babb, S M Michalek, y J R McGhee. 1982. «Lipopolysaccharide (LPS) regulation of the immune response: LPS converts germfree mice to sensitivity to oral tolerance induction». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 129 (3) (Septiembre): 959-965.
- Watanabe, Norihiko, Shino Hanabuchi, Vassili Soumelis, Wei Yuan, Stephen Ho, Rene de Waal Malefyt, y Yong-Jun Liu. 2004. «Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4+ T cell homeostatic expansion». *Nature Immunology* 5 (4) (Abril): 426-434. doi:10.1038/ni1048.

- Watanabe, Toyooki, Kazuya Hamada, Airo Tategaki, Hideyuki Kishida, Hozumi Tanaka, Mitsuki Kitano, y Taku Miyamoto. 2009. «Oral administration of lactic acid bacteria isolated from traditional South Asian fermented milk “dahi” inhibits the development of atopic dermatitis in NC/Nga mice». *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 55 (3) (Junio): 271-278.
- Whitacre, Caroline C, Fei Song, Richard M Wardrop 3rd, Kim Campbell, Melanie McClain, Jacqueline Benson, Zhen Guan, y Ingrid Gienapp. 2004. «Regulation of autoreactive T cell function by oral tolerance to self-antigens». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1029 (Diciembre): 172-179. doi:10.1196/annals.1309.033.
- Wills-Karp, M, J Santeliz, y C L Karp. 2001. «The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis». *Nature Reviews. Immunology* 1 (1) (Octubre): 69-75. doi:10.1038/35095579.
- Wilson, Shannon, Kristen Blaschek, y Elviragonzalez de Mejia. 2005. «Allergenic proteins in soybean: processing and reduction of P34 allergenicity». *Nutrition Reviews* 63 (2) (Febrero): 47-58.
- Wood, Robert A. 2003. «The natural history of food allergy». *Pediatrics* 111 (6 Pt 3) (Junio): 1631-1637.
- Xiong, Huizhong, Jayashree Dolpady, Matthias Wabl, Maria A Curotto de Lafaille, y Juan J Lafaille. 2012. «Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies». *The Journal of Experimental Medicine* (Enero 16). doi:10.1084/jem.20111941. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22249450>.
- Xu, L, A Kitani, y W Strober. 2010. «Molecular mechanisms regulating TGF-beta-induced Foxp3 expression». *Mucosal Immunology* 3 (3) (Mayo): 230-238. doi:10.1038/mi.2010.7.
- Yamamoto, M, L S McDaniel, K Kawabata, D E Briles, R J Jackson, J R McGhee, y H Kiyono. 1997. «Oral immunization with PspA elicits protective humoral immunity against Streptococcus pneumoniae infection». *Infection and Immunity* 65 (2) (Febrero): 640-644.
- Yang, M, C Yang, y Y Mine. 2010. «Multiple T cell epitope peptides suppress allergic responses in an egg allergy mouse model by the elicitation of forkhead box transcription factor 3- and transforming growth factor-beta-associated mechanisms». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 40 (4) (Abril): 668-678. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03442.x.
- Ying, Sun, Brian O'Connor, Jonathan Ratoff, Qiu Meng, Kirsty Mallett, David Cousins, Douglas Robinson, et al. 2005. «Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174 (12) (Junio 15): 8183-8190.
- Young, E J. 1983. «Human brucellosis». *Reviews of Infectious Diseases* 5 (5) (Octubre): 821-842.
- Zeiger, R S, H A Sampson, S A Bock, A W Burks Jr, K Harden, S Noone, D Martin, S Leung, y G Wilson. 1999. «Soy allergy in infants and children with IgE-associated cow's milk allergy». *The Journal of Pediatrics* 134 (5) (Mayo): 614-622.
- Zhan, Y, A Kelso, y C Cheers. 1993. «Cytokine production in the murine response to brucella infection or immunization with antigenic extracts». *Immunology* 80 (3) (Noviembre): 458-464.
- Zhang, Fang, Gang Huang, Bo Hu, Yong Song, y Yi Shi. 2011. «Induction of immune tolerance in asthmatic mice by vaccination with DNA encoding an allergen-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 combination». *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 18 (5) (Mayo): 807-814. doi:10.1128/CVI.00434-10.
- Zhang, T, W Pan, M Takebe, B Schofield, H Sampson, y X-M Li. 2008. «Therapeutic effects of a fermented soy product on peanut hypersensitivity is associated with modulation of T-helper type 1 and T-helper type 2 responses». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 38 (11) (Noviembre): 1808-1818. doi:10.1111/j.1365-2222.2008.03075.x.
- Zhang, X, L Izikson, L Liu, y H L Weiner. 2001. «Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 167 (8) (Octubre 15): 4245-4253.
- Zhang, Y, L K Shoda, K A Brayton, D M Estes, G H Palmer, y W C Brown. 2001. «Induction of interleukin-6 and interleukin-12 in bovine B lymphocytes, monocytes, and macrophages by a CpG oligodeoxynucleotide (ODN 2059) containing the GTCGTT motif». *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 21 (10) (Octubre): 871-881. doi:10.1089/107999001753238123.

- Zhou, Baohua, Michael R Comeau, Thibaut De Smedt, H Denny Liggitt, Martin E Dahl, David B Lewis, Dora Gyarmati, Theingi Aye, Daniel J Campbell, y Steven F Ziegler. 2005. «Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice». *Nature Immunology* 6 (10) (Octubre): 1047-1053. doi:10.1038/ni1247.
- Ziegler, Steven F. 2010. «The role of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in allergic disorders». *Current Opinion in Immunology* 22 (6) (Diciembre): 795-799. doi:10.1016/j.coi.2010.10.020.
- Zoppi, G, y S Guandalini. 1999. «The story of soy formula feeding in infants: a road paved with good intentions». *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 28 (5) (Mayo): 541-543.