



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

***Trabajo de Tesis Doctoral***

***ANÁLISIS Y APLICACIÓN DE ESTRATEGIAS PARA MODULAR LA  
RESPUESTA INFLAMATORIA EN PATOLOGÍAS INTESTINALES***

---

***Tesista: Lic. MARÍA LUCÍA ORSINI DELGADO***

***Director: Dr. GUILLERMO HORACIO DOCENA***

**2016**



*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 en el Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP), UNLP-CONICET.*



## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo de Tesis implicó un gran crecimiento en lo personal y en lo profesional. Es por esto que quiero agradecer:

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

A mi querida Universidad Nacional de La Plata, a la que le debo toda mi formación académica, desde el jardín de infantes hasta la carrera de posgrado.

A Guille, por la formación que me dio, por confiar en mí desde que era alumna y proponerme trabajar bajo su dirección, y por el optimismo y la simpleza con que se toma las cosas. Sobre todo por permitirme trabajar en un lugar con gente excepcional del que hoy me siento parte.

En especial a mi Paolis, mi “co-directora”, por su paciencia, por estar a mi lado siempre, por responder a cada duda, por ayudarme en cada momento, por los consejos y por haber encontrado en ella una amiga, sos una genia!

A Costita, por aguantarme, por su honestidad, su humor ácido, y los divinos cursos de posgrado que compartimos. También por las aventuras en los múltiples gimnasios, y por las cervecitas para compensar. Te quiero Costita!

Perdón a ambas por sentarme a su lado y arruinarles sus oídos.

A Saraya, por su energía inigualable y su sinceridad, adoro a la gente que dice las cosas de frente!

A Junchis-Agustineta!, por ser adorables, buena gente y simples!. Gracias a los dos por sus consejos, y sobre todo por Pipina!.

A Reni y Loli, gracias por la forma en que se toman la vida, siempre con una sonrisa, espero aprender de ustedes algún día (Reni soy fan de tus hijos!).

A Coquita y Trejo, gracias por los momentos compartidos y por su buen humor, lamento la dificultad que tienen para acomodar los tubos como corresponde.

A Dave, por haber aprendido juntos el modelo de colitis y por la Flagelina!.

A Giorgio, por sus comentarios justos que inevitablemente sacan sonrisas.

A Alberto, por sus historias durante almuerzos y sobremesas, y por haberme recibido en el laboratorio.

Al resto del IIFP, en particular a los integrantes del Ex-LISIN, gracias a todos por las charlas, los intercambios de opiniones, muchas veces encontradas, y los momentos compartidos.

A las grandes amigas que me dio la vida: Euge, Vero, Ro y Ani, gracias por todas las cenas, salidas, viajes y charlas inagotables, por conocerme mejor que nadie, es bueno saber que están!.

A mis amigos de la facu: Carito y Bel (compañeras de esta aventura), Mari, Picho, Vale, Queen y Mica, siempre presentes, gracias por hacer momentos difíciles más fáciles, las quiero! Y a Feli, Santi y Ger, que hicieron que estudiar fuera más fácil y divertido, gracias por su amistad!

En particular quiero agradecerle a mi familia, a mamá y a papá, por enseñarme que aprender era mi responsabilidad, gracias por darme las “herramientas”, por confiar en la educación pública, y por obligarme a aprender inglés. Gracias Ma por dar todo por nosotras, por permitirme estar orgullosa de ser tu hija!, y por haberme transmitido el interés por la bioquímica. Pa, sé que desde donde estés, nos estás cuidando. A mis hermanas, gracias por enseñarme todo, en particular la regla de tres simple, que la aplico todos los días!. Gracias a las dos por los momentos compartidos, gracias Paula por darme un hermano mayor, Ramiro, sabés que sos uno más!, y los dos sobrinos más lindos del mundo, Fran y Marti!, los adoro!. A mi abuela Mona, parte importante en mi educación, como olvidar sus dictados! Y por ser la primera en enseñarme a cocinar.

Finalmente a Aguz, la familia que hoy elijo, mi compañero en esta aventura y en la que viene, gracias por acompañarme en la montaña rusa de emociones, por enseñarme que para opinar hay que saber y hay que informarse. Gracias por los momentos buenos y los no tan buenos, por ayudarme a crecer. Gracias por elegirme. Y gracias también por tu familia, de la cual me siento parte.

**Gracias a todos por su paciencia, sobre todo en este último tiempo.**

## **ABREVIATURAS**

<b>AA</b>	Alergias alimentarias
<b>Ac(s)</b>	Anticuerpo(s)
<b>Ag(s)</b>	Antígeno(s)
<b>BCA</b>	Ácido bicinconínico
<b>BCR</b>	Receptor de célula B
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina
<b>CPA</b>	Célula presentadora de antígenos
<b>CU</b>	Colitis ulcerosa
<b>DAI</b>	Índice de actividad de la enfermedad
<b>DC(s)</b>	Célula(s) dendrítica(s)
<b>DO</b>	Desafío oral
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EAST</b>	Enzyme Attached Sorbent Test
<b>EC</b>	Enfermedad de Crohn
<b>EII</b>	Enfermedades inflamatorias intestinales
<b>FAE</b>	Epitelio asociado a folículos
<b>FAL</b>	Fosfatasa alcalina
<b>FcεRI</b>	Receptor de IgE de alta afinidad
<b>FI</b>	Incremento relativo
<b>GALT</b>	Tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina y eosina
<b>HAI</b>	Índice de actividad histológica
<b>HRP</b>	Horseradish peroxidase
<b>i.r.</b>	Intra-rectal
<b>ig</b>	Intragástrica
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>ILF</b>	Folículo linfoide aislado
<b>ip</b>	Intraperitoneal
<b>IT</b>	Inmunoterapia
<b>ITO</b>	Inmunoterapia oral
<b>iTreg</b>	Células Treg inducidas
<b>ITSL</b>	Inmunoterapia sublingual
<b>iv</b>	Intravenosa
<b>LB</b>	Linfocito B
<b>LC</b>	Células de Langerhans
<b>LP</b>	Lámina propia
<b>LT</b>	Linfocito T
<b>MALT</b>	Tejido linfoide asociado a mucosas
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>MLN</b>	Nódulo linfoide mesentérico
<b>MP</b>	Material particulado
<b>MP<sub>10</sub></b>	Material particulado menor a 10µm
<b>MPO</b>	Mieloperoxidasa
<b>NLR</b>	Receptor tipo Nod
<b>NOD</b>	Dominios de oligomerización de nucleótidos
<b>nTreg</b>	Células Treg naturales
<b>oLC</b>	Células de Langerhans de la cavidad oral

<b>Omp</b>	Proteína de membrana externa
<b>PAMP</b>	Patrón molecular asociado a patógeno
<b>PC</b>	Prueba cutánea
<b>pDC</b>	Células dendríticas plasmacitoides
<b>PLV</b>	Proteínas de leche de vaca
<b>PNPP</b>	p-nitrofenilfosfato de sodio
<b>PP</b>	Placas de Peyer
<b>PRR</b>	Receptor de reconocimiento de patrón
<b>qPCR</b>	PCR en tiempo real
<b>RT</b>	Retrotranscripción
<b>sc</b>	Subcutánea
<b>SE</b>	Suero equino
<b>SF</b>	Solución fisiológica
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>slgA</b>	IgA secretoria
<b>SIM</b>	Sistema inmune de mucosas
<b>sl</b>	Sublingual
<b>SLN</b>	Nódulos linfoides sublinguales
<b>TC</b>	Toxina colérica
<b>TCR</b>	Receptor de célula T
<b>TLR</b>	Receptor tipo Toll
<b>TMB</b>	Tetrametilbencidina
<b>TNBS</b>	Ácido 2,4,6 trinitrobencen sulfónico
<b>TNP</b>	Trinitrofenilo
<b>Treg</b>	Célula T regulatoria

# ÍNDICES





## **ÍNDICE DE CONTENIDOS**

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>HIPÓTESIS</b> .....	5
<b>OBJETIVOS GENERALES</b> .....	5
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	7
Sistema inmune de mucosas .....	9
Homeostasis e inflamación en el intestino .....	14
Alergias alimentarias .....	22
Enfermedades inflamatorias intestinales.....	33
Modelos animales .....	40
<b>MATERIALES &amp; MÉTODOS</b> .....	43
<b>1. Modelo murino de alergia a las proteínas de leche de vaca</b> .....	45
1.1 Extractos proteicos .....	45
1.2 Planes de inmunización .....	45
1.3 Desafío oral (DO) .....	47
1.4 Evaluación de la respuesta inmune .....	47
<b>2. Modelos animales de colitis</b> .....	54
2.1 Preparación de reactivos inmunomoduladores .....	54
2.2 Inducción y modulación del proceso inflamatorio .....	55
2.3 Evaluación de la respuesta inflamatoria .....	57
<b>3. Técnicas generales</b> .....	59
3.1 Preparación de muestras para histología.....	59
3.2 Técnicas de biología molecular .....	60
3.3 Extracción de proteínas a partir de tejidos .....	64
3.4 Determinación de citoquinas por ELISA .....	64
3.5 Análisis estadístico.....	65
<b>PARTE I</b>	
<b>ESTRATEGIAS DE INMUNOMODULACIÓN DE UN MODELO MURINO DE ALERGIA A LAS PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA</b> .....	67
Introducción .....	69
Objetivos Generales .....	77
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>INMUNOTERAPIA ORAL EN UN MODELO MURINO DE ALERGIA A LAS PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA</b> .....	79
I.1.1 Objetivos específicos .....	82
I.1.2 Resultados .....	83
I.1.3 Discusión.....	94

<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>INDUCCIÓN DE TOLERANCIA MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN SUBLINGUAL DE OMP16 JUNTO A PLV PARA MODULAR LA ALERGI A ALIMENTARIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>97</b>
I.2.1 Objetivos Específicos .....	100
I.2.2 Resultados .....	101
I.2.3 Discusión.....	110
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES PARTE I .....</b>	<b>113</b>
<b>PARTE II</b>	
<b>OPTIMIZACIÓN DE UN MODELO MURINO DE COLITIS Y DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE INMUNOMODULACIÓN .....</b>	<b>123</b>
Introducción .....	125
Objetivos Generales .....	133
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>OPTIMIZACIÓN Y MODULACIÓN DE UN MODELO MURINO DE COLITIS .....</b>	<b>135</b>
II.3.1 Objetivos Específicos .....	138
II.3.2 Resultados .....	139
II.3.3 Discusión.....	152
<b>CAPÍTULO 4</b>	
<b>INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES SOBRE LA INFLAMACIÓN INTESTINAL EN EL MODELO DE COLITIS.....</b>	<b>155</b>
II.4.1 Objetivos.....	158
II.4.2 Resultados .....	159
II.4.3 Discusión.....	165
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES PARTE II .....</b>	<b>167</b>
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES FINALES.....</b>	<b>175</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>183</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la mucosa intestinal en homeostasis.....	13
Figura 2. Plasticidad funcional de células Treg.....	18
Figura 3. Mecanismos de hipersensibilidad según Gell y Coombs.....	23
Figura 4. Proceso de sensibilización y degranulación de mastocitos y basófilos.....	25
Figura 5. Síntomas generados en un paciente con AA frente a la exposición al alérgeno.....	27
Figura 6. Prueba cutánea.....	31
Figura 7. Zonas del tracto gastrointestinal afectadas en EC y en CU.....	34
Figura 8. Zonas del epitelio intestinal afectadas en las diferentes formas de EII.....	35
Figura 9. Factores asociados al desarrollo de EII.....	36
Figura 10. Respuesta inmune de la mucosa frente a Ag de bacterias comensales en EII.....	39
Figura 11. Preparación de agua de bebida con cenizas volcánicas.....	55
Figura 12. Curva de amplificación.....	62
Figura 13. Signos clínicos post-desafío oral.....	84
Figura 14. Prueba cutánea.....	85
Figura 15. Determinación de anticuerpos séricos específicos de PLV por EAST o ELISA.....	86
Figura 16. Cuantificación de citoquinas en sobrenadante de cultivo de esplenocitos.....	87
Figura 17. Cuantificación de transcritos correspondientes a citoquinas y factores de transcripción en la mucosa intestinal.....	88
Figura 18. Evaluación de células Treg en LP por citometría de flujo.....	89
Figura 19. Evaluación de la producción de citoquinas regulatorias por células Treg de LP por citometría de flujo.....	90
Figura 20. Diferenciación de células Treg <i>in vitro</i> y transferencia celular a ratones receptores naïve..	91
Figura 21. Transferencia adoptiva de células Treg generadas <i>in vivo</i> .....	92
Figura 22. Signos clínicos post-desafío oral.....	102
Figura 23. Prueba cutánea.....	103
Figura 24. Determinación de anticuerpos séricos específicos de PLV por EAST o ELISA.....	105
Figura 25. Cuantificación de citoquinas en sobrenadante de cultivo de esplenocitos.....	106
Figura 26. Evaluación de poblaciones de DCs de LP por citometría de flujo.....	107
Figura 27. Evaluación de población de linfocitos Th1 en SLN por citometría de flujo.....	108
Figura 28. Evaluación de población de linfocitos Treg en SLN por citometría de flujo.....	109

## Índice de figuras

María Lucía Orsini Delgado

---

<b>Figura 29. Mecanismo de inducción de tolerancia por ITSL alérgeno específica.....</b>	<b>121</b>
<b>Figura 30. Peso corporal e índice de actividad de la enfermedad, DAI.....</b>	<b>140</b>
<b>Figura 31. Evaluación macroscópica del colon.....</b>	<b>140</b>
<b>Figura 32. Evaluación histológica del colon y de la actividad MPO.....</b>	<b>141</b>
<b>Figura 33. Cuantificación de transcritos correspondientes a citoquinas y factores de transcripción en colon por qPCR.....</b>	<b>142</b>
<b>Figura 34. Cuantificación de citoquinas en colon por ELISA.....</b>	<b>143</b>
<b>Figura 35. Variación del peso corporal respecto al día 0.....</b>	<b>144</b>
<b>Figura 36. Índice de actividad de la enfermedad, DAI.....</b>	<b>145</b>
<b>Figura 37. Evaluación macroscópica del colon.....</b>	<b>145</b>
<b>Figura 38. Evaluación histológica del colon y de la actividad MPO.....</b>	<b>146</b>
<b>Figura 39. Evaluación de fibrosis intestinal por tinción tricrómica de Masson.....</b>	<b>147</b>
<b>Figura 40. Cuantificación de citoquinas en colon por ELISA.....</b>	<b>147</b>
<b>Figura 41. Variación de pesos corporales y DAI.....</b>	<b>149</b>
<b>Figura 42. Evaluación macroscópica del colon.....</b>	<b>149</b>
<b>Figura 43. Evaluación histológica del colon y de la actividad MPO.....</b>	<b>150</b>
<b>Figura 44. Cuantificación de transcritos correspondientes a citoquinas quimoquinas y factores de transcripción en colon por qPCR.....</b>	<b>150</b>
<b>Figura 45. Cuantificación de citoquinas en colon por ELISA.....</b>	<b>151</b>
<b>Figura 46. Variación de pesos corporales respecto al día 0.....</b>	<b>160</b>
<b>Figura 47. Índice de actividad de la enfermedad, DAI.....</b>	<b>161</b>
<b>Figura 48. Evaluación macroscópica del colon.....</b>	<b>161</b>
<b>Figura 49. Evaluación histológica del colon y actividad MPO.....</b>	<b>162</b>
<b>Figura 50. Cuantificación de transcritos correspondientes a citoquinas quimoquinas y factores de transcripción en colon por qPCR.....</b>	<b>163</b>
<b>Figura 51. Evaluación microscópica de las cenizas volcánicas.....</b>	<b>164</b>

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Signos clínicos de hipersensibilidad inmediata.....	47
Tabla 2. Índice de actividad de la enfermedad (DAI).....	57
Tabla 3. Índice de actividad histológica (HAI).....	58
Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos (primers).....	63

**ÍNDICE DE ESQUEMAS**

Esquema 1. Protocolo general de sensibilización de ratones a PLV.....	46
Esquema 2. Protocolo general de instilación i.r. de TNBS para la inducción de colitis.....	56
Esquema 3. Protocolo de sensibilización a PLV y tratamiento por vía ig.....	83
Esquema 4. Protocolo de sensibilización a PLV y tratamiento por vía sl.....	101
Esquema 5. Protocolo de inducción de colitis aguda.....	139
Esquema 6. Protocolo de inducción de fibrosis intestinal.....	143
Esquema 7. Protocolo de modulación de colitis aguda con P2.....	148
Esquema 8. Protocolo de inducción de colitis por administración de cenizas volcánicas en el agua de bebida.....	159



# **RESUMEN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS GENERALES**





**RESUMEN**

Durante las últimas décadas se ha reportado un importante incremento en la incidencia de patologías inmunes inflamatorias, no infecciosas, fundamentalmente en países desarrollados o en vías de desarrollo. Debido a la velocidad con que se ha incrementado la incidencia de estas patologías, sólo los cambios en los factores ambientales son capaces de explicarlo. Estudios epidemiológicos han permitido observar una asociación entre el incremento en patologías inflamatorias no infecciosas y la disminución en la incidencia de patologías infecciosas, debido a una mejora en las condiciones sanitarias, por mejoras en la higiene personal, y al incremento en el uso de vacunas y antibióticos, que implican una menor exposición a microorganismos (Okada et al. 2010). En base a estos datos epidemiológicos surge la Hipótesis de la Higiene, que plantea inicialmente que la menor exposición a microorganismos infecciosos que induzcan una respuesta Th1, genera un desbalance, con la consecuente inducción de respuestas inmunes Th2 hacia Ags inocuos (Strachan 1989). Sin embargo, el incremento en patologías autoinmunes y otras patologías asociadas a una respuesta de perfil Th1, llevaron a reformular dicha hipótesis. Así, el incremento observado en inmunopatologías Th1 y Th2 se debería a mecanismos regulatorios defectuosos.

Es sabido que la enorme variedad y cantidad de microorganismos que componen la microbiota intestinal ejercen diversas funciones que son relevantes desde el punto de vista metabólico, nutritivo, pero también inmunológico. Estos microorganismos, la gran mayoría saprófitos, y sus componentes participan activamente de la inducción de diferentes células con funciones regulatorias que formarán parte de los circuitos regulatorios que operan a nivel local y sistémico. Estos mecanismos son importantes para evitar las reacciones de hipersensibilidad y fenómenos de autoinmunidad. Por lo tanto la Hipótesis de la Higiene reformulada postula que un menor contacto con microorganismos patógenos y saprófitos, por los hábitos de vida en los países occidentalizados o desarrollados, genera mecanismos regulatorios deficientes, que dependiendo de factores de susceptibilidad individual, darán origen al incremento en la incidencia de las inmunopatologías Th2-dependientes (alérgicas) o Th1-dependientes (autoinmunidad) (Okada et al. 2010; MacDonald et al. 2011). Entre estas patologías se encuentran las alergias alimentarias y las enfermedades inflamatorias intestinales, cuyas formas principales son la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Dadas la alta morbi-mortalidad de estas enfermedades, el estudio de las bases inmunológicas y de la influencia de factores ambientales en el desarrollo o potenciación de las

mismas, así como la evaluación de diferentes estrategias terapéuticas que permitan modular dichas inmunopatologías, resulta fundamental para mejorar la calidad de vida de los pacientes.

En este trabajo de tesis estudiamos diferentes estrategias terapéuticas para modular la respuesta inmune alérgica, haciendo uso de un modelo de alergia alimentaria experimental. Para ello administramos a ratones previamente sensibilizados, bajas dosis del alérgeno por vía oral, o por vía sublingual en presencia o ausencia de un agonista de TLR4 (la proteína externa de membrana de *Brucella abortus*, Omp16) como adyuvante pro-Th1 mucosal. Tanto con la inmunoterapia oral, como con la inmunoterapia sublingual en presencia de Omp16, logramos modular la respuesta inmune alérgica en forma local y sistémica, reduciendo la expresión y secreción de citoquinas asociadas a una respuesta Th2, e incrementando la frecuencia de la población de células Treg y/o Th1.

Por otro lado nos propusimos optimizar un modelo de colitis experimental, inducida por administración intra-rectal de TNBS, y evaluar el efecto de la administración oral de un péptido con propiedades anti-inflamatorias, previamente demostradas *in vitro* e *in vivo* en el modelo de alergia experimental (Moronta 2015, trabajo de tesis doctoral; Moronta et al. 2016). El modelo de colitis se caracteriza por la generación en colon de un infiltrado transmural, daño epitelial, y una respuesta inmune Th1, así como el desarrollo de fibrosis en la forma crónica, con características similares a las observadas en pacientes con enfermedad de Crohn. La administración oral de un péptido de Amaranto, con propiedades anti-inflamatorias, logró modular la respuesta inflamatoria, reduciendo el daño epitelial y el infiltrado celular en colon, así como la expresión y secreción de citoquinas pro-inflamatorias tanto de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa.

Finalmente, decidimos aplicar el modelo de colitis al estudio de factores ambientales en la modulación del proceso inflamatorio intestinal. Durante la erupción del volcán Puyehue en 2011, se detectó un empeoramiento de los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, falta de respuesta a los tratamientos convencionales, y aumento en las intervenciones quirúrgicas por graves complicaciones. En base a esta observación nos propusimos evaluar el efecto de la administración oral de cenizas volcánicas, como factor ambiental potenciador de la respuesta inmune inflamatoria, en el modelo de colitis experimental. De esta forma evidenciamos que la administración oral de cenizas volcánicas, incrementó el daño tisular y el infiltrado celular en el modelo de colitis, así como la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y factores de transcripción asociados. Dado que las cenizas volcánicas están compuestas de partículas menores a 10µm, y los

elementos principales son aluminio, silicio y titanio, los cuales han sido implicados en la activación del inflamasoma, vía de NLRP3, proponemos que esta es la vía por la cual las cenizas potencian la respuesta inmune inflamatoria.

Los resultados aquí planteados serán de utilidad para comprender las bases inmunológicas de diferentes estrategias inmunomodulatorias para el re-establecimiento de la tolerancia mucosal hacia Ags dietarios y microbianos, y para resaltar la importancia de los factores ambientales como disparadores o potenciadores de patologías inflamatorias intestinales.



### **HIPÓTESIS**

La hipótesis de trabajo sobre la cual se basan los objetivos propuestos en este proyecto es que la administración de diferentes componentes ambientales o dietarios por vías mucosales es capaz de revertir o potenciar una respuesta inmune mucosal inadecuada, por restauración de los mecanismos de tolerancia deficitarios o activación de la inmunidad innata local.

### **OBJETIVOS GENERALES**

- ▣ Evaluar diferentes estrategias terapéuticas en un modelo murino IgE-dependiente de alergia a las proteínas de leche de vaca.
- ▣ Optimizar un modelo murino de colitis experimental y evaluar la influencia de la administración oral de diferentes componentes asociados a factores ambientales.



# INTRODUCCIÓN





## **SISTEMA INMUNE DE MUCOSAS**

Las mucosas constituyen la mayor superficie de contacto con el medio exterior; la permanente y dinámica exposición que las mismas tienen a diferentes tipos de antígenos (dietarios, microbianos y ambientales) ha determinado que evolutivamente presenten una muy intensa actividad inmunológica, lo que permite explicar por qué el 80% de los linfocitos T y B se encuentran en estos tejidos. Las mucosas, además de cumplir con funciones básicas de intercambio de nutrientes, metabolitos y gases, constituyen un sitio central para el sistema inmune, en el cual se regula su activación o silenciamiento dependiendo de las características del antígeno. Así, el sistema inmune de mucosas (SIM), que es el conjunto de elementos del sistema inmune (células, moléculas, tejidos y órganos) asociados a una determinada mucosa, es el sitio donde se generan los principales mecanismos regulatorios periféricos que permiten controlar la instauración de reacciones inmunológicas aberrantes frente a auto-antígenos o antígenos inocuos (alimentarios o ambientales), evitando las enfermedades autoinmunes y las de hipersensibilidad. Esta función la cumple a través de numerosos y complejos mecanismos que incluyen barreras físicas, enzimas y componentes peptídicos, y células que actúan como centinelas o como efectoras ubicadas en sitios inductores (tejido linfoide asociado a la mucosa o MALT, y ganglios linfoides drenantes), y efectores del sistema inmune (lámina propia) (Mayer 2003; Xavier & Podolsky 2007). Se han caracterizado diferentes SIM según el tejido en el que se encuentre: SIM de la cavidad oral, SIM gastro-intestinal, SIM de la piel, SIM respiratorio, SIM genito-urinario, etc.

Dado su tamaño (más de 8 metros de longitud), características (aproximadamente 300 m<sup>2</sup> de superficie y exposición a una inmensa cantidad y variedad de antígenos) y función (intercambio de nutrientes y funciones inmunológicas), el tracto gastrointestinal presenta el más complejo y extenso SIM del organismo, aún no del todo comprendido, conteniendo el mayor porcentaje de los linfocitos B (LB) y los linfocitos T (LT). El sistema inmune asociado a esta mucosa debe “decidir” contra qué antígenos (Ags) montar una respuesta inmune activa y frente a cuáles inducir los mecanismos de tolerancia; de forma que para preservar ciertos Ags que ingresan por la vía oral (Ags dietarios) y los presentes en el intestino (microbiota) se inducen los mecanismos de tolerancia, y a la vez se induce la activación inmunológica frente a microorganismos patógenos (Izcue et al. 2009; MacDonald et al. 2011).

Diferentes elementos propios del tracto gastrointestinal, o del sistema inmune de la mucosa intestinal participan en el mantenimiento de la fisiología u homeostasis, de este órgano. Las enzimas pancreáticas se encargan de degradar los componentes potencialmente

inmunogénicos, en péptidos, facilitando su absorción y reduciendo su inmunogenicidad. Por otro lado, el *mucus*, compuesto por glicoproteínas, producido por las células caliciformes, reduce el contacto de los componentes de la luz intestinal con la capa epitelial y sirve como reservorio de la inmunoglobulina (Ig) A secretada (*slgA*) por las células plasmáticas ubicadas en la lámina propia (LP), y los componentes secretados por las células de Paneth: *zinc*, *criptidinas* y *defensinas*, que tienen actividad antimicrobiana, y normalmente son secretadas en respuesta a estímulos vía receptores de la inmunidad innata, como los receptores tipo Toll (TLR) o Nod (NLR).

También se considera que la *microbiota intestinal* constituye un órgano adicional por la importancia y complejidad de la misma. Contiene en promedio más células ( $10^{14}$  células) que la totalidad de las células del organismo ( $10^{13}$  células) y alrededor de 150 veces más genes que todos los genes de las células eucarióticas del organismo. El conjunto de microorganismos y genes es lo que se denomina microbioma. Esta comunidad de microorganismos, la gran mayoría procariotas, se caracteriza además por su diversidad (más de 1000 especies de bacterias identificadas) y su variación a lo largo de la vida del huésped. El intestino fetal es estéril, y desde el momento del nacimiento se produce la colonización, en función del tipo de parto (natural o cesárea), dieta, condiciones de higiene, administración de vacunas y medicación (principalmente antibióticos), lo cual determina que su composición varíe a lo largo de la vida, en particular durante los primeros años. Los organismos han desarrollado evolutivamente complejos mecanismos, aún no del todo comprendidos, para establecer una simbiosis con esta comunidad de microorganismos, lo cual le aporta importantes funciones tanto desde el punto de vista nutritivo (aporte de nutrientes, degradación de componentes de la dieta, etc.), como inmunológico (competencia con microorganismos patógenos para evitar su invasión, inducción de mecanismos de tolerancia, estimulación del sistema inmune para el correcto desarrollo del SIM, etc.). Tal es así, que se ha demostrado que animales crecidos en ambientes libres de microorganismos presentan un SIM asociado al intestino deficiente, lo cual repercute en la fisiología del sistema inmune a nivel sistémico; por lo tanto, es indudable que la presencia de la microbiota es esencial para la viabilidad del organismo. (O'Hara & Shanahan 2006; Feng & Elson 2011). La composición de la microbiota, también varía según la sección del tracto gastro-intestinal y existen nichos de colonización muy específicos dependiendo del microorganismo. Así, la mayor concentración y diversidad de microorganismos se encuentra en la cavidad oral y en el colon (Izcue et al. 2009). Esto determina que la fisiología y la composición del SIM también varíen a lo largo del tracto gastro-intestinal, de manera que existen patologías localizadas únicamente en la cavidad oral

(periodontitis), en el intestino delgado (alergias alimentarias, enfermedad celíaca) o en el intestino grueso (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa).

Para poder estudiar la diversidad de la microbiota, ha sido necesario el desarrollo de una metodología diferente a la tradicional del cultivo microbiológico. Para ello se han empleado técnicas de secuenciación masiva de última generación permitiendo identificar a los microorganismos en base al estudio de su genoma. De esta manera la pirosecuenciación permitió caracterizar productos de PCR del gen que codifica para el RNA ribosómico (rDNA) 16S, el cual es único para cada bacteria. Así se ha identificado lo que se denomina una microbiota “sana” y una microbiota “enferma” asociada a diferentes patologías (cáncer, autoinmunidad, diabetes tipo II, alergias, etc.), lo cual estaría íntimamente relacionado con los mecanismos inmunológicos subyacentes inducidos (Kostic et al. 2014).

Esta comunidad de microorganismos se encuentra separada del medio interno por una monocapa de células epiteliales que forman parte del compartimento epitelial; el correcto funcionamiento y la integridad de esta **barrera epitelial** es fundamental para mantener la fisiología intestinal. Las células epiteliales, que conforman esta monocapa a lo largo de las vellosidades y criptas, están unidas entre sí mediante uniones estrechas, generando una barrera física que limita, aunque no impide, el intercambio de Ags entre el lumen y el medio interno (Mayer 2003). Estas uniones están formadas por un conjunto de proteínas (integrinas, ocludinas, etc.) sintetizadas por las células epiteliales y que se mantienen unidas covalentemente. Su expresión está regulada por las citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-13, IL-17 e IFN- $\gamma$ ) presentes en el medio, de manera tal que durante procesos inflamatorios la barrera se vuelve más permeable y el control de Ags difiere con respecto al estado de homeostasis (Xavier & Podolsky 2007; Izcue et al. 2009).

Las células epiteliales constituyen una población heterogénea de células, con diferentes localización y funciones: células caliciformes, encargadas de la producción y secreción de mucus principalmente localizadas en el colon, las células de Paneth que producen y secretan péptidos antimicrobianos están básicamente en las criptas, y las células M, encargadas de la traslocación de Ags (solubles y particulados) desde el lumen al interior, se encuentran localizadas en el epitelio asociado a los folículos linfoides (FAE) y en la LP. Estas células cumplen, además de su función de barrera en la interface, un rol activo en cuanto a que son capaces de detectar la presencia de procariontes a través de la expresión de un conjunto de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), conservados en

## Introducción

María Lucía Orsini Delgado

---

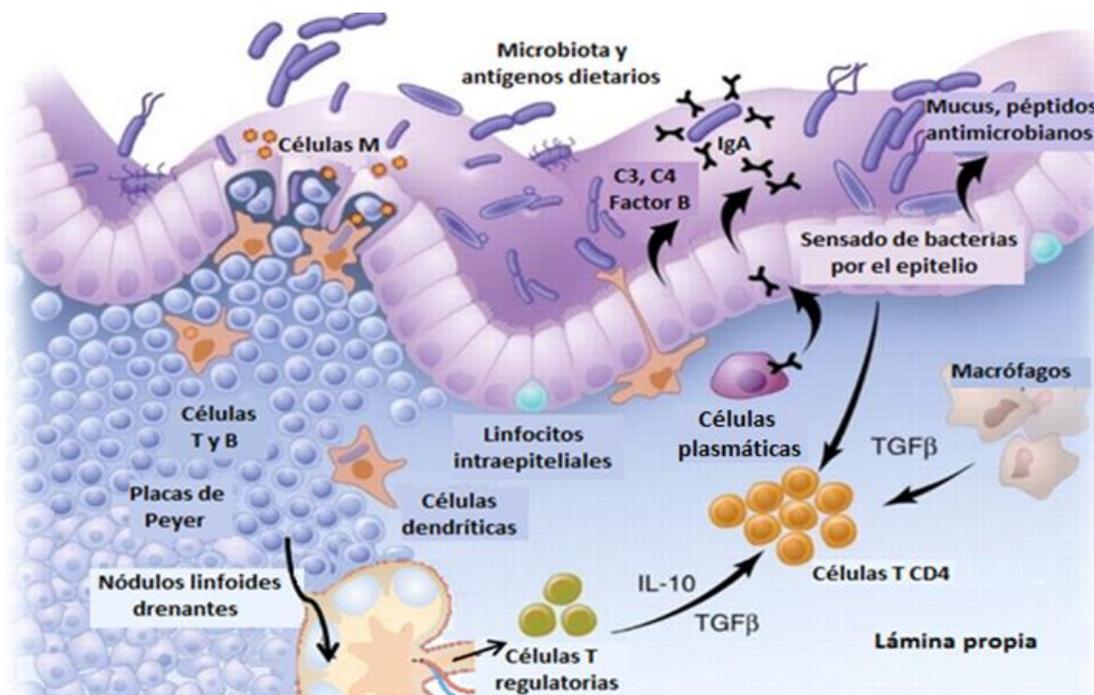
bacterias, hongos, parásitos y virus. Entre estos se encuentran los receptores TLR y NLR, los receptores scavengers, receptor de manosa, las moléculas de unión a dominios de oligomerización de nucleótidos (NOD), etc. En general el reconocimiento de su agonista (PAMP), desencadena una respuesta inmune inflamatoria a través de la activación de la vía intracelular de NF $\kappa$ B, (Philpott & Girardin 2004; MacDonald & Monteleone 2005). De esta manera censan la presencia de patógenos en la superficie de las células, dado que son los únicos con capacidad de penetrar la espesa capa de mucus que recubre la superficie apical de estas células. Una vez que las células detectan los PAMPs, se activan induciendo la expresión de quimoquinas y citoquinas pro-inflamatorias, incrementando la expresión de moléculas co-estimuladoras e incluso expresando moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y II. En situación de homeostasis estas células son capaces de presentar Ags en el contexto de MHC clase II, actuando como células presentadoras de antígenos no profesionales, lo que lleva a la inducción de una respuesta tolerogénica (Mayer 2003), básicamente frente a proteínas captadas de la luz intestinal, y aunque es en cierta forma debatible, ya que no se ha demostrado *in vivo*, estas células se pueden transformar en células presentadoras de antígenos profesionales.

En contacto con la barrera epitelial, se encuentran las células propias del sistema inmune. Funcionalmente el SIM está compartimentalizado en sitios inductivos y sitios efectoros. Los primeros son estructuras organizadas (folículos linfoides aislados, Placas de Peyer y ganglios linfáticos) en las que se activan las células del sistema inmune, mientras que en los sitios efectoros se localizan las células activadas que van a cumplir un rol efector (LP) (Brandtzaeg et al. 2008; Russell et al. 2015). Mientras las Placas de Peyer (PP), en humanos son entre 100 y 200, se localizan principalmente en el intestino delgado (ileum), los folículos linfoides aislados (ILF), varios cientos, están ubicados en el intestino delgado, pero fundamentalmente en el intestino grueso. Las células M están localizadas en el FAE, aunque en los últimos años se ha identificado este tipo de células en otras zonas del epitelio intestinal. Como se mencionó anteriormente estas células son las encargadas de muestrear constantemente los Ags de la luz intestinal. Sin degradarlos los traslocan a la cara basal y los secretan para ser endocitados por macrófagos y células dendríticas (DCs), que se alojan en la cavidad que ellas mismas conforman. Estas células son las encargadas de procesarlos y presentarlos a los LT y LB que se encuentran por debajo del epitelio agrupados en las áreas T y B respectivamente (Izcue et al. 2009). Aquí se pre-activan los LB y LT específicos, los cuales deben migrar al ganglio regional para continuar y culminar el proceso de activación. Dado que existe un número limitado y reducido de PP, estas estructuras constituyen un elemento muy

particular del sistema inmune y no son, de ninguna manera, una vía de ingreso de macromoléculas como parte de la función absorbiva del intestino. Las principales vías de ingreso de macromoléculas son el pasaje transcelular, a través de las células epiteliales, que implica la degradación de las proteínas a péptidos y aminoácidos, y el pasaje paracelular, a través de las uniones estrechas establecidas entre las células epiteliales. Dado que en la mayor parte de la superficie intestinal predominan estos dos últimos sistemas de captación de macromoléculas, principalmente proteínas, éstas constituyen las principales vías de absorción. Por esta razón, y para mantener una funcionalidad intestinal adecuada desde el punto de vista nutricional e inmunológico, es fundamental mantener controlada la permeabilidad intestinal. Esto se logra con un adecuado control del estado inflamatorio basal del tejido (homeostasis intestinal). Ante la presencia de una inflamación aguda o crónica, el pasaje de moléculas y electrolitos se altera pudiendo generarse un proceso patológico transitorio o permanente.

En situación de homeostasis intestinal la respuesta inmune que se desarrolla frente a la enorme cantidad de Ags presentes es supresora, lo que asegura no montar una respuesta inmune inadecuada frente a los componentes de la microbiota ni a las macromoléculas que ingresan por la vía oral. El conjunto de mecanismos que asegura este estado se denomina tolerancia oral.

En la **Figura 1** se esquematiza la mucosa intestinal y el sistema inmune asociado, mostrando los sitios inductores y efectores, y las células que predominan en cada sitio.



**Figura 1. Representación de la mucosa intestinal en homeostasis.** Representación de mucosa intestinal, de los sitios inductores y efectores, y de las células involucradas en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Esquema adaptado de MacDonald & Monteleone 2005.

### **HOMEOSTASIS E INFLAMACIÓN EN EL INTESTINO**

A diferencia de los demás tejidos, la mucosa intestinal se encuentra en un estado inflamatorio basal constante y fisiológico, debido a la gran carga de Ags a la que está expuesto, muchos de los cuales son o contienen ligandos de TLR y potenciales mitógenos, y a que se requiere un cierto grado de permeabilidad para favorecer el intercambio de nutrientes. Para mantener este estado inflamatorio basal, se requiere un ajustado control de la enorme cantidad de células inmunes que se alojan en el extenso tejido, principalmente en la LP intestinal. En individuos normales, carentes de patologías, predominan mecanismos regulatorios encargados de mantener este estado denominado homeostasis intestinal. De esta manera se establece una no activación frente a Ags que evolutivamente han sido implicados en el aporte de funciones al organismo (Ags dietarios y la microbiota), pero siendo a la vez el SIM capaz de generar una respuesta inmune protectora en respuesta a microorganismos patógenos (MacDonald et al. 2011).

La inmunidad innata, presente en los organismos evolutivamente más primitivos, evolucionó para detectar y controlar a los microorganismos, y de esta manera limitar las infecciones, pero también para inducir los mecanismos de la inmunidad adaptativa, presentes sólo a partir de la aparición de los vertebrados, responsables de generar la memoria inmunológica. Entre estos mecanismos es fundamental la participación de los PRR presentes tanto en células de la inmunidad innata (macrófagos, DCs, células epiteliales, neutrófilos, eosinófilos, etc.) como de la inmunidad adaptativa (Treg) (Sutmuller et al. 2006; Xavier & Podolsky 2007). La presencia de un microorganismo patógeno en la mucosa intestinal genera un foco inflamatorio a partir del reconocimiento del mismo por parte de las células de la inmunidad innata (básicamente macrófagos y DCs), a través de los receptores antes mencionados. Este proceso genera la atracción de otras células y la movilización de LB y LT hacia los ganglios mesentéricos (MLN), los cuales luego de activarse migran nuevamente a la LP para ejercer su función de eliminación del patógeno y mantener un pool de memoria (específico de cada tejido) que medie protección ante futuras exposiciones al patógeno. Sin embargo, este proceso inflamatorio debe limitarse para evitar el daño tisular y una potencial patología, y aquí intervienen distintas células capaces de mantener diferentes y complejos circuitos de regulación tanto de la rama efectora innata como de la adaptativa. Es decir que la autolimitación del proceso inflamatorio es una parte fundamental de la inflamación aguda para recuperar el estado de homeostasis, y cuando esto no sucede se produce una inflamación crónica que, de perpetuarse, genera un proceso patológico (Izcue et al. 2009).

Diferentes células con funciones regulatorias han sido implicadas en el control de la inflamación en el tracto gastrointestinal y en la recuperación de la integridad de la barrera epitelial, incluyendo macrófagos y DCs tolerogénicas, LT regulatorios (Treg), y LB regulatorios (Breg). Se han descrito diferentes mecanismos, muchos de los cuales son comunes para varias poblaciones celulares e incluyen la acción de citoquinas inmuno-regulatorias, la privación de metabolitos o la inducción de apoptosis de LT activados efectores por contacto célula-célula, (MacDonald et al. 2011), como explicaremos brevemente a continuación.

Las citoquinas inmuno-regulatorias por excelencia son IL-10 y TGF- $\beta$ , aunque recientemente se han descrito nuevas citoquinas que ejercen funciones supresoras (IL-25, IL-27, IL-35, etc.). Tanto Treg como Breg, DCs tolerogénicas y macrófagos con actividad regulatoria (M2) han sido descritos como fuente de **IL-10** (Moore et al. 2001). Esta citoquina ejerce su efecto directo sobre linfocitos y células mieloides, limitando su activación y la respuesta inflamatoria; además es una citoquina necesaria para el desarrollo de los Treg denominados Tr1. Esta citoquina ha sido descrita como inhibidora de la producción de citoquinas y quimoquinas pro-inflamatorias por monocitos y macrófagos, y como responsable de inducir la producción de antagonistas solubles de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Moore et al. 2001). Por otro lado, esta citoquina ha sido implicada en la diferenciación y cambio de isotipo de células B a células plasmáticas productoras de IgA, así como en la potenciación de la respuesta citotóxica de células T CD8<sup>+</sup> (Izcue et al. 2009). Animales deficientes en esta citoquina, o en su receptor, muestran serias deficiencias en los mecanismos regulatorios, sin embargo son viables.

Por otra parte, **TGF- $\beta$**  es una citoquina pleiotrópica, con funciones esenciales y muy disímiles (anti-inflamatoria, pro-inflamatoria o pro-fibrogénica) dependiendo del blanco celular, de la concentración y del entorno en el cual actúan. Existen 3 isoformas de TGF- $\beta$ , en particular nos interesa TGF- $\beta$ 1; esta citoquina es secretada como una pre-proteína, debiendo sufrir modificaciones conformacionales para ser activada, las cuales son mediadas por metaloproteasas, y otras moléculas como furina y las integrinas  $\alpha_V\beta_6$  y  $\alpha_V\beta_8$  (Li et al. 2006). Su función central es inducir tolerancia y contener y resolver los procesos inflamatorios, para ello al inicio del proceso inflamatorio favorece la migración de diferentes tipos celulares al inducir la producción de metaloproteasas por células epiteliales, las cuales degradan la matriz extracelular; también induce en LB el cambio de isotipo a IgA y, en caso de haber niveles elevados de IL-6 e IL-23, la diferenciación de LT hacia un perfil Th17; sin embargo, concentraciones más elevadas de TGF- $\beta$  inhiben la diferenciación de células T naïve a células Th17, e inducen la expresión de FoxP3 y su

diferenciación a células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>. Por otro lado, limita la diferenciación de células Th1 y Th2, y la producción y secreción de citoquinas pro-inflamatorias (Li et al. 2006). Finalmente esta citoquina es también importante en la **restauración de la barrera epitelial**, y en el remodelamiento del tejido afectado, induciendo la diferenciación de diferentes tipos celulares a miofibroblastos y la producción de proteínas de matriz extracelular en forma controlada permitiendo la regeneración del tejido (Biancheri, Di Sabatino et al. 2013). Sin embargo, cantidades excesivamente elevadas de la misma generan procesos de fibrosis con diferenciación de células epiteliales a miofibroblastos y secreción de colágeno (Biancheri, Di Sabatino et al. 2013).

Otro de los mecanismos que aseguran el mantenimiento de la homeostasis intestinal es la privación de metabolitos. Se ha descrito que la enzima indoleamina 2,3 dioxigenasa (IDO) cumple un rol central al degradar el aminoácido triptofano a kinurenina. El aminoácido triptofano es un aminoácido esencial, y por lo tanto necesario para la proliferación de LT, con lo cual su degradación inhibe la proliferación celular. IDO puede ser expresada por varios tipos celulares incluidos macrófagos y DCs, su expresión se encuentra elevada en intestino y se incrementa luego de la inducción de procesos inflamatorios para el control de los mismos (Izcue et al. 2009). La privación de metabolitos no sólo limita la proliferación celular sino que también induce la **apoptosis** de los LT. La inducción de apoptosis en células efectoras, también puede ser inducida por células NK o LT CD8<sup>+</sup>, por contacto célula-célula (sistema Fas-FasL) o por mediadores solubles (granzimas). Los cuerpos apoptóticos generados son posteriormente fagocitados por DCs y macrófagos lo cual induce la producción de TGF- $\beta$ , desencadenando los mecanismos inmunosupresores anteriormente descritos (Izcue et al. 2009).

Entre las células que participan en el restablecimiento y mantenimiento de la homeostasis intestinal son fundamentales los Treg. Si bien se han descrito diferentes poblaciones, su función reguladora ha sido atribuida principalmente al factor de transcripción FoxP3 (Zheng & Rudensky 2007). Las células Treg pueden adquirir la expresión de FoxP3 y su fenotipo regulatorio en el timo, durante el proceso denominado tolerancia central y en este caso los Treg se denominan Treg naturales o nTreg. Durante la diferenciación linfocitaria, se genera un repertorio potencialmente infinito de receptores T (TCR) y B (BCR) capaces de reconocer cualquier Ag, inclusive Ags propios (Pabst & Mowat 2012). Para evitar el desarrollo de patologías autoinmunes la mayor parte de los LT auto-reactivos son eliminados en el timo (selección negativa) en lo que se denomina tolerancia central. Sin embargo, los LT que logran sobrevivir y salir a circulación son también auto-reactivos, pero reconocen los Ags propios con una menor afinidad. Con estos linfocitos el sistema inmune es

capaz de ejercer los mecanismos de defensa frente a los microorganismos patógenos. Es decir que el sistema inmune funciona por reactividad cruzada. Sin embargo, para evitar que estos LT maduros se activen frente a Ags propios periféricos es necesario un conjunto adicional de mecanismos de control denominados tolerancia periférica. Entre estos mecanismos, los principales son 3:

- ▣ **Delección clonal:** muerte por apoptosis, mediado por el sistema Fas-FasL, de los LT que se han activado reiteradamente por la presencia de un Ag en forma persistente.
- ▣ **Anergia clonal:** estado de no activación y proliferación que adquieren los LT cuando la célula presentadora de antígenos carece de la señal co-estimuladora o señal 2.
- ▣ **Inmunosupresión:** inducción de LT específicos con funciones regulatorias (iTreg) cuando la activación linfocitaria se produce en un microentorno regulatorio, básicamente en presencia de citoquinas regulatorias y DCs tolerogénicas. Esto es lo que ocurre en el intestino en homeostasis.

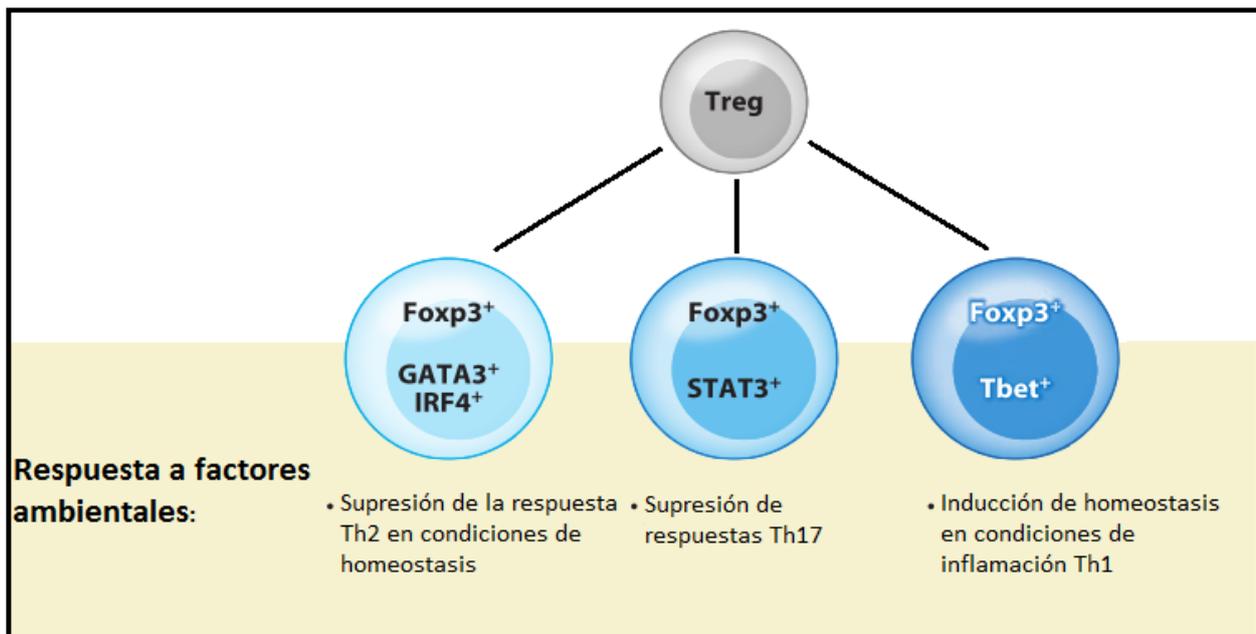
La población de células Treg no es homogénea, y no utiliza un único mecanismo supresor, sino que pueden actuar a través de un repertorio diverso y dinámico, que cambia dependiendo del contexto inflamatorio y la localización del proceso inflamatorio. Las células Treg son, en su gran mayoría, células anergizadas e inmunosupresoras. La inducción del factor de transcripción FoxP3 es la responsable de su función supresora. FoxP3 interactúa con otros factores de transcripción, suprimiendo la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como IL-2, IL-4, IL-17, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Williams & Rudensky 2007; Josefowicz et al. 2012), e induce la secreción de IL-10 y/o TGF- $\beta$ , entre otras citoquinas, cuyas funciones han sido descritas anteriormente. Estas células se caracterizan además por expresar la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2 (CD25) y requieren por lo tanto grandes cantidades de IL-2 para su diferenciación y para su mantenimiento en periferia, con lo cual se propone que inhibirían la proliferación de células T efectoras por privación de esta citoquina. También es fundamental en su efecto supresor la expresión de en su superficie de ciertas moléculas como CTLA-4 y GITR (Huehn & Beyer 2015). Aunque se desconoce la forma concreta del mecanismo supresor de CTLA-4, es importante para el correcto funcionamiento de las células Treg, y se ha visto que al interactuar con CD80/86 de DCs, induce en ellas la expresión deIDO, ejerciendo así un efecto supresor en forma indirecta (Fallarino et al. 2003). También se ha visto que la expresión conjunta de FoxP3 con otros factores de transcripción como T-bet, GATA-3 o IRF4, potencia su efecto supresor dirigido puntualmente hacia células Th1 o Th2 respectivamente, y que la interacción de FoxP3 con ROR $\gamma$ t, junto con la expresión de STAT3, inducida por IL-10, evita

la diferenciación de las células hacia un perfil Th17, lo que resalta la diversidad de las Treg antes mencionada, **Figura 2** (Josefowicz et al. 2012).

Sin embargo, también se han descrito otras poblaciones Treg que son CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup>, producen IL-10, IFN-γ o TGF-β, como las Tr1, y no está del todo claro en qué circunstancias son importantes. Si bien existen otros marcadores, factores de transcripción y mecanismos descritos para estas células regulatorias, los mencionados son los más relevantes.

Asimismo se han caracterizado otros linfocitos con propiedades regulatorias:

- ▣ **Linfocitos T CD8αα<sup>+</sup> y CD8αβ<sup>+</sup>**: secretan IL-10 y TGF-β e inducen apoptosis de células T efectoras y células presentadoras de antígeno (Smith & Kumar 2008). Se encuentran en circulación y en tejidos fuertemente tolerogénicos como hígado e intestino.
- ▣ **Linfocitos Breg**: secretan elevadas cantidades de IL-10, inhiben la respuesta inflamatoria de células Th1 y Th17 e inducen la diferenciación de LT a iTreg, potenciando su expresión de FoxP3 y CTLA-4. En ciertas circunstancias, inducen la activación de LT CD8<sup>+</sup> a células citotóxicas las cuales inducen la apoptosis de LB y LT activadas a través del sistema Fas-FasL (Mauri & Bosma 2012).



**Figura 2. Plasticidad funcional de células Treg.** Esquematización de la heterogeneidad de las células Treg en función de los factores ambientales presentes, y la respuesta inflamatoria a modular. Imagen adaptada de Josefowicz et al. 2012.

Otro mecanismo, que resulta fundamental para inducir tolerancia hacia los componentes presentes en el lumen intestinal, es la exclusión inmune a través de los anticuerpos (Acs) que son traslocados por las células epiteliales hacia el lumen (principalmente IgA). Estos evitan que los

microorganismos saprófitos colonicen la mucosa y que sustancias potencialmente peligrosas puedan penetrar la barrera epitelial. Por lo tanto el establecimiento y mantenimiento de la homeostasis intestinal requiere de una compleja red de células y componentes solubles que deben funcionar en forma altamente regulada para lo cual es indispensable mantener una barrera intestinal intacta.

La naturaleza del Ag definirá el mecanismo por el cual será absorbido y el tratamiento inmunológico que recibirá; se ha demostrado que las estructuras organizadas del tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal (GALT), ILF y PP, son críticas para la absorción de Ags particulados, como los componentes de la microbiota, a través de las células M. Sin embargo, en LP los componentes de la microbiota son muestreados a través de macrófagos y DCs (caracterizados por el marcador CXCR1 o receptor de fraktalina), que son capaces de emitir protrusiones o dendritas a través de las uniones estrechas entre las células epiteliales y de esta manera captar componentes lumbinales sin alterar la integridad de la barrera epitelial. De esta forma, los Ags de la microbiota alcanzan las DCs y/o macrófagos presentes en las PP o en los ILF, las primeras migran a las zonas T de las áreas debajo del epitelio en el folículo, donde son pre-activados, para luego culminar su activación en las áreas T de los ganglios regionales. En estas circunstancias (ausencia de inflamación) se produce la presentación de Ags y los LT específicos se transforman en Treg (Pabst & Mowat 2012).

Para el caso de Ags solubles estas vías de muestreo son similares, aunque se deben agregar aquellas vías de traslocación del Ag nativo por pasaje paracelular a través de las uniones estrechas. Una vez que el Ag ingresa en forma intacta y se encuentra en el tejido subepitelial, es captado por las DCs que migran a los MLN para inducir la diferenciación de los iTreg específicos (en un entorno no inflamatorio, homeostático o tolerogénico). Si bien esta última vía no parecería ser *a priori* importante para la absorción de macromoléculas nativas, en la totalidad de la extensión del intestino resulta un mecanismo relevante, principalmente en el intestino delgado donde la capa de mucus es más delgada o inexistente (existe una escasa microbiota en esta región). A pesar de los bajos valores de pH del estómago y de las enzimas pancreáticas liberadas en el intestino, algunos Ags son resistentes y se llegan intactos a la LP minutos después de su administración por vía oral. Los Ags de bajo peso molecular se cree que alcanzan la LP por transporte paracelular. En cambio, los Ags de mayor peso molecular, que no pueden ingresar por transporte paracelular, son endocitados por enterocitos, que expresan moléculas de MHC clase II, y luego liberados vía exosomas hacia la cara baso-lateral; estos exosomas son posteriormente captados por las DCs

ubicadas en la LP (Karlsson et al. 2001). Los Ags solubles también pueden ser captados directamente en el lumen, como se mencionó anteriormente, por células mieloides presentes en LP a través de la extensión de “dendritas” (Rescigno et al. 2001; Mazzini et al. 2014). Sin embargo, se ha visto recientemente que las células CX3CR1<sup>+</sup> no son capaces de migrar a ganglio, y co-expresan F4/80. Por lo tanto actualmente se postula que los macrófagos son los encargados de muestrear los Ags en la luz intestinal y que traspasan los mismos a través de porinas a DCs, las cuales se caracterizan por expresar CD103 y producir ácido retinoico a partir de la vitamina A captada del entorno. Estas células migran posteriormente al MLN e inducen los Treg (Mazzini et al. 2014). También se propone que los macrófagos CX3CR1<sup>+</sup> podrían participar en el mantenimiento de tolerancia al producir IL-10, lo que potencia las células Treg, principalmente en el colon (Pabst & Mowat 2012).

Por lo tanto las células Treg se pueden generar en ILF, en PP y en MLN (todos sitios inductores). Estas células luego migran a LP guiados por quimoquinas (CCR9, CCR10) y moléculas de adhesión ( $\alpha_4\beta_7$ ) para ejercer la función regulatoria. Por último, en este entorno tolerogénico, las células B se diferencian a células plasmáticas secretoras de IgA, la cual será transportada hacia la luz intestinal a través del receptor específico de IgA en la cara basal de las células epiteliales (MacDonald et al. 2011; Pabst & Mowat 2012).

Un mecanismo adicional de inducción de tolerancia, implica la migración de los Ags absorbidos, por vena porta, hacia el hígado. En el hígado existe una gran variedad de células presentadoras de antígenos y Treg; las células endoteliales sinusoidales, células de Kupffer y DCs plasmacitoides son eficientes en la captación de Ags de circulación e inducción de tolerancia sistémica (Goubier et al. 2008; Thomson & Knolle 2010).

Por lo tanto existe una extensa y compleja variedad de células y moléculas que participan en mecanismos, aún no del todo conocidos, necesarios para preservar ciertos Ags. Cuando alguno o varios de estos mecanismos no funcionan adecuadamente la situación puede cambiar drásticamente. Frente a defectos en la permeabilidad gastrointestinal, fallas a nivel de Treg u otras células regulatorias, o fallas en los mecanismos de activación inmunológica que determinan que las células regulatorias no logren controlarlos, se genera una respuesta inmune activa anormal dirigida a los Ags de la microbiota o de la dieta, generando un proceso inflamatorio que puede perpetuarse en el tiempo y transformarse en una inflamación crónica con potenciales daños tisulares (MacDonald et al. 2011). Este tipo de procesos puede participar en la instauración de inmunopatologías tales como las enfermedades inflamatorias intestinales (EII), cuyas formas

principales son la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU), o las alergias alimentarias (AA), entre otras (Pabst & Mowat 2012).

En los países desarrollados y en vías de desarrollo, la mayoría de las enfermedades infecciosas intestinales se han logrado controlar, sin embargo, la incidencia de las AA y enfermedades inflamatorias idiopáticas, incluyendo las EII, se ha incrementado en forma dramática en los últimos años; es decir que actualmente se redujeron los procesos inflamatorios causados por infecciones, pero aumentaron los procesos inflamatorios sin infección (MacDonald & Monteleone 2005). Si bien estas patologías están asociadas a cierta predisposición genética, el rápido incremento de la incidencia, sólo puede atribuirse a factores externos (Guarner et al. 2006). A pesar de que la causa del incremento en la incidencia de estas enfermedades continúa sin comprenderse completamente, una de las hipótesis más fuertes es que la baja exposición a procesos infecciosos, ha alterado el balance entre la microbiota comensal y el SIM, contribuyendo al desarrollo de patologías alérgicas y autoinmunes en individuos genéticamente predispuestos, conocida como la **Hipótesis de la Higiene** (MacDonald & Monteleone 2005; Okada 2010). Originalmente esta hipótesis atribuye el marcado incremento de las alergias y de la severidad de sus manifestaciones en las últimas décadas, a una menor exposición a estímulos microbianos durante los primeros años de vida, planteando como mecanismo la desviación Th1/Th2. Una menor exposición a patógenos intracelulares inductores de una respuesta Th1, como consecuencia de un medio ambiente más limpio, influye en la manera en que las células presentadoras de antígenos, básicamente las DCs, modulan la activación de los LT (Strachan 1989); sumado a esto, 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. Sin embargo, esto no permite justificar el incremento observado en la incidencia de enfermedades autoinmunes; en función de estas observaciones, la Hipótesis de la Higiene fue reformulada, y se buscaron mecanismos adicionales, que permitieran explicar el incremento en la incidencia de estas patologías. Uno de ellos plantea que el desarrollo de una respuesta inmune intensa contra Ags de microorganismos patógenos, inhibe la respuesta inmune frente a Ags débiles como auto-antígenos y alérgenos, por competencia de los linfocitos por citoquinas, complejos MHC/péptidos y factores de crecimiento necesarios para la proliferación y diferenciación de LB y LT (Okada et al. 2010). Otro de los mecanismos propuestos es que la inflamación en estas patologías, resulta de una actividad defectuosa de las células Treg; en este modelo, defectos en la generación de células

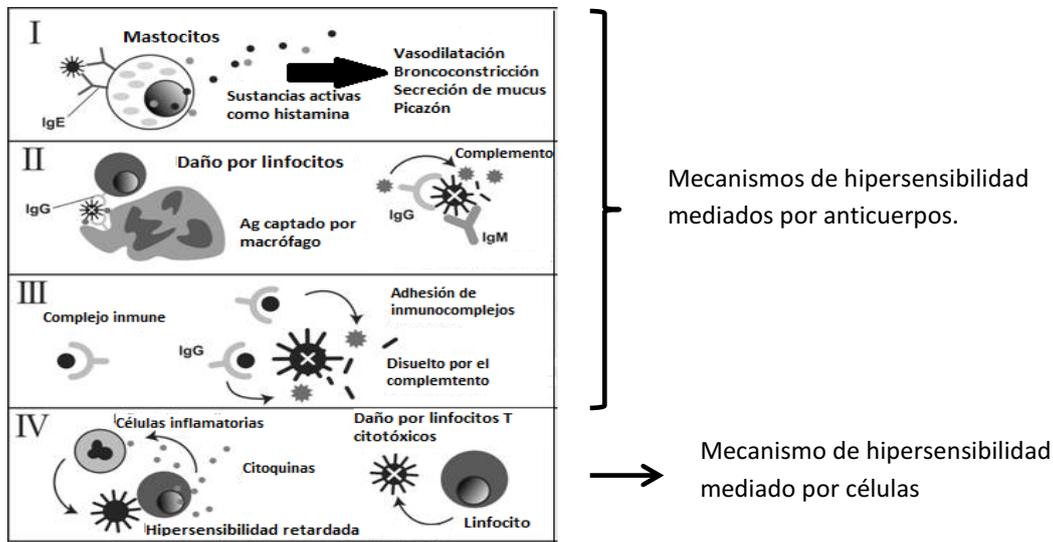
Treg, o defectos en los LT efectores que las hacen refractarias a los mecanismos regulatorios, hacen que no sea posible controlar la activación de células cuyos TCR reconocen Ags de la microbiota o la dieta (Okada et al. 2010; MacDonald et al. 2011). Ambos mecanismos no son excluyentes, ya que las células Treg podrían estar también implicadas en los mecanismos de competencia antigénica. De esta manera, la Hipótesis de la Higiene actualmente postula que los cambios en el estilo de vida en los países industrializados han llevado a un descenso en las infecciones que inducen respuestas tanto Th1 (bacterianas y virales) como Th2 (parasitarias), generando así un incremento en la incidencia tanto de patologías autoinmunes como alérgicas, por defectos en la activación o en la regulación del sistema inmune (Guarner et al. 2006; Okada et al. 2010). Como mencionamos anteriormente, dos de las patologías inmunes cuya incidencia se ha visto incrementada en las últimas décadas son las AA y las EI, en las cuales nos centraremos en este trabajo.

### **ALERGIAS ALIMENTARIAS**

Las enfermedades alérgicas incluyen un conjunto de manifestaciones clínicas causadas por una falla en los mecanismos de activación o de regulación de la respuesta inmune frente a Ags inocuos ampliamente distribuidos en la naturaleza. Este tipo de respuestas, denominadas reacciones de hipersensibilidad, fueron clasificadas clínicamente por Gell y Coombs en cuatro tipos: Tipo I, II, III y IV (Gell & Coombs 1963). A pesar que se describieron desde el punto de vista clínico en la década del 50, actualmente se conocen los mecanismos moleculares y celulares que las originan y se ha mantenido su clasificación, aunque originalmente existía un tipo más de reacción. Las reacciones de tipo I, II y III están mediadas por Acs, mientras que la de tipo IV está mediada por células (**Figura 3**) y todas tienen en común que la inflamación es el mecanismo que genera el daño tisular. Además para su instauración se requiere en todas un contacto repetitivo con el Ag de manera que la frecuente instauración del proceso inflamatorio será la responsable de alterar la fisiología del órgano blanco.

Una reacción alérgica puede ser causada por cualquiera de los 4 mecanismos de hipersensibilidad, incluso es común que varios mecanismos se presenten en forma simultánea o secuencial en el tiempo, con lo cual en ciertas ocasiones se identifica más de un elemento inmunopatogénico, lo cual implica una complicación para su diagnóstico. Es importante resaltar que las enfermedades alérgicas son las patologías de origen inmunológico con mayor incidencia a nivel mundial, llegando a afectar, en países desarrollados, un 20-30 % de la población (Branum & Lukacs 2009). Asimismo, y como se mencionó anteriormente, su presentación clínica se ha

modificado en las últimas 4-5 décadas en cuanto a la incidencia de presentación y la gravedad del cuadro clínico.



**Figura 3. Mecanismos de hipersensibilidad según Gell y Coombs.** Representación de los 4 mecanismos de hipersensibilidad descritos por Gell y Coombs, imagen adaptada de Takeuchi et al. 1990.

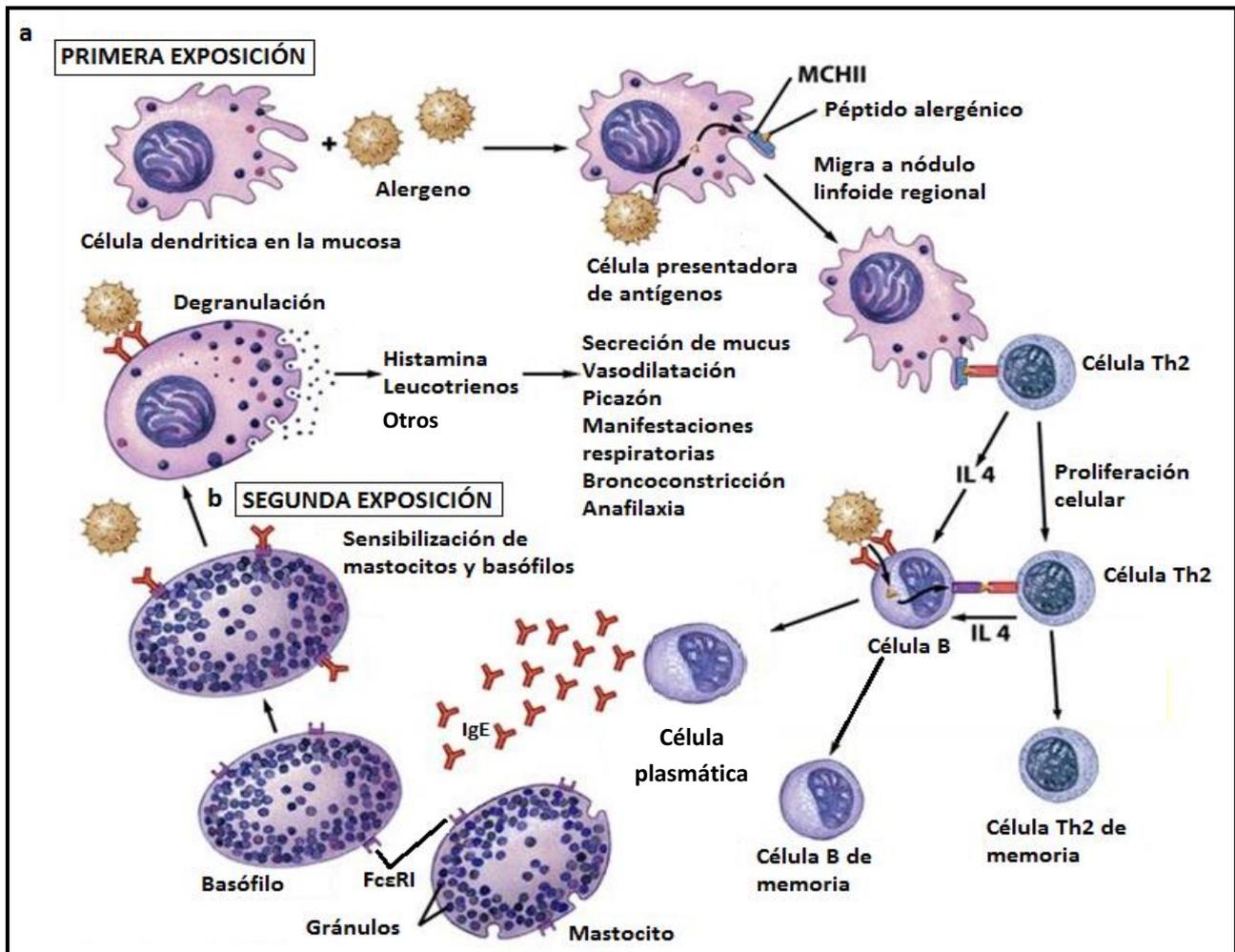
En particular nos interesan las reacciones de **hipersensibilidad tipo I, inmediatas o IgE-mediadas**, dado que son las que más frecuentemente se presentan y además, y más importante, son las más graves ya que pueden comprometer la vida del paciente. Como describimos previamente, en condiciones de homeostasis, la respuesta normal frente a los Ags ambientales inocuos es la generación de células Treg antígeno-específicas; sin embargo, en pacientes atópicos, se observa una respuesta celular de perfil Th2, que induce un cambio de isotipo en las células B, llevando a la generación de anticuerpos IgE antígeno-específicos (Berin & Mayer 2013). Dado que se trata de una enfermedad multifactorial existen factores genéticos individuales que predisponen a su aparición y factores ambientales disparadores. Se podría explicar de dos formas esta activación aberrante del sistema inmune frente a un Ag inocuo: existe una activación exacerbada y desregulada de mecanismos Th2-dependientes o se producen fallas a nivel de los mecanismos regulatorios que controlan a los mecanismos Th2. Se ha demostrado que líneas de LT crecidas a partir de células aisladas de biopsias de intestino de pacientes con alergia a leche de vaca mostraron una fuerte proliferación en presencia de leche, con liberación de citoquinas de perfil Th2, en particular IL-13, sin observarse citoquinas de perfil Th1 (IFN- $\gamma$ ), ni regulatorias (TGF- $\beta$  e IL-10) (Beyer et al. 2002). Un patrón similar se ha observado en LT aislados de sangre periférica de pacientes con alergia al maní, mostrando un incremento de células Th2 en comparación con pacientes control o pacientes alérgicos que generaron tolerancia al maní, los cuales mostraron una mayor proporción de células Th1 (Turcanu et al. 2003). Por otro lado, existe un creciente número

de trabajos que describen fallas a nivel de los mecanismos de tolerancia en pacientes alérgicos, tal como postula la Hipótesis de la Higiene ampliada. Krogulska y col. describieron una menor expresión génica de FoxP3, IL-10 y TGF- $\beta$  en células aisladas de sangre periférica de pacientes con alergia a leche de vaca o al huevo, respecto a los pacientes controles no alérgicos, y un marcado incremento en la expresión de estos genes en células de pacientes que generaron tolerancia en forma espontánea (Krogulska et al. 2011); así también, en un estudio realizado en pacientes alérgicos al maní que recibieron inmunoterapia oral, se pudo ver un incremento de células Treg en sangre periférica de aquellos pacientes que desarrollaron inmunotolerancia, en comparación con los pacientes no tratados o tratados pero que no desarrollaron tolerancia (Syed et al. 2014).

Las reacciones de hipersensibilidad tipo I constan de dos fases, una primera fase de sensibilización, y una posterior fase efectora. En la **fase de sensibilización**, frente a una primera exposición al Ag inocuo, en lugar de generarse una respuesta tolerogénica, las células presentadoras de antígenos liberan citoquinas pro-inflamatorias, de forma que activan el factor de transcripción GATA-3 en células T naïve, induciendo su diferenciación hacia un perfil Th2; la activación de GATA-3 es IL-4/STAT6 dependiente, con lo cual se cree que es necesaria una secreción inicial de IL-4 por parte de las DCs para la diferenciación de los LT a un perfil Th2 (Neurath et al. 2002). Las células Th2 producen diferentes citoquinas, IL-4 es la responsable de inducir en linfocitos B el cambio de isotipo de IgG a IgE con la consiguiente secreción exacerbada de anticuerpos IgE. Por otro lado IL-3, IL-5 y el factor estimulador de la formación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) secretadas por los LTh2 favorecen la producción y la supervivencia de mastocitos, eosinófilos y basófilos, estimulando la maduración y movilización de los eosinófilos de la médula ósea. Estas células presentan en su superficie receptores de alta afinidad de Fc $\epsilon$  (Fc $\epsilon$ RI), los cuales unen la IgE sintetizada y secretada por las células plasmáticas (Morafo et al. 2003), quedando así sensibilizadas.

Frente a posteriores exposiciones al alérgeno, éste se une a los anticuerpos IgE unidos a sus receptores de alta afinidad (Fc $\epsilon$ RI) en mastocitos, basófilos y eosinófilos, y si una misma molécula de alérgeno contiene al menos dos epitopes con capacidad de unir y puentear dos complejos IgE/Fc $\epsilon$ RI, se genera una señal intracelular, que activa la célula, induce la degranulación y liberación del contenido de sus gránulos citosólicos en forma inmediata, y la síntesis *de novo* de otros mediadores que mantienen el foco inflamatorio en el tiempo (**Fase efectora**). Por lo tanto, es importante tener en cuenta que el proceso inflamatorio inducido en la fase efectora consta de dos etapas: una inmediata que se produce a los 30-60 minutos de la exposición al alérgeno, y una

tardía, a las 24-72hs de la exposición original. En la **Figura 4** se esquematizan los procesos de sensibilización y posterior degranulación de mastocitos y basófilos en una respuesta inmune alérgica.



**Figura 4. Proceso de sensibilización y degranulación de mastocitos y basófilos.** Representación de la respuesta inmune frente a la primera exposición al alérgeno (fase de sensibilización) (a), y re-exposiciones posteriores (fase efectora) (b). Imagen adaptada Figura 18.1 Microbiology, 6th ed. © 2005 Wisley & Sons.

Las sustancias que se encuentran en los gránulos de mastocitos y basófilos, y las que son sintetizadas *de novo* presentan importantes propiedades pro-inflamatorias. En los gránulos el principal componente es la histamina, responsable de generar un proceso inflamatorio inmediato, pero también existen preformadas las siguientes sustancias: proteoglicanos (heparina, condroitina sulfato), sulfatasas, proteasas neutras ( $\alpha$  y  $\beta$  tripsina, quimasa, catepsina G, carboxipeptidasa, hidrolasa ácida) y citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8). Entre las sustancias pro-inflamatorias que se sintetizan podemos mencionar: Medidores lipídicos (PGD<sub>2</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>, TXA<sub>2</sub>, PAF), citoquinas (IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-15, IL-16), quimoquinas (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1, RANTES, etc.), y factores de crecimiento (GM-CSF, FGF, VEGF). Su 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. Cabe mencionar que el eosinófilo además contiene en sus gránulos sustancias que resultan altamente tóxicas para las células eucarióticas: proteína básica mayor, proteína catiónica del eosinófilo y neurotoxina derivada del eosinófilo. Por esta razón estas células se encuentran en un muy bajo porcentaje en circulación y están principalmente como células inmaduras en la médula ósea.

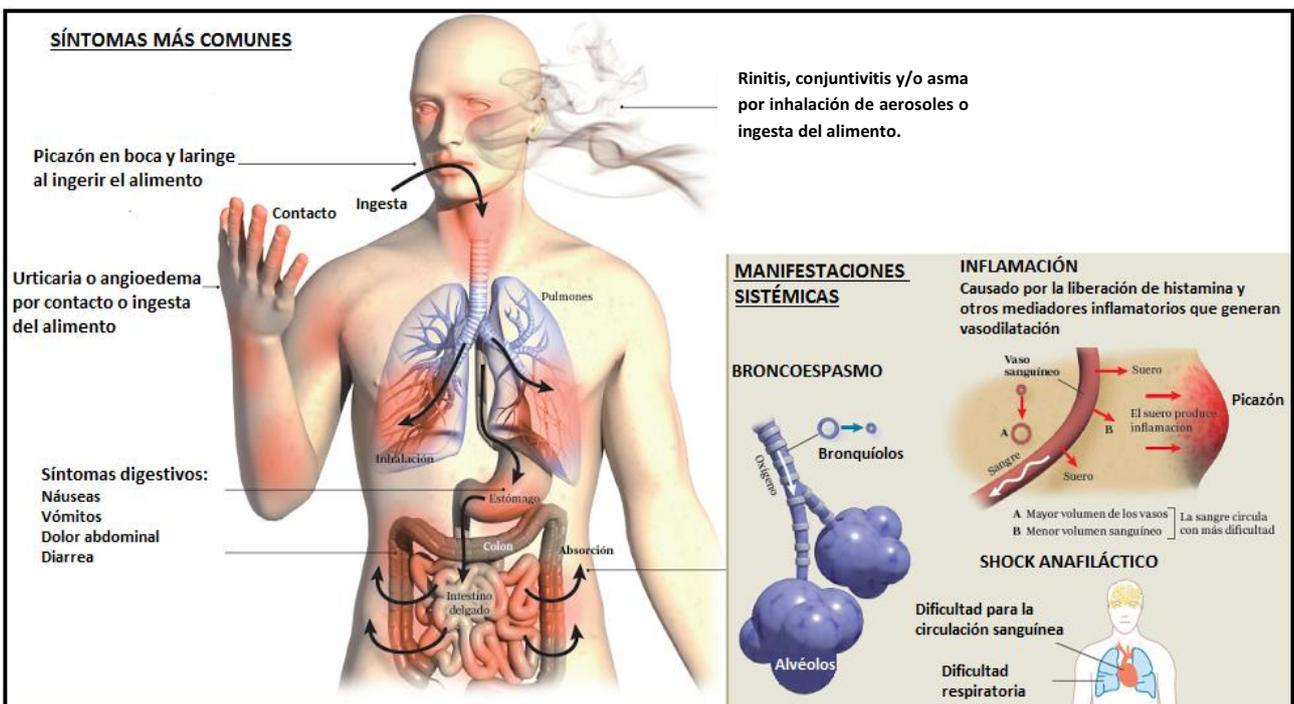
En cuanto a las **alergias alimentarias** (AA) en particular, son un síndrome que comprende diversas entidades clínicas, afectando a diferentes sistemas y órganos: enterocolitis, esofagitis eosinofílica, proctocolitis, gastroenteropatía eosinofílica, anafilaxia, síndrome de alergia oral, dermatitis atópica, eczema, etc. Dado que estas alergias se originan a partir del ingreso el alérgeno por la vía oral comprometen principalmente al tracto gastrointestinal, aunque también pueden afectar la piel, el árbol respiratorio o incluso tratarse de un fenómeno sistémico y generar una anafilaxia cuando afectan dos o más órganos.

Cualquiera de los 4 mecanismos de hipersensibilidad antes mencionados pueden ser los responsables de originar el cuadro inflamatorio y las manifestaciones clínicas luego de repetitivos contactos con el alérgeno. Las AA se han clasificado en tres grupos en función de los mecanismos inmunológicos puestos en juego:

- ▣ **Inmediatas o dependientes de IgE:** los signos clínicos aparecen dentro de los minutos posteriores a 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.
- ▣ **Retardadas o mediadas por células:** pueden estar involucrados los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Th1) o CD8<sup>+</sup>, eosinófilos, neutrófilos o macrófagos. En general la presentación clínica es tardía, ocurriendo horas o días después de la exposición a los alérgenos, y suelen manifestarse como enterocolitis, esofagitis, enteritis, dermatitis de contacto, proctocolitis, etc.
- ▣ **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 del daño tisular. Suelen presentarse como dermatitis atópica, esofagitis, gastroenteritis o enteritis eosinofílicas.

Las más comunes son las mediadas por IgE (McClain & Bannon 2006) y se presentan mayoritariamente en edad pediátrica (5-6%) y en menor medida en adultos (1-4%) (Branum & Lukacs 2009), constituyendo la primera manifestación de una alergia en un individuo susceptible. En la **Figura 5** se resumen las manifestaciones clínicas observadas en pacientes con AA IgE-mediada, minutos después de la exposición al alérgeno por diferentes vías.



**Figura 5. Síntomas generados en un paciente con AA frente a la exposición al alérgeno.** Resumen de las manifestaciones clínicas observadas en pacientes con alergia alimentaria luego de la exposición al alérgeno por ingesta, contacto o inhalación de vapores. Imagen adaptada de Clínica Universidad de Navarra 2012, <http://www.cun.es/actualidad/temas-destacados/alergia-alimentaria-desensibilizacion> infográfico.

La razón por la cual las AA se manifiestan preferentemente en la niñez es debido al contacto temprano con Ags dietarios en individuos susceptibles, a la presencia de una mucosa gastrointestinal inmadura y que no “aprendió a controlar” los Ags que ingresan por la cavidad oral, a la inmadurez del sistema inmune, y al establecimiento de la microbiota que recién se estabiliza luego de los 10 años de edad (Sicherer & Sampson 2006). En conjunto estos factores determinan que las AA sean la primera manifestación de la condición de alérgico en un individuo que presenta una susceptibilidad genética. Por esta razón, la leche de vaca constituye el principal alérgeno alimentario en numerosas regiones, afectando aproximadamente a un 2,5% de la población pediátrica (Sicherer & Sampson 2014). De igual manera se debe considerar que la sensibilización por contacto del alérgeno con 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 leche de vaca. Esto determina que la sensibilización alérgica no sólo se produzca por los Ags que ingresan por la cavidad oral, sino también a través de la piel (Saloga & Knop 2000).

Las células que se generan en un determinado sitio inductivo son programadas para migrar al sitio efector de la misma mucosa que les dio origen a través de un conjunto de quimoquinas y moléculas de adhesión cuyas moléculas complementarias son generadas por el estroma de la mucosa. Por lo tanto el tráfico celular está específicamente regulado para que cada célula migre a la mucosa correspondiente. Sin embargo, existen mucosas que comparten estos circuitos de migración, con lo cual las células inmunes que se activan en una determinada mucosa (sitio inductivo) cuando migran al sitio efector para cumplir su función pueden alojarse en otras mucosas relacionadas y esto podría explicar por qué existen asociaciones de síntomas entre la mucosa originalmente implicada y otras. Por esta razón es común observar en pacientes con AA síntomas gastrointestinales junto a manifestaciones en el árbol respiratorio luego del contacto con el alérgeno alimentario (Campbell et al. 2001; Álvarez et al. 2007).

Si bien existen factores genéticos y ambientales que predisponen a ciertos individuos al desarrollo de patologías alérgicas, es importante tener en cuenta que cualquier Ag es potencialmente alérgico, siempre y cuando tenga propiedades inmunogénicas. Más de 170 alimentos han sido descriptos como alérgicos, pero el 90% de las reacciones aberrantes son causadas sólo por 8 alimentos principalmente (los porcentajes expresados entre paréntesis representan el porcentaje de población pediátrica y adulta afectada en Estados Unidos, respectivamente): leche de vaca (2,2%; 0,3%), huevo (1,5%; 0,2%), maní (1%; 0,6%), frutos secos (0,5%; 0,6%), pescados (0,1%; 0,4%), mariscos (0,1%; 0,4%), cereales que contienen gluten (trigo, avena, cebada y centeno), y soja (0,3%; 0,4%) (Sicherer & Sampson 2010). Como puede observarse, ciertos alérgenos son más comunes dentro de la población pediátrica y revierten en la edad adulta, como la leche de vaca y el huevo, y muchos otros son más prevalentes en la población adulta como los frutos secos, pescados, y mariscos. En la mayoría de los casos la afección se resuelve en forma espontánea antes de los 5 años de edad dependiendo del alimento (Nowak-Węgrzyn & Sampson 2011). Sin embargo esto no significa que la alergia se ha curado. A esta edad aproximada se alcanza la madurez del sistema inmune de la mucosa gastrointestinal y la microbiota se ha establecido, por lo cual en la gran mayoría de los casos el sistema inmune se regula adecuadamente en el tracto gastrointestinal. Pero, dado que existe una susceptibilidad

genética en el paciente, las demás mucosas al contactar el Ag que ingresa por la misma o llega por circulación puede que no logren instaurar los mecanismos de tolerancia necesarios para evitar una reacción inflamatoria. La mayoría de los niños con alergia a leche de vaca (ALV) no mediada por IgE pierden la sensibilidad al tercer año de vida, pero un 10-25% de los niños con ALV IgE-mediada mantienen la reactividad en años subsiguientes, y 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, que no logran desarrollar tolerancia específica (Boyano-Martínez et al. 2002; Järvinen et al. 2007). Las alergias a maní y las frutas secas tienen un desarrollo más prolongado, suelen ser persistentes y observarse en adultos (Longo et al. 2013). Las chances de perder sensibilidad a maní son sólo del 20%, y aproximadamente del 10% para frutos secos (Longo et al. 2013). 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. Para alérgenos de la leche de vaca, se sabe que el reconocimiento de epítopes conformacionales determina que se adquiera tolerancia a edades más tempranas, en comparación con el reconocimiento de epítopes lineales que determina una alergia persistente (Savilahti et al. 2010).

Sin embargo, más allá de la instauración de los procesos de tolerancia oral que permiten restituir los mecanismos inmuno-regulatorios 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 leche de vaca o huevo en la primera infancia está asociada con mayor riesgo de sensibilización a alérgenos ambientales y el desarrollo de asma (Cianferoni & Spergel 2009). Es decir, que de no mediar un correcto manejo terapéutico de los individuos con una sintomatología gastrointestinal inicial, que suele presentarse simultáneamente con manifestaciones dermatológicas, va a continuarse en el tiempo con una sensibilización por alérgenos inhalatorios y las consiguientes manifestaciones clínicas del tipo rinitis o asma.

Múltiples trabajos han demostrado que entre el 50% y el 90% de los casos que originalmente se considera una AA, no lo son. Es por eso que existe una necesidad de realizar un diagnóstico de certeza para lo cual es necesario realizar distintos tipos de pruebas que pongan en evidencia los mecanismos moleculares y/o celulares involucrados. El diagnóstico de la AA consta de varias etapas. En el año 2010 un panel de expertos del Instituto Nacional de Enfermedades

Alérgicas e Infecciosas de Estados Unidos (NIAID), emitió un comunicado con las guías para el diagnóstico y manejo de las AA (Boyce et al. 2010). En esta guía se plantea que para el correcto diagnóstico, en primer lugar es importante la **historia clínica** del paciente y los antecedentes familiares. En las alergias IgE-mediadas, las manifestaciones clínicas aparecen dentro de las primeras horas luego del contacto con el alérgeno, lo que facilita la identificación del alimento responsable. En los casos en que esto no ocurre, se debe recurrir a pruebas complementarias que permitan conocer o inferir acerca del mecanismo inmunológico que está involucrado, y el alérgeno disparador del mismo. Es importante además realizar un diagnóstico diferencial de otras posibles reacciones adversas causadas por un alimento:

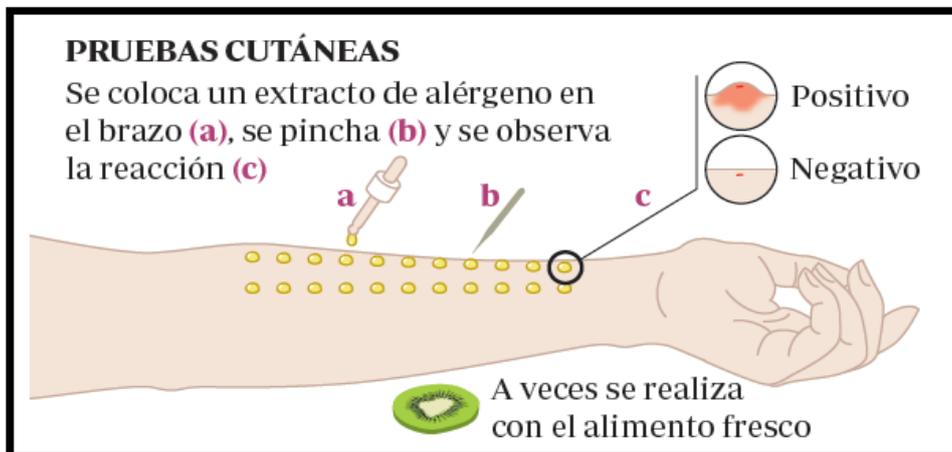
- ▣ Reacciones tóxicas: originadas por algún elemento tóxico presente en el alimento, principalmente por contaminaciones bacterianas y fúngicas y las toxinas secretadas por estos microorganismos. También es común la presencia de sustancias farmacológicamente activas como la histamina o la serotonina que se encuentran entre otros en pescados en descomposición, chocolate, banana, palta, etc.
- ▣ Reacciones no tóxicas, no inmunes: deficiencias enzimáticas, alteraciones anatómicas, problemas psico-somáticos, etc.

La historia clínica le permitirá al médico identificar el posible alimento causante de las reacciones adversas, así como diferenciar entre una patología mediada o no mediada por IgE, dependiendo del tiempo que tardan en aparecer los síntomas según lo reportado por el paciente o familiar responsable. En base a estos datos, el médico decidirá realizar pruebas complementarias como las explicadas a continuación.

La **Prueba cutánea (PC)** es realizada con extractos de alérgenos o, en el caso de alérgenos lábiles, con el alérgeno en forma natural; la técnica consiste en inocular una pequeña cantidad de un extracto que contiene una cantidad conocida del alérgeno en la piel del antebrazo, usando una lanceta calibrada para tal fin. Como control negativo se utiliza solución fisiológica, y como control positivo histamina. La prueba se considera positiva si aparece, a los pocos minutos de la inoculación, una reacción inflamatoria en la zona en que se inyectó el alérgeno, dependiendo del diámetro de la induración, como se esquematiza en la **Figura 6**.

Esta prueba 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, pero en forma controlada en la piel. En general es una prueba segura, aunque el médico debe considerar en qué caso es factible su ejecución.



**Figura 6. Prueba cutánea.** Esquema de la prueba cutánea que consiste en la administración subcutánea de un extracto del alérgeno o del alimento natural, y la evaluación de la aparición de la inflamación dentro de los minutos posteriores a la inoculación. Imagen adaptada del infográfico de Clínica Universidad de Navarra 2012, <http://www.cun.es/actualidad/temas-destacados/alergia-alimentaria-desensibilizacion>

Por otro lado, en forma rutinaria y en simultáneo a la PC, se realiza la **detección *in vitro* de anticuerpos IgE específicos**, antes de la realización de una prueba de provocación oral controlada. Esta prueba también es empleada para el seguimiento de pacientes alérgicos de larga evolución, o que han presentado reacciones anafilácticas. Para su determinación se requieren de inmunoensayos tipo ELISA de elevada sensibilidad y especificidad, dado que estos Acs se miden en suero, y las concentraciones son del orden de los ng/ml. Se pueden determinar Acs IgE totales o específicos de ciertos alérgenos individuales o de la fuente alérgica, como leche o  $\alpha$ -lactoglobulina,  $\beta$ -lactoglobulina o caseínas (Sampson & Albergo 1984; Sampson & Ho 1997). Estos ensayos no ponen en riesgo la salud del paciente, pero tampoco dosan el componente patognomónico de la reacción, dado que la IgE soluble no es capaz de desencadenar una reacción alérgica hasta que se une a los receptores específicos en las células inflamatorias. Sin embargo, estos ensayos en conjunto con los resultados de las PC, permiten inferir acerca de la presencia de IgE específica, y su posible relación con la instauración de una reacción inflamatoria.

Por último, el panel de expertos del NIAID, recomienda en las guías de diagnóstico de 2010 realizar, a modo confirmatorio, la **prueba de provocación oral controlada (PO)**, más allá de que el paciente presente una historia clínica compatible con una reacción alérgica mediada por IgE, acompañada de una demostración de un mecanismo IgE mediante una PC positiva, o una determinación de IgE específica sérica positiva. Esta prueba 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 AA y, en la actualidad, sigue siendo la única **prueba que confirma o descarta con total seguridad la alergia** a un alimento cuando se realiza en forma estandarizada, doble ciego y con placebo (elevados parámetros de sensibilidad y especificidad). Para realizar esta prueba, el paciente debe suspender la ingesta del alimento sospechoso durante las 2 semanas previas. Luego, el paciente será internado transitoriamente bajo la supervisión de personal médico especializado, y se le administrará el alimento en dosis crecientes y a determinados intervalos de tiempo. Se comienza con dosis por debajo de la dosis umbral que se establece en forma individual en base a la PC, y se registra la aparición de signos clínicos inmediatos y tardíos. En numerosos casos, dado el costo, el tiempo que consume y la disponibilidad de personal, 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) o simple ciego (sólo el evaluador conoce el contenido del desafío); en estos casos, un resultado negativo descarta la AA, pero un resultado positivo debe ser confirmado por una PO estandarizada, doble ciego y con placebo. La principal ventaja de esta prueba es su similitud con la situación real de exposición al alimento, pero reviste un riesgo para el paciente debido a la potencial inducción de una reacción anafiláctica. Por esta razón este tipo de pruebas debe realizarse bajo la estricta supervisión médica y en lugares preparados para el tratamiento de emergencia en caso de producirse una anafilaxia. También existe como alternativa, y cuando el riesgo de una anafilaxia es bajo o nulo, que el desafío se realice en forma domiciliaria.

Una vez establecido el diagnóstico de certeza e identificado el alimento nocivo, el médico está en condiciones de iniciar el tratamiento. Actualmente el único tratamiento efectivo para tratar las AA consiste en la restricción dietaria y la consiguiente eliminación del estímulo inmunológico, lo cual reduce o elimina la instauración del proceso inflamatorio y el cuadro clínico. Sin embargo esto que parece simple y lineal, en la realidad no lo es por diversos motivos:

- Se trata de pacientes en su gran mayoría pediátricos y lactantes por lo cual por lo cual se debe reemplazar la leche (principal alérgeno alimentario en el mundo) por un sustituto adecuado, y dado que existe una elevada reactividad cruzada entre los alérgenos principales de las leches de diferentes mamíferos y de otras especies (soja por ejemplo), la elección del sustituto lácteo es difícil.

- ▣ La eliminación de un alimento de la dieta de un niño suele afectar su crecimiento, principalmente cuando se trata de la leche.
- ▣ Las reacciones accidentales que se producen en la gran mayoría de los pacientes por desconocimiento de la presencia del alérgeno en un alimento, ya sea por contaminación cruzada entre alimentos, desconocimiento de la presencia de un alérgeno en la composición de un alimento, errores u omisiones en el etiquetado de un alimento, etiquetado poco claro, o reactividades cruzadas con otros alérgenos alimentarios o no alimentarios. Muchas de estas reacciones suelen ser graves y, de no tratarse adecuadamente, ponen en riesgo la vida de los pacientes.

Por otro lado, existen los tratamientos farmacológicos sintomáticos (antihistamínicos, corticoides, anti-leucotrienos, biológicos, etc.), que tampoco corrigen el defecto inmunológico, ni aseguran una remisión a largo plazo, sino que revierten el proceso inflamatorio en el órgano blanco actuando a distintos niveles.

Por estas razones en los últimos años se ha profundizado la necesidad de desarrollar terapias correctivas del defecto inmunológico. Las más promisorias tienden a restaurar los mecanismos de tolerancia, y de esta manera evitar las reacciones adversas durante el tratamiento o exposiciones accidentales. Estas inmunoterapias (IT) consisten en la administración controlada y escalonada de cantidades crecientes del alérgeno nocivo, hasta alcanzar dosis que permitan tolerar la exposición natural al alérgeno. Actualmente es sabido que estos procedimientos, que operan sobre los SIM, inducen algunos de los mecanismos que median la tolerancia inmunológica, antes mencionados. Sin embargo, no se conocen completamente los mecanismos que gobiernan estos tratamientos, y esto ha generado en los últimos años un marcado interés en su estudio en todo el mundo.

### **ENFERMEDADES INFLAMATORIAS INTESTINALES**

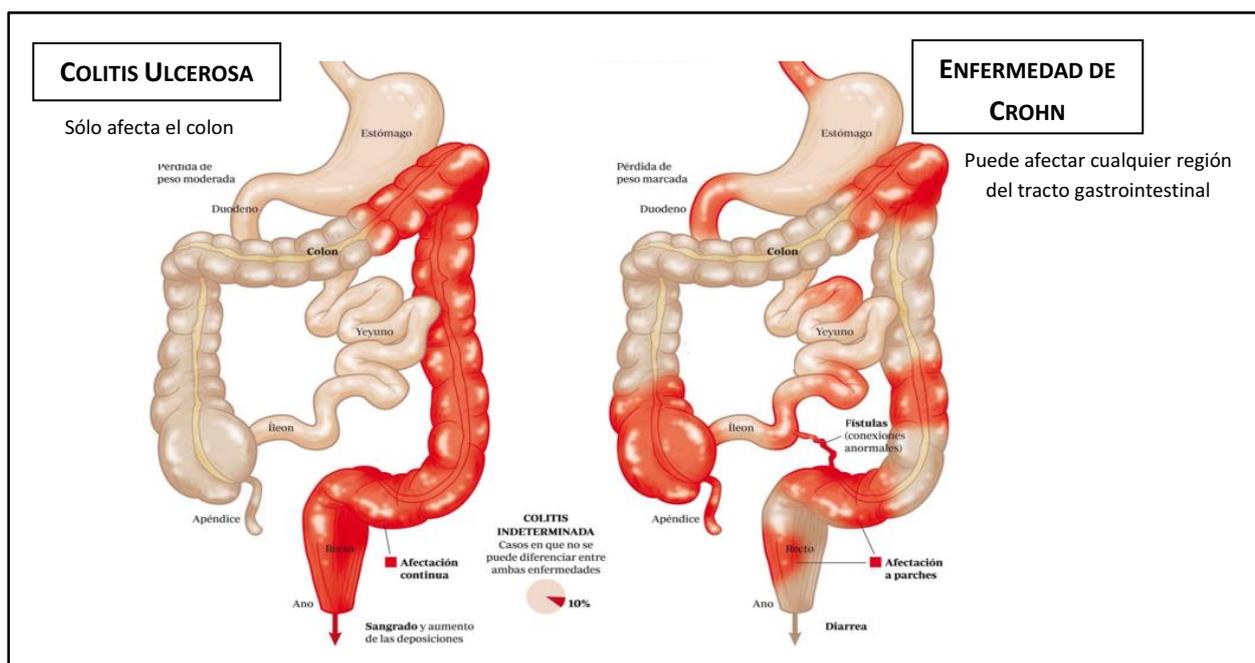
Las enfermedades inflamatorias intestinales son un grupo de patologías caracterizadas por la inflamación crónica y recidivante de diferentes regiones del tracto gastrointestinal, principalmente del intestino, produciendo lesiones en la mucosa que pueden ser desde leves hasta graves, con perforaciones, úlceras, fístulas, estenosis y pudiendo generar a largo plazo cáncer de colon (Kaser et al. 2010; Baumgart & Sandborn 2012). Los pacientes con alguna de las formas de EII sufren de diarrea crónica, pérdida de peso, dolor abdominal, fiebre y fatiga, y pueden sufrir

## Introducción

María Lucía Orsini Delgado

manifestaciones extra-intestinales incluyendo úlceras en piel y en la boca, artritis e inflamación del ducto biliar (MacDonald & Monteleone 2005).

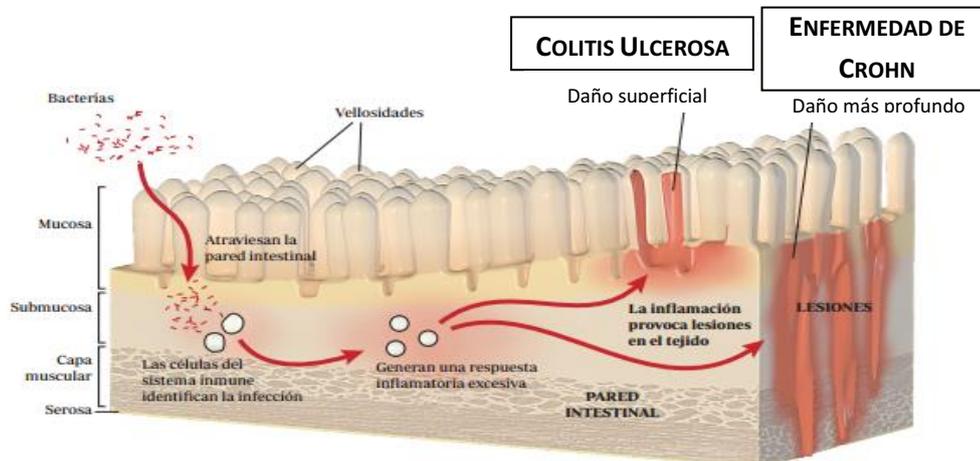
Las dos formas principales de las EII son la Enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU). Presentan numerosas similitudes, pero tienen ciertas diferencias clínicas y fisiopatogénicas. Como se esquematiza en la **Figura 7**, en CU las lesiones cubren áreas continuas de la mucosa intestinal y se extienden desde el recto en dirección proximal, mientras que en EC cualquier porción del tracto gastrointestinal, desde la boca al ano, puede estar afectada, aunque es más frecuente en la región ileo-cecal, el recto y la zona peri-anal. A diferencia de lo que ocurre en CU las lesiones inflamatorias en EC presentan en forma intercalada áreas inflamadas y no inflamadas. Además pueden presentarse manifestaciones extra-intestinales (oftalmológicas, articulares, dermatológicas, hepáticas, etc.), que suelen alterar el curso de la enfermedad en forma variable; estos pacientes son más propensos a sufrir otro tipo de enfermedades inflamatorias crónicas (Strober et al. 2002; Kaser et al. 2010).



**Figura 7. Zonas del tracto gastrointestinal afectadas en EC y en CU.** Representación de las zonas del tracto gastrointestinal más comúnmente afectadas en Colitis Ulcerosa y en Enfermedad de Crohn; en rojo se representan las zonas inflamadas. Imagen adaptada de infográfico de la Clínica Universidad de Navarra 2011 <http://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/enfermedades/colitis-ulcerosa>.

Además el diagnóstico diferencial de EC y CU se basa en diferencias a nivel histológico. Como se representa en la **Figura 8**, en EC se observan alteraciones en todo el espesor de la pared intestinal con un marcado infiltrado de células mononucleares, formación de granulomas en el 60% de los casos, y en un porcentaje importante de pacientes se pueden observar formas más severas que incluyen estenosis y formación de úlceras fistulizantes; mientras que en CU la lesión

inflamatoria afecta sólo las capas superficiales de la mucosa, principalmente el compartimento epitelial, con un infiltrado de células mononucleares y neutrófilos, y pérdida de células caliciformes. (Strober et al. 2002; Kaser et al. 2010; Baumgart & Sandborn 2012; Ordás et al. 2012).



**Figura 8. Zonas del epitelio intestinal afectadas en las diferentes formas de EII.** Representación de las diferentes zonas afectadas de la pared intestinal, en las dos formas más comunes de las EII. Esquema adaptado de imagen obtenida de Clínica Universidad de Navarra 2011. <http://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/enfermedades/colitis-ulcerosa>.

De esta forma, además de los síntomas referidos por los pacientes, y la presencia de sangrado en materia fecal, tanto el estudio colonoscópico/endoscópico, que permite evaluar la ubicación del proceso inflamatorio y el tipo y distribución de las lesiones generadas en la mucosa, como la evaluación histopatológica, son fundamentales para el correcto diagnóstico de estas patologías, así como para el diagnóstico diferencial entre las distintas formas de EII. Sin embargo, desde el punto de vista de los mecanismos inmunológicos no se han descrito diferencias tan claras entre ambas patologías.

En las últimas décadas, como se mencionó anteriormente, se ha observado un notable incremento en la incidencia y prevalencia de las EII, principalmente en Estados Unidos, Inglaterra y países del norte europeo, con valores de incidencia para cada una de las formas más prevalentes por separado, que ascienden a 8,3/100.000 habitantes por año en promedio, variando de 0,3-24/100.000 habitantes por año según la zona, y siendo la prevalencia 4,9-505/100.000 habitantes (Molodecky et al. 2012). Aunque en nuestro país no se dispone de esta información, un estudio realizado durante el 2008 revela una prevalencia de 90 casos de EC y CU cada 100.000 pacientes, con una relación de CU:EC aproximadamente 2:1 (Sambuelli no publicado).

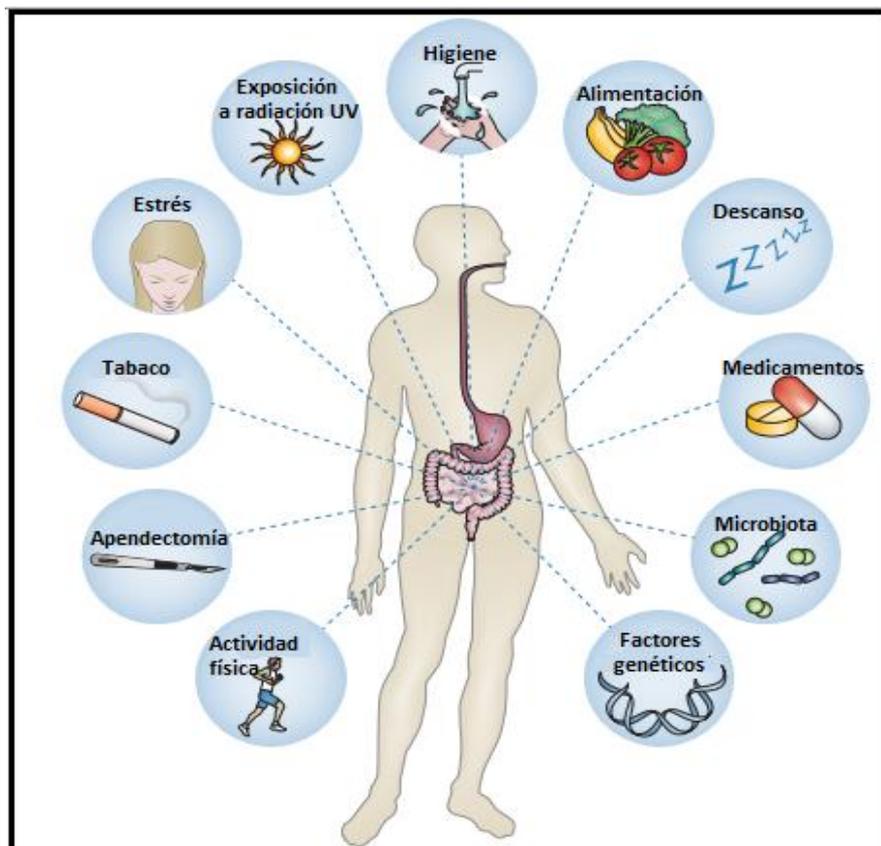
Estudios epidemiológicos han demostrado, en forma contundente, que ciertos factores genéticos son importantes a la hora de determinar la susceptibilidad al desarrollo de EII. Sin

## Introducción

María Lucía Orsini Delgado

embargo, si bien se han detectado hasta el momento 163 loci de susceptibilidad (Jostins et al. 2012), la penetrancia no es completa, y éstos no son suficientes para explicar el incremento en la incidencia observado en las últimas décadas. Esto refleja que, además de los factores genéticos, existen factores adicionales que favorecen el establecimiento de estas patologías, al igual que como se describió para las enfermedades alérgicas. En concordancia con esto, diferentes estudios muestran que individuos que migraron de regiones con baja prevalencia como Asia, a regiones de alta prevalencia como Inglaterra, han mostrado una mayor susceptibilidad a padecer alguna de las formas de EII, especialmente en la primer generación de individuos luego de establecerse en estos lugares; esta mayor susceptibilidad también se ha visto en poblaciones de países en vías de desarrollo a medida que fue aumentado la industrialización, lo cual resalta la importancia de factores ambientales (Molodecky et al. 2012; Ananthakrishnan 2015).

Como explicaremos en la Parte II de este trabajo de tesis y como se representa en la **Figura 9**, dentro de los factores ambientales asociados a estas patologías, podemos identificar factores externos como contaminación ambiental, alimentación, actividad física, consumo de tabaco, higiene personal, estrés y consumo de medicamentos, y factores internos como la composición de la microbiota (Ananthakrishnan 2015).



**Figura 9. Factores asociados al desarrollo de EII.** Representación de los diferentes factores que han sido asociados al desarrollo de EII. Imagen adaptada de Ananthakrishnan 2015.

Como se ha demostrado en diversos trabajos, los pacientes con EI presentan un desbalance de su microbiota o una disbiosis, y los factores ambientales externos, en particular la alimentación, son capaces de inducir este cambio en la composición de la microbiota (Morgan et al. 2012; Kostic et al. 2014).

En cuanto a los mecanismos inmunológicos asociados a estas patologías, para la EC son bastante más claros que para la CU. La EC es el resultado de una respuesta inmune inadecuada frente a Ags de la microbiota comensal en individuos genéticamente predispuestos. Entre los factores genéticos más importantes asociados a la EC, encontramos varios relacionados con la respuesta inmune frente a microorganismos patógenos. El más importante es NOD2, que codifica un receptor intracelular de la inmunidad innata (NLR), expresado en macrófagos, neutrófilos y DCs de LP, y en células de Paneth, y reconoce un componente de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, el muramil dipéptido, induciendo la activación del sistema inmune vía NFκB (Di Sabatino et al. 2013), y la secreción de α-defensinas por células de Paneth (Wehkamp et al. 2005); mutaciones en NOD2 llevan a un desarrollo más temprano de esta patología probablemente por un control deficiente de los componentes de la microbiota. Otros genes asociados a la EC también están relacionados al procesamiento intracelular de bacterias, como la autofagia y la inducción de apoptosis. En la EC se observa un aumento de la permeabilidad intestinal por alteración de las uniones estrechas por la presencia de citoquinas pro-inflamatorias, lo que permite el ingreso paracelular de microorganismos comensales hacia la LP, permitiendo la presentación de Ags a los LT en forma aberrante por macrófagos y por DCs; el ingreso puede darse no sólo por el pasaje paracelular, sino también por medio de DCs o células M, como hemos explicado anteriormente, con lo cual puede haber pacientes que no presenten inicialmente una alteración en la barrera epitelial (Di Sabatino et al. 2013). Tanto las DCs como los macrófagos activados, polarizan las células T hacia un perfil Th1 o Th17, vía IL-12 o IL-23 respectivamente. La citoquina IL-12, estimula las células T activando el factor de transcripción T-bet, el cual induce la producción de TNF-α, IFN-γ, e IL-2. Por otro lado, IL-23, estimula la activación del factor de transcripción ROR-γt, induciendo la secreción de IL-17A, y la proliferación y mantenimiento de las células Th17; IL-1β, IL-6 y TGF-β, no son capaces de inducir células Th17 a partir de células T naïve en humanos (aunque sí en ratones), pero sí de potenciar o reactivar células Th17 (Rodevatti et al. 2009). Mientras las citoquinas de perfil Th1 actúan sobre las poblaciones celulares locales induciendo la destrucción de microorganismos intracelulares, reclutando células inflamatorias y generando daño tisular, IL-17 promueve el reclutamiento de neutrófilos, al inducir la secreción de IL-8 por células epiteliales; los

neutrófilos secretan metaloproteasas y elastasas, responsables de la degradación de la matriz extracelular y de la generación de úlceras y fístulas. Los sucesivos ciclos de daño, remodelación y cicatrización generan a largo plazo el desarrollo de fibrosis intestinal con pérdida de la función tisular.

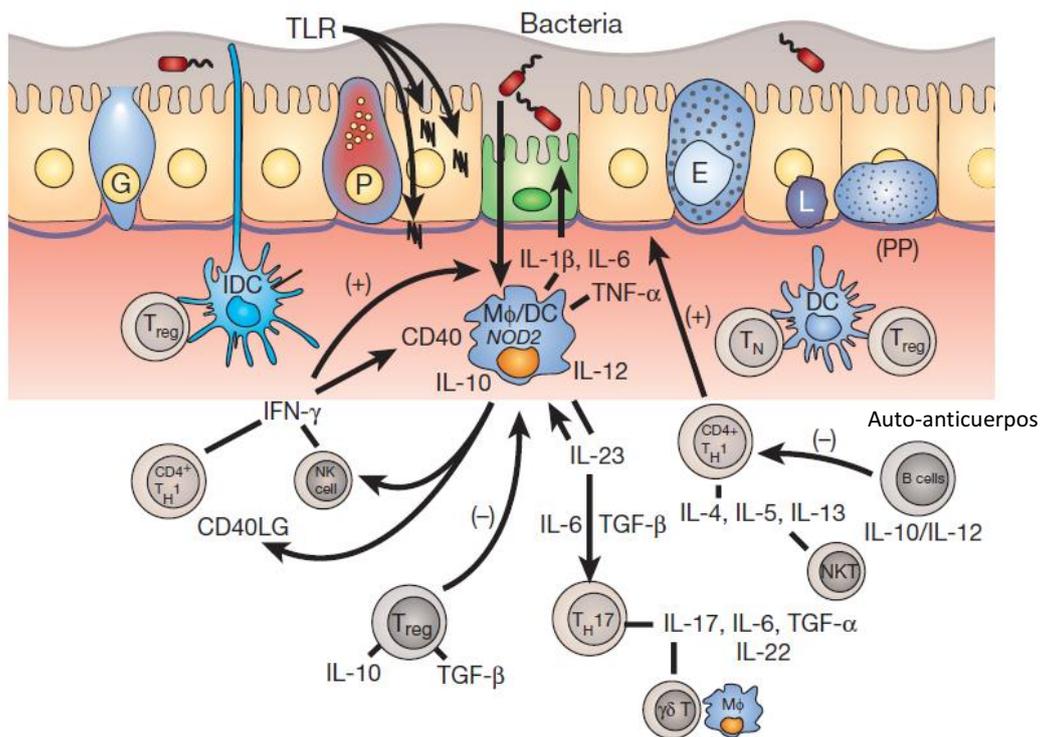
Además se han observado, en estos pacientes, defectos en la apoptosis de células T activadas, por un desbalance entre los factores pro y anti-apoptóticos, lo que genera una supervivencia aumentada de estas células con una mayor secreción de citoquinas pro-inflamatorias (Bouma & Strober 2003; Xavier & Podolsky 2007; Di Sabatino et al. 2013). En estos pacientes también se han detectado fallas a nivel de los mecanismos de tolerancia. Es frecuente observar en muestras colónicas niveles elevados de TGF- $\beta$  y Smad7 (Monteleone et al. 2001); al unirse TGF- $\beta$  a su receptor específico de membrana dispara una vía de señalización intracelular que involucra la fosforilación de Smad2, Smad3 y luego Smad4 para promover la transcripción de diferentes genes, y luego los diferentes efectos biológicos en la que esta citoquina está involucrada. Esta vía está regulada por Smad7 que inhibe la fosforilación de Smad4. Los niveles elevados de Smad7 en pacientes con EII determinan que TGF- $\beta$  sea una citoquina regulatoria no funcional, haciendo a las células T refractarias a la acción de dicha citoquina. Estos hallazgos llevaron recientemente a plantear una terapia de bloqueo de Smad7, la cual logra restaurar el efecto supresor de TGF- $\beta$  (Monteleone et al. 2015).

Por otro lado, los factores inmunológicos implicados en la CU, son más controversiales. Se ha observado una respuesta Th2 anómala, con secreción de IL-13 e IL-5 pero sin secreción de IL-4; la secreción de IL-13 también se ha atribuido a células NKT. En estos pacientes hay un infiltrado predominantemente neutrofílico, debido a una excesiva secreción de IL-8 por células epiteliales y endoteliales, estimulando la secreción de metaloproteasas y elastasas, importantes en la degradación de la matriz extracelular, lo que desencadena la formación de úlceras; el daño epitelial genera una alteración de la barrera epitelial, y consecuentemente una penetración de microorganismos a LP. También se ha observado en estos pacientes, la presencia de autoanticuerpos pANCA y anti-tropomiosina. Además, en trabajos recientes, se han visto implicadas células Th17 y células Th1/Th17 (que secretan tanto IL-17 como IFN- $\gamma$ ), que estarían implicadas en el reclutamiento de neutrófilos y en la secreción de TNF- $\alpha$  por macrófagos (Bouma & Strober 2003, Xavier & Podolsky 2007, Di Sabatino et al. 2012).

Como podemos ver, en ambas patologías se genera una respuesta inmune anormal frente a Ags de la microbiota observándose una respuesta inmune inflamatoria exacerbada, así como

defectos en los mecanismos regulatorios, aunque la importancia de la microbiota es mucho más clara en la EC que en la CU (Monteleone et al. 2001; Fantini et al. 2009).

En la **Figura 10**, se representan los mecanismos inmunológicos implicados en ambas formas de EII, mostrando el efecto de las diferentes poblaciones celulares, como se ha explicado anteriormente.



**Figura 10. Respuesta inmune de la mucosa frente a antígenos de bacterias comensales en EII.** Representación de la respuesta inmune anormal en la mucosa intestinal frente a Ags de la microbiota en pacientes con EII. Imagen adaptada de Xavier & Podolsky 2007.

En los últimos años se han logrado grandes avances en la comprensión de estas patologías y en el desarrollo de diferentes estrategias terapéuticas; los tratamientos anti-inflamatorios disponibles actualmente, que consisten en inmunosupresores (esteroides, azatioprinas, metotrexato), anti-inflamatorios (amino salicilatos) y anticuerpos anti-TNF-α (Infliximab), permiten controlar el proceso inflamatorio y prolongar los períodos de remisión, mejorando la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, un elevado número de pacientes, aproximadamente 50%, no responden a los tratamientos farmacológicos ni biológicos por lo cual se debe recurrir a los métodos quirúrgicos. Estos tratamientos no logran resolver el proceso inmunológico, sino sólo controlarlo y retrasar la aparición de complicaciones, y esto está íntimamente relacionado con el desconocimiento de la etiología de estas patologías. Es por esto que continuar estudiando los procesos inmunológicos subyacentes a estas patologías, intentar controlar los factores externos

que actúan como disparadores de estas enfermedades y desarrollar nuevas inmunoterapias, es fundamental para lograr reducir la incidencia y mejorar el curso de las EII.

### **MODELOS ANIMALES**

Como se desprende de lo antes expuesto, el desarrollo de nuevas terapias anti-inflamatorias, con una baja toxicidad, bajo costo y seguros para el paciente son una necesidad médica urgente para patologías crónicas como las AA y las EII. Las nuevas terapias buscan redireccionar la respuesta inmune de manera de aliviar el foco inflamatorio y restablecer la homeostasis intestinal (Strober et al. 2002; Bouma et al. 2003; Dalmaso et al. 2008; Kaser et al. 2010).

Dado que la experimentación en humanos es limitada desde el punto de vista ético y por el riesgo de reacciones adversas, el uso de modelos animales nos provee una herramienta importante para el estudio de la patogénesis de diferentes enfermedades, como las AA y las EII, y para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. El desarrollo de terapias destinadas tanto a la prevención, como a la supresión de las múltiples manifestaciones clínicas de una patología, requiere el conocimiento de su patogénesis y de los mecanismos moleculares y celulares subyacentes. Es por ello que los modelos animales constituyen herramientas esenciales para ahondar en el estudio de los mecanismos fisiopatogénicos subyacentes a las enfermedades inflamatorias que afectan el intestino.

Los ratones son los animales de laboratorio predominantemente utilizados para estudiar el desarrollo de diferentes enfermedades, especialmente por su tamaño, sus ciclos de reproducción cortos, la facilidad de la limpieza y mantenimiento, así como por la relativamente fácil manipulación genética en comparación con otros animales. El largo tiempo de uso de modelos murinos en investigación, ha permitido el desarrollo continuo de herramientas celulares y moleculares para permitir la investigación de mecanismos de interés. Actualmente, los ratones son la especie más caracterizada desde el punto de vista biológico, inmunológico y genético, y existen múltiples cepas, siendo los animales más utilizados los ratones BALB/c, C57/BL6 y C3H/HeJ (Gramberg et al. 2013).

A través de los modelos animales se ha logrado profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares y celulares de las AA y las EII. En ambas patologías se ha caracterizado una activación anómala de los linfocitos T y las teorías más modernas postulan que podrían ser la consecuencia de deficiencias a nivel de la regulación del sistema inmune, involucrando

principalmente las células Treg (Monteleone 2001; Krogulska 2010). El empleo de modelos murinos ha permitido confirmar estas hipótesis (Curotto 2008; Griseri 2010), y mediante la manipulación de la integridad de la barrera epitelial se ha logrado alterar la tolerancia natural, e inducir inflamación (Jurjus et al. 2004; McClain & Bannon 2006; Alex et al. 2009; Berin & Mayer 2009). Si bien existen modelos en ratón que desarrollan colitis en forma espontánea, permitiendo el estudio no sólo de los procesos inflamatorios sino de los mecanismos disparadores, los modelos animales de AA han sido aplicados principalmente al estudio de la fase efectora, ya que los ratones no desarrollan alergia en forma espontánea, y deben utilizarse diferentes herramientas para evitar el desarrollo de tolerancia e inducir la patología como explicaremos más adelante (Berin & Mayer 2009).



# MATERIALES & MÉTODOS





## 1. MODELO MURINO DE ALERGIA A LAS PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA

### 1.1 Extractos proteicos

#### 1.1.1 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 (indicadas en cada caso) según el método en el que serían empleadas, en PBS pH 7.4 o buffer bicarbonato pH 8.4, al momento de ser utilizadas. Se agitó hasta lograr la máxima disolución y se filtró. Se cuantificó el contenido proteico.

#### 1.1.2 Proteína recombinante de *Brucella abortus*

Se utilizó la proteína de membrana externa Omp16, provista por el grupo de la Dra. Juliana Cassataro (Instituto de Investigaciones Biotecnológicas “Dr. Rodolfo A. Ugalde”, IIB-INTECH UNSAM-CONICET; San Martín, Prov. Buenos Aires, Argentina). Brevemente, según se describe en Giambartolomei et al. 2004, las bacteria *E.coli* BL21 (DE3) competentes (Stratagene) fueron transformadas con la construcción (pET-U-Omp16 con cola de histidina) y la Omp16 que se obtuvo en forma recombinante fue expresada, y aislada por sonicación. Posteriormente fue purificada por cromatografía de afinidad empleando resinas de Ni-NTA. Para eliminar el LPS, la Omp16 recombinante fue adsorbida en Polimixina B. Se obtuvo un contenido menor a 0,25 unidades de endotoxina/ $\mu\text{g}$  de proteína, el cual fue determinado con el test de *Limulus ameobocyte* (Giambartolomei et al. 2004). Se cuantificó el contenido proteico y se conservó hasta su empleo a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 1.1.3 Cuantificación de proteínas

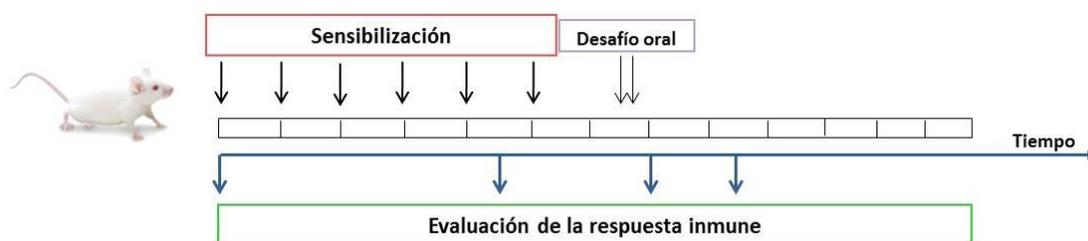
La concentración de proteínas totales en los extractos crudos de leche de vaca y en la fracción recombinante purificada se determinó por micrométodo de Bradford (Bradford 1976) o mediante el método de ácido Bicinconínico (*Pierce BCA Protein Assay*), empleando seroalbúmina bovina como standard de proteínas para la curva de calibración en ambos casos, y siguiendo las indicaciones del fabricante.

### 1.2 Planes de inmunización

#### 1.2.1 Sensibilización alérgica

Se utilizaron ratones BALB/c de 5-6 semanas de edad, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, con certificado de salubridad para patógenos específicos.

Los protocolos aplicados han sido aprobados por el Comité Interno para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. Para la sensibilización se administraron en forma intragástrica (ig), empleando una sonda metálica, 200µl de una solución de antígeno (PLV) (100mg/ml en buffer bicarbonato de amonio 3% pH8), junto con 10µl de una solución 1mg/ml de toxina colérica (*Sigma*) (TC) como adyuvante mucosal. Dos horas antes de cada administración se retiró el alimento y 30 minutos antes se les administró 200µl de la solución de bicarbonato de amonio, a fin de disminuir la acidez estomacal. El plan de sensibilización consistió en una administración semanal, durante 6 semanas; 10 días después de finalizada la sensibilización se realizaron dos desafíos orales administrando 200µl de soluciones 100mg/ml de PLV, en dos días consecutivos, a fin de evaluar los signos clínicos (**Esquema 1**). Los ratones se agruparon en diferentes lotes: Sensibilizado (que recibieron 6 dosis de PLV con TC, en las concentraciones antes descriptas, durante el período de sensibilización), Control (que recibió 6 dosis de una solución que sólo contenía PLV, en la concentración antes indicada, durante el período de sensibilización), Tratamiento (recibieron PLV y TC al igual que el grupo sensibilizado, y diferentes tratamientos previos o posteriores a la sensibilización). En todos los casos los animales fueron mantenidos en el Bioterio del IIFP 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 empleado (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.



**Esquema 1. Protocolo general de sensibilización de ratones a PLV.** El protocolo de sensibilización consiste en la administración semanal de 20mg de PLV junto con 10µg de TC, durante 6 semanas, y la realización de dos desafíos orales en días consecutivos, con 20mg de PLV. La respuesta inmune se evalúa de diferentes formas durante todo el protocolo.

### 1.2.2 Planes de modulación

Para la optimización de la modulación de la respuesta Th2 inducida durante la fase de sensibilización, se evaluaron las siguientes variables:

- ▣ **Agentes moduladores:** se emplearon diferentes concentraciones de PLV en PBS o buffer bicarbonato 3% pH 8 y proteína recombinante de *Brucella abortus*, Omp-16.
- ▣ **Vías de administración:** intragástrica (ig) y sublingual (sl).
- ▣ **Dosis, frecuencia y estrategias:** Se probaron distintas dosis de los agentes moduladores 10pg, 10ng o 10µg de PLV o 50µg de Omp16; distintas frecuencias de administración (días consecutivos o no) y en distintas etapas del plan (previo y post-sensibilización).

### 1.3 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 200µl de una solución conteniendo únicamente PLV, por vía ig en diferentes concentraciones (12,5-200mg/ml). Los signos clínicos indicadores de la inducción de reacciones mediadas por IgE se registraron a partir de los 15 minutos posteriores a la exposición al antígeno alcanzando un pico aproximadamente 45 minutos después de la aparición del primer síntoma. Los animales fueron observados durante la hora y media siguiente al DO 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 DO.

### 1.4 Evaluación de la respuesta inmune

#### 1.4.1 Ensayos *in vivo*

##### 1.4.1.a Evaluación de signos clínicos 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**).

Puntaje	Signos clínicos observados
0	Sin síntomas.
1	Rascado de nariz y cabeza y 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 frecuencia respiratoria.
3	Respiración dificultosa, cianosis alrededor de la boca y cola.
4	Inactividad, convulsiones.
5	Muerte.

**Tabla 1. Signos clínicos de hipersensibilidad inmediata.** Tabla de puntajes asignados a los diferentes signos clínicos.

Luego de asignados los índices clínicos se considera el valor máximo alcanzado por cada animal de cada uno de los lotes. Estos índices se determinan por dos investigadores en forma independiente y a ciego.

### **1.4.1.b Prueba cutánea**

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 subcutánea (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 en forma inmediata. 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 por vía sc.

Se inocularon por vía sc, en la almohadilla plantar de las patas traseras, 20µl de una solución 4mg/ml de PLV en solución fisiológica (SF) estéril en una de las patas traseras (esta concentración se definió previamente por titulación, encontrándose que la misma genera una respuesta positiva en ratones sensibilizados, y una respuesta negativa en ratones control), y SF estéril como control negativo o histamina como control positivo, en la pata contra-lateral, en diferentes ratones. Inmediatamente después de la inyección sc se procedió a la inoculación iv de 100µl 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 inflamación y coloración azul en la zona de inoculación, que se consideró positiva cuando la diferencia de espesor entre la almohadilla plantar inoculada con el antígeno y la almohadilla plantar inoculada con el control negativo (determinada mediante el uso de un calibre digital de precisión 0,01mm), fuera mayor a 0,3mm. 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.

## 1.4.2 Ensayos *in vitro*

### Evaluación de la respuesta inmune humoral

Los niveles séricos de diferentes isotipos de anticuerpos específicos para PLV fueron determinados por métodos inmunoenzimáticos desarrollados en nuestro laboratorio (ELISA indirecto o EAST) en los sueros provenientes de los ratones de los diferentes lotes. Previamente se optimizó la cantidad de antígeno a utilizar para sensibilizar la fase sólida (PLV), y la concentración de anticuerpo secundario conjugado. Como control negativo se utilizó suero proveniente de ratones no sensibilizados, fosas sin sensibilizar, o se omitió el anticuerpo primario (suero).

#### **1.4.2.a Determinación en suero de IgE específica de PLV por EAST**

La determinación de IgE específica se realizó por EAST, para lo cual se preparó la fase sólida según Ceska (Ceska 1981), y luego se procedió según Docena (Docena et al. 1996).

**Activación de papeles con CNBr:** se activaron papeles de celulosa como fase sólida para lo cual se sumergieron 20g de discos de papel de filtro (*Whatman*) de 5mm de diámetro, en una solución conteniendo 20g de CNBr en 500 ml de agua destilada, bajo campana. Se llevó a pH10,5 con NaOH 1M. Luego se realizaron lavados sucesivos utilizando las siguientes soluciones: NaHCO<sub>3</sub> 0,005M, 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 IgE específica en el suero de los ratones, se emplearon los discos de papel activados con CNBr; éstos fueron sensibilizados con 1,75mg/ml de PLV en buffer 0,1M carbonato/bicarbonato pH 9.4. Se incubaron los papeles con el extracto proteico durante toda la noche a temperatura ambiente, luego éstos fueron lavados con buffer de sensibilización (buffer carbonato pH9.4) 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 50µl de suero de ratón sin diluir durante 16hs a 4°C. Luego de realizar los lavados, los papeles se incubaron con 50µl del anticuerpo biotinilado anti-IgE de ratón (BD Pharmigen), llevado a una

concentración de 8µg/ml, utilizando como diluyente suero equino (SE) 3% en solución fisiológica, durante 16 horas a 4°C. Se lavaron los discos nuevamente y se incubaron con avidina conjugada a fosfatasa alcalina (SIGMA, 1:1000) durante 30 minutos a 37°C. Finalmente se agregaron 200µl de la solución de sustrato para-nitrofenil fosfato (PNPP), deteniéndose la reacción 20 minutos más tarde con 100µl de EDTA 0.1M. Se midió la absorbancia a 405nm en el lector de placa (Sirio SAECS, Radim Company, Italia).

### **1.4.2.b Determinación en suero de IgG1 e IgG2a específicos de PLV por ELISA indirecto**

Los isotipos IgG fueron determinados por ELISA, para lo cual se sensibilizaron placas de microelisa de poliestireno (NUNC, Maxisorp) con 1 µg/fosa de PLV diluidos en 100µl de buffer de sensibilización (buffer carbonato pH 9.4). Posteriormente se bloqueó con SE al 5% en SF y se incubó con 100µl de los sueros diluidos 1:200 en diluyente (1 hora a 37°C). Luego se incubó con el anticuerpo secundario específico obtenido en oveja, según el isotipo a determinar (Dako, 1:2000), conjugado a peroxidasa durante 1 hora a 37°C. Se agregaron 100µl de solución de sustrato/cromógeno para peroxidasa (OPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Después de 15 minutos la reacción se detuvo con 50µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se midió la densidad óptica a 492nm.

### **Evaluación de la respuesta inmune celular**

A fin de evaluar la respuesta inmune celular inducida durante la sensibilización y el tratamiento, el día posterior al DO, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, se aislaron células de diferentes tejidos (bazo, ganglios mesentéricos, ganglios sublinguales o intestino), y se realizaron diferentes ensayos.

### **1.4.2.c Procesamiento de tejidos para cultivo celular**

**Bazo:** se extrajo el bazo de los ratones de los distintos lotes. Se disgregaron mecánicamente hasta obtener una suspensión celular en medio RPMI estéril. Se realizó el recuento de células viables con el colorante vital Tripan blue, se centrifugó (5 min a 500xg) y se resuspendió el pellet celular en medio de cultivo RPMI estéril suplementado con suero fetal bovino (SFB) 5% y antibióticos (estreptomina y penicilina) a razón de 8x10<sup>6</sup> células/ml (suspensión 2X). Esta suspensión fue cultivada junto a los estímulos proteicos como se menciona posteriormente.

**Ganglios mesentéricos y sublinguales:** los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) y sublinguales (SLN) extraídos de los distintos animales fueron procesados en RPMI con 1mg/ml de colagenasa tipo IV (*Sigma*). Se disgregaron mecánicamente con la ayuda de pinza y tijera, y se incubaron durante 30min a 37°C con agitación. Posteriormente los ganglios fueron homogeneizados por pasajes a través de aguja y jeringa, y se centrifugaron a 500xg durante 5min; luego las células se resuspendieron en RPMI suplementado. Se realizó el recuento celular como se describió previamente para bazo, y se sembraron 100µl de la suspensión celular ( $2 \times 10^5$  células/fosa) en placa de 96 para análisis de citoquinas por citometría de flujo como se describe más adelante.

**Intestino delgado:** para el aislamiento de linfocitos de lámina propia se empleó la técnica descrita previamente con algunas modificaciones (Dillon & MacDonald 1985). Brevemente, los animales 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 y se lo sumergió en una solución de HBSS con 2% de SE y antibióticos. Se mantuvo en hielo hasta el siguiente paso. Luego, las piezas de intestino se pasaron a una segunda solución de HBSS completo con 1mM de ditioneitol (DTT) y 2% SE para eliminar el mucus; se incubaron por 10min a 4°C. Posteriormente, se realizaron dos pasajes por otra solución de HBSS 2% SE y 2mM EDTA de manera de secuestrar calcio y permitir la ruptura de las uniones estrechas entre las células epiteliales; se incubó durante 15min a 37°C con agitación por cada pasaje. Una vez separadas las células epiteliales, el tejido fue disgregado mecánicamente con ayuda de bisturís y se pasó a una solución de RPMI con 1mg/ml de colagenasa tipo IV (*Sigma*), se incubó durante 30 min a 37°C con agitación y la suspensión resultante fue filtrada, centrifugada (10min a 500xg) y resuspendida en medio RPMI completo, o directamente en buffer staining (PBS, 2% de SFB) para proceder con la marcación celular para citometría de flujo, como se describe más adelante.

#### **1.4.2.d Análisis de la producción de citoquinas en células aisladas de bazo**

Las células aisladas de bazo, como se describió anteriormente, fueron cultivadas en placas de cultivo celular de 48 fosas (Cell Star®, GBO), empleando como medio de cultivo RPMI suplementado con 5% de suero fetal bovino y antibióticos. Se colocaron

500µl de la suspensión celular ( $4 \times 10^6$  células/fosa) y 500µl de una solución 2X en RPMI de PLV (2000µg/ml) como estímulo antigénico. Como control positivo del ensayo de citoquinas secretadas por LT se cultivaron las células en fosas previamente sensibilizadas con anti-CD3, o con medio RPMI como control negativo. Luego de 72 horas de cultivo a 37°C en atmósfera controlada de CO<sub>2</sub>, se cuantificó en el sobrenadante de los cultivos la presencia de citoquinas mediante el empleo de un ELISA de captura indirecto de origen comercial.

### **1.4.2.e Marcación celular intra-citoplasmática para citometría de flujo**

A partir de las células aisladas de los diferentes tejidos se realizaron cultivos celulares en placas de 96 fosas (Cell Star®, GBO), colocando 200µl de la suspensión celular ( $2 \times 10^5$  células/fosa) en presencia de Brefeldina A (inhibidor del transporte de proteínas desde el retículo endoplásmico al complejo de Golgi) a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 12hs. Pasado este tiempo las células fueron lavadas con buffer staining (solución 2% de suero fetal bovino en PBS), se bloquearon los receptores Fc con suero normal de ratón durante 15min a 4°C, para luego detectar las proteínas de superficie de interés con los anticuerpos específicos asociados a diferentes fluorocromos durante 30min 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 la tinción intra-citoplasmática. Brevemente, una vez fijadas y permeabilizadas las células, se incubaron con la concentración óptima del anticuerpo anti-citoquina específico conjugado a un determinado fluorocromo.

Las células fueron analizadas por citometría de flujo multiparamétrica, empleando un citómetro Becton Dickinson FACSCalibur. Las diferentes poblaciones celulares se analizaron utilizando el software de análisis de citometría de flujo FlowJo 7.6.

### **1.4.2.f Análisis de la producción de transcritos para citoquinas y factores de transcripción por biología molecular**

Para evaluar los niveles de mRNA de diferentes citoquinas en diferentes tejidos, se tomaron muestras de los tejidos y se conservaron a -80°C en 350µl de RNA<sup>later</sup>® (Ambion®). Posteriormente, como se describe detalladamente más adelante (3.2), se procedió a la extracción de RNA, transcripción reversa y finalmente amplificación de

diferentes genes por real time PCR. Los genes evaluados fueron: IL-5, IL-13, GATA-3, IFN- $\gamma$ , T-bet, IL-10, Foxp3 y  $\beta$ -actina como gen constitutivo.

#### **1.4.2.g Determinación de citoquinas en tejidos por ELISA**

Para evaluar la concentración de citoquinas producidas a nivel local en la mucosa, se tomaron muestras de yeyuno y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. El extracto proteico y la determinación de citoquinas se realizaron como se describe más adelante (3.3 y 3.4).

### **1.4.3 Transferencia adoptiva de células T regulatorias**

Linfocitos T regulatorios inducibles (iTreg) fueron generados *in vitro* o *in vivo*, y transferidos a animales naïve por vía iv. Para demostrar su capacidad regulatoria *in vivo*, los animales a los cuales se les realizó la transferencia celular fueron posteriormente sensibilizados como se indicó en el punto 1.2. y se evaluó la respuesta inmune mediante los ensayos antes mencionados (1.4.1 y 1.4.2).

#### **1.4.3.a Generación *in vitro* de células iTreg**

Se extrajo el bazo de ratones naïve, y se disgregó en forma mecánica en esterilidad utilizando medio de cultivo completo hasta obtener una suspensión celular. De la misma fueron separadas células  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$  en asepsia por cell-sorting, citometría de flujo (BD FACSAria II), empleando anticuerpos anti-CD4 y anti-CD25 conjugados (eBioscience). Se realizó el recuento de las células purificadas, las que fueron estimuladas con anti-CD3/anti-CD28 ( $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$  y  $2\mu\text{g}/\text{ml}$  respectivamente; eBioscience) en presencia de IL-2 ( $20\text{ng}/\text{ml}$ , Preprotech) y TGF- $\beta$  ( $5\text{ng}/\text{ml}$ , Preprotech) por 5 días. El fenotipo de las células Treg generadas *ex vivo* fue analizado por citometría de flujo (expresión de FoxP3 y CD25) y ELISA (concentración de IL-10 en el sobrenadante de cultivo de las células diferenciadas).

Luego para la inducción de tolerancia,  $1 \times 10^6$  células diferenciadas fueron inyectadas por vía iv en ratones receptores naïve, los cuales fueron posteriormente sensibilizados como ya se describió (1.2.1).

#### **1.4.3.b Inducción *in vivo* de células iTreg**

Para la obtención *in vivo* de iTreg, ratones dadores recibieron por vía ig diariamente  $10\text{mg}/\text{ml}$  de PLV o solución fisiológica durante 5 días; posteriormente fueron sensibilizados con PLV+TC como fue descrito anteriormente en 1.2.1 (ratones

PLV<sub>prev</sub>). Linfocitos aislados de MLN fueron caracterizados por citometría de flujo (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>), e inyectados a razón de 4x10<sup>6</sup> células en ratón receptores naïve, los cuales fueron posteriormente sensibilizados. Como control, se transfirieron células provenientes de MLN de animales que fueron sensibilizados, que y recibieron PBS (en lugar de PLV) en forma previa a la sensibilización (PBS<sub>prev</sub>). Luego los ratones transferidos fueron sensibilizados como se indicó anteriormente.

Para confirmar si el mecanismo modulador que revierte la respuesta alérgica es mediado por las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg, las células CD25<sup>+</sup> fueron depletadas *ex vivo* previo a la transferencia adoptiva de células: células aisladas de ratones sensibilizados control (PBS<sub>prev</sub>) (sin Treg) o ratones tolerizados (PLV<sub>prev</sub>) (con alto número de células Treg) fueron incubadas con anti-CD25 obtenido en rata (eBioscience) o el isotipo control correspondiente (eBioscience), con suero de rata, por 40 minutos a 4°C (Smaldini et al. 2015). Las células remanentes fueron lavadas y se analizó su fenotipo por citometría de flujo; posteriormente éstas fueron inyectadas en ratones receptores naïve, que luego fueron sensibilizados. Como control adicional, ratones receptores fueron inyectados con PBS y posteriormente sensibilizados.

## 2. MODELOS ANIMALES DE COLITIS

### 2.1 Preparación de reactivos inmunomoduladores

#### 2.1.1 Solución de Ácido 2,4,6 trinitrobencensulfónico (TNBS)

Se utilizó TNBS 1M (*Sigma Aldrich*) para preparar soluciones de TNBS de diferente concentración (25-50 mg/ml) en etanol al 50%, dependiendo del protocolo a aplicar.

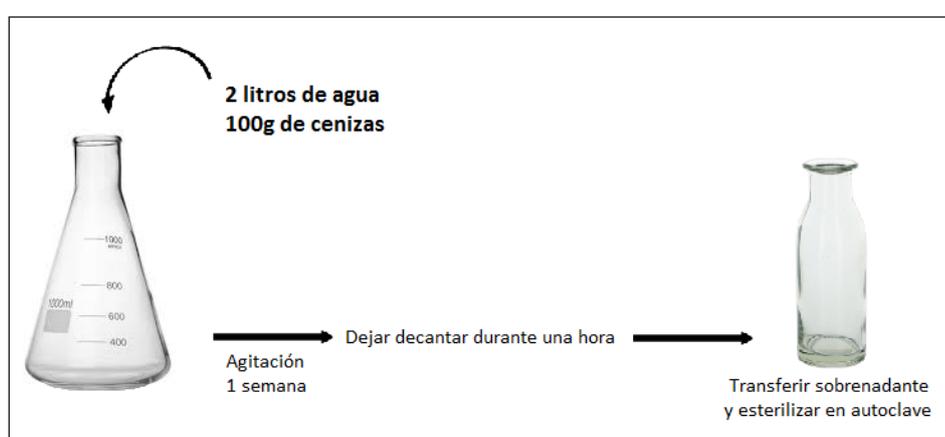
#### 2.1.2 Péptidos de *Amaranthus hypocondriacus*

Se utilizó un péptido aislado de la semilla de amaranto (*Amaranthus hypocondriacus*) previamente caracterizado por el grupo, de secuencia SSEDIKE, al que llamaremos P2 (Moronta et al. 2016). El péptido producto de una digestión simulada, fue aislado por HPLC, secuenciado por MALDI-TOF y posteriormente sintetizado. La síntesis peptídica se realizó mediante la técnica de síntesis peptídica en fase sólida (solid phase peptide synthesis -SPPS), (Merrifield 1963). Luego de la escisión de los péptidos de la resina del soporte sólido, los péptidos se purificaron por RP-HPLC usando una columna Kromasil 100-5 C18, 4,6x250mm, 5µm (AkzoNobel, Sweden). Se utilizaron como solventes de corrida el buffer A con 0,1% TFA en agua destilada y el buffer B con 0,1% TFA en acetonitrilo. Se utilizó un gradiente lineal de 10% - 50% en buffer B en un tiempo de elución de 11 min, con un flujo de elución de 1ml/min.

Posteriormente, las muestras se analizaron a través de un espectrómetro de masas de ionización por electro-espray (ESI-MS), registrándose una pureza mayor a 98%.

### 2.1.3 Cenizas volcánicas

Se pesaron 100g de cenizas volcánicas obtenidas en la ciudad de San Carlos de Bariloche (Rio Negro, Argentina), luego de la erupción del volcán Puyehue en 2011, y se agregaron 2 litros de agua corriente. Se dejó en agitación durante una semana para asegurar la disolución de aquellos componentes solubles presentes en las cenizas. Luego se dejó decantar durante 1h y se tomó el sobrenadante, el cual presentaba partículas en suspensión. Se separó el sobrenadante en botellas de vidrio y se procedió a la esterilización en autoclave (**Figura 11**).



**Figura 11. Preparación de agua de bebida con cenizas volcánicas.** Protocolo de preparación de agua de bebida con cenizas volcánicas, se pesan 100g de cenizas, se trituran con mortero y se transfieren a Erlenmeyer con 2 litros de agua corriente. Se deja en agitación durante 1 semana, posteriormente se deja decantar durante 1 hora, se toma el sobrenadante, se separa en botellas y se esteriliza en autoclave.

Para analizar el tamaño y la composición de las cenizas volcánicas, se tomó una muestra de las cenizas volcánicas secas y una muestra del sobrenadante previamente preparado como se explicó anteriormente, la cual se secó en estufa. Las muestras fueron esparcidas en un portaobjetos de Cu-Zn sobre cinta doble faz de grafito. Para el análisis de la composición se utilizó un Microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM) Modelo FEI ESEM Quanta 200 (Servicio de microscopía electrónica de barrido y microanálisis, Departamento de Mecánica, Facultad de Ingeniería, UNLP). Se trabajó en bajo vacío y se determinó en forma semi-cuantitativa la composición elemental de la muestra, por la técnica de espectroscopía dispersiva de energía.

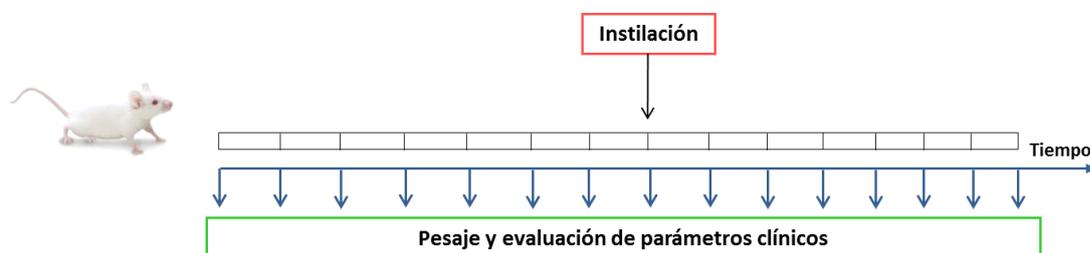
## 2.2 Inducción y modulación del proceso inflamatorio

Se utilizaron ratones BALB/c de 5-6 semanas de edad, que fueron mantenidos en el bioterio del IIFP, con ciclos de luz/oscuridad natural, a 20-24°C y con agua y comida *ad libitum*. Sobre

estos animales se aplicaron diferentes protocolos para inducir un proceso inflamatorio en el colon.

### 2.2.1 Modelo agudo de colitis

Para la inducción del proceso inflamatorio agudo, los animales fueron instilados por única vez por vía intra-rectal (i.r.) con 100 $\mu$ l de una solución entre 25-50mg/ml (según el lote) de TNBS, en etanol 50%, o sólo etanol 50% como control. Los ratones se agruparon en diferentes lotes según el estímulo recibido: TNBS, Control (Etanol), Tratamiento (según el tratamiento recibido). Los animales fueron sacrificados una semana después de la instilación. Durante el protocolo experimental los animales fueron evaluados en cuanto a su peso corporal y la manifestación de diferentes signos clínicos.



Esquema 2. Protocolo general de instilación i.r. de TNBS para inducción de colitis.

### 2.1.2 Modelo crónico de colitis

Para la inducción del proceso inflamatorio crónico, el protocolo consistió en 1 instilación i.r. cada 2 semanas, un total de 6 veces, con concentraciones de TNBS que oscilaron entre 25-50 mg/ml en cada instilación. Durante todo el protocolo se monitoreó el peso corporal y signos de diarrea. Los ratones se agruparon en diferentes lotes según el estímulo inflamatorio recibido: TNBS o Control (Etanol). Los animales fueron sacrificados 15 días después de la última instilación.

### 2.1.3 Modelo de colitis empleando cenizas volcánicas

Animales naïve, recibieron agua de bebida con cenizas volcánicas, como se describió previamente, durante 2 semanas consecutivas. Los grupos control recibieron agua corriente esterilizada; las botellas de agua con cenizas fueron agitadas dos veces por día para mantener las partículas en suspensión. El día 7 se realizó una única instilación por vía i.r. de 100 $\mu$ l de TNBS 35mg/ml en etanol al 50%, flagelina de *Salmonella typhimurium* (FliC) 1,8mg/ml en PBS, o etanol al 50% como control. Dependiendo del estímulo inflamatorio recibido los animales se agruparon en diferentes lotes: TNBS, Control (Etanol) o flagelina (FliC), con o sin cenizas en el agua de bebida.

## 2.3 Evaluación de la respuesta inflamatoria

### 2.3.1 Ensayos *in vivo*

#### 2.3.1.a Monitoreo del peso corporal

Los animales fueron pesados diariamente o 3 veces por semana dependiendo del modelo. Los pesos registrados para cada ratón fueron graficados como porcentaje respecto al día -1.

#### 2.3.1.b Índice de actividad de la enfermedad (DAI)

Se evaluó la presencia de diarrea y sangre en materia fecal diariamente o 3 veces por semana según el modelo. Con estos datos, junto al del peso corporal, se asignó un puntaje que indica el índice de actividad de la enfermedad (DAI), con valores que oscilan entre 0 (sin signos clínicos) y 12 (enfermedad grave). Por lo tanto el DAI considera la pérdida de peso corporal (pp), la consistencia de la materia fecal (CMF) y la presencia de sangrado (S), otorgándose un puntaje según corresponda y el valor total es la suma de los tres puntajes (**Tabla 2**).

Pérdida de peso	Puntos	Consistencia de materia fecal	Puntos
Sin pérdida	0	Normal	0
1 - 5% de pérdida	1	MF blanda	2
5 - 10% de pérdida	2	Diarrea acuosa	4
10 - 15% de pérdida	3		
> 15% de pérdida	4		
<b>DAI= pp + CMF + S</b>		<b>Sangrado</b>	
			<b>Puntos</b>
		Sin sangrado	0
		Sangrado leve	2
		Sangrado marcado	4

**Tabla 2.** Índice de actividad de la enfermedad DAI. Puntaje asignado teniendo en cuenta diferentes parámetros clínicos.

### 2.3.2 Ensayos *ex vivo* e *in vitro*

#### 2.3.2.a Evaluación macroscópica del colon

Luego de sacrificados los animales, se extrajo el colon, se midió su longitud (cm), se evaluó el aspecto (engrosamiento, presencia de sangre), se limpió suavemente con PBS estéril para eliminar la materia fecal, se secó sobre una servilleta de papel para eliminar el exceso de PBS, y se procedió a pesarlo en balanza analítica con precisión 0,1mg. Se calculó la relación peso/longitud (mg/cm) y se graficó para evaluar las diferencias entre los distintos grupos.

**2.3.2.b Índice de actividad histológica (HAI)**

Las muestras de colon se procesaron como se indica en el punto 3.1. A partir de los cortes teñidos con H&E, se evaluó en forma semi-cuantitativa por microscopía la presencia de infiltrado celular y de daño epitelial y, teniendo en cuenta la magnitud de los mismos se estableció un puntaje que oscila entre 0 (sin daño) y 8 (daño extenso con pérdida de estructura). El índice de actividad histológica es el resultado de la suma de los puntajes individuales correspondientes al infiltrado y daño epitelial, calculados según la **Tabla 3**.

Daño epitelial	Puntos	Infiltrado	Puntos
Ninguno	0	Ninguno	0
Mínima pérdida de células caliciformes	1	Infiltrado alrededor de la base de las criptas	1
Pérdida importante de células caliciformes	2	Infiltrado en la muscularis de la mucosa	2
Pérdida mínima de criptas y extensa de células caliciformes	3	Extenso infiltrado en la muscularis de la mucosa y edema	3
Pérdida extensa de criptas	4	Infiltrado de la submucosa	4

**HAI= DañoEpitelial + Infiltrado**

**Tabla 3. Índice de actividad histológica (HAI).** Puntaje asignado teniendo en cuenta diferentes parámetros histológicos.

**2.3.2.d Análisis de la expresión de transcritos correspondientes a citoquinas y factores de transcripción por biología molecular**

Se tomaron muestras de colon de 1cm de longitud y se conservaron en 350µl de RNAlater® (Ambion®) a -80°C hasta su procesamiento. Posteriormente, para determinar los niveles de transcritos, se realizó una extracción de RNA, transcripción reversa, y finalmente amplificación de diferentes genes por real time PCR. En este caso los genes evaluados fueron: IL-1β, IL-6, TNF-α, Ccl20, T-bet, IFN-γ, GATA-3, IL-13, RORγt e IL-17A.

**2.3.2.e Análisis de la concentración de citoquinas en tejidos por ELISA**

Se tomaron muestras de colon y se guardaron a -80°C hasta su procesamiento. El extracto proteico y la determinación de citoquinas se realizaron como se describe más adelante (3.3 y 3.4).

**2.3.2.f Análisis de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO)**

Sobre porciones de colon de 1-2cm de longitud; luego de limpiarlos con PBS y pesarlos, se agregaron 250µl de buffer MPO (buffer 50mM de acetato de sodio pH5.4). Las muestras se disgregaron en forma mecánica empleando un homogeneizador

Ultraturrax (IKA®T10 basic ULTRA-TURRAX®), luego se centrifugaron durante 5min a 10.000xg. En el sobrenadante se determinó la actividad de la enzima MPO. En una placa de ELISA se realizó una curva standard utilizando Peroxidasa comercial en el rango de 40 - 0,625µg/ml (con actividad 60 unidades de purpurogalina/mg a 20°C). Se colocaron 100µl por fosa de estándar o muestra, y luego se agregaron 100µl de tetrametilbencidina (TMB) (eBioscience). Se incubó durante 30min a 37°C, y se detuvo la reacción mediante el agregado de 50µl de ácido sulfúrico 2N. Se midió la absorbancia a 450nm y en base a la curva standard se determinó la actividad enzimática de la muestra. El resultado final se expresó como unidades de purpurogalina en relación al peso del tejido. (A todas las soluciones se les agregó un cocktail de inhibidores de proteasas (*Sigma*) antes de utilizarlas).

### 3. TÉCNICAS GENERALES

#### 3.1 Preparación de muestras para histología

##### 3.1.1 Fijación e inclusión en parafina

Los tejidos se fijaron durante 24hs en formol 10%. Luego se colocaron en canastillas y se enjuagaron con agua corriente durante 15min. Posteriormente se procedió a deshidratar los tejidos colocándolos durante 1h en cada solución de etanol de concentración creciente (50%, 70%, 96% y 100%), y finalmente 90min en xilol. Una vez finalizado el proceso de deshidratación, se procedió a la inclusión del tejido en parafina, para ello se colocaron las canastillas con los tejidos durante 1h en parafina fundida a 60°C, y luego se colocaron los tejidos en un molde con parafina fundida durante 1h más y finalmente se dejó solidificar.

##### 3.1.2 Coloración con Hematoxilina y Eosina (H&E)

Sobre las muestras incluidas en parafina se realizaron cortes de 5µm de espesor con micrótopo y se colocaron sobre vidrios positivados con poli-L-Lisina. Los vidrios con las muestras fueron colocados en estufa a 60°C durante 30min (hasta fundir la parafina). A continuación se procedió a desparafinar las muestras colocando los vidrios en xilol durante 15min, para luego rehidratar los cortes de tejido colocando los vidrios durante 1min en soluciones de etanol de diferente concentración (100%, 96%, 70% y 50%). Luego se transfirieron las muestras a agua y se procedió a colorear los núcleos con Hematoxilina de Gill (Biopur) durante 6min. A fin de diferenciar el colorante se procedió a enjuagar los tejidos en agua corriente durante 3min. A continuación, se enjuagaron los cortes con abundante agua

destilada y se coloreó el resto del tejido en Eosina (Biopur) durante 3min; luego de enjuagar con agua corriente los vidrios, se procedió a deshidratar las secciones de tejido sumergiendo los vidrios en soluciones de etanol de concentraciones crecientes y finalmente en xilol.

### 3.1.3 Coloración tricrómica de Masson

A partir de las muestras incluidas en parafina se realizaron cortes de 5µm de espesor que se colocaron sobre vidrios positivados con poli-L-Lisina y luego se desparafinaron y rehidrataron como se explicó anteriormente. Luego se transfirieron las muestras a agua y se procedió a colorear los núcleos con Hematoxilina (Weigert) por 5min. A fin de diferenciar el colorante se procedió a enjuagar los tejidos en agua corriente durante 5min. A continuación se enjuagaron los cortes con abundante agua destilada, y se transfirieron al colorante fucsina-escarlata (compuesto por 90ml de escarlata de Biebrich 1% en agua destilada, 9ml de fucsina ácida 1% en agua destilada y 1ml de ácido acético glacial), durante 5min. Posteriormente se enjuagaron los cortes con abundante agua destilada por 5min. Para asegurar una correcta tinción con el colorante verde luz, y comenzar la diferenciación del colorante fucsina-escarlata, se colocaron los vidrios en ácido fosfomolibdico 5% en agua destilada, durante 15min, y posteriormente se transfirieron al colorante verde luz 2%, donde se dejaron durante 10min. A continuación se enjuagaron los cortes rápidamente en agua destilada, y se pasaron a una solución de ácido acético 1% en agua destilada, durante 3min, para diferenciar el colorante verde luz. Luego se procedió a deshidratar las secciones de tejido sumergiendo los vidrios en soluciones de etanol de concentraciones crecientes y finalmente en xilol. Las muestras se montaron entre portaobjetos y cubreobjetos empleando bálsamo de Canadá.

## 3.2 Técnicas de biología molecular

Se estudió la expresión de diferentes genes en muestras provenientes de diferentes tejidos de los ratones.

### 3.2.1 Extracción de RNA

Para la obtención de RNA total se colocó el tejido en buffer lisis comercial, y se lo homogeneizó mecánicamente mediante el empleo de un homogeneizador de tejidos (UltraTurrax). Para su aislamiento se utilizó 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 sílica de la columna; el DNA contaminante se elimina utilizando una DNasa recombinante, aumentando así la pureza

de RNA. Luego se realizan lavados sucesivos 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 analizó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia (A) a 260 y 280nm. La 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 utilizó el valor de absorbancia a 260nm y se consideró una unidad de absorbancia como equivalente a 40µg/ml de RNA, por lo cual  $[RNA] = 40 \mu\text{g/ml} \times A_{260} \times (1/\text{dilución})$ .

### 3.2.2 Reacción de transcripción reversa (RT)

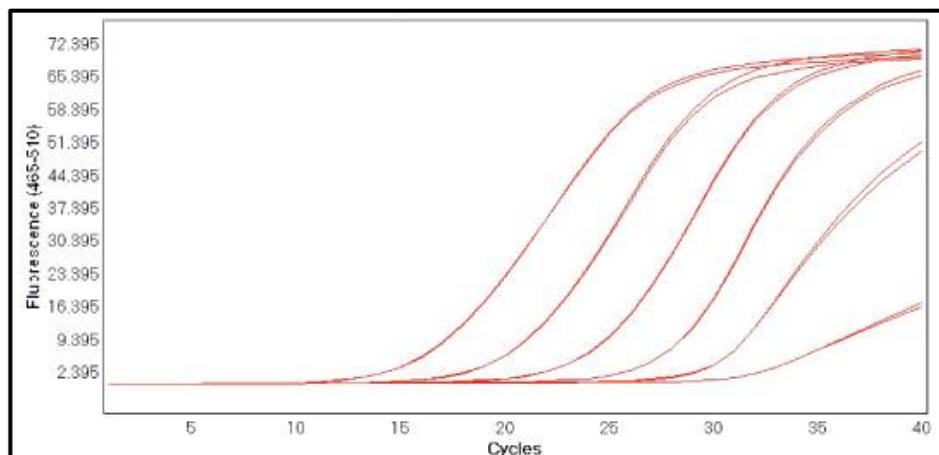
Esta técnica se basa en la obtención de DNA complementario a partir del RNA mensajero (Mullis 1990), utilizando la enzima transcriptasa inversa (M-MLV). Para ello se siguió el siguiente protocolo: se mezcló 1µg de RNA total con 1µl de random primer (10µg/µl), y agua libre de RNasas de manera de tener un volumen final de 12µl, la mezcla se incubó 5min a 70°C para desnaturalizar el RNA e inmediatamente se enfrió a 4°C, proceso mediante el cual hibridaron los primers. Luego se agregó una mezcla con 4µl de buffer de la transcriptasa inversa, 1,5µl de DTT 100mM, 0,5µl de inhibidor de nucleasas de RNA, 1µl de dNTPs y 1µl de la enzima SuperScript II (Invitrogen). Las muestras fueron incubadas en el termociclador (Mastercycler® gradient, Eppendorf) a 37°C por 45min, a 70°C durante 15min para terminar la reacción y luego fueron enfriadas a 4°C. El cDNA obtenido fue guardado a -20°C hasta su empleo.

### 3.2.3 PCR en tiempo real (qPCR)

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 recomenzar el ciclo.

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 qPCR 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 12**).



**Figura 12.** Curva de amplificación obtenido con un sistema SYBR Green para un gen dado en diluciones seriadas de una muestra por duplicado.

En estas curvas se distinguen 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 ciclo umbral, caracterizado como CT, 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  $\beta$ -actina para estandarizar la cantidad total de cDNA. En la **Tabla 4** se describen los genes de interés analizados. Se graficó el valor correspondiente a “veces de incremento” (FI) de los niveles de mRNA ( $2^{\Delta Cts}$ ), el cual fue determinado comparando el Ct del gen de interés con el correspondiente al de  $\beta$ -actina (Cts); y comparando los valores de Ct entre muestras de animales del lote control correspondiente según el caso y de animales de los demás lotes ( $\Delta Cts$ ), para establecer una variación en la expresión. Por lo tanto lo que se cuantificó es la variación de los niveles de un transcripto respecto a los de un animal control.

### 3.2.4 Primers

Los primers para los distintos 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 empleando el software PearlPrimer v.1.1.20. Los primers fueron diseñados únicamente con regiones exónicas con el fin de evitar una probable amplificación inespecífica de DNA genómico. Para asegurarnos la especificidad de los primers, se realizó en cada caso un alineamiento básico local (nucleotide BLAST), utilizando la base de datos del NIH, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

A continuación se muestra la lista de primers utilizados, y las secuencias de los mismos.

Gen	Nomenclatura	Secuencia (5' → 3')
IL-1 $\beta$	Fwd il-1b	TGGGTATTGCTTGGGATCCA
	Rv il-1b	AATCTATACCTGTCCTGTGTAATGAAAGAC
IL-6	Fwd il-6	GTTCTCTGGGAAATCGTGGAAA
	Rv il-6	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
TNF- $\alpha$	Fwd tnf-a	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA
	Rv tnf-a	CCTCCACTTGGTGGTTTGCT
CCL20	Fwd ccl20	TTTTGGGATGGAATTGGACAC
	Rv ccl20	TGCAGGTGAAGCCTCAACC
IFN- $\gamma$	Fwd ifn-g	TGGCATAGATGTGGAAGAAAAGAG
	Rv ifn-g	TGCAGGATTTTCATGTCACCAT
T-bet	Fwd T-bet	CTACATGCTCTGTGAATCAG
	Rv T-bet	CATCTTTTCTTATTTTGGTG
IL-5	Fwd il-5	TACTCATAAAAATCACCAGC
	Rv il-5	TTATTAATGACAGGTTTTGG
IL-13	Fwd il-13	ACATCACACAAGACCAGACT
	Rv il-13	TTTGTATAAAGTGGGCTAC
GATA-3	Fwd GATA-3	TGTCCAGTCAGTAACTTTCA
	Rv GATA-3	CAGTCACCTGAGTCTTCTCT
IL-17A	Fwd il-17a	TCCAGAATGTGAAGGTCAACC
	Rv il-17a	CTTCATTGCGGTGGAGAGTC
ROR- $\gamma$ t	Fwd ror-gt	TACTGAAAGCAGGAGCAATGG
	Rv ror-gt	GTGGTTGTTGGCATTGTAGG
IL-10	Fwd il-10	GGACTTTAAGGGTTACTTGG
	Rv il-10	CAAATGCTCCTTGATTTCTG
TGF- $\beta$	Fwd tgf-b1	AACCAAGGAGACGGAATACAG
	Rv tgf-b1	CTGATCCCCTTGATTTCCAC
$\beta$ -actina	Fwd b-act	CGTCATCCATGGCGAACTG
	Rv b-act	GCTTCTTTCAGCTCCTTCGT

**Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos (primers) usados para la amplificación de genes murinos a partir de muestras de ratón.**

### **3.3 Extracción de proteínas a partir de tejidos**

Para determinar y estandarizar la concentración de citoquinas en yeyuno o colon, las muestras de tejido a analizar fueron pesadas. A continuación se agregaron 200µl de buffer lisis (Hepes, EDTA, KCl y Nonidet P40), y se procesaron las muestras mediante el empleo del homogeneizador de tejidos; las muestras se incubaron durante 15min a 4°C. Luego se centrifugaron a 8.000xg por 30min a 4°C, se recolectaron los sobrenadantes y se midió para cada muestra la concentración de proteínas por BCA. Los extractos se alicuotaron y se guardaron a -80°C hasta el momento de cuantificar las citoquinas por ELISA. Finalmente se expresó el resultado como µg de citoquina/g de tejido. (A todas las soluciones se les agregó un cocktail de inhibidores de proteasas (*Sigma*) antes de utilizarlas).

### **3.4 Determinación de citoquinas por ELISA**

Se cuantificó en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos o en extractos proteicos obtenidos a partir del procesamiento de los tejidos la presencia de diferentes citoquinas mediante el empleo de ensayos comerciales de ELISA de captura indirecto: interferón gamma (Mouse IFN-γ ELISA, Ready-SET-Go!, eBioscience), IL-5 (Mouse IL-5 ELISA, Ready-SET-Go!, eBioscience), IL-13 (Mouse IL-13 ELISA, Ready-SET-Go!, eBioscience), IL-10 (Mouse IL-10 ELISA, Ready-SET-Go!, eBioscience), TGF-β (Mouse TGF-β ELISA, Ready-SET-Go!, eBioscience) e IL-1β (Mouse IL-1β ELISA, Ready-SET-Go!, eBioscience).

Se introdujeron algunas modificaciones técnicas al protocolo indicado por el fabricante para optimizar el ensayo en función de las concentraciones de citoquinas presentes en los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos o en los tejidos. Brevemente, se sensibilizaron las placas de ELISA (NUNC, MaxiSorp) con 100µl/fosa del anticuerpo de captura correspondiente a cada caso en una concentración de 1.25µg/ml para IL-5 e IFN-γ, 4µg/ml de IL-13, IL-10, TGF-β e IL-1β en buffer de sensibilización pH9.0, durante 12hs a 4°C. Luego se lavó y se realizó el bloqueo con 200µl/fosa de "Buffer Assay" (PBS con BSA 0.5%, pH 7.4) durante 1h a 37°C. Luego de los lavados correspondientes, se agregó 100µl/fosa de sobrenadante de cultivo o de extracto proteico de tejido; paralelamente se procesaron los estándares de citoquina de cada kit para construir la curva de calibración (provistos por el kit), durante 1h a 37°C o 16hs a 4°C. Tras realizar los lavados se agregaron 100µl/fosa del anticuerpo secundario (anti-ratón IFN-γ-biotinilado 0.125µg/ml, anti-ratón IL-5 biotinilado 0.10µg/ml, anti-ratón IL-13-biotinilado 0.0625µg/ml, anti-ratón IL-10-biotinilado, anti-ratón TGF-β-biotinilado o anti-ratón IL-1β-biotinilado) durante 1h a 37°C. Finalmente, se realizó una incubación de 30min a

37°C con Streptavidina-HRP (0,15µg/ml). Se empleó TMB comercial como sustrato y luego de detener la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N se midió la densidad óptica a 450nm. La concentración de citoquinas en el sobrenadante de cultivo se calculó a partir de la curva de calibración construida con los estándares (DO 450nm vs. Concentración de citoquinas en pg/ml).

### **3.5 Análisis estadístico**

Los gráficos y el análisis de datos de los diferentes ensayos fueron realizados 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. En algunos casos en que sólo fueron comparados dos grupos se realizó la prueba *t* de Student no pareado.



# PARTE I

## ESTRATEGIAS DE INMUNOMODULACIÓN DE UN MODELO MURINO DE ALERGIA A LAS PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA





## INTRODUCCIÓN

Las alergias alimentarias (AA) IgE-mediadas, afectan aproximadamente a un 4-8% de los niños y a un 3-4% de los adultos pudiendo definirse dos fenotipos de pacientes: aquellos con alergia transitoria y aquellos con alergia persistente. Estos últimos presentan mayores dificultades a la hora de intentar revertir la patología y, a pesar de los esfuerzos por desarrollar diferentes estrategias terapéuticas que permitan la desensibilización de los pacientes y la recuperación temprana de la tolerancia oral, actualmente el único tratamiento aceptado para las AA sigue siendo la eliminación estricta del alérgeno de la dieta, el asesoramiento nutricional y el tratamiento de los efectos adversos en caso de exposición accidental al alérgeno, siendo necesario, en los casos de pacientes con antecedentes de anafilaxia, contar con epinefrina para controlar los síntomas graves de esta afección (Nowak-Węgrzyn & Sampson 2011; Berin 2014).

Como hemos explicado anteriormente, en pacientes con AA, se observa una fuerte respuesta celular Th2-mediada que induce la generación de anticuerpos IgE antígeno-específicos (Berin & Mayer 2013). Probablemente este estado sea la consecuencia de fallas en nivel de la tolerancia inmune, dado que se han hallado defectos cuantitativos o cualitativos en las células Treg. Como estrategia para intentar revertir esta falta de tolerancia hacia los antígenos de la dieta, se han desarrollado las IT, que se definen como tratamientos basados en la modulación de la respuesta inmune. Dentro de éstas se encuentran las IT alérgeno-específicas, que se basan en la administración controlada de dosis crecientes de la proteína alérgica a pacientes alérgicos IgE-dependientes hasta alcanzar un estado en el cual logran tolerar la exposición natural al alérgeno. Durante su desarrollo se requiere la supervisión médica. El objetivo final es alcanzar una dosis de mantenimiento de este estado, que se continúe por el mayor período de tiempo posible, y que garantice la no-reactividad frente a la exposición al alérgeno una vez finalizado el tratamiento, incluso después de semanas, meses o años de no estar expuesto al mismo (Wang & Sampson 2013). A diferencia de la tolerancia, la desensibilización a un alérgeno depende de la ingesta regular del mismo, y la discontinuación lleva a la pérdida o disminución del efecto protector. Por lo tanto, dependiendo del individuo y de factores aún no del todo conocidos, una IT puede llevar generar en el paciente un mecanismo de *desensibilización*, en el cual se requiere mantener la administración controlada del alérgeno para evitar reacciones de hipersensibilidad, o de *tolerancia*, en el cual el paciente discontinúa el tratamiento y mantiene la falta de respuesta al alérgeno durante su exposición natural al mismo. Dentro de las terapias alérgeno-específicas más

estudiadas se encuentran la inmunoterapia oral (ITO) y la inmunoterapia sublingual (ITSL), que emplean tanto alérgenos nativos como recombinantes.

La ITO consiste en la administración regular de bajas dosis del alérgeno por vía oral, que van incrementándose gradualmente hasta alcanzar una dosis de mantenimiento. El estudio de la ITO se remonta a principios del siglo XX, cuando Schofield reportó haber tratado a un paciente con alergia al huevo a través de la administración oral de pastillas con muy bajas dosis de huevo crudo, que fue aumentando paulatinamente hasta lograr la desensibilización luego de 8 meses de tratamiento; posteriormente varios casos han sido publicados, en los que se logró evidenciar la instauración de una desensibilización. Sin embargo, ya se sabía en ese entonces que en muchos casos se generaba tolerancia en forma espontánea con la edad, y lo que se proponía era que a través de la ITO se podía inducir tolerancia en forma más temprana (Edwards 1940). Los avances logrados en los últimos años han determinado que la ITO como tratamiento para revertir en forma permanente la alergia, haya tomado cada vez más importancia en la práctica clínica. A pesar que en diferentes trabajos se ha logrado una mejoría en los pacientes tratados, la baja cantidad de pacientes incluidos es los ensayos clínicos así como el no empleo de placebo (Caminiti et al. 2009), ha determinado que se deban ampliar el número de estudios. En aquellos casos en que se ha estudiado una cantidad de pacientes adecuada, realizando los controles correspondientes, sólo se puede definir un estado de desensibilización alcanzado debido a que el porcentaje de pacientes que desarrollaron tolerancia en el grupo de pacientes tratados y en el grupo que recibía placebo era similar (Staden et al. 2007), una vez finalizada la ITO aquellos pacientes que lograron tolerar la ingesta del alérgeno, siguieron en contacto con el mismo, con lo cual no se puede asegurar que se haya generado tolerancia en forma permanente (Skripak et al. 2008; Varshney et al. 2011), o, lo que es más importante en base a las definiciones enunciadas, en los casos en que se ha evitado la ingesta del alérgeno una vez finalizada la ITO, se ha reportado la reaparición de síntomas frente a una nueva exposición al mismo (Keet et al. 2012; Syed et al. 2014). Sin embargo, lo más relevante en la ITO, razón por la cual no existen guías de tratamientos estandarizadas y aprobadas para su uso en la práctica clínica, son las reacciones adversas que generan durante el tratamiento, lo que genera el abandono del tratamiento por parte de los pacientes afectados. Esto determina actualmente que, a pesar de los múltiples estudios realizados y los avances logrados, la ITO siga siendo un tratamiento experimental, y que no existan tratamientos aprobados para su uso clínico (Berin & Mayer 2013).

Por otro lado la ITSL consiste en la administración de bajas dosis del alérgeno, en el orden de microgramos a miligramos, bajo la lengua evitando la deglución, al menos durante cierto tiempo (Henson & Burks 2012). Si bien la ITSL ha demostrado ser efectiva y segura para el tratamiento de alergias respiratorias IgE-mediadas (Lin et al. 2013), el primer reporte de ITSL para alergias alimentarias es muy reciente (2003), en el que una paciente con alergia severa al kiwi, que había presentado episodios de anafilaxia, luego de 2 meses de tratamiento escalonado logró tolerar la ingesta de kiwi sin presentar manifestaciones clínicas (Mempel et al. 2003). Posteriormente se han realizado diferentes protocolos de ITSL, registrándose en 2005 el primer trabajo doble-ciego con control de placebo (Enrique et al. 2005); en ellos se ha demostrado que la ITSL es una opción segura para el tratamiento de las AA gracias a las bajas dosis empleadas en comparación con la ITO (menor a 10mg de proteína en ITSL, y del orden de los 4g de proteína en ITO) para inducir los mecanismos de tolerancia, lo que implica un menor riesgo de reacciones adversas durante el tratamiento (Kim et al. 2011; Keet et al. 2012; Fleischer et al. 2013). Sin embargo, aunque existen muy pocos trabajos en los que se compara la eficiencia de la ITSL frente a la ITO, la primera ha mostrado una menor eficiencia en la inducción de los mecanismos regulatorios mucosales y sistémicos (Keet et al. 2012; Narisety et al. 2015).

Si bien a través de la ITO y de la ITSL es posible desensibilizar a pacientes con AA, no existe un protocolo estandarizado, dada la falta de consistencia de los mismos en cuanto a dosis empleadas, tiempos de tratamientos y, fundamentalmente, debido a la aparición de reacciones adversas. A partir de los resultados publicados por los diferentes autores, es posible concluir que una mayor duración en el tiempo del tratamiento y de la dosis de mantenimiento, aseguran una mejora en la desensibilización. En cuanto al desarrollo de tolerancia permanente, pocos trabajos han evaluado la respuesta a largo plazo, y los que lo han hecho, encontraron que en la mayoría de los casos la discontinuación del tratamiento lleva a una pérdida de los efectos observados luego del tratamiento. En general los tiempos de tolerancia reportados no superan los 24 meses. (Wang & Sampson 2013). Los cambios inmunológicos evidenciados luego de la desensibilización a alérgenos alimentarios incluyen: descenso de la sensibilización de mastocitos y basófilos, descenso en el diámetro de la induración en la PC, incremento de anticuerpos específicos IgG4 e IgA, en algunos casos, descenso de anticuerpos IgE específicos y de citoquinas Th2 (Mempel et al. 2003; Patriarca et al. 2003; Skripak et al. 2008; Varshney et al. 2011; Kim et al. 2011; Vickery et al. 2013). Sin embargo, el mecanismo subyacente que genera estos cambios no se conoce completamente. En base a lo observado en los pacientes que desarrollan tolerancia en forma espontánea, se cree

que la expansión transitoria de células T regulatorias inducidas (iTreg), sería la responsable de la inhibición de la respuesta Th2, o incluso de la desviación de la respuesta inmune hacia un perfil Th1 (Schreffler et al. 2009; Berin & Mayer 2013). Hasta el momento, la inmunoterapia alergeno-específica ha sido exitosa sólo en lograr la desensibilización, pero no hay evidencias fehacientes que demuestren el desarrollo de tolerancia. Por estas razones es necesario profundizar los estudios y desarrollar nuevas terapias que minimicen la aparición de reacciones adversas durante el tratamiento (Henson & Burks 2012).

Una estrategia alternativa a las IT descritas para el tratamiento de las AA, es la administración de las proteínas alergénicas intactas o modificadas combinadas con componentes que potencien la respuesta tolerogénica (adyuvantes), desviando la respuesta inmune hacia un perfil Th1 o Treg. Estas inmunoterapias con adyuvantes varían desde la co-administración del alérgeno con un microorganismo muerto por calor o con un producto microbiano purificado, hasta la generación de una proteína fusión entre el adyuvante y el alérgeno. Como es ampliamente conocido actualmente, los adyuvantes se unen a receptores de reconocimiento de patrón (PRR) en células presentadoras de antígeno de la inmunidad innata, inducen la activación celular y de esta manera desvían la respuesta inmune hacia un perfil Th1 o Treg dependiendo de las características de la molécula adyuvante (Berin 2013). Entre los adyuvantes más estudiados en alergia se encuentran la *Listeria monocytogenes* muerta por calor (Li et al. 2003), *E. coli* modificada genéticamente para expresar los principales alérgenos de maní, muerta por calor (Wood et al. 2013), el oligonucleótido CpG que actúa activando TLR9 en DCs y LB, desviando la respuesta inmune hacia un perfil Th1 (Kulis et al. 2013), así como una proteína fusión flagelina-ovoalbúmina, agonista de TLR5, desviando la respuesta inmune hacia un perfil Th1 (Burggraf et al. 2011).

En trabajos realizados por el grupo de la Dra. Juliana Cassataro, se pudo evidenciar que la administración intraperitoneal (ip) u oral de la proteína externa de membrana de *Brucella abortus* Omp16 tiene efectos protectores frente a la infección por dicho patógeno, induciendo, sin la necesidad de adyuvantes, una respuesta de perfil Th1, lo que demuestra su capacidad auto-adyuvante. La adyuvancia de Omp16 se pudo explicar, al menos parcialmente, por la activación de DCs, tanto *in vivo* como *in vitro*, vía TLR4 (Pasquevich et al. 2010). En base a estos resultados, en trabajos previos de nuestro grupo, se estudió el efecto adyuvante de Omp16, en el tratamiento de un modelo experimental de alergia a las proteínas de leche de vaca, y se evidenció que la administración nasal u oral de esta proteína junto a PLV, logra revertir el desarrollo de la

respuesta alérgica Th2 específica e inducir una respuesta inmune específica Th1 (Ibáñez et al. 2013; Smaldini et al. 2014) con el consiguiente control y reversión de la alergia experimental.

Con el fin de optimizar las dosis de alergenó a emplear en las IT y para incrementar la eficiencia en la inducción de tolerancia con la consiguiente reducción de los efectos adversos, se incorporó el uso de diferentes adyuvantes en los protocolos terapéuticos en modelos animales. El desarrollo de distintos modelos animales de alergia experimental ha mostrado gran utilidad para los ensayos pre-clínicos, permitiendo comprender los mecanismos moleculares y celulares subyacentes inducidos, y abordar los estudios para el desarrollo de nuevas terapias en pacientes (Finkelman et al. 2007). Los animales más comúnmente empleados en estos modelos son los ratones por distintos motivos: conocimiento del genoma, amplia disponibilidad de reactivos específicos (Acs 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. Las grandes similitudes entre el sistema inmune de humano y de ratón, y sus mecanismos de regulación, demuestran la importancia de los modelos murinos tanto para comprender los complejos mecanismos inmunológicos y fisiopatológicos involucrados en el desarrollo de la respuesta alérgica, como para evaluar diferentes tratamientos preventivos o terapéuticos (McClain & Bannon 2006; Berin & Mayer 2009; Dearman & Kimber 2009). Sin embargo, en la especie ratón no existe la alergia y por lo tanto es necesario inducirla experimentalmente para disponer de este tipo de modelos.

En ratones, la respuesta fisiológica frente a la exposición a un antígeno que ingresa por el tracto gastrointestinal es la inducción de tolerancia inmunológica, caracterizada por la generación de linfocitos Treg específicos; esto significa que frente a un Ag que ingresa por vía oral no se produciría una reacción alérgica en forma espontánea (similar a lo que ocurre en un individuo no alérgico). Por esta razón el desarrollo de modelos murinos de alergia implica que, en una fase inicial de sensibilización, se deban emplear adyuvantes pro-Th2 para inducir la sensibilización alérgica IgE-dependiente (Berin & Mayer 2013). Este hecho implica una marcada diferencia con respecto a la inducción de la patología en humanos, por lo cual la aplicación de estos modelos está restringida casi exclusivamente al estudio de la fase efectora de estas enfermedades.

Los adyuvantes usualmente utilizados incluyen adyuvantes sistémicos, como el hidróxido de aluminio (Al(OH)<sub>3</sub>), así como adyuvantes mucosales que se administran por vía ig como la TC y la enterotoxina B de *Staphylococcus* (McClain & Bannon 2006; Berin & Mayer 2009; Dearman &

Kimber 2009). El  $\text{Al}(\text{OH})_3$  administrado por vía ip junto con el alérgeno de interés induce la liberación de ácido úrico de las DCs, el que es detectado como una señal de estrés y genera la activación de inflammasoma (Eisenbarth et al. 2008; Kool et al. 2008). La secreción de IL-1 $\beta$ , promueve la activación y diferenciación de los linfocitos T 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 TC, administrada por vía ig, promueve la respuesta inmune que más ajustadamente reproduce lo que ocurre en una AA (Trabajo de Tesis Doctoral Smaldini 2012). En ratones BALB/c, la TC administrada en combinación con las PLV por vía ig, induce una respuesta inmune local (intestino) y sistémica antígeno-específica, Th2-dependiente, rompiendo la tolerancia oral e induciendo la respuesta alérgica (Agren et al. 1997; Smaldini et al 2012). 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 (Li et al. 1999). La administración oral de TC lleva a un incremento de la migración de DCs CD103<sup>+</sup> normalmente tolerogénicas, de LP a MLN, e induce una respuesta Th2 de células T naïve a través de la molécula co-estimuladora OX40L (Blázquez & Berin 2008).

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

- La unión de la subunidad B a células epiteliales, células M y CPAs entre otras, permitiendo su internalización, y promoviendo la activación celular a través del aumento de AMP cíclico, lo que aumenta la expresión de moléculas co-estimuladoras y de receptores de quimoquinas (Eriksson et al. 2003; Gagliardi & De Magistris 2003).
- La estabilidad frente a proteasas, que determina que sea una potente enterotoxina bacteriana, radicando aquí su importancia como adyuvante mucosal al administrarla por la vía oral.
- La estimulación de las CPAs a través de su unión al receptor de gangliósidos GM1, potenciando la presentación de antígenos mediante el aumento de la secreción de IL-1 (Bromander et al. 1991).

- ▣ La movilización de DCs inmaduras a intestino, mediante el aumento de CCL20/MIP-3 $\alpha$  por las células epiteliales intestinales (Anjuère et al. 2004), lo que promueve una respuesta alérgica en un entorno pro-Th2 (Eriksson et al. 2003).

También se ha estudiado en nuestro grupo el empleo de bicarbonato de amonio 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 pylori*) 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 de la TC a los componentes de aluminio presentes en las drogas antiácidas que activan el inflammasoma (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 alérgica de las proteínas alimentarias ingeridas, al no alterar su conformación nativa y alcanzar la superficie de la mucosa con su conformación natural. Así, la administración de una solución de bicarbonato de amonio por vía ig, previo a la administración de PLV junto a TC en ratones BALB/c nos permite inducir una respuesta inmune Th2-dependiente a nivel local y sistémico. De esta manera podemos simular en animales la alergia a las PLV y evaluar diferentes tratamientos. En esta primera etapa del trabajo nos planteamos estudiar en nuestro modelo experimental de alergia, el mecanismo de acción de la ITO y de la ITSL, utilizando en el segundo caso Omp16 como adyuvante mucosal para desviar la respuesta inmune hacia un perfil Th1.



**OBJETIVOS GENERALES**

- ▣ Modular la respuesta inmune establecida en un modelo murino de alergia a las PLV utilizando diferentes estrategias terapéuticas.
- ▣ Evaluar diferentes parámetros moleculares y celulares involucrados en el restablecimiento de la tolerancia hacia las PLV.



# CAPÍTULO 1

INMUNOTERAPIA ORAL EN UN MODELO MURINO DE  
ALERGIA A LAS PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA





La ITO está siendo ampliamente estudiada como tratamiento para las alergias alimentarias IgE-mediadas. Si bien hay reportes de protocolos experimentales de ITO en pacientes alérgicos al maní o a la leche, que muestran un incremento en la dosis de alérgeno tolerada por los pacientes tratados en comparación con los que recibieron un placebo (Pajno et al. 2010; Martorelli et al. 2011; Varshney et al. 2011; Vickery et al. 2013), el mecanismo por el cual se logra esta desensibilización no se conoce completamente. Por esta razón es fundamental el empleo de modelos animales de alergia experimental para estudiar y optimizar este tipo de terapias correctivas.

En esta etapa del trabajo, buscamos restituir la tolerancia oral a las proteínas de leche de vaca, por administración oral de bajas dosis del alérgeno por vía ig (inmunoterapia oral), haciendo uso del modelo murino de alergia IgE-mediado a las proteínas de leche de vaca, previamente optimizado y caracterizado por nuestro grupo (Smaldini et al. 2012).

Dado que los mecanismos que median la inducción de tolerancia no han sido completamente dilucidados, pero se ha visto un incremento de células Treg en pacientes que generaron tolerancia en forma espontánea (Kroguslka et al. 2011), evaluaremos diferentes parámetros *in vivo* e *in vitro* para caracterizar los mecanismos subyacentes a la inducción y modulación de la alergia experimental, y estudiaremos el efecto de la transferencia adoptiva de células Treg generadas *in vivo* o *in vitro* a animales naïve que posteriormente sensibilizaremos.

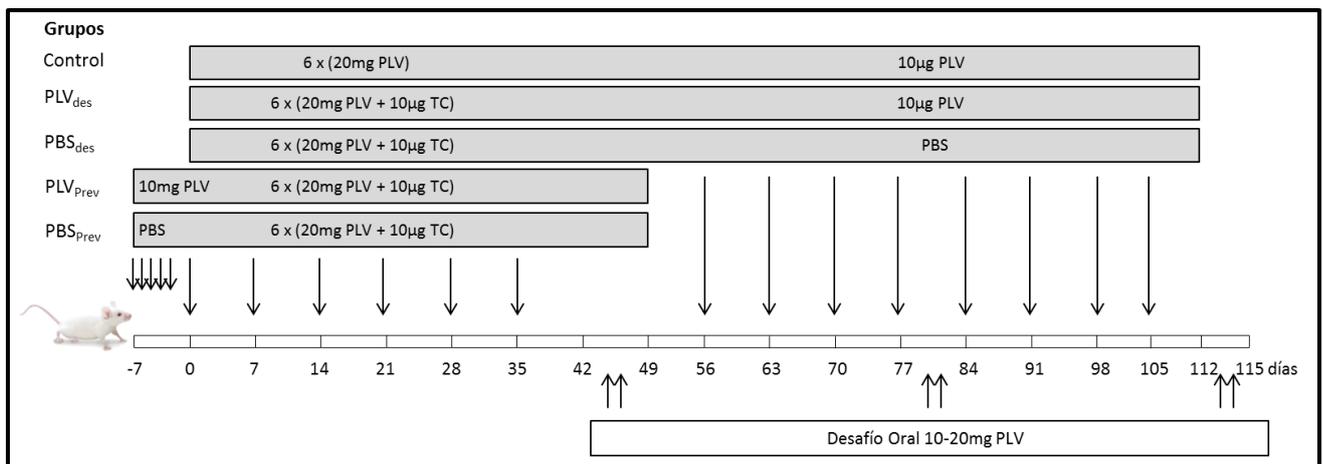
### **I.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ▣ Evaluar los mecanismos inmunológicos asociados a la inducción de tolerancia oral mediante la aplicación de inmunoterapias tolerogénicas, previo a la sensibilización de ratones BALB/c (inmunointervención preventiva).
- ▣ Evaluar los mecanismos inmunológicos en la restitución de la tolerancia oral a PLV en ratones previamente sensibilizados a PLV (inmunointervención desensibilizante).

## I.1.2 RESULTADOS

### I. 1.2.1 Inmunointervención preventiva y desensibilizante

Ratones BALB/c de 5-6 semanas de edad fueron sensibilizados por vía ig con PLV y TC como se describió. Dos grupos de ratones recibieron por vía ig diariamente, durante la semana previa a la sensibilización, PBS (PBS<sub>prev</sub>) o PLV (PLV<sub>prev</sub>); otros dos grupos recibieron por vía ig luego de la sensibilización, una vez por semana durante 8 semanas PBS (PBS<sub>des</sub>) o PLV (PLV<sub>des</sub>); un grupo control sólo recibió PLV por vía ig durante y luego del período de sensibilización (Control).



**Esquema 3. Protocolo de sensibilización a PLV y tratamiento por vía ig.** Los días 0, 7, 14, 21, 28 y 35 los diferentes lotes recibieron 20mg de PLV junto con 10µg de TC; el grupo control sólo recibió 20mg de PLV en esos días. Como tratamiento, los grupos PLV<sub>prev</sub> y PBS<sub>prev</sub> recibieron 5 dosis de 10mg de PLV o PBS respectivamente, la semana previa a la sensibilización; los grupos PLV<sub>des</sub> y PBS<sub>des</sub> recibieron 1 dosis por semana de 10µg de PLV o PBS respectivamente, durante 8 semanas posteriores a la sensibilización; y el lote control recibió 10µg de PLV 1 vez por semana durante 8 semanas. Todos los ratones fueron desafiados por vía ig con 10 o 20mg de PLV a distintos tiempos. El protocolo se realizó al menos dos veces.

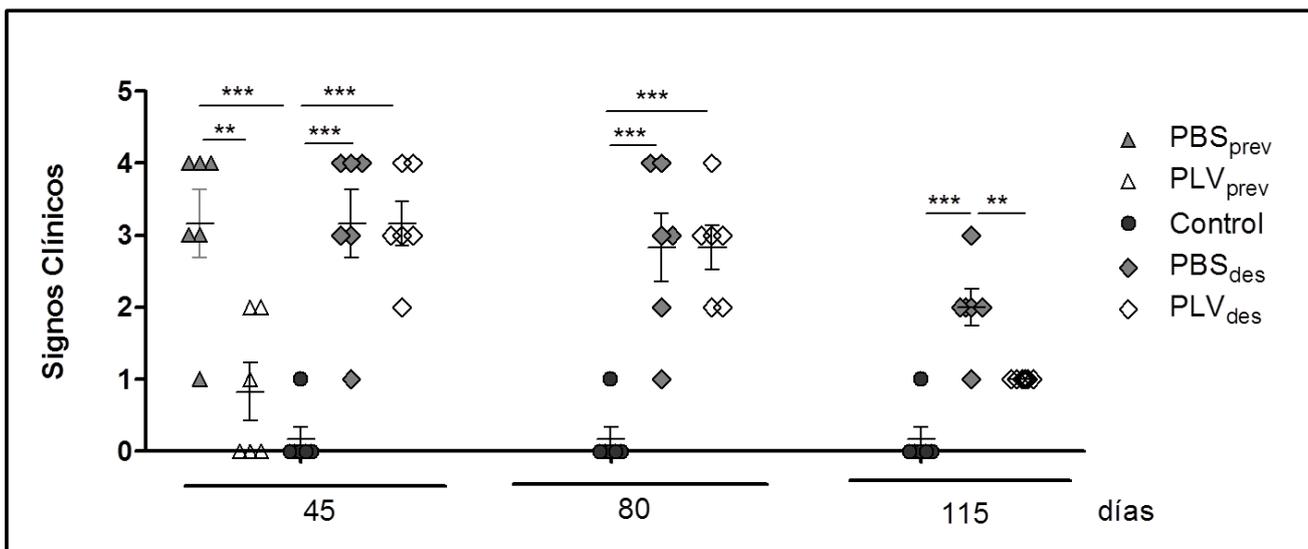
#### a. Evaluación *in vivo* de la respuesta inmune

##### Desafío oral con PLV y evaluación de los signos de hipersensibilidad

A los 10 días de la última dosis de PLV y TC (días 45 y 46), los ratones fueron desafiados en dos días consecutivos con 10 y 20mg de PLV por vía ig respectivamente. Los ratones que recibieron tratamiento luego de la sensibilización fueron desafiados, además, después de 4 (día 80) y 8 (día 115) semanas de tratamiento. Luego de realizar los desafíos orales con 10mg de PLV, se evaluaron los signos clínicos inducidos en los siguientes 60 minutos a la exposición. Según los signos clínicos observados por 2 investigadores diferentes a ciego, se estableció un puntaje a cada animal, teniendo en cuenta la intensidad de los mismos, como se muestra en la **Tabla 1**.

A diferencia de los grupos control y PLV<sub>prev</sub>, los grupos PBS<sub>prev</sub>, PBS<sub>des</sub> y PLV<sub>des</sub> mostraron manifestaciones clínicas luego del DO realizado los días 45 y 46; hinchazón alrededor de los ojos y

boca, dificultad respiratoria, pelo erizado y baja respuesta a estímulos, signos compatibles con un estado inflamatorio local y sistémico. En la **Figura 13** se graficaron los puntajes asignados por animal. Estos datos muestran que la administración de PLV previo a la sensibilización, previno la aparición de signos clínicos, sin observarse diferencias significativas entre los grupos control y PLV<sub>prev</sub>; por el contrario, los grupos PBS<sub>prev</sub>, PBS<sub>des</sub> y PLV<sub>des</sub>, sí mostraron diferencias significativas en los puntajes de signos clínicos respecto a los animales del lote control (día 45).



**Figura 13. Signos clínicos post-desafío oral.** Se muestran los puntajes asignados según los signos clínicos observados dentro de los 60 minutos posteriores al desafío oral con 20mg de PLV. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, ANOVA de doble entrada.

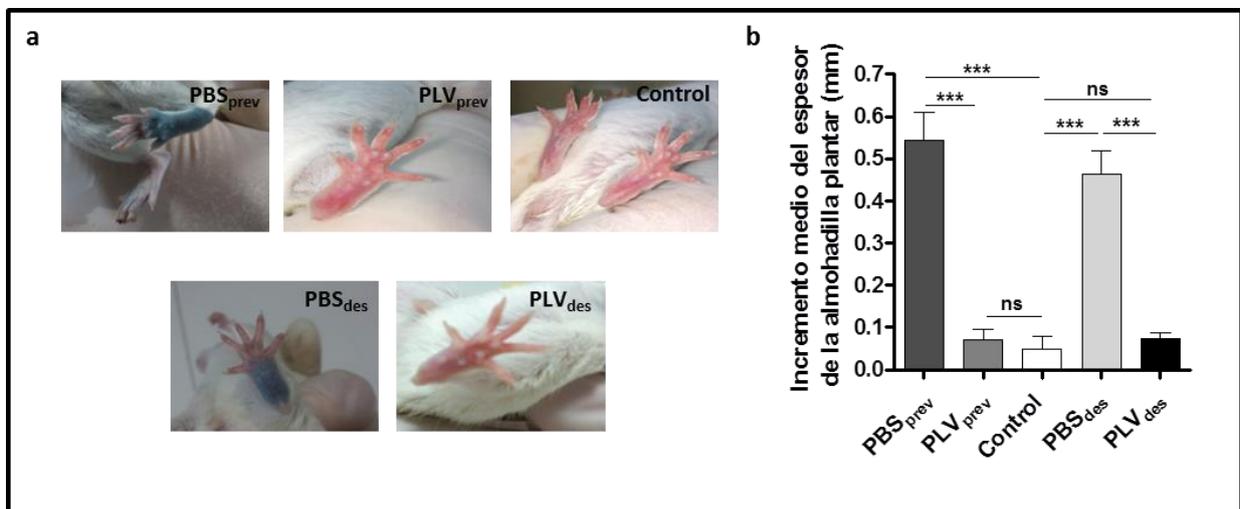
Luego de 4 semanas de tratamiento con 10µg de PLV o con PBS posteriores a la sensibilización (día 80), no se observó en los ratones de los grupos tratados un descenso de los signos clínicos; sin embargo, luego de 8 semanas de tratamiento (día 115), el grupo PLV<sub>des</sub> mostró un marcado descenso en las manifestaciones clínicas, mostrando un comportamiento similar al grupo control.

Los signos clínicos observados en los animales sensibilizados muestran una respuesta compatible con un estado alérgico luego de la sensibilización con el antígeno y TC. La administración de PLV previo a la sensibilización, previno la aparición de signos clínicos al sensibilizarlos con PLV y TC y luego de los DO con PLV.

Por otro lado, el tratamiento con bajas dosis de PLV (10µg), posterior a la sensibilización con PLV y TC, indujo un marcado descenso de las manifestaciones clínicas post-DO, lo cual podría asociarse al restablecimiento de la tolerancia hacia el antígeno dietario PLV.

### Prueba cutánea

Previo al sacrificio, se realizó la PC inoculando por vía sc 20 $\mu$ l de una solución 4mg/ml de PLV en SF estéril en la almohadilla plantar de una de las patas traseras, o de SF estéril como control negativo en la almohadilla plantar de la pata contra-lateral, y por vía iv 100 $\mu$ l de una solución 0,25% de Azul de Evans. Una PC positiva se caracteriza por la aparición de color azul en la almohadilla plantar en la que se inoculó PLV, a causa de la extravasación del colorante, inducida por un proceso inflamatorio desencadenado por la activación de mastocitos cutáneos por el Ag. Para cuantificar esta reacción, se midió el espesor de ambas almohadillas plantares y se graficó la diferencia entre las mismas.



**Figura 14. Prueba cutánea.** (a) Imágenes de la almohadilla plantar en la que se inyectó por vía sc la solución con el antígeno. (b) Gráfico de la diferencia de espesor entre las dos almohadillas plantares. \*\*\* $p < 0,001$ , ANOVA de entrada simple.

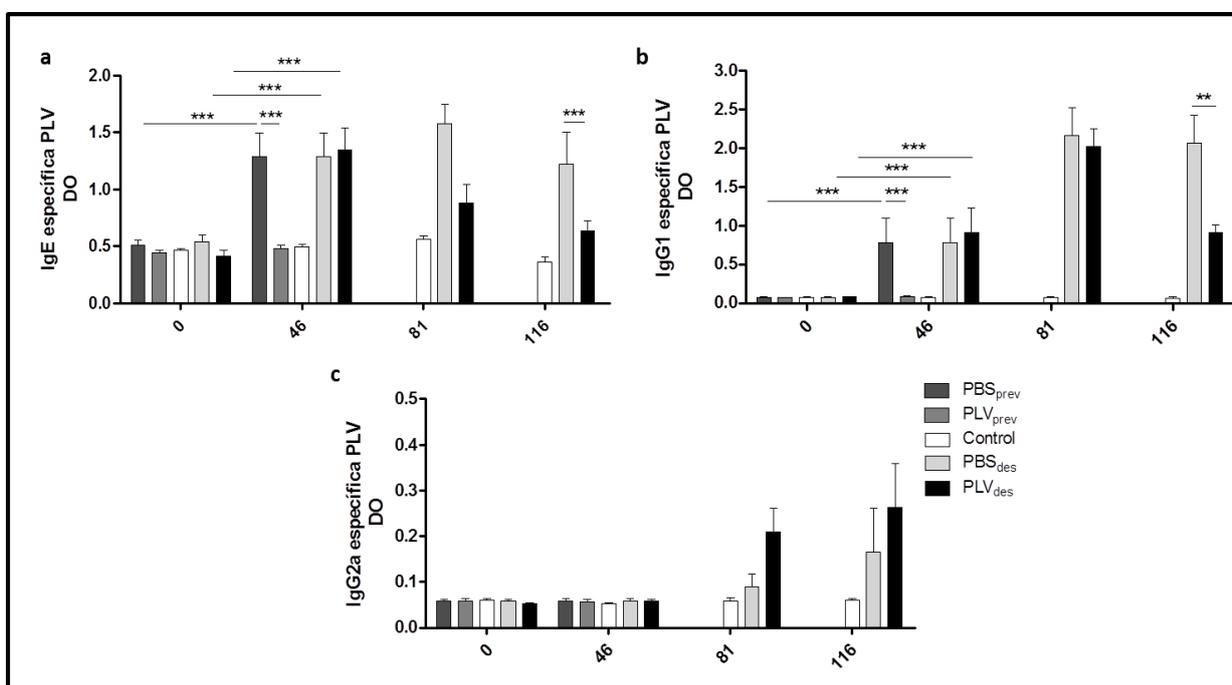
Como se muestra en la **Figura 14a**, los animales del grupo que recibieron PLV previo a la sensibilización (PLV<sub>prev</sub>), o luego de la sensibilización (PLV<sub>des</sub>), mostraron una PC negativa, al igual que los ratones del grupo control. Los ratones sensibilizados, que recibieron PBS como tratamiento previo o posterior (PBS<sub>prev</sub> y PBS<sub>des</sub> respectivamente), mostraron una PC positiva. Los resultados mostrados en la **Figura 14b** indican que los animales sensibilizados que recibieron PLV como tratamiento, al igual que los animales del lote control, tienen el mismo espesor en las dos patas traseras; sin embargo, los animales que fueron sensibilizados y tratados con PBS, se observó una diferencia significativa entre ambas patas. Se observó además que un 67% de los animales del lote PBS<sub>prev</sub> y un 84% de los animales del lote PBS<sub>des</sub>, mostraron manifestaciones clínicas, como rascado de nariz e hinchazón alrededor de los ojos, así como extravasación del colorante a esas zonas durante la PC.

Los resultados de los ensayos realizados *in vivo* demuestran que la respuesta inmune establecida tras la sensibilización es una respuesta sistémica, y que la administración de PLV, ya sea en forma previa o posterior a la sensibilización, revirtió dichas manifestaciones.

**b. Evaluación *in vitro* de la respuesta inmune**

**Determinación de anticuerpos séricos**

Con el fin de monitorear la producción de anticuerpos específicos de PLV, se tomaron muestras de sangre durante todo el protocolo experimental. Se evaluaron así los niveles séricos de IgE, IgG1 e IgG2a específicos en los días 0, 46, 81 y 116 (Figura 15).



**Figura 15. Determinación de anticuerpos séricos específicos de PLV por EAST o ELISA.** Niveles séricos de diferentes isotipos de anticuerpos específicos de PLV a diferentes tiempos (a) Anticuerpos IgE específicos (b) anticuerpos IgG1 específicos (c) anticuerpos IgG2a específicos. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, ANOVA de doble entrada.

En concordancia con los resultados observados *in vivo*, el tratamiento previo con PLV previno el aumento de isotipos específicos del perfil Th2 (IgE e IgG1), encontrándose al día 46 niveles equivalentes a los del grupo control. Los grupos de ratones sensibilizados (PBS<sub>prev</sub>, PBS<sub>des</sub> y PLV<sub>des</sub>) mostraron niveles de IgE e IgG1 específicos de PLV elevados el día 46 respecto al grupo control. El día 81, después del primer período de tratamiento, los niveles correspondientes a estos isotipos se mantuvieron elevados para los animales del grupo PLV<sub>des</sub>. Sin embargo al día 115, después del segundo período de tratamiento, se observó un descenso marcado de los niveles de IgE y de IgG1, lo que coincide con lo observado en la PC y en los signos clínicos luego del DO. Si bien a este tiempo se observó un incremento en los niveles de IgG2a específica (isotipo asociado a

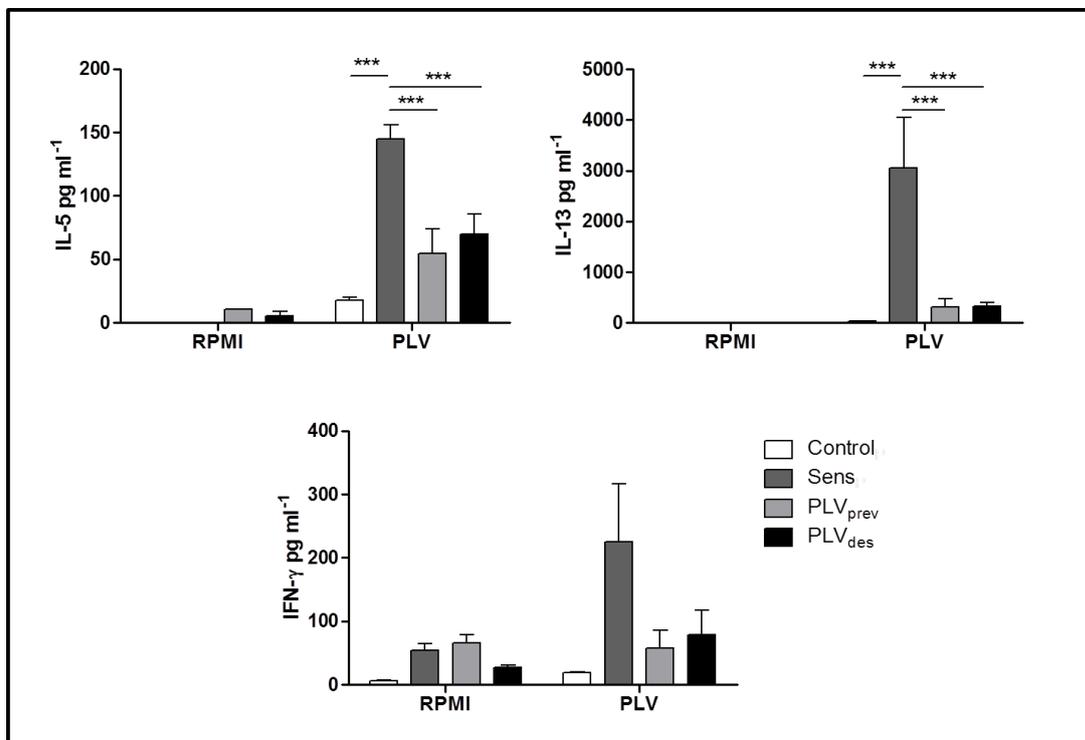
una respuesta inmune Th1) en el lote PLV<sub>des</sub>, los valores encontrados corresponden a niveles basales, probablemente sin significado biológico.

Por lo tanto, observamos que los isotipos de perfil Th2 aumentaron durante la sensibilización con PLV y TC, y que el tratamiento con PLV logró prevenir (PLV<sub>prev</sub>) y revertir (PLV<sub>des</sub>) la inducción de IgG1 e IgE.

### Evaluación de la respuesta inmune celular

Los ratones tratados fueron desafiados por vía oral con 20mg de PLV 24hs antes de ser sacrificados. Para evaluar la respuesta inmune celular a nivel sistémico se tomaron muestras de bazo y para analizar la respuesta celular a nivel local se aislaron células de LP de yeyuno. Para simplificar, y dada la similitud en la respuesta, unificamos los datos obtenidos de los grupos PBS<sub>prev</sub> y PBS<sub>des</sub> en un único grupo sensibilizado (Sens).

Las células aisladas de bazo fueron cultivadas en medio solo (RPMI) o con leche de vaca (PLV). Luego de 72hs de cultivo, los sobrenadantes fueron colectados y se cuantificó la concentración de citoquinas de perfil Th1 y Th2 por ELISA.



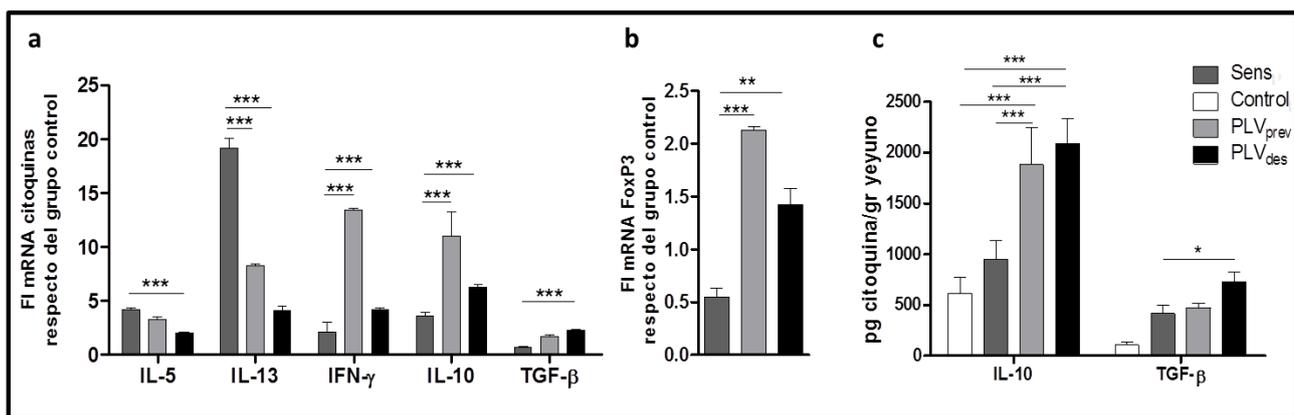
**Figura 16. Cuantificación de citoquinas en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos.** Evaluación de la concentración de citoquinas de perfil Th2 (IL-5 e IL-3) y Th1 (IFN-γ), en el sobrenadante de cultivo con medio (RPMI), o en presencia de PLV (PLV). \*\*\*p<0,001, ANOVA de doble entrada.

Como se muestra en la **Figura 16**, las células de bazo de ratones del grupo Sens, cultivadas en presencia de PLV, secretaron grandes cantidades de IL-5 e IL-13. Los esplenocitos de los

ratones de los dos grupos tratados con PLV, secretaron cantidades significativamente menores de citoquinas Th2 con respecto al grupo Sens. En cuanto a la producción de IFN- $\gamma$ , se observan valores basales en todos los grupos de animales. Esto resultados indican que la sensibilización alérgica genera la producción sistémica de citoquinas Th2; mientras que cuando estos animales fueron tratados (en forma previa o posterior a la sensibilización), se logró modular significativamente la producción de estas citoquinas.

Por otro lado, se evaluó la respuesta celular a nivel de la mucosa intestinal. Para ello se tomaron muestras de intestino delgado para la cuantificación de los transcritos correspondientes a citoquinas Th1, Th2 y regulatorias. Como puede observarse en la **Figura 17a**, en el grupo sensibilizado se produjo un marcado aumento de los niveles de mRNA de las citoquinas de perfil Th2. Dicho incremento fue modulado en los grupos que recibieron PLV como tratamiento (PLV<sub>prev</sub> y PLV<sub>des</sub>), observándose además en ambos grupos, un incremento en los transcritos de IFN- $\gamma$  e IL-10, y de TGF- $\beta$  sólo en el grupo PLV<sub>des</sub>. Además, en estos animales tratados, se encontró un incremento significativo de los niveles de mRNA correspondiente a FoxP3 en yeyuno (**Figura 17b**).

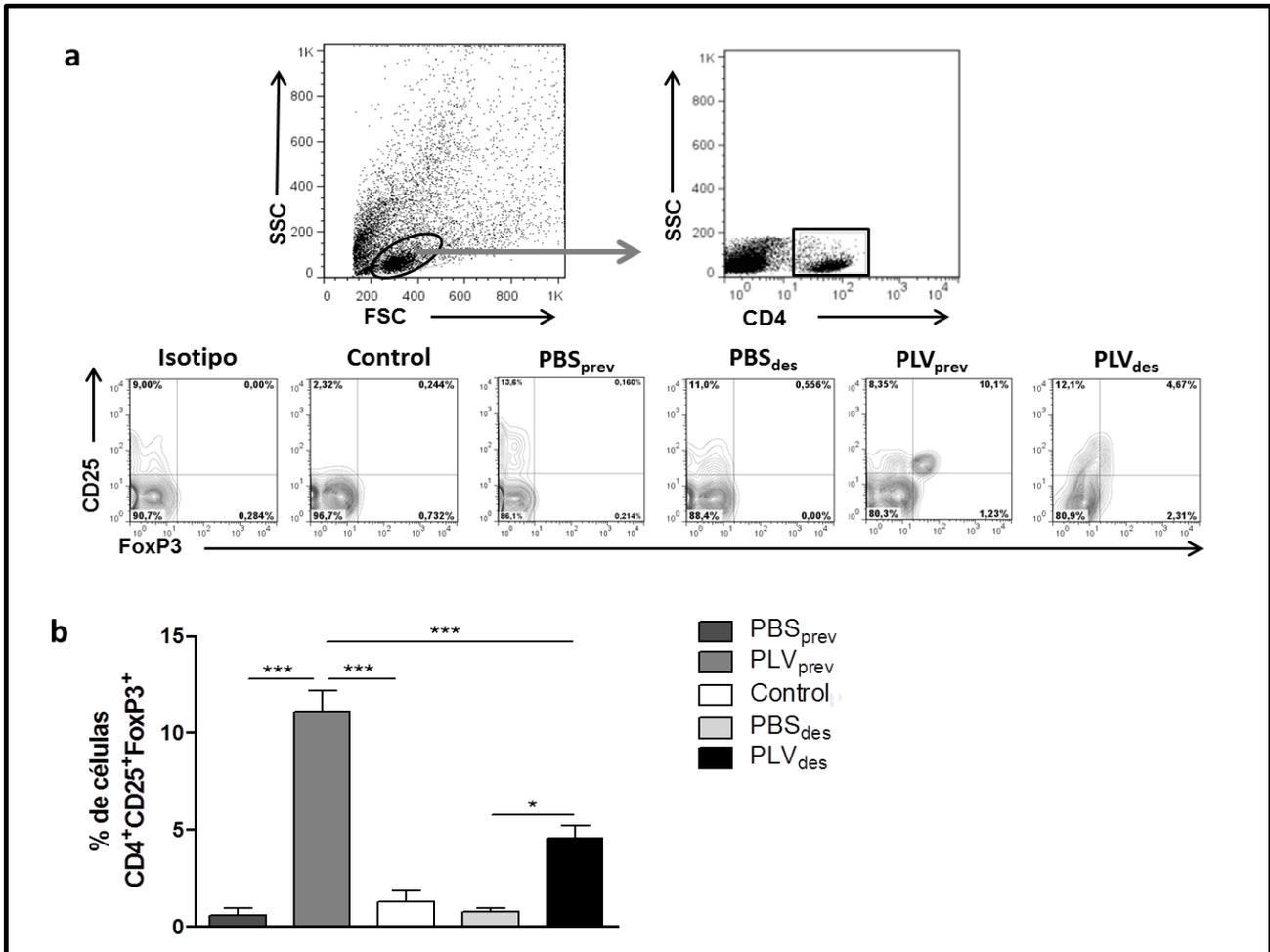
Al evaluar los niveles proteicos de las citoquinas regulatorias, encontramos que los ratones tratados con PLV mostraron un incremento significativo de IL-10, y que el grupo PLV<sub>des</sub> mostró, además, un aumento significativo en los niveles de TGF- $\beta$ , en forma similar a lo observado a nivel de mRNA (**Figura 17c**).



**Figura 17. Cuantificación de transcritos correspondientes a citoquinas y factores de transcripción en la mucosa intestinal. (a) y (b)** Se evaluaron por RT qPCR los niveles de mRNA de citoquinas Th1, Th2 y regulatorias. **(c)** se midió la concentración proteica de citoquinas regulatorias en yeyuno por ELISA. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 ANOVA de simple entrada **(b)** y de doble entrada **(a)** y **(c)**.

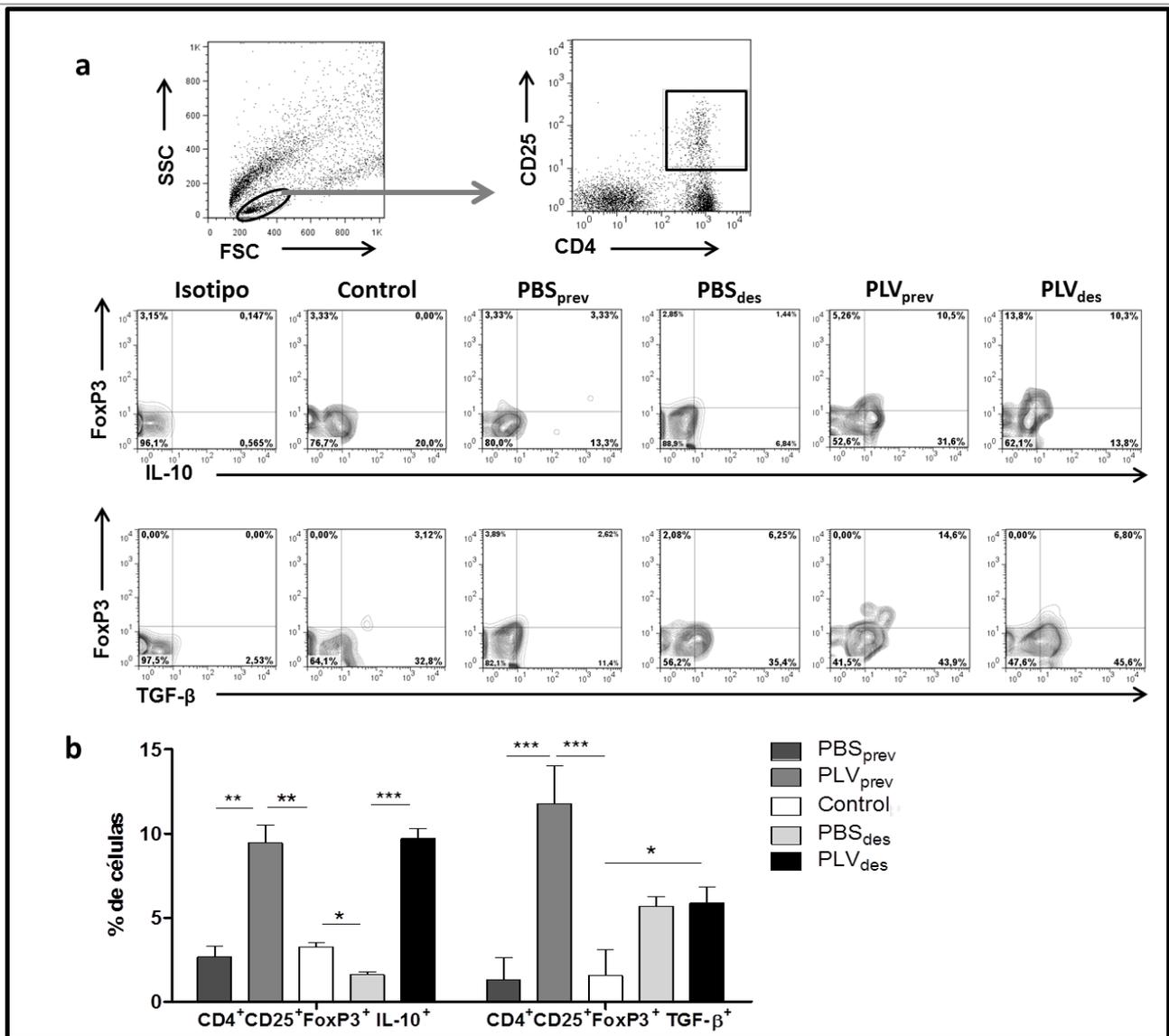
Por otro lado evaluamos por citometría de flujo el porcentaje de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> presentes en la mucosa intestinal. Para ello tomamos muestras de yeyuno y a partir de la suspensión celular de LP se seleccionó en la citometría de flujo la población correspondiente a linfocitos (según tamaño y granularidad); luego se seleccionó la población CD4<sup>+</sup>,

y sobre ésta se evaluó el porcentaje de células  $CD25^+FoxP3^+$ . Como se puede ver en la **Figuras 18a** y **18b**, se encontró un marcado incremento en la población celular  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ , en ratones que recibieron PLV como tratamiento ( $PLV_{prev}$  y  $PLV_{des}$ ), respecto a los grupos Control y sensibilizados ( $PBS_{prev}$  y  $PBS_{des}$ ) siendo el incremento mayor para el grupo  $PLV_{prev}$  que  $PLV_{des}$ .



**Figura 18. Evaluación de células Treg en LP por citometría de flujo.** Se evaluaron las poblaciones celulares presentes en LP, las imágenes son en representación de los diferentes lotes. (a) Se evaluó el porcentaje de linfocitos  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ . (b) Representación gráfica de los porcentajes de células Treg en lámina propia para cada grupo de ratones. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ . ANOVA de simple entrada.

Por otro lado, evaluamos los niveles de citoquinas regulatorias en esta población celular; para ello dentro de la población de linfocitos, seleccionamos las células  $CD4^+CD25^+$ , y en ellas evaluamos la expresión de FoxP3 e IL-10 o TGF- $\beta$ . Como se muestra en las **Figuras 19a** y **19b**, en los ratones del grupo  $PLV_{prev}$  se indujo un incremento de células  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  productoras de IL-10 y de células productoras de TGF- $\beta$  respecto del grupo control y  $PBS_{prev}$ . Por otro lado, en el grupo  $PLV_{des}$  encontramos un incremento significativo de la población de células  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  productoras de IL-10, aunque no así de las productoras de TGF- $\beta$ , con respecto al grupo control y  $PBS_{des}$ .



**Figura 19. Evaluación de la producción de citoquinas regulatorias por células Treg en LP por citometría de flujo.** Se evaluó la producción de citoquinas regulatorias por la población de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> presentes en LP, las imágenes son en representación de los diferentes lotes. (a) Se evaluó el porcentaje de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, productores de IL-10 o de TGF-β (b) Representación gráfica de los porcentajes de células Treg productoras de IL-10 o TGF-β en lámina propia para cada grupo de ratones. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001. ANOVA de doble entrada.

### 1.1.2.2 Transferencia adoptiva de células Treg

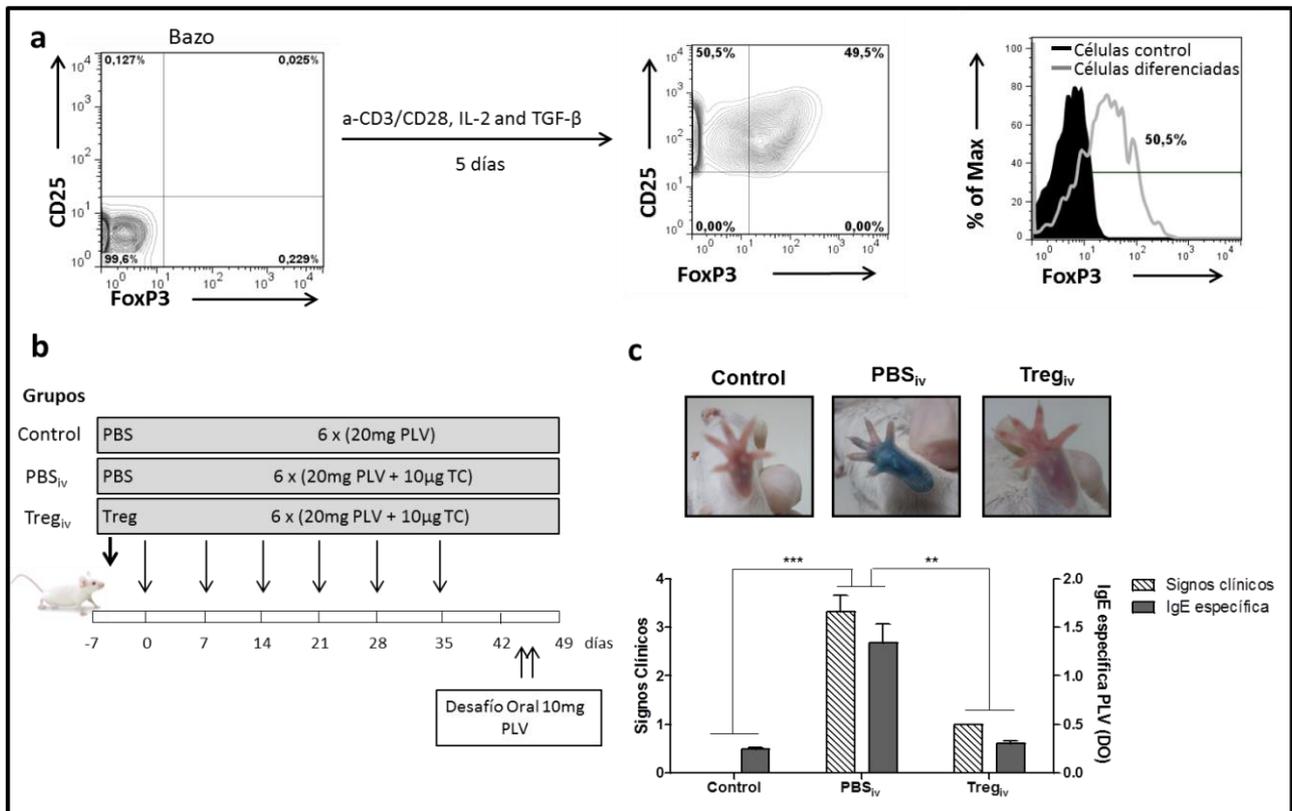
Finalmente, para confirmar que la modulación de la respuesta alérgica fue mediada en nuestro modelo de alergia alimentaria a través de la generación de células Treg, decidimos evaluar si la transferencia adoptiva de las mismas a ratones naïve los protegía del desarrollo de una respuesta Th2 e hipersensibilidad IgE-mediada.

Para este fin seguimos dos estrategias:

#### a. Transferencia adoptiva de células Treg generadas *in vitro*

Células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> aisladas de bazo de ratones naïve, fueron cultivadas en presencia de anti-CD3/anti-CD28, TGF-β e IL-2 durante 5 días. Como se muestra en la **Figura 20a**,

aproximadamente el 50% de dichas células se diferenciaron a  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  y en el sobrenadante de cultivo se midió la producción de IL-10. Estas células fueron transferidas, a razón de  $1 \times 10^6$  células por ratón, por vía iv a ratones naïve, los que posteriormente fueron sensibilizados con PLV y TC ( $Treg_{iv}$ ). Se incluyeron en el ensayo los siguiente controles, control positivo en el que se administró PBS por vía iv previo a la sensibilización ig con PLV y TC ( $PBS_{iv}$ ), y como control negativo se administró PBS por vía iv y posteriormente sólo se administró leche por vía ig (Control).



**Figura 20. Diferenciación de células Treg *in vitro* y transferencia celular a ratones receptores naïve.** (a) Células  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  aisladas de bazo fueron diferenciadas *in vitro* durante 5 días en presencia de a-CD3/CD28 (2.5  $\mu$ g/ml y 2  $\mu$ g/ml respectivamente), IL-2 (20 ng/ml) y TGF- $\beta$  (5 ng/ml) (b) Protocolo de transferencia de células diferenciadas y posterior sensibilización de los animales. (c) Imágenes representativas de las pruebas cutáneas realizadas sobre ratones de los diferentes lotes, y gráficos de signos clínicos post-DO oral con PLV y de los niveles de IgE específica a PLV. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . ANOVA de doble entrada.

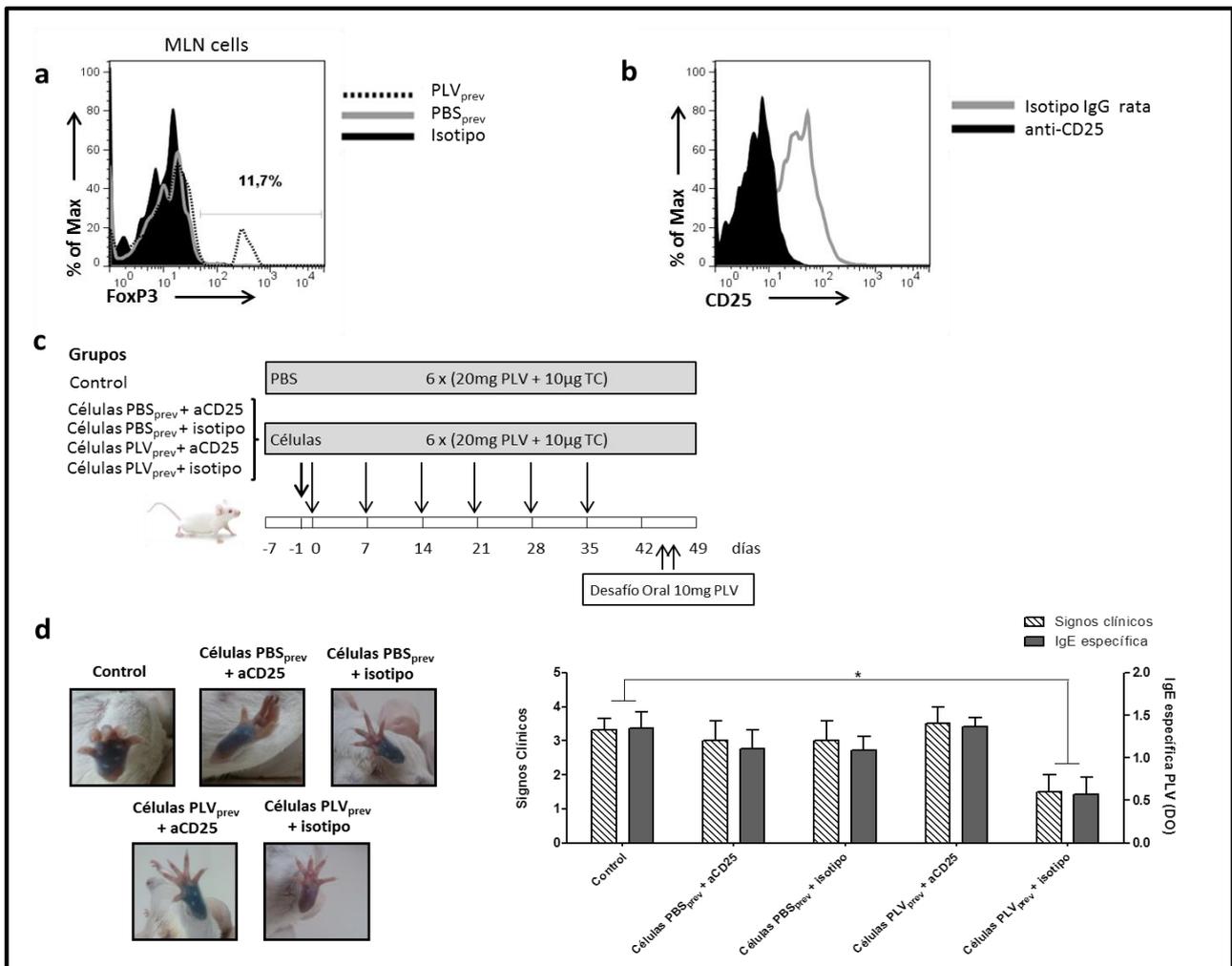
Como puede observarse, la diferenciación *in vitro* de las células de bazo, indujo un 50% de linfocitos  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  (Figura 20a). Al ser transferidas estas células a animales naïve y luego éstos ser sensibilizados, observamos que se suprimió la inducción de signos clínicos inmediatamente después del DO con PLV, así como del incremento de los niveles séricos de IgE específica de PLV. Además se negativizó la PC (Figura 20c).

Como puede observarse, los resultados de los animales que recibieron células Treg por vía iv fueron similares a los observados en los animales del lote Control; por otro lado, los animales

del lote PBS<sub>iv</sub> mostraron signos clínicos luego del desafío oral con PLV, niveles de IgE específica a PLV elevados, y una PC positiva (**Figura 20c**), similar a los animales sensibilizados.

**b. Transferencia adoptiva de células Treg inducidas *in vivo***

Finalmente se aislaron células de MLN de ratones PLV<sub>prev</sub> y PBS<sub>prev</sub>, y se analizó por citometría de flujo los porcentajes de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Como se muestra en la **Figura 21a**, se obtuvo una mayor frecuencia de células Treg en ratones del lote PLV<sub>prev</sub>, en comparación con los ratones del lote PBS<sub>prev</sub>. Posteriormente las células aisladas fueron incubadas con a-CD25 o el isotipo control, para depletar las células CD25<sup>+</sup> (células T efectoras y Treg) (**Figura 21b**). Se inocularon por vía iv 4x10<sup>6</sup> células por ratón, o PBS como control adicional, el día -1 en ratones naïve, los cuales fueron posteriormente sensibilizados, quedando así 5 grupos diferentes como se



muestra en la **Figura 21c**.

**Figura 21. Transferencia adoptiva de células Treg generadas *in vivo*.** (a) Frecuencia de células FoxP3<sup>+</sup> en células aisladas de MLN de ratones PBS<sub>prev</sub> o PLV<sub>prev</sub>. (b) Expresión de CD25 luego de incubar las células con a-CD25 o el isotipo correspondiente. (c) Protocolo de transferencia de células a animales naïve. (d) Resultados correspondientes a la PC, los signos clínicos y los niveles séricos de IgE específica a PLV. \*p<0,05, ANOVA de doble entrada.

Los ratones que recibieron PBS, células de ratones PBS<sub>prev</sub> (incubadas con  $\alpha$ -CD25 o isotipo) o células de ratones PLV<sub>prev</sub> incubadas con  $\alpha$ -CD25, mostraron una PC positiva luego de la sensibilización, signos clínicos de hipersensibilidad luego del DO, y niveles elevados de IgE específica de PLV. Sin embargo, los ratones que recibieron células aisladas de ratones PLV<sub>prev</sub>, incubadas con el isotipo correspondiente, presentaron PC negativa y signos clínicos e IgE significativamente más bajos que los demás grupos (**Figura 21d**).

Estos resultados indican que la transferencia de células Treg logró inhibir la inducción de la sensibilización alérgica, con la consiguiente supresión en la producción de IgE. Esto se traduce en la no inducción de signos clínicos luego del DO con PLV y en la negativización de la PC o no activación de mastocitos tisulares.

### I.1.3 DISCUSIÓN

En esta etapa del trabajo de tesis, realizamos dos tipos de inmunointervención en nuestro modelo de AA IgE-mediada. El primer método consistió en la administración ig de 10mg de PLV previo a la sensibilización ig con PLV y TC (PLV<sub>prev</sub>), o de PBS como control positivo (PBS<sub>prev</sub>). Como pudimos ver, el tratamiento preventivo con PLV logró evitar el desarrollo de signos clínicos inmediatamente después de la exposición oral a PLV luego del protocolo de sensibilización, así como prevenir el incremento de IgE específica de PLV y la consecuente activación de mastocitos tisulares, evidenciado por una PC negativa. Estos animales mostraron además niveles reducidos de IL-5 e IL-13 en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos estimulados con PLV, así como un incremento en LP de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> productoras de IL-10 o de TGF-β, sugiriendo que estas células serían responsables de la supresión de la respuesta inmune.

El segundo método de inmunointervención consistió en la desensibilización de los animales alérgicos, por administración oral de bajas dosis (10μg) de PLV una vez por semana durante 8 semanas, o PBS como control. A través de este tratamiento logramos, reducir los signos clínicos luego del DO con PLV, negativizar la PC y disminuir los niveles séricos de IgE específica de PLV. También en este caso logramos reducir los niveles de IL-5 e IL-13 producidos por esplenocitos estimulados con PLV, e incrementar en LP los porcentajes de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> productoras de IL-10. Además, para alcanzar en los ratones tratadas manifestaciones clínicas comparables a lo observado en los grupos sensibilizados desafiados con 5mg de PLV, debimos incrementar la dosis de desafío 8 veces (40mg de PLV). Dado que los animales tratados con PLV luego de la sensibilización toleraron DO con 10mg de PLV 5 meses después de discontinuar el tratamiento, podemos sostener que la inducción de tolerancia se logró por supresión activa y que no se trata de una inmunoterapia de desensibilización. Sin embargo son necesarios estudios adicionales para confirmar este hallazgo y determinar el tiempo máximo que el tratamiento logra mantener la tolerancia.

En trabajos previos se han evidenciado defectos en las células Treg de pacientes atópicos (Nguyen et al. 2009; Krogulska et al. 2011), y que en ciertos casos en que los pacientes adquirieron tolerancia en forma natural, se produjo un incremento en la expresión génica de Foxp3, IL-10 y TGF-β en células aisladas de sangre periférica (Krogulska et al. 2011); es por esto que quisimos verificar si la modulación de nuestro modelo de alergia estaba dado por un incremento de estas células. Para ello transferimos células Treg generadas *in vitro* o *in vivo*, y posteriormente

sensibilizamos a los animales administrando por vía ig PLV y TC. Como mostramos anteriormente, los ratones que recibieron por vía iv, previo a la sensibilización, células Treg generadas *in vitro* a partir de células aisladas de bazo de ratones naïve, o células Treg generadas *in vivo*, aisladas de MLN de ratones pre-tratados con leche y posteriormente sensibilizados, no desarrollaron alergia luego de la sensibilización; sin embargo, los ratones que recibieron por vía iv PBS, células aisladas de animales pre-tratados con PLV incubadas con  $\alpha$ -CD25, o células aisladas de ratones pre-tratados con PBS, y que fueron posteriormente sensibilizados a PLV, mostraron signos clínicos luego del DO con PLV, PC positiva, y niveles elevados de IgE específica de PLV.

Así, podemos asegurar, que en nuestro modelo de ITO logramos inducir células Treg  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  productoras de IL-10 en LP, logrando controlar la respuesta Th2 y disminuyendo así los niveles de IL-13 e IL-5, así como los niveles de IgE, lo cual se asoció a una disminución de los signos clínicos post-DO y a la negativización de la PC. Si bien en las dos IT estudiadas logramos reducir significativamente la inducción de signos clínicos luego de los DO, en todos los animales tratados se observan síntomas correspondientes a un score clínico de 1 (rascado de nariz).



# CAPÍTULO 2

INDUCCIÓN DE TOLERANCIA MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN  
SUBLINGUAL DE OMP16 JUNTO A PLV PARA MODULAR LA  
ALERGIA ALIMENTARIA EXPERIMENTAL





La inmunoterapia sublingual constituye una variante altamente promisorio de las IT como tratamiento correctivo de las AA. La principal ventaja es que requiere bajas dosis de alérgeno para inducir tolerancia, y esto reduce marcadamente los efectos adversos en comparación con la ITO. Si bien hay numerosos ensayos clínicos realizados en humanos, se desconoce el mecanismo involucrado en el restablecimiento de la tolerancia, y hasta el momento se ha demostrado que resulta menos eficiente que la ITO.

Sobre la base de lo que postula la Hipótesis de la Higiene, muchos adyuvantes están siendo estudiados en pacientes alérgicos en terapias que reviertan el defecto inmunológico. El empleo de agonistas de TLR capaces de inducir una inmunidad Th1-dependiente ha permitido revertir los mecanismos Th2-dependientes que gobiernan las alergias IgE-mediadas (Huang et al. 2008; Ibáñez et al. 2013; Smaldini et al. 2014). Sobre la base de estos hallazgos planteamos que la administración mucosal de un adyuvante pro-Th1, como Omp16 (Pasquevich et al. 2010), sería capaz de desviar la respuesta alérgica Th2, lo cual sentaría las bases experimentales para el desarrollo de una inmunointervención basada en inmunomodulación.

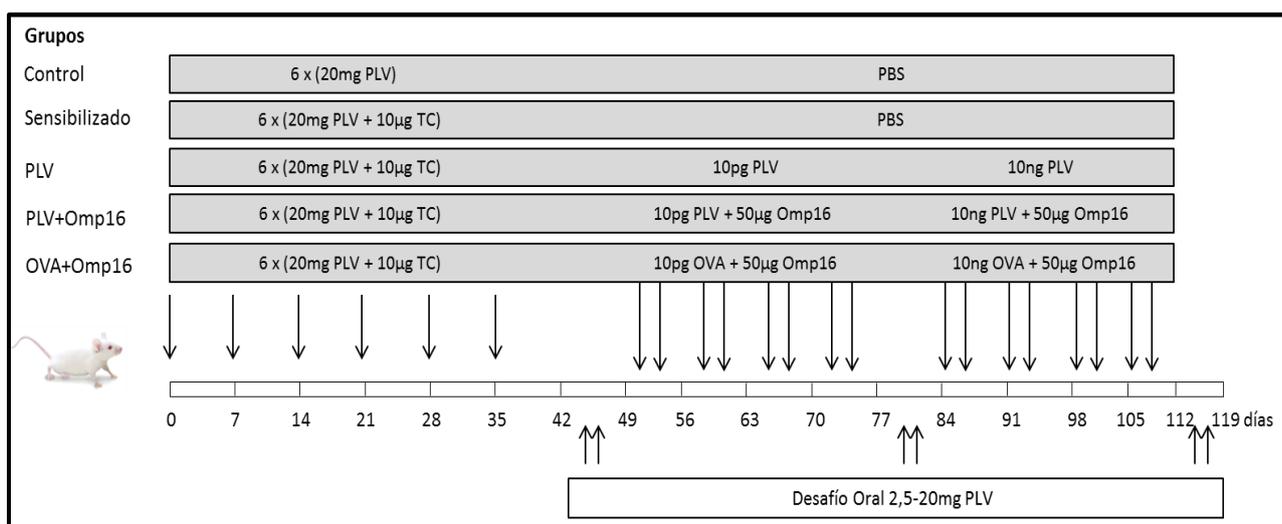
Por lo tanto en este capítulo proponemos como hipótesis de trabajo el re-direccionamiento de la respuesta inmune específica Th2-mediada contra antígenos dietarios inducida en animales sensibilizados, mediante la administración de adyuvantes microbianos por la vía sl en combinación con el antígeno de interés (PLV), generando una respuesta inmunomodulatoria Th1 que suprima la reacción alérgica, y utilizando dosis del alérgeno muy bajas, de manera de reducir los riesgos de efectos adversos durante el tratamiento.

### **I.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ▣ Reestablecer la tolerancia a PLV en ratones previamente sensibilizados administrando PLV en combinación con Omp16 por vía sl.
- ▣ Estudiar los mecanismos inmunológicos asociados al restablecimiento de la tolerancia.

## I.2.2 RESULTADOS

En el **Esquema 4** se muestra el protocolo de sensibilización (similar al mostrado en el capítulo 1), y los tratamientos aplicados. Ratones BALB/c de 6 semanas de edad fueron sensibilizados por vía ig con PLV+TC una vez por semana durante 6 semanas consecutivas; 30 minutos antes de cada administración de PLV+TC se administró buffer bicarbonato a fin de aumentar el pH estomacal. Diez días después de la última dosis de sensibilización se realizaron dos DO con diferentes cantidades de PLV, y luego se procedió a iniciar el tratamiento. Se realizaron 2 administraciones semanales por vía sl durante 8 semanas, de 4µl de una solución en PBS conteniendo las proteínas de interés o sólo PBS como control. Los tratamientos fueron realizados con PLV (PLV), PLV junto con Omp16 (PLV+Omp16), OVA con Omp16 como control de especificidad del tratamiento (OVA+Omp16), y sólo PBS (Sensibilizado). El grupo Control recibió sólo PLV por vía ig durante el período de sensibilización, y PBS sublingual durante el período de tratamiento. En el esquema se indican las cantidades de proteínas y adyuvantes administrados. Cabe destacar que este tratamiento se optimizó para emplear  $2 \times 10^6$  veces menos Ag con respecto a la sensibilización o al DO (10pg vs 20mg) para minimizar la aparición de reacciones adversas durante el tratamiento. Es importante mencionar que en el segundo round de tratamiento se administró 1000 veces más PLV (10ng) que en el primer ciclo. Este incremento en la dosis de Ag empleado es similar al que se emplea en los ensayos clínicos en pacientes.

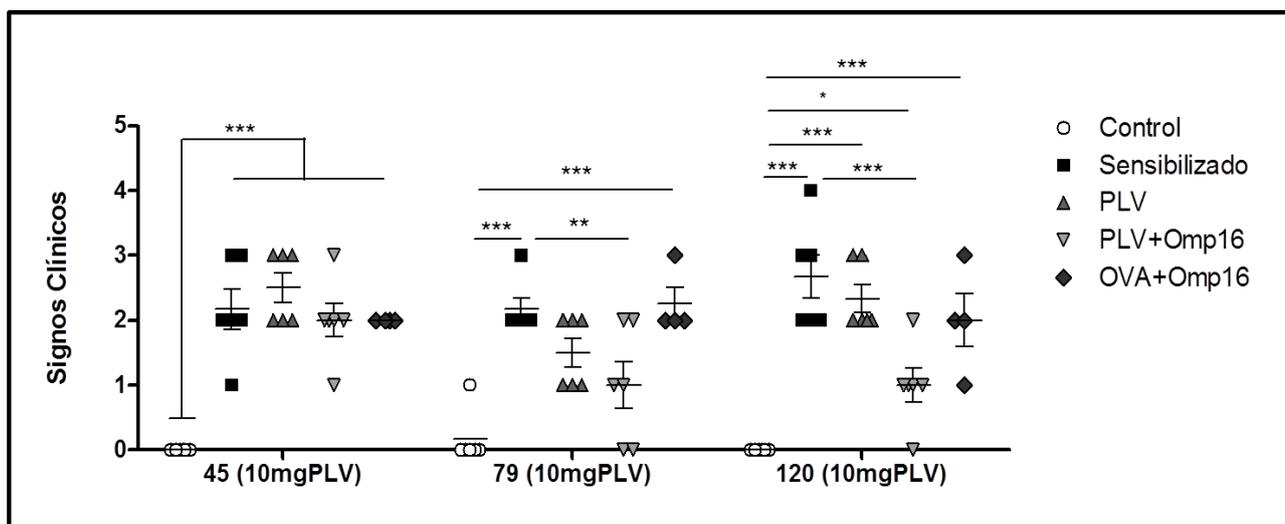


**Esquema 4. Protocolo de sensibilización a PLV y tratamiento por vía sl.** Los días 0, 7, 14, 21, 28 y 35 los diferentes ratones recibieron 20mg de PLV junto con 10µg de TC. El grupo control sólo recibió 20mg de PLV. Los grupos PLV, PLV+Omp16, OVA+Omp16 recibieron 8 dosis (2 por semana durante 4 semanas) de 10pg de PLV, 10pg de PLV con 50µg de Omp16 o 10pg de OVA con 50µg de Omp16 respectivamente, y luego 8 dosis más de 10ng de PLV, 10ng de PLV con 50µg de Omp16 o 10ng de OVA con 50µg de Omp16 respectivamente. El grupo control y el grupo sensibilizado sólo recibieron PBS como tratamiento. Todos los ratones fueron desafiados por vía ig con 5 a 20mg de PLV a distintos tiempos. El protocolo se realizó dos veces.

**Evaluación *in vivo* de la respuesta inmune**

**Desafío oral con PLV**

Los ratones fueron desafiados luego de la sensibilización con 5, 10 ó 20mg de PLV, y se evaluaron los signos clínicos dentro de los 60 minutos posteriores al DO. Como se muestra en la **Figura 22**, luego del período de sensibilización (día 45), todos los lotes que recibieron PLV junto con TC mostraron signos clínicos en forma homogénea (score 2), y significativamente mayores a lo observado en el lote control, el cual no mostró signos clínicos de hipersensibilidad. Luego del primer período de tratamiento, los ratones fueron desafiados nuevamente con 5mg y 10mg de PLV a fin de evaluar diferencias en la inducción de signos clínicos. Como se puede observar, en esta primera etapa, se evidenciaron diferencias significativas entre el grupo sensibilizado y el grupo PLV+Omp16 en la inducción de signos clínicos luego del DO. No se observaron diferencias con el grupo de control de especificidad que recibió OVA+Omp16, ni con el lote que sólo recibió PLV como tratamiento. Finalmente, luego del segundo período de tratamiento, a los 120 días, se encontró una disminución significativa de los signos clínicos en los animales que recibieron PLV+Omp16 como tratamiento, respecto al lote Sensibilizado, aunque se siguieron observando signos clínicos post-DO leves. Los animales del lote PLV, si bien mostraron una leve disminución en los signos clínicos respecto al lote sensibilizado, las diferencias no fueron significativas; los animales del lote OVA+Omp16, tampoco mostraron diferencias significativas respecto lote Sensibilizado. Algo similar se observó al realizarse el DO con 5mg de PLV, sólo que los scores clínicos alcanzados fueron menores en todos los lotes.

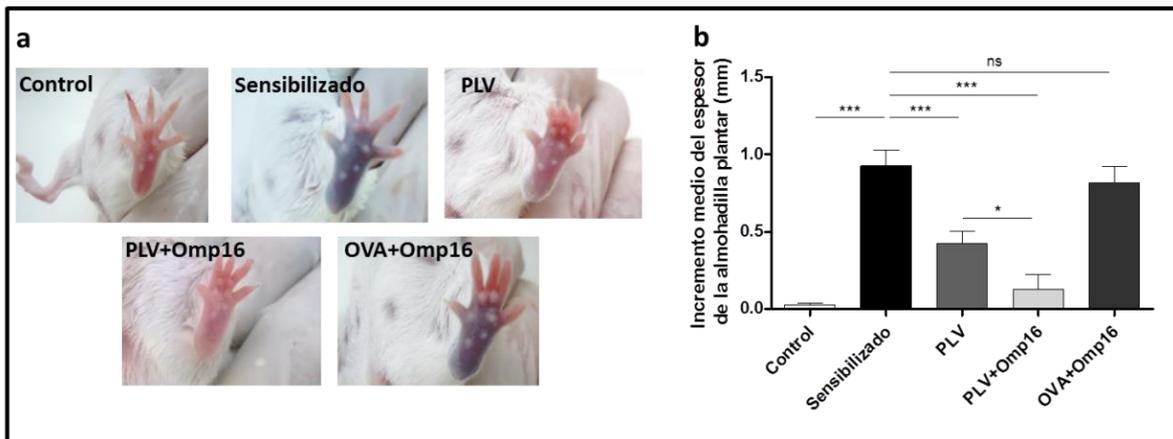


**Figura 22. Signos clínicos post-desafío oral.** Se muestran los puntajes asignados según los signos clínicos observados dentro de los 60 minutos posteriores al DO con 10mg de PLV. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , ANOVA de doble entrada.

Los signos clínicos observados son compatibles con una respuesta de hipersensibilidad inmediata a nivel sistémico, (rascado de nariz, hinchazón de hocico y conjuntiva, disminución de la respuesta a estímulos, pelo erizado, etc.). Como se pudo ver, el tratamiento con PLV+Omp16 redujo los signos clínicos observados, mientras que no observamos lo mismo al tratar los ratones sólo con PLV. Estos resultados reflejan lo que ocurre en pacientes que son tratados con el alérgeno y desarrollan reacciones adversas.

### Prueba cutánea

Previo al sacrificio y luego del DO se realizó la PC, administrando por vía sc en la almohadilla plantar 20µl de una solución de 4mg/ml de PLV en SF estéril, o de SF estéril como control negativo, y 100µl de una solución 0,25% de Azul de Evans en PBS estéril por vía iv; la aparición de color azul en la almohadilla plantar a los minutos de la inoculación del Ag se considera una PC positiva. Al mismo tiempo y para cuantificar la reacción se midió el espesor de ambas almohadillas plantares y se graficó la diferencia entre las mismas.



**Figura 23. Prueba cutánea. (a)** Imágenes de la almohadilla plantar en la que se inyectó por vía sc la solución con el antígeno. **(b)** Gráfico de la diferencia de espesor entre las dos almohadillas plantares. \*p<0,05, \*\*\*p<0,001. ANOVA de simple entrada.

Como se puede observar en la **Figura 23a** los ratones que recibieron PLV+Omp16 por vía sc, mostraron PC negativa, mientras que los que recibieron PLV mostraron una PC positiva leve; en cuanto a los animales que recibieron OVA+Omp16 mostraron una PC positiva similar a la del grupo Sensibilizado.

La cuantificación de la reacción inflamatoria empleando un calibre digital, permitió comparar el espesor de las almohadillas plantares y calcular la diferencia entre la almohadilla en la que se inyectó PLV y en la que se inyectó SF estéril. Los ratones tratados tanto con PLV como con PLV+Omp16 mostraron una disminución significativa del espesor respecto de los animales del grupo sensibilizado, siendo en los animales del lote PLV+Omp16 comparable con el lote control

(Figura 23b). Estos valores se correlacionaron con la extravasación del colorante Azul de Evans. Algunos animales que mostraron una PC positiva, también presentaron signos clínicos y extravasación del colorante a hocico, conjuntiva y orejas, lo cual se asocia a una respuesta inmune sistémica. Los animales que fueron sensibilizados con PLV+TC y luego tratados con OVA+Omp16, no negativizaron la PC, ni mostraron diferencias significativas con los ratones sensibilizados.

Los ensayos realizados *in vivo* mostraron una disminución de la respuesta alérgica en los animales que recibieron como tratamiento el específico PLV+Omp16, respecto de aquellos animales que recibieron PBS como tratamiento, u OVA+Omp16, lo que muestra que la inmunoterapia establecida es alérgeno-específica y que permite disminuir la sensibilización de las células a nivel local (mucosa intestinal) y sistémico (mastocitos cutáneos); en cuanto a los animales del lote PLV, si bien se observaron signos clínicos post-DO más leves respecto al lote Sensibilizados, las diferencias no fueron significativas, y aunque la PC mostró una inflamación más leve que el lote Sensibilizado, no logró negativizarse completamente como sí ocurrió en los animales del lote PLV+Omp16. Estos resultados indican *a priori* que la administración de PLV junto con Omp16 con el esquema aplicado permite controlar y revertir la inducción de reacciones alérgicas. De esta forma, Omp16 estaría funcionando como un adyuvante mucosal, optimizando el tratamiento sublingual antígeno-específico.

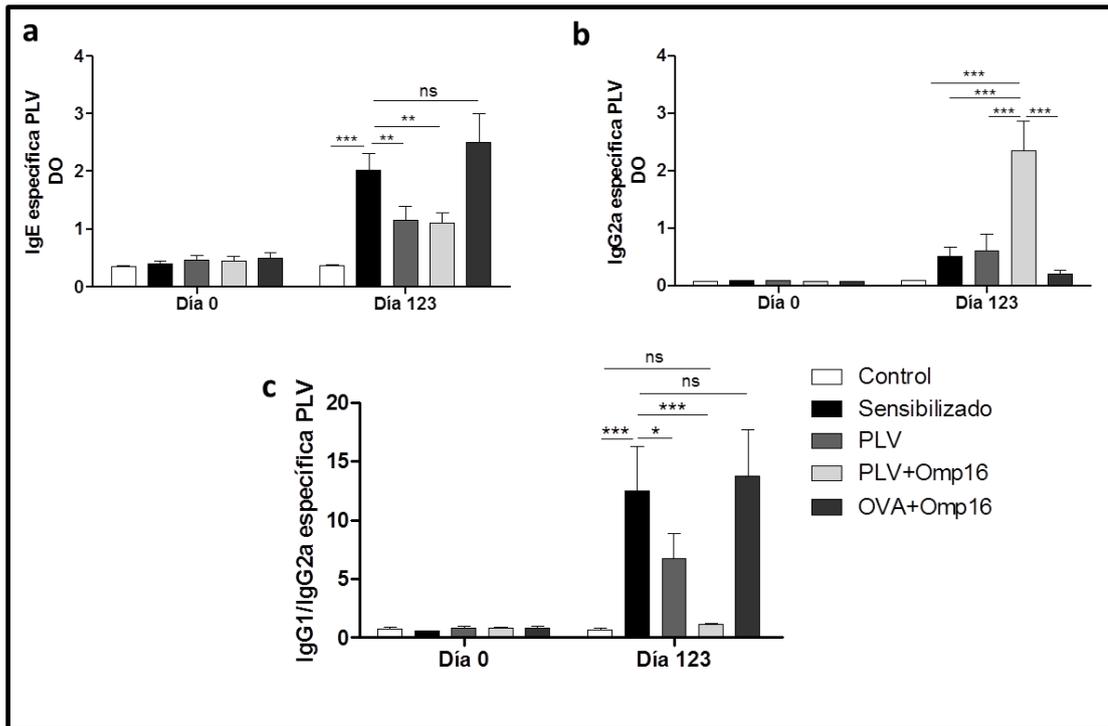
### Evaluación *in vitro* de la respuesta inmune

#### **Determinación de anticuerpos séricos**

Se determinaron a diferentes tiempos los niveles de anticuerpos séricos específicos de PLV, de diferentes isotipos, para evaluar la respuesta inmune humoral. En la **Figura 24**, se grafican los resultados correspondientes a los niveles de IgE, IgG2a (isotipo Th1) específicos y la relación IgG1/IgG2a.

En la **Figura 24a** vemos que los niveles séricos de IgE específica de PLV aumentan en forma significativa el día 123 en los lotes Sensibilizado y OVA+Omp16. Los animales que fueron tratados con PLV o PLV+Omp16, mostraron valores de IgG2a significativamente menores que los ratones sensibilizados. Además encontramos en los animales tratados un aumento de los niveles de IgG2a específica de PLV, lo cual indica una desviación específica de la respuesta inmune hacia un perfil Th1, que se ve reflejado en un descenso significativo la relación IgG1/IgG2a en el lote PLV+Omp16 respecto de los lotes Sensibilizado, PLV u OVA+Omp16; incluso es comparable a los valores del lote Control. El tratamiento con PLV no indujo la secreción de IgG2a.

Por lo tanto podemos concluir que la sensibilización con PLV y TC, indujo un aumento de los niveles de IgE específica de PLV y que el tratamiento con PLV o PLV+Omp16 revierte este incremento. Además en el último caso se observa una desviación de la respuesta inmune específica hacia un perfil Th1 lo que refleja que Omp16 estaría induciendo una inmunomodulación específica, ya que dicha desviación no se observa en el lote de animales tratados con OVA+Omp16.



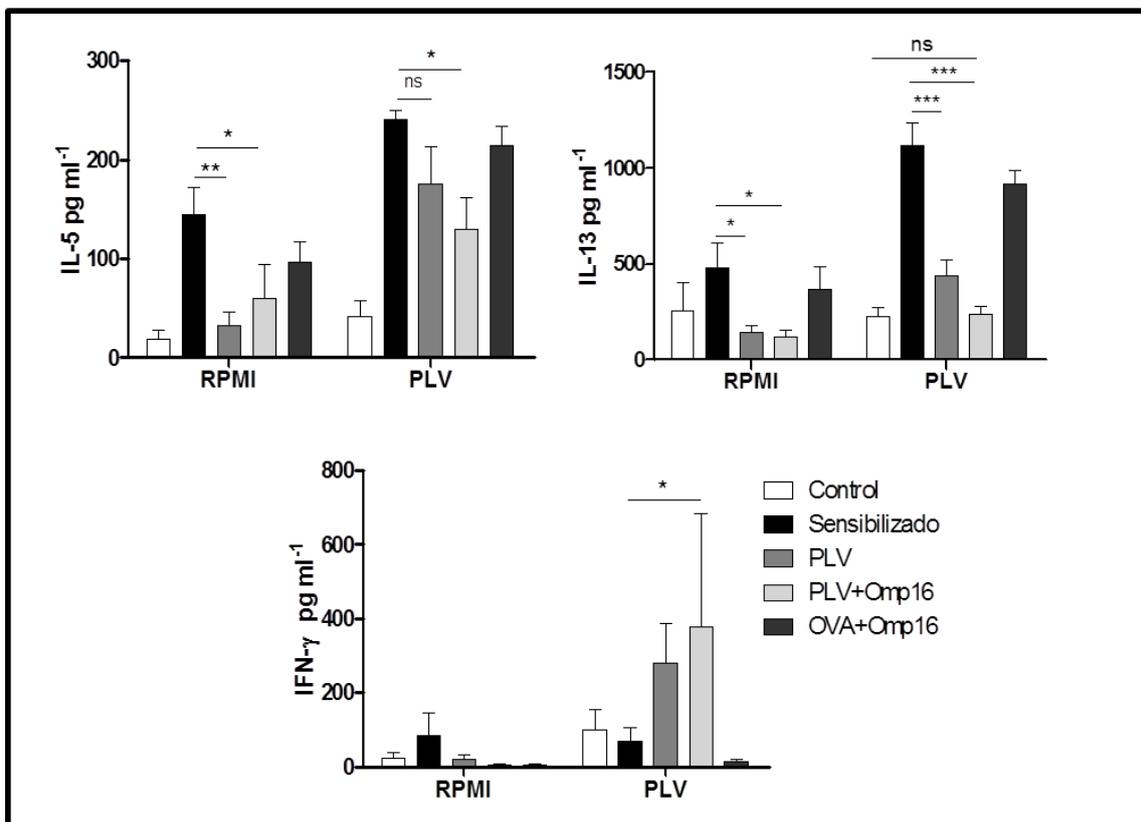
**Figura 24. Determinación de anticuerpos séricos específicos de PLV por EAST o ELISA.** Niveles séricos de diferentes isotipos de anticuerpos específicos a PLV a diferentes tiempos **(a)** Anticuerpos IgE específicos a PLV, **(b)** anticuerpos IgG2a específicos a PLV y **(c)** relación entre los niveles de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos a PLV. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , ANOVA de doble entrada.

### Evaluación de la respuesta inmune celular

Luego de 24hs del último DO, los animales fueron sacrificados para tomar muestras de bazo, LP de yeyuno y SLN, con el fin de analizar la respuesta inmune celular.

Las células de bazo fueron cultivadas en presencia de PLV (PLV), o medio (RPMI). A las 72hs se recolectó el sobrenadante de cultivo y se determinó la concentración de citoquinas por ELISA. Como se puede observar en la **Figura 25**, las células aisladas de los ratones pertenecientes a los lotes PLV y PLV+Omp16 mostraron una menor respuesta Th2 frente al estímulo con PLV, siendo los niveles de IL-13 del lote PLV+Omp16 comparables con los del lote control; en cuanto a los niveles de IFN- $\gamma$ , el lote PLV+Omp16 presentó una mayor secreción respecto a los demás lotes,

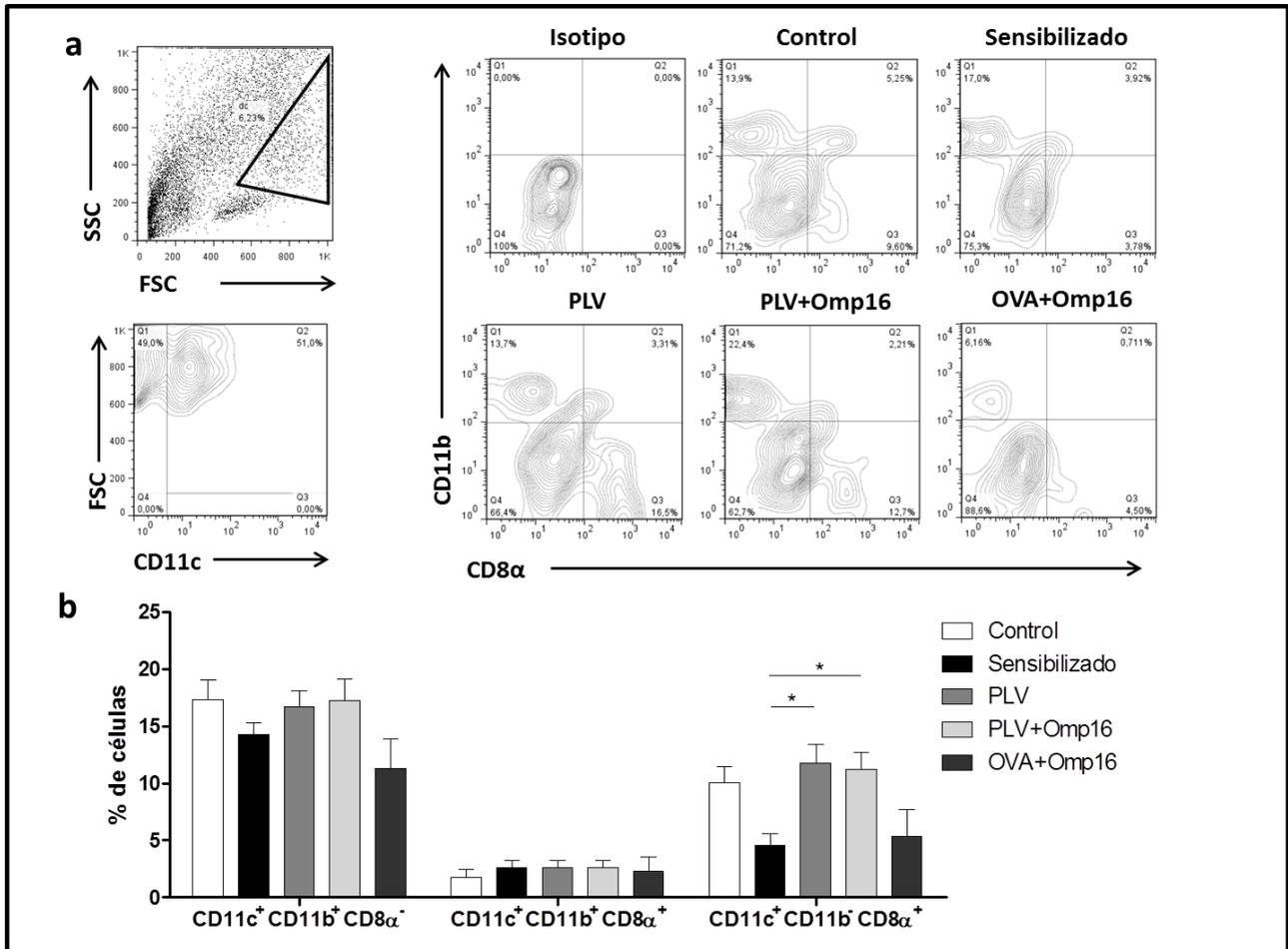
siendo la diferencia significativa respecto al lote Sensibilizado. Dado que el lote que recibió OVA+Omp16 no mostró diferencias con el lote Sensibilizado, podemos concluir que la modulación de la respuesta celular con Omp16 es también antígeno-específica en cuanto a la activación celular, demostrando entonces su función como adyuvante pro-Th1.



**Figura 25. Cuantificación de citoquinas en sobrenadante de cultivo de esplenocitos.** Concentración de IL-5, IL-13 e IFN-γ (pg ml<sup>-1</sup>) en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos, en presencia de PLV (PLV) o medio (RPMI). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, ANOVA de doble entrada.

Se evaluaron además por citometría de flujo, las poblaciones celulares presentes en LP de yeyuno. Para ello células aisladas de LP fueron marcadas con anti-CD11c, anti-CD11b y anti-CD8α. Se estableció la población de DCs por tamaño y complejidad (FSC vs SSC), y luego se seleccionó la población CD11c<sup>+</sup> (Figura 26a). Se evaluaron las diferentes poblaciones de DCs, según expresaran o no CD11b y/o CD8α. Como se observa en la Figura 26b, los animales del lote Sensibilizado y OVA+Omp16, mostraron una disminución de la población de DCs plasmacitoides CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD8α<sup>+</sup> respecto al lote control, población que fue restituida por la administración sublingual de PLV o PLV+Omp16. Es conocido que esta población de DCs está involucrada en la inducción de tolerancia, o en la desviación de la respuesta inmune hacia un perfil Th1 (Kang 2012). Dado que los porcentajes de las poblaciones de DCs encontradas en LP de animales del lote OVA+Omp16, fueron similares a las encontradas en los animales del

lote Sensibilizado, mostramos nuevamente que la sola administración de Omp16 no es capaz de revertir la respuesta alérgica, sino que es necesaria la administración combinada con el Ag.

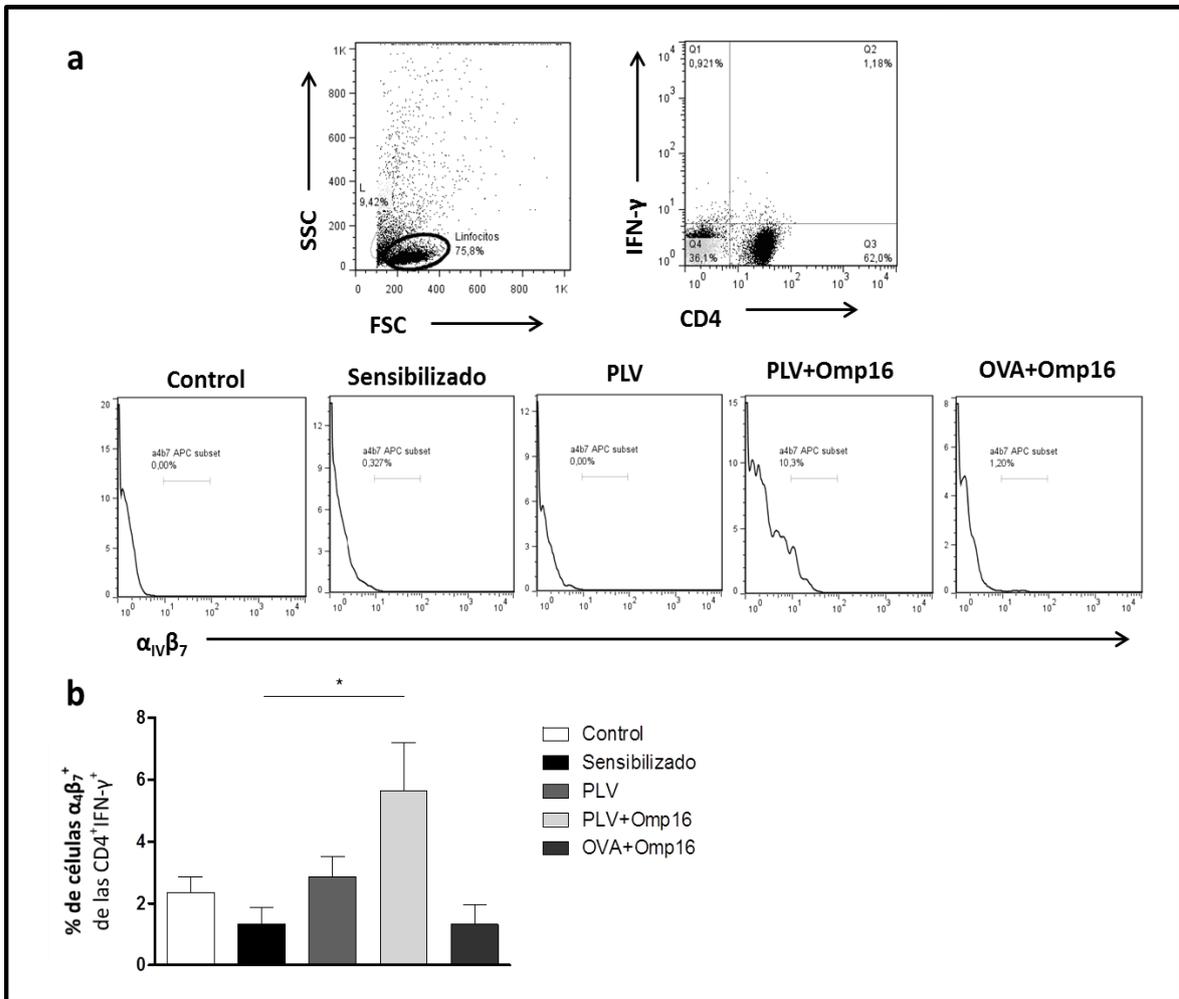


**Figura 26. Evaluación de poblaciones de DCs de LP por citometría de flujo.** (a) Imágenes representativas de los diferentes lotes. En base a tamaño y granularidad, se hizo un gate para DCs; luego se estudiaron las poblaciones CD11c<sup>+</sup> y sobre el gate de células CD11c<sup>+</sup> se analizó la expresión de CD11b y CD8α. (b), Representación gráfica de los porcentajes de las diferentes poblaciones de DCs encontradas en LP de animales de los diferentes lotes. \*p<0,05 ANOVA de doble entrada.

Por otro lado se estudiaron las poblaciones de linfocitos aislados de SLN. Dado que como se vio previamente en nuestro grupo la administración intra-nasal (Ibáñez et al. 2013) u oral (Smaldini et al. 2014) de Omp16 junto a PLV logró desviar la respuesta inmune desde un perfil Th2 hacia un perfil Th1, quisimos evaluar las diferentes poblaciones de linfocitos T. Para esto, células aisladas de SLN fueron marcadas para determinar la presencia de células Th1 (CD4<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup>), Treg (CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>), o Tr1 (CD4<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>). Se determinó además la presencia en estas células aisladas de SLN de la integrina α<sub>4</sub>β<sub>7</sub>, como marcador de tráfico a LP de intestino.

En primer lugar se hizo una selección de la población de linfocitos según tamaño y granularidad, y luego se seleccionaron las células CD4<sup>+</sup> IFN-γ<sup>+</sup>; sobre esta población celular se evaluó la expresión de la proteína de la integrina α<sub>4</sub>β<sub>7</sub>. Como puede verse en la **Figura 27**, el lote

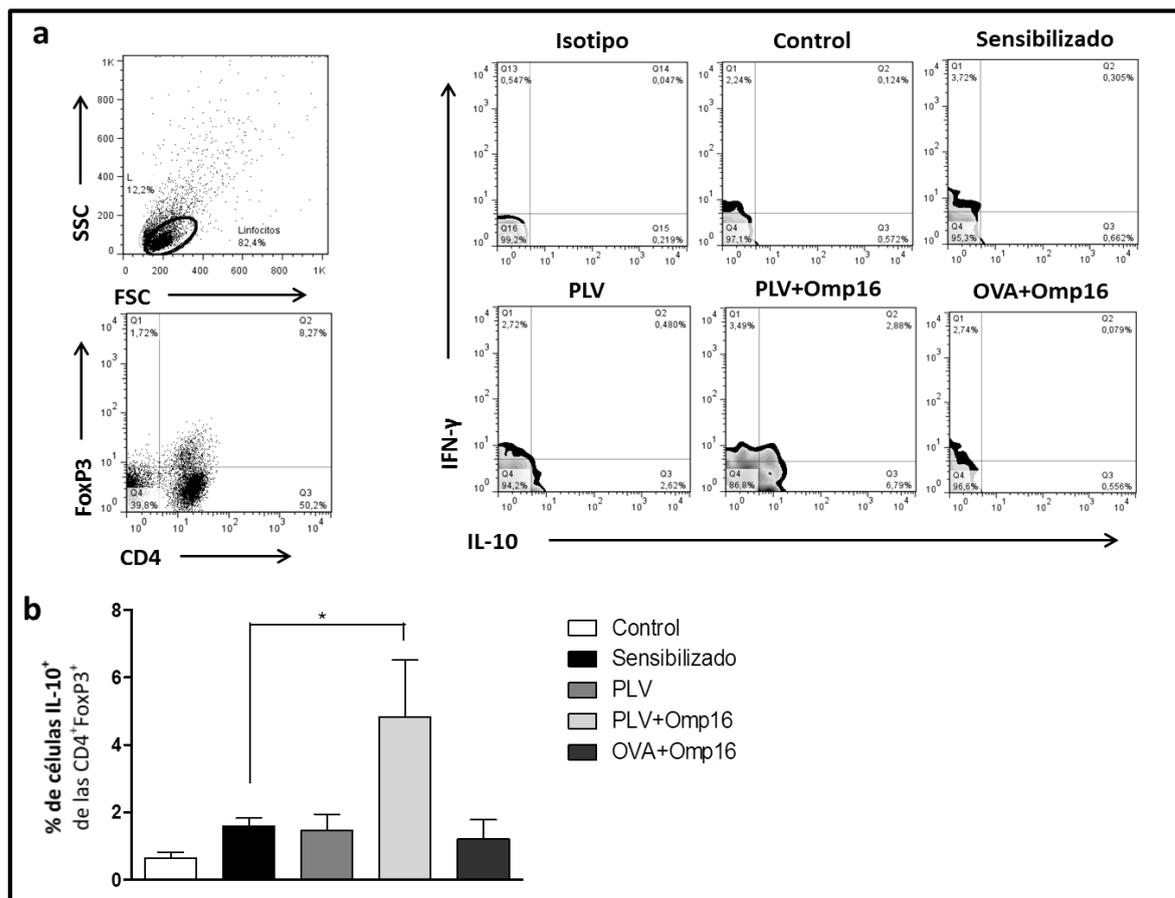
PLV+Omp16 muestra un aumento en el porcentaje de células  $CD4^+ IFN-\gamma^+ \alpha_4\beta_7^+$ , mostrando entonces que hay un incremento en la población de células Th1 que expresan la integrina  $\alpha_4\beta_7$ , lo cual sugiere que los LT podrían generarse en SLN y luego migrar a LP de intestino para ejercer su función inmunomodulatoria.



**Figura 27. Evaluación de población de linfocitos Th1 en SLN por citometría de flujo.** (a) Imágenes representativas de los diferentes lotes. Primero se hizo una selección por tamaño y granularidad, luego se seleccionó la población de células  $CD4^+ IFN-\gamma^+$ , sobre las que se evaluó la expresión de la integrina  $\alpha_4\beta_7$ . (b) Representación gráfica de los porcentajes de las células Th1 que expresan  $\alpha_{IV}\beta_7$  \* $p < 0,05$  ANOVA de entrada simple.

Finalmente se estudió el porcentaje de células Treg productoras de IL-10 presente en SLN. Como puede observarse en la **Figura 28a**, en primer lugar se hizo una selección de linfocitos según tamaño y granularidad, luego se seleccionó la población  $CD4^+ FoxP3^+$  y sobre ellas se estudió la presencia de IFN- $\gamma$  e IL-10. En el gráfico (**Figura 28b**) se evidencia que el lote PLV+Omp16, mostró un incremento significativo de la población  $CD4^+ Foxp3^+ IL-10^+$  en SLN respecto del lote sensibilizado, y no así el lote PLV, esto muestra que la administración conjunta de PLV con el adyuvante Omp16, indujo mayor cantidad de células Treg que la administración de PLV sola.

Se evaluó además el porcentaje de células que expresan en forma simultánea IL-10 e IFN- $\gamma$ , a fin de determinar si el aumento en IFN- $\gamma$  era a causa del aumento de la población de células Tr1. No se observaron diferencias significativas entre los diferentes lotes para la población de células CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, por lo tanto podemos concluir que en el lote PLV+Omp16 se indujeron células Th1 y Treg, que finalmente revirtieron la respuesta Th2 previamente establecida en la mucosa intestinal, mediante la administración si de PLV junto a Omp16.



**Figura 28. Evaluación de poblaciones de linfocitos Treg en SLN por citometría de flujo.** (a) Imágenes representativas de los diferentes lotes. Primero se hizo una selección por tamaño y granularidad, luego se seleccionó la población CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>, luego se evaluó la expresión de la integrina IL-10 e IFN- $\gamma$  en dichas células. (b) Representación gráfica de los porcentajes de las células Treg que expresan CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup>. \*p<0,05 ANOVA entrada simple.

La inducción de células dendríticas CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> en LP intestinal, podría estar implicada en la restitución de la tolerancia mucosal y la supresión de los signos clínicos de alergia. Es necesario completar los estudios para poder correlacionar la inducción de linfocitos Th1 y Treg en la cavidad oral con la inducción de tolerancia intestinal.

### I.2.3 DISCUSIÓN

En este capítulo hemos 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* Omp16, la cual mediante su unión a TLR4 en CPAs ejerce propiedades adyuvantes pro-Th1 (Pasquevich et al. 2010).

En trabajos previos de nuestro grupo, hemos visto que la inoculación intra-nasal de PLV con Omp16 o con LPS durante la sensibilización de los animales, suprimió la activación de la respuesta Th2, disminuyendo las manifestaciones clínicas luego del desafío oral con el antígeno y los niveles de IgE específica, y aumentando los niveles de IgG2a específica; esto no se observó cuando se administró el antígeno sin adyuvante (Ibáñez et al. 2013). Por otro lado, ratones que fueron tratados por vía ig con Omp16 en simultáneo a la sensibilización, mostraron una respuesta Th1, que fue efectiva para la disminución del score clínico post-DO con PLV, los niveles séricos de IgE específicos y negativización la PC antígeno-específica (Smaldini et al. 2014).

En nuestro modelo de alergia a PLV mediado por IgE, pudimos ver aquí que la administración sublingual de PLV junto con el adyuvante Omp16 permitió reducir los signos clínicos y negativizar la PC, utilizando cantidades  $2 \times 10^6$  veces menores de PLV que las empleadas en la ITO, optimizando el tratamiento en comparación con la sola administración de PLV; de hecho, para observar el mismo score clínico en los animales tratados que en los animales sensibilizados, tuvimos que incrementar 8 veces la dosis de PLV durante el desafío oral (de 5mg de PLV a 40mg de PLV).

Al evaluar diferentes parámetros inmunológicos, pudimos evidenciar que la administración conjunta de PLV y Omp16 ofrece ciertas ventajas por sobre la administración de PLV. Hallamos que, además del descenso en los niveles séricos de IgE específica de PLV, hubo un marcado incremento en los niveles de IgG2a específica a PLV (isotipo Th1), viéndose un descenso significativo de la relación IgG1/IgG2a respecto de los demás lotes que recibieron PLV+TC. Además observamos un descenso significativo en la secreción de IL-5 e IL-13 (citoquinas Th2) por los esplenocitos en respuesta al estímulo con PLV respecto a los grupos sensibilizado y OVA+Omp16, junto a un incremento significativo en la secreción de IFN- $\gamma$ .

En cuanto a las poblaciones celulares, podemos concluir que en LP de ratones Sensibilizados y tratados con OVA+Omp16, la población de DCs plasmacitoides CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>

CD8 $\alpha^+$  se encuentra disminuida con respecto al lote control, similar a lo observado en pacientes alérgicos para poblaciones de DCs con frecuencias semejantes. Dicha población celular, asociada a un perfil tolerogénico (Kang 2012), fue restituida en los lotes de animales tratados con PLV y PLV+Omp16. Por otro lado, en este mismo lote se vio también un incremento en SLN de células Th1 (CD4 $^+$ IFN- $\gamma^+$  $\alpha_4\beta_7^+$ ), lo que muestra una recuperación del balance Th1/Th2, y de células Treg productoras de IL-10. Se ha descrito previamente que Omp16 es capaz de inducir la producción de IL-10 en ratones (Ibáñez et al. 2013). Por lo tanto la modulación mucosal de la inmunidad Th2 de ratones alérgicos podría estar mediada por la acción conjunta de Th1 y Treg inducidos en la mucosa oral como resultado de la administración combinada de PLV y Omp16.

Por último, dado que el lote OVA+Omp16 (control de especificidad) mostró en todos los casos un comportamiento similar al lote Sensibilizado, podemos concluir que Omp16 no desvía la respuesta inmune hacia un perfil Th1 cuando es administrada con un antígeno no relacionado (OVA), sino que es necesario que sea administrado con el alérgeno específico (PLV en este caso). Estos resultados son alentadores para proponer a Omp16 como un adyuvante mucosal que, administrado por vía sl, es capaz de revertir una alergia alimentaria.



# DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES PARTE I

---



La alergia a las PLV afecta al 3-5% de la población pediátrica; dado que la leche es una de las principales fuentes de proteínas, importante para el adecuado desarrollo pondero-estatural, y dado el alto riesgo de anafilaxia por una ingesta accidental, la búsqueda de estrategias que permitan restablecer la tolerancia es fundamental para mejorar la morbi-mortalidad de esta patología. El estudio y comprensión de los mecanismos subyacentes para el restablecimiento de la tolerancia es fundamental, y el uso de modelos animales constituye una herramienta biológica de valor.

Como explicamos previamente, en el grupo hemos desarrollado y optimizado un modelo murino de alergia IgE-mediada a leche de vaca en ratones BALB/c (Trabajo de Tesis Doctoral de Smaldini 2011, Smaldini et al. 2012), que reproduce las principales características moleculares, celulares y clínicas de la AA en humanos: sensibilización antigénica por vía oral, manifestaciones clínicas locales y sistémicas inmediatamente posteriores a la exposición oral al Ag, incremento en los niveles plasmáticos de histamina luego del DO, inducción de IgE específica, secreción de citoquinas Th2 y PC positiva, mostrando un proceso Th2-dependiente en la mucosa intestinal, tal como se ha observado en pacientes con AA (Vandezande et al. 1999; Beyer et al. 2002).

En esta primera etapa del trabajo, evaluamos dos estrategias terapéuticas para la inmunomodulación específica de las AA, empleando el modelo murino de alergia a las proteínas de leche de vaca IgE-mediado. Ambas estrategias, basadas en la administración de bajas dosis del alérgeno por diferentes vías a fin de inducir una respuesta tolerogénica específica, son terapias promisorias en diferentes ensayos clínicos para el restablecimiento de la tolerancia hacia antígenos de la dieta. La primera estrategia, consistió en la administración ig de dosis diarias de 10mg de PLV durante la semana previa a la sensibilización (prevención), o de 10µg de PLV semanalmente durante 8 semanas posteriores a la sensibilización (tratamiento), conocida como ITO. Como mostramos en el Capítulo 1, la administración de bajas dosis de PLV indujo células  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  en la mucosa intestinal, con un incremento de la producción de IL-10; esto estuvo acompañado de una supresión de la respuesta Th2, evidenciado por una disminución de la producción de IL-5 e IL-13, así como una reducción en los niveles de IgE específica de PLV en suero. Consecuente logramos reducir los signos clínicos luego del DO, en el cual se emplearon dosis de PLV 1000 veces más altas que durante el tratamiento, y una menor activación de los mastocitos cutáneos, evidenciado por la negativización de la PC. En su conjunto, estos datos sugieren que las

células Treg inducidas controlan la activación de mastocitos, o que los mastocitos tienen menor cantidad de anticuerpos IgE específicos unidos a sus receptores de alta afinidad, FcεRI.

En estudios realizados en muestras de pacientes con AA se ha evidenciado una disminución en la frecuencia y función de células Treg, observándose una disminución en el porcentaje de esta población en sangre periférica y en células aisladas de lámina propia de biopsias de pacientes, así como una reducción en la expresión génica de FoxP3, IL-10 y TGF-β (Beyer et al. 2002; Turcanu et al. 2003; Krogulska et al. 2011); por otro lado, se ha observado en pacientes que desarrollaron tolerancia oral en forma espontánea, así como en pacientes que fueron desensibilizados durante la ITO, un incremento de los porcentajes de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, en sangre periférica, sugiriendo que estas células serían las responsables de la supresión de la respuesta inmune alérgica (Schrefler et al. 2009; Syed et al. 2014). En este trabajo obtuvimos resultados similares al detectaren las muestras de LP de intestino de animales que fueron desensibilizados con PLV un incremento en la frecuencia de la población de células Treg productoras de IL-10. Además, para alcanzar manifestaciones clínicas comparables a lo observado en los grupos sensibilizados (ratones alérgicos, no tratados), fue necesario aumentar la dosis de Ag en el desafío oral 8 veces en los ratones tratados.

Se ha reportado que animales que recibieron en forma preventiva β-lactoglobulina por vía ig y que fueron posteriormente sensibilizados por vía ip con el alérgeno e hidróxido de aluminio, presentaron a las 72hs del DO, un incremento en la población de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> en PP, MLN y bazo (Adel-Patient et al. 2011). En otro trabajo se observó que animales sensibilizados con alérgenos de huevo y posteriormente tratados por vía ig con péptidos que sólo contenían epitopes T del alérgeno presentaron en sangre periférica mayor porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, y un incremento en la secreción de IL-10 y TGF-β por células de bazo estimuladas con el Ag (Rupa & Mine 2012). Sin embargo en estos trabajos, no se evaluó la respuesta inmune a nivel de la mucosa intestinal como se realizó en el presente trabajo, donde detectamos un incremento de células Treg productoras de IL-10, capaces de suprimir la respuesta inflamatoria local y sistémica.

Asimismo, y para confirmar el rol tolerogénico de las células Treg inducidas, realizamos ensayos de transferencia de células Treg generadas *in vitro* e *in vivo* por vía iv, y posteriormente sensibilizamos a los animales por vía ig. Los resultados hallados indican que la transferencia de células Treg, generadas *in vivo* o *in vitro*, previno el desarrollo de alergia, mientras que la

depleción de esta población celular anuló este efecto tolerogénico. Esto confirma que en los animales tratados, el aumento de Treg es capaz de prevenir o revertir el desarrollo de una respuesta Th2 específica para PLV. En un trabajo realizado en pacientes alérgicos al maní que recibieron ITO se observó que la inducción de tolerancia estaba asociada a un incremento de la población de células Treg en sangre periférica, y a una desmetilación del gen de FoxP3 en regiones CpG (Syed et al. 2014). Así, podemos concluir que el mecanismo por el cual se reestableció la tolerancia a través de la ITO en nuestro modelo de alergia experimental, es el incremento de la población de células Treg productoras de IL-10 en la mucosa intestinal y a nivel sistémico.

Como explicamos previamente, la desensibilización se define como el restablecimiento de la no-respuesta inmunológica específica a un alérgeno durante el tratamiento, mientras que la tolerancia se refiere a la inducción de la no-respuesta, incluso luego de discontinuar la administración del alérgeno. En la mayoría de los estudios realizados en pacientes que recibieron ITO, pudo confirmarse una desaparición de los signos clínicos frente a la exposición del alérgeno, sin embargo, dado que los pacientes siguieron en contacto con el alimento una vez finalizado el tratamiento, o no se realizó el seguimiento adecuado, no se puede definir si el mecanismo inducido por la inmunoterapia fue tolerancia o desensibilización (Skripak et al. 2008; Varshney et al. 2011). Por otro lado, en los pocos casos en que se evaluó a los pacientes una vez finalizado el tratamiento, se determinó que a las semanas de concluir el mismo, la mayoría de los pacientes perdían la tolerancia y volvían a presentar signos y síntomas de alergia frente a una nueva re-exposición al alérgeno (Keet et al. 2012; Syed et al. 2014). En nuestro modelo estudiamos el tiempo que perdura la tolerancia inducida, y observamos que 5 meses después de finalizado el tratamiento, el DO con el alérgeno no indujo síntomas, lo cual nos permite sugerir que logramos inducir tolerancia oral en forma permanente.

La segunda estrategia terapéutica aplicada consistió en evaluar la vía sublingual como vía de modulación de la respuesta alérgica. La inmunoterapia sublingual está siendo ampliamente estudiada. Una de las principales ventajas de la ITSL es que pueden utilizarse dosis menores de Ag a las utilizadas en la ITO, ya que por esta vía se evita la digestión y degradación proteica, lo que determina que se induzcan menor cantidad de reacciones adversas durante el tratamiento. Sin embargo, los resultados observados en pacientes mostraron que la ITSL es menos eficiente que la ITO en la inducción de los mecanismos de tolerancia (Kim et al. 2011; Keet et al. 2012; Narisety et al. 2015). Por esta razón el uso de adyuvantes mucosales que induzcan una respuesta Th1

específica, desviando la respuesta inmune alérgica, está siendo evaluado como una opción terapéutica para incrementar la eficiencia del tratamiento de las enfermedades alérgicas por administración *sl*. Adyuvantes agonistas de receptores tipo Toll, como CpG, que activa TLR9 (Huang et al. 2008), o Pam3CSK4, que activa TLR2 (Lomabardi et al. 2008), así como la proteína fusión OVA-Flagelina, que activa TLR5 (Burggraf et al. 2011) han sido ampliamente estudiados en modelos experimentales de asma alérgico. En el caso de las alergias alimentarias, el uso de adyuvantes asociado a la inmunoterapia alérgico-específica no ha sido explorado. En nuestro modelo de AA evaluamos la capacidad inmunomoduladora de la proteína recombinante de membrana externa de *Brucella abortus* (Omp16) al ser administrada por vía *sl* junto con PLV. Se trata de una proteína de membrana, que estimula la activación de la inmunidad innata, a través de TLR4 y genera la inducción de una respuesta Th1-dependiente (Pasquevich et al. 2010). Previamente en nuestro grupo se demostró la capacidad adyuvante mucosal de Omp16 al ser administrada junto con PLV por vía *in o ig*, en simultáneo con el proceso de sensibilización alérgica en el modelo de alergia experimental (Ibáñez et al. 2013, Smaldini et al. 2014). Como mostramos en el Capítulo 2, la administración *sl* de PLV o de Omp16 junto con PLV luego de la sensibilización logró modular la respuesta alérgica, siendo más marcada la inmunomodulación en el segundo caso. En ambos lotes pudimos ver que la ITSL logró reducir los niveles séricos de anticuerpos IgE específicos de PLV, sin embargo, en el lote que recibió PLV+Omp16, se vio además un incremento de los anticuerpos IgG2a (isotipo Th1) específicos, mostrando una relación IgG1/IgG2a comparable con el lote control; por otro lado, esta modulación logró revertir la activación de mastocitos, evidenciada por la negativización de la PC. En cuanto a la respuesta celular, evidenciamos en ambos lotes una disminución en la secreción de IL-13 por esplenocitos estimulados con PLV, pero sólo el lote que recibió PLV+Omp16 mostró además una disminución en la secreción de IL-5 junto con un incremento en la secreción de IFN- $\gamma$ . Como control de especificidad administramos OVA junto con el adyuvante Omp16; los animales que recibieron este tratamiento mostraron resultados similares a los observados en el lote de ratones sensibilizados con PLV.

Con estos datos podemos concluir que la administración conjunta de PLV y Omp16 logró modular la respuesta Th2 induciendo una respuesta de perfil Th1 específica, así como un incremento de la población de células Treg, lo cual fue demostrado por ensayos *in vitro* e *in vivo*. Además, para observar los mismos signos clínicos en los ratones tratados que en el lote de animales sensibilizados, tuvimos que incrementar la dosis de PLV del desafío oral 8 veces en el lote PLV+Omp16, similar a lo observado en los animales que recibieron ITO. Los resultados obtenidos

muestran la mayor eficacia del empleo de un adyuvante mucosal por la vía si para modular la respuesta inmune inducida en la mucosa intestinal.

Las células dendríticas plasmacitoides (pDC) se caracterizan por presentar un fenotipo CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> además de expresar CD45R, PDCA-1 y Singlec-H (Maazi et al. 2013). Estas células, ampliamente estudiadas, se pueden clasificar en CD8α<sup>-</sup>β<sup>-</sup>, CD8α<sup>+</sup>β<sup>-</sup> y CD8α<sup>+</sup>β<sup>+</sup>. Se ha visto que las dos últimas poblaciones presentan capacidad tolerogénica al inducir la diferenciación de células T a un perfil regulatorio, o por inducción de anergia (Ochando et al. 2006; Lombardi et al. 2012), y están implicadas en la inmunotolerancia y en la inmunidad antiviral induciendo la diferenciación de células T hacia un perfil Treg o Th1 respectivamente (Maazi et al. 2013). La implicancia de las mismas en la inducción de células Treg se ha demostrado en diferentes patologías como asma alérgico (Maazi et al. 2013), alergias alimentarias (Dubois et al. 2009), enfermedades autoinmunes (Chan et al. 2012) y trasplantes (Ochando et al. 2006), así como durante el embarazo en la inducción de tolerancia fetal (Bella et al. 2011). En nuestro modelo de alergia experimental pudimos evidenciar que la población celular CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD8α<sup>+</sup> está reducida en LP de animales sensibilizados y que el tratamiento con PLV, ya sea en presencia o ausencia de Omp16, logra restablecerla. Además en los SLN observamos un incremento de células Treg productoras de IL-10 y de células CD4<sup>+</sup> productoras de IFN-γ que expresan la integrina α<sub>4</sub>β<sub>7</sub>, marcador de tráfico celular a intestino.

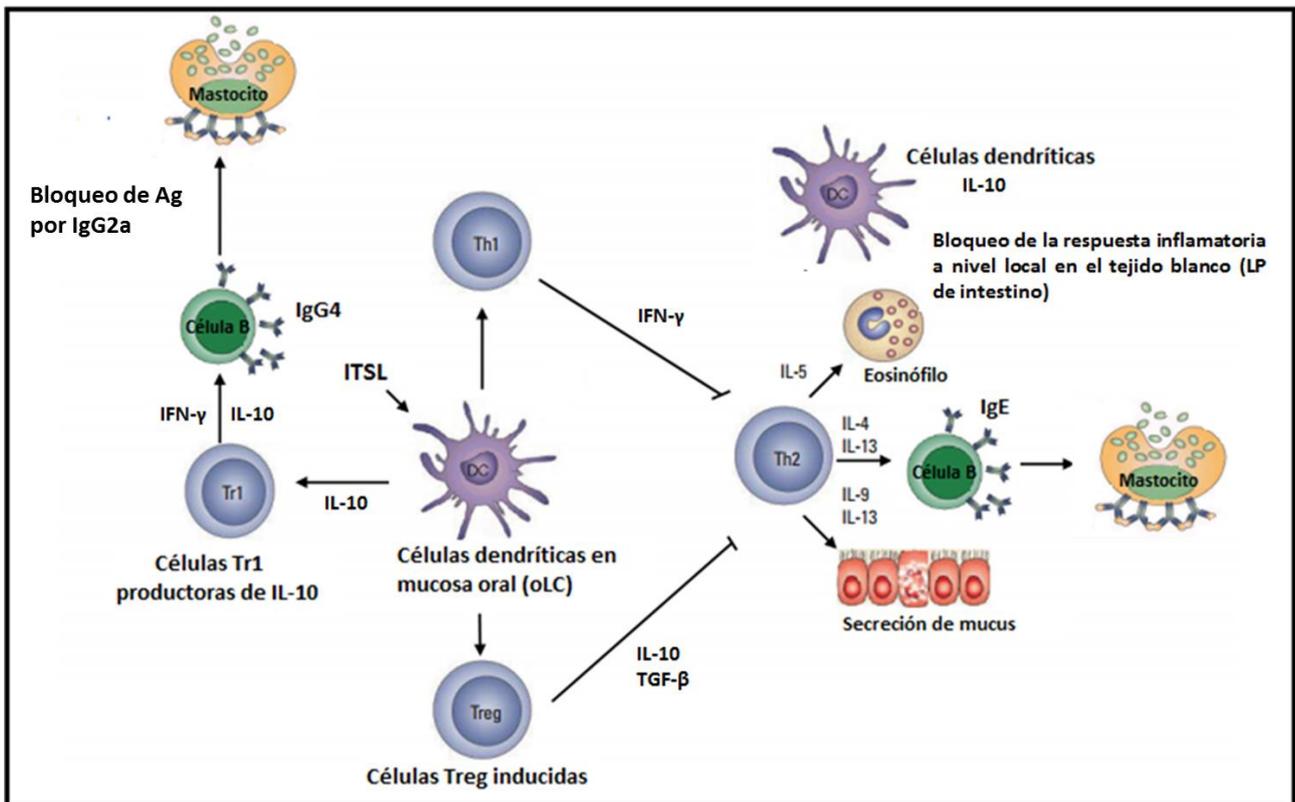
En cuanto al mecanismo implicado en la inducción de tolerancia oral por administración si del alérgeno, sabemos que la mucosa oral es muy absortiva, y constituye un entorno tolerogénico (Novak et al. 2011). En trabajos previos se ha visto que las CPAs predominantes en la mucosa oral son células de Langerhans (oLC), que, a diferencia de las LC cutáneas, se caracterizan por inducir una respuesta tolerogénica o Th1/Th17; presentan en su superficie receptores de reconocimiento de patrones moleculares procarióticos, principalmente TLR2 y TLR4, mediante los cuales son constantemente estimuladas (Allam et al. 2011). Por esta razón estas células constituyen blancos potenciales para su inmunomodulación empleando diferentes tipos de adyuvantes. Las oLC de pacientes alérgicos y de pacientes no-alérgicos, también presentan en su superficie receptores de alta afinidad para IgE, FcεRI, implicados en la endocitosis, procesamiento y presentación de antígenos durante la ITSL (Allam et al. 2003; Novak et al. 2004; Allam et al. 2008).

Se ha reportado que en ensayos *in vitro* la estimulación de oLCs con ligandos de agonistas de TLR4 inducen la expresión de IL-10 y de moléculas co-inhedoras como B7-H1 y B7-H3, que

inducen la apoptosis o supresión de células T efectoras, junto con una disminución de la molécula co-activadora B7.2 (CD86), lo que redundaría en la inducción de una respuesta inmune tolerogénica (Allam et al. 2008). Además en ensayos *in vitro*, a partir de células aisladas de la mucosa oral de pacientes, se vio que las oLC que captan procesan y presentan los alérgenos, no presentan el marcador de maduración CD83 ni el receptor de quimoquinas CCR7, necesario para su migración a los órganos linfoides periféricos, por lo cual presentan los antígenos a células T en la mucosa local. Esta menor maduración de las DCs ha sido asociada a la inducción de tolerancia (Allam et al. 2010; Novak et al. 2011).

Debido a la expresión de receptores TLR2 y TLR4 en oLC, se ha estudiado el uso de adyuvantes mucosales agonistas de estos receptores. La estimulación de oLC de pacientes con ligandos de TLR4, aumenta la expresión de moléculas co-inhibitorias, así como la producción de IL-10 y TGF- $\beta$ , y al co-cultivarlas con células T naïve, se induce su diferenciación a células Treg productoras de IL-10 y TGF- $\beta$  (Allam et al. 2008). En modelos animales, se ha evidenciado que la administración sublingual del Ag solo, o conjugado con adyuvantes, induce la supresión de LT efectoras, y un incremento en el porcentaje de células Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) y en la producción de TGF- $\beta$  e IL-10, tanto a nivel local como periférico (Sun et al. 2006; Yamada et al. 2012).

Teniendo en cuenta lo observado en nuestro modelo y lo descrito en bibliografía, proponemos entonces que la administración sl del alérgeno combinado con Omp16 induce la captación del alérgeno por las oLC en animales alérgicos, de forma específica a través de los Fc $\epsilon$ RI, y que la señalización vía TLR4, previene la expresión de moléculas co-estimuladoras, induciendo simultáneamente la expresión de moléculas co-inhibitorias. De esta manera las oLC con un perfil tolerogénico, secretan IL-10 e IFN- $\gamma$ , e inducen la supresión de células Th2 y la diferenciación hacia un perfil Treg o Th1 específico, a nivel local. Estas células Treg y Th1 específicas migrarían por linfa a los ganglios periféricos y posteriormente a sitios efectoras, incluida LP de intestino. En los sitios efectoras, la secreción de citoquinas regulatorias y de perfil Th1 por parte de los LT generados en la mucosa oral, sería capaz de inducir pDC tolerogénicas frente a una nueva exposición a los alérgenos, las cuales inducirían en los ganglios drenantes la diferenciación de células T naïve hacia un perfil Th1 o Treg, logrando modular así la respuesta alérgica (**Figura 29**). En otras palabras, la administración de PLV junto a Omp16 por vía sl induce Treg y Th1 en la mucosa oral, que al migrar a la mucosa intestinal genera un entorno tolerogénico, modulando la activación de los linfocitos T locales.



**Figura 29. Mecanismo de inducción de tolerancia por ITSL alérgico específica.** El alérgeno junto con el adyuvante interactúan con las DCs a nivel local, induciendo su maduración y la posterior diferenciación de LT hacia un perfil Treg, Tr1 o Th1. La secreción de IL-10 y TGF- $\beta$  induce en LB el cambio de isotipo hacia IgG2a, que suprime el entrecruzamiento de IgE/Fc $\epsilon$ RI por bloqueo en circulación del alérgeno, evitando la degranulación de mastocitos. Por otro lado, las células Treg y Th1 migran al tejido expuesto al alérgeno, en el caso de AA a LP de intestino, donde inhiben la respuesta Th2 por generación de un microentorno tisular Th1. Imagen adaptada de Akkoc et al. 2011.

En conjunto con los resultados observados previamente en el grupo (Ibáñez et al. 2013, Smaldini et al. 2014), podemos concluir que Omp16 presenta una propiedad adyuvante de perfil Th1 capaz de modular la respuesta Th2 al ser administrada por diferentes vías mucosales. Los resultados de esta etapa muestran que es posible revertir una respuesta Th2 ya establecida mediante la administración conjunta de PLV y Omp16 por vía sublingual, mostrando una eficiencia similar a la observada en la ITO. Además, dado que la inducción de una respuesta Th1 específica sería la responsable, al menos en parte, del restablecimiento de la tolerancia, éste resultaría un tratamiento potencialmente eficiente para pacientes alérgicos en los que se detectan defectos cualitativos o cuantitativos de las células Treg (Laucaat et al. 2007).

Como pudimos observar en esta primera etapa del trabajo de tesis, tanto la ITO como la ITSL permitieron revertir la respuesta alérgica, sin embargo, dado que las dosis utilizadas en ITSL son mucho menores, y que el uso de Omp16 permitió una mejor inducción de tolerancia, consideramos que esta estrategia terapéutica sería la más apropiada, a fin de evitar reacciones adversas durante el tratamiento.



# PARTE II

OPTIMIZACIÓN DE UN MODELO MURINO DE COLITIS Y  
DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE INMUNOMODULACIÓN





## INTRODUCCIÓN

Como explicamos anteriormente, la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU) son las dos formas más comunes de las EII y representan las patologías inflamatorias crónicas intestinales con mayor incidencia en países desarrollados. A pesar de sus numerosas similitudes, presentan ciertas diferencias en cuanto a las manifestaciones clínicas y a su fisiopatogenia. En particular nos interesa profundizar los estudios en EC.

La EC puede afectar cualquier porción del tracto gastrointestinal, desde la boca al ano, aunque es más frecuente que afecte las zonas ileo-cecal, el recto y la zona peri-anal; las lesiones inflamatorias se presentan en forma intercalada, con áreas no inflamadas y zonas inflamadas, y son comunes las manifestaciones extra-intestinales (oftalmológicas, articulares, dermatológicas, hepáticas, etc.) que suelen alterar el curso de la enfermedad en forma variable, y las complicaciones severas (fístulas, estenosis, perforaciones, etc.). A nivel histológico se observan alteraciones en todo el espesor de la pared intestinal, desde el compartimento epitelial hasta la capa muscular, y se caracteriza, a diferencia de la CU, por la formación de granulomas en el 60% de los casos (Strober et al. 2002; Kaser et al. 2010; Di Sabatino et al. 2013).

Si bien se ha avanzado notablemente en el conocimiento de los mecanismos subyacentes en la mucosa intestinal, no se conoce su etiología ni la causa de su recidiva en cuanto a la clínica. Sin embargo, se han logrado importantes avances en el desarrollo de tratamientos anti-inflamatorios que logran controlar el proceso inflamatorio mucosal y mejorar la calidad de vida de los pacientes, aunque no existen, hasta el momento, tratamientos que logren la resolución absoluta de la inflamación intestinal en el 100% de los pacientes (Di Sabatino et al. 2012). Esto probablemente refleje que, por más que existan dos formas reconocidas de EII desde el punto de vista clínico, endoscópico e histológico, en realidad se trate de un conjunto más diverso de entidades clínicas caracterizadas por una inflamación crónica recidivante del intestino con una base inmunológica. Por estas razones es importante profundizar los estudios sobre los mecanismos moleculares y celulares subyacentes para poder definir nuevos blancos terapéuticos a fin de lograr la remisión de la inflamación.

En estas patologías se ha evidenciado una activación anómala de los LT, y deficiencias a nivel de la regulación, involucrando principalmente a las células Treg (Monteleone et al. 2001). Los modelos animales se han convertido en una herramienta esencial para este para estudiar estas patologías, ya que han permitido confirmar la hipótesis de fallas a nivel de las células Treg que

inducen inflamación intestinal y pérdida de la homeostasis (Griseri et al. 2010), y mediante la manipulación de la integridad de la barrera epitelial se ha logrado alterar la tolerancia natural e inducir inflamación (Jurjus et al. 2004; Alex et al. 2009). Los modelos animales de colitis, fáciles de inducir, también han aportado información importante para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Para que un modelo experimental de colitis sea adecuado, debe reunir ciertas características que lo asemejen a lo que ocurren en pacientes con EI: el intestino debe presentar alteraciones morfológicas, con un proceso inflamatorio y alteraciones inmunológicas similares o idénticas a las observadas en pacientes. También es recomendable conocer el background genético y las características inmunológicas de la cepa utilizada. Los diferentes modelos de colitis en ratones se pueden agrupar en 5 clases (Strober et al. 2002; Jurjus et al. 2004):

- ▣ Modelos de ratones deficientes en ciertos genes relacionados con moléculas del sistema inmune (IL-10<sup>-/-</sup>, IL-2<sup>-/-</sup>).
- ▣ Modelos de ratones transgénicos (STAT-4 Tg, HLA-B27 Tg).
- ▣ Modelos de colitis espontánea (SAMP1/Yit, C3H/HeJBir).
- ▣ Modelos de transferencia adoptiva de células T a ratones con inmunodeficiencia combinada severa o SCID (transferencia de células CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup>, o CD8<sup>+</sup> específicas para Hsp-60).
- ▣ Modelos de colitis inducida por compuestos químicos (TNBS, DSS, Oxazolona).

En particular nos interesa el modelo de colitis inducida por ácido 2,4,6 trinitrobencensulfónico (TNBS), dada su simplicidad y similitud con la EC. La instilación intra-rectal de TNBS en etanol 50% altera la barrera epitelial por irritación química y modifica proteínas de la luz intestinal uniendo covalentemente grupos trinitrofenilo (TNP), de forma que actúa como un hapteno. De esta forma se induce una respuesta inmune inflamatoria en la porción distal del colon caracterizada por un infiltrado transmural de LT y macrófagos. Estas manifestaciones histopatológicas son acompañadas por un marcado descenso de peso corporal, diarrea, sangrado y prolapso rectal (Neurath et al. 2000). El aumento de la permeabilidad sumado a la modificación de covalente de las proteínas de la luz intestinal, induce una respuesta caracterizada por un incremento de citoquinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$  y Ccl-20 y por un infiltrado mononuclear que afecta todo el espesor de la pared intestinal. En cuanto a la respuesta inmune adaptativa, se

observa una respuesta combinada de perfil Th1 con incremento de IL-12 e IFN- $\gamma$  y de perfil Th17, con incremento de la secreción de IL-17 (Alex et al. 2009).

El proceso inflamatorio transmural y los continuos procesos de regeneración y daño observados en pacientes con EC, derivan en engrosamiento de la pared intestinal con fibrosis y estenosis en el 30% de los casos, muchos de los cuales deben ser intervenidos quirúrgicamente (Rieder & Fiocchi 2009). Durante procesos inflamatorios agudos, se secreta TGF- $\beta$ , que actúa diferenciando células T naïve a células Treg a fin de revertir el estado inflamatorio, e induciendo la expresión de metaloproteasas (MMPs), inhibidores de MMPs y colágeno por células epiteliales intestinales que se transforman en miofibroblastos (Biancheri, Di Sabatino et al. 2013). En procesos inflamatorios crónicos como el observado en pacientes con EC, si bien se ve que TGF- $\beta$  está aumentada en el tejido, su vía de señalización en células T efectoras está bloqueada, de modo que las células T son refractarias a TGF- $\beta$  (Monteleone et al. 2001). Esto imposibilita el control del proceso inflamatorio y altera la homeostasis intestinal (Fantini et al. 2009). Niveles elevados y sostenidos de TGF- $\beta$  inducen la síntesis excesiva de matriz extracelular y un desbalance entre los niveles de MMPs e inhibidores de MMPs por miofibroblastos, lo que genera una acumulación anormal de colágeno y otras proteínas de matriz extracelular (Biancheri, Giuffrida et al. 2013). Este proceso deriva en el desarrollo de fibrosis intestinal con la consecuente pérdida de función del tejido, y a largo plazo en el desarrollo de estenosis. Dado que no existen tratamientos capaces de revertir la fibrosis ya establecida, la única solución en estos pacientes es la resección quirúrgica de la zona fibrosada/estenosada (Bettenworth & Rieder 2014). Por lo tanto, los mecanismos inmunológicos inducidos en la mucosa intestinal son los responsables de generar el proceso inflamatorio, y la activación de los fibroblastos y la diferenciación de miofibroblastos son los responsables del daño tisular. En conclusión el tratamiento ideal de estas patologías debería revertir el proceso inflamatorio, previo a la instauración irreversible del proceso de fibrosis. La aplicación de modelos de fibrosis intestinal para el desarrollo de nuevas terapias resulta un área de sumo interés en gastroenterología.

La forma crónica del modelo de colitis inducida por TNBS consiste en inducir períodos alternados de inflamación con daño y de recuperación, simulando lo observado en pacientes con EII. Este proceso induce a largo plazo el desarrollo de fibrosis intestinal, observándose además de un incremento de las citoquinas de perfil Th1/Th17, un marcado incremento de TGF- $\beta$ , y desarrollo de estenosis (Strober et al. 2002, Ray et al 2014). A partir de lo observado clínicamente, histopatológicamente e inmunológicamente, tanto en la forma aguda como en la forma crónica,

podemos decir que el modelo de colitis inducida por TNBS es el adecuado para estudiar la inmunopatogenia de pacientes con EC.

En cuanto a la incidencia de las EII, en las últimas décadas se ha visto un marcado incremento en la misma, que resalta la importancia de los factores ambientales en el establecimiento o reactivación de estas patologías multifactoriales, ya que no puede explicarse por cambios a nivel genético. Los factores ambientales que pueden contribuir al establecimiento de las EII se resumen en el término “Exposoma”. Los mismos pueden tener efectos directos sobre las células epiteliales o sobre células del sistema inmune, así como sobre la composición y actividad metabólica de la microbiota intestinal, que como se describió anteriormente es muy importante en la modulación del sistema inmune de la mucosa intestinal. Dado que un individuo está expuesto a miles de factores externos durante toda su vida, es difícil establecer el efecto específico individual de los diferentes factores ambientales; sin embargo, entre los factores más importantes para las EII, se destacan la alimentación, la contaminación ambiental, el uso de medicamentos y fundamentalmente la composición de la microbiota (Rogler & Vavricka 2015).

Como mencionamos en la introducción de este trabajo, la microbiota comensal evoluciona desde el momento del nacimiento, puede alcanzar en colon concentraciones de  $10^{11}$  a  $10^{12}$  células/g de contenido luminal, se estabiliza en la adultez y cumple funciones esenciales como digestión de sustratos no digeridos por el huésped, modulación del sistema inmune y control del crecimiento de microorganismos patógenos por competencia (Kostic et al. 2014). Sin embargo, alteraciones en la composición de la microbiota puede derivar en la desregulación del SIM y alterar la homeostasis intestinal generando un cuadro inflamatorio (Khor et al. 2011). Esto es lo que se observa en pacientes con EII, generándose una activación inmunológica aberrante contra los componentes de la microbiota, con un incremento de la secreción de anticuerpos IgG (anti-flagelina) y de LT efectores específicos de antígenos bacterianos (Macpherson et al. 1996; Strober et al. 2007). Por otro lado, se ha detectado una disbiosis en estos pacientes, con una menor diversidad de la microbiota y un incremento de bacterias entero-adherentes en pacientes con EC. Sin embargo, hasta el momento no se han hallado alteraciones en pacientes con CU. También se ha observado una reducción significativa de los síntomas en los pacientes con EC tratados con antibióticos (Ananthakrishnan 2015). En trabajos con modelos animales se ha visto una alteración en la variedad de especies bacterianas que habitan comúnmente el colon (Lupp et al. 2007), y en particular en el modelo de colitis inducida por TNBS, se ha visto una respuesta inmune específica contra antígenos de los microorganismos comensales intestinales (Neurath et al. 2000); además, se

ha demostrado que en animales crecidos en ambientes libres de microorganismos, no se logra inducir colitis, y que ciertas cepas bacterianas confieren protección frente al desarrollo de colitis, lo cual confirma el rol fundamental de la microbiota en la patogenia de esta enfermedad (Kostic et al. 2014; Ananthakrishnan 2015). Sin embargo, se desconoce si una alteración en la microbiota es un factor disparador de la patología, una consecuencia o si existe una combinación de ambos (Strober et al. 2007).

A pesar que se conoce que los factores ambientales determinan la composición de la microbiota del intestino (alimentación, medicamentos, consumo de tabaco, contaminación ambiental, etc.) (Kostic et al. 2014), se desconoce la importancia relativa de cada factor individual. Por esta razón es que existen numerosos grupos que investigan la incidencia individual de los mismos en las EII (Rogler & Vavricka 2015). Uno de los factores ambientales más relevantes que determinan la composición de la microbiota intestinal es la dieta. Si bien no se conoce una dieta específica que desencadene o prevenga el desarrollo de las EII, es importante tener en cuenta la interacción entre ciertos patrones de dieta a largo y a corto plazo, y la composición de la microbiota. Por ejemplo las dietas veganas o vegetarianas resultan beneficiosas al reducir los niveles de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, que normalmente se encuentran incrementadas en pacientes con EII (Kostic et al. 2014). Más allá de su interacción con la microbiota, en múltiples trabajos se ha estudiado el efecto de la dieta sobre el riesgo de padecer alguna de las formas de las EII. En un trabajo publicado en 2011, en que se reunió toda la información disponible en la bibliografía hasta el momento, se evaluó el efecto de diferentes grupos de alimentos sobre el desarrollo de EC o CU; los datos encontrados mostraron que el consumo de grasas saturadas, ácidos grasos  $\omega 6$ , y carnes, se asocian a un riesgo incrementado de padecer CU y EC, mientras que el consumo de alimentos de origen vegetal como fibra dietaria y frutas disminuye el riesgo de padecer EC, pero no CU. En cuanto al efecto del consumo de carbohidratos, no se ha encontrado una correlación directa (Hou et al. 2011). Es por esto que varios grupos han estudiado el efecto del consumo de alimentos con propiedades anti-inflamatorias, que prevengan el establecimiento o recidiva de las EII. Tal es el caso de la vainillina (Rogler et al. 2009), la curcumina (Hanai & Sugimoto 2009) o probióticos y prebióticos que inducen cambios en la composición de la microbiota (Sartor 2004).

Los alimentos, además de contener macronutrientes y micronutrientes, contienen aditivos, contaminantes y micropartículas en forma variable, lo mismo ocurre con el agua que bebemos, que contiene cantidades variables de microorganismos y compuestos orgánicos e inorgánicos. Los

aditivos alimentarios y la presencia de micropartículas en los alimentos, han sido asociados a un riesgo incrementado de padecer EII (Ng et al. 2013). Las micropartículas son partículas de tamaño menor a  $10\mu\text{m}$ , no biológicas, inertes, que se encuentran en el aire, el agua y los alimentos. En países desarrollados se ingieren aproximadamente 40mg de micropartículas exógenas por día como excipientes de medicamentos, de pasta dental, aditivos alimentarios, colorantes, etc. Entre los principales componentes de estas partículas se han identificado cristales de silicio, sales de aluminio, aluminosilicatos y dióxido de titanio (Powell et al. 2007; Rogler & Vavricka 2015). En muestras de intestino de individuos sanos o con EII se ha observado una hiperpigmentación de macrófagos intestinales, principalmente de PP, por presencia de partículas de silicio, aluminio y titanio en sus fagolisosomas, con igual distribución celular en ambas poblaciones, que da origen en individuos susceptibles a una inflamación granulomatosa crónica (Powell et al. 1996). Además de la fagocitosis directa de las micropartículas, su patogenicidad se ha visto asociada a la capacidad adsortiva, lo que le permite formar complejos micropartícula-calcio-componente dietario o bacteriano, generando una respuesta inmune anormal frente a estos componentes de la luz intestinal (Ashwood et al. 2007; Powell et al. 2007).

La contaminación ambiental es otro de los factores ambientales importantes en las EII. La industrialización genera en la atmósfera niveles elevados de gases como  $\text{NO}_2$  y  $\text{SO}_2$ , y de material particulado (MP) menor a  $10\mu\text{m}$  ( $\text{MP}_{10}$ ), esto se ha visto asociado a un incremento en la incidencia y en la hospitalización de pacientes con EII, así como un desarrollo de estas patologías a edades más tempranas (Ananthakrishnan et al. 2011). La exposición del intestino a contaminantes ambientales ocurre por el clearance mucociliar del MP de los pulmones y posterior deglución, así como por la ingesta de agua y alimentos contaminados (Beamish et al. 2011); también se han visto efectos a nivel sistémico de los contaminantes gaseosos, induciendo el incremento de citoquinas pro-inflamatorias, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y GM-CSF, así como de células polimorfonucleares en circulación, probablemente debido a una activación de los macrófagos alveolares (Tan et al. 2000; van Eeden et al. 2001). Los contaminantes ambientales pueden inducir una respuesta inflamatoria sobre el intestino por acción directa sobre las células epiteliales, por activación sistémica del sistema inmune o por modulación de la microbiota intestinal (Beamish et al. 2011).

Diferentes trabajos, que estudian el efecto del MP a nivel pulmonar, muestran que la forma en que éste activaría el sistema inmune es vía inflamasoma, en particular activando NLRP3 con producción de IL-18 e IL-1 $\beta$  (Cassel et al. 2008; Dostert et al. 2008; Hornung et al. 2008). Sin embargo, a pesar del incremento observado en la incidencia y la gravedad de los casos de EII,

posiblemente asociados a un incremento en la contaminación ambiental, existen pocos trabajos en la literatura que muestren el efecto directo de la contaminación ambiental sobre la inflamación a nivel intestinal. Uno de ellos se basa en la administración ig de MP a ratones, observándose un incremento de la permeabilidad intestinal, apoptosis de células epiteliales intestinales, y secreción de citoquinas pro-inflamatorias (Mutlu et al. 2011).

Dado que es de nuestro interés evaluar diferentes aspectos de la EC, en primer lugar nos propusimos optimizar el modelo de colitis con TNBS, definiendo dosis y frecuencia de administración de TNBS en nuestras condiciones experimentales para lograr el desarrollo de inflamación similar a la observada en pacientes con EC, para posteriormente evaluar el efecto modulador de la administración de un péptido derivado de amaranto, un alimento que ha mostrado efectos anti-inflamatorios a nivel intestinal *in vitro* e *in vivo*.

Por último, nos planteamos evaluar el efecto pro-inflamatorio de la administración ig de cenizas volcánicas como contaminante ambiental, a raíz del incremento producido en la hospitalización de pacientes con EII agravada en Buenos Aires luego de la erupción del volcán Puyehue en el año 2011.



**OBJETIVOS GENERALES**

- ▣ Optimizar el modelo murino de EII con TNBS previamente descrito, que simule EC en las etapas aguda y crónica.
- ▣ Modular la respuesta inmune establecida en el modelo murino agudo de TNBS por administración de un péptido derivado de amaranto con propiedades anti-inflamatorias.
- ▣ Estudiar el efecto de factores ambientales en el desarrollo del modelo murino de colitis.



# CAPÍTULO 3

## OPTIMIZACIÓN Y MODULACIÓN DE UN MODELO MURINO DE COLITIS





El modelo de colitis inducida con TNBS reproduce bastante ajustadamente lo que ocurre en la inflamación intestinal de pacientes con EC. Para poder evaluar diferentes estrategias que modulen la inflamación establecida, nos propusimos en primer lugar optimizar el modelo de colitis aguda con TNBS en nuestras condiciones experimentales de trabajo. Se evaluaron diferentes dosis de TNBS que en una única instilación i.r. permite inducir un proceso inflamatorio en el colon de los animales. Posteriormente evaluamos diferentes protocolos experimentales para la inducción de un modelo crónico de colitis con fibrosis.

Como mencionamos anteriormente las EII son patologías multifactoriales, que se desarrollan en pacientes genéticamente predispuestos frente a ciertos estímulos ambientales. Los cambios de hábitos alimenticios han aumentado en las últimas décadas el riesgo de padecer alguna de las formas de EII. En particular, se han evidenciado cambios en la microbiota por consumo de proteínas animales y grasas saturadas (Hou et al. 2011; Ng et al. 2013). Por esta razón el consumo de alimentos o infusiones que tengan un efecto anti-inflamatorio o inmunomodulador está siendo estudiado como potenciales alimentos funcionales para estas patologías (Gearry et al. 2009; Hanai & Sugimoto 2009; Wu et al. 2009). El Amaranto presenta propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias. Estudios previos del grupo han comprobado que péptidos derivados de la digestión simulada de proteínas de la semilla tienen efectos anti-inflamatorios sobre células epiteliales intestinales humanas y en el modelo murino de alergia alimentaria (Trabajo de Tesis de Moronta 2015, Moronta et al. 2016). Hemos identificado un péptido derivado de la digestión de proteínas de la semilla de Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*), de secuencia SEDIKE, al que llamaremos aquí P2, que modula la vía de señalización de NFκB *in vitro* e *in vivo*. Además la administración de dicho péptido por vía oral en el modelo de alergia a PLV IgE-mediado logra reducir los signos clínicos, la prueba cutánea y la respuesta inmune humoral y celular, suprimiendo la secreción de IgE, IL-5 e IL-13. Sin embargo, desconocemos exactamente el mecanismo molecular de modulación del SIM.

Siendo que esta patología, y en particular este modelo de colitis, se caracteriza por la inducción del factor de transcripción NFκB en el proceso inflamatorio intestinal (Neurath et al 2000), hemos estudiado el rol modulador de este péptido en el modelo de colitis experimental. Para ello administramos el péptido P2 por vía ig, en un protocolo de administración optimizado.

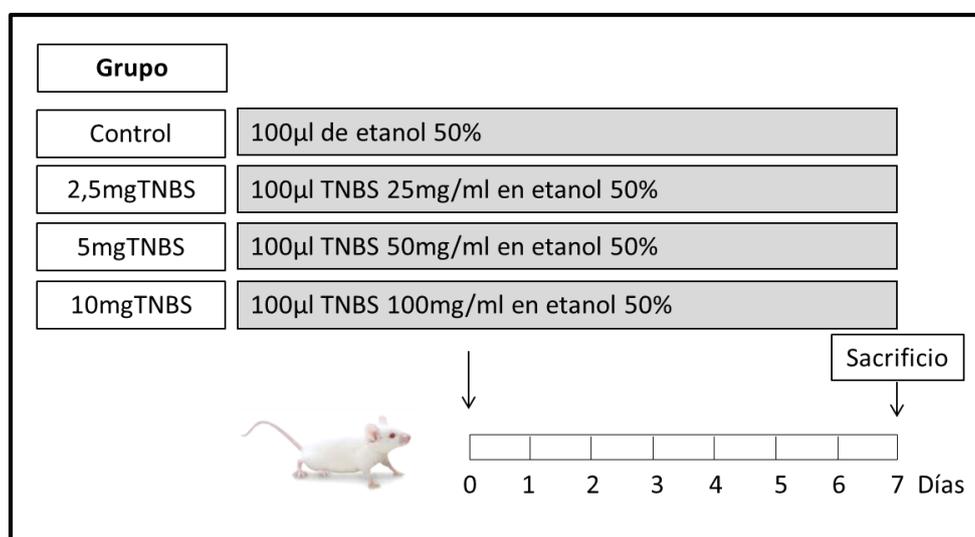
### II.3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ▣ Optimizar un modelo murino de colitis aguda, evaluar la respuesta inmunológica establecida.
- ▣ Optimizar un modelo murino de colitis crónica, con fibrosis intestinal, evaluar la respuesta inmunológica establecida.
- ▣ Modular la respuesta inmunológica establecida en el modelo agudo de colitis, utilizando el péptido P2 de Amaranto.

## II.3.2 RESULTADOS

### II.3.2.1 Modelo agudo de colitis

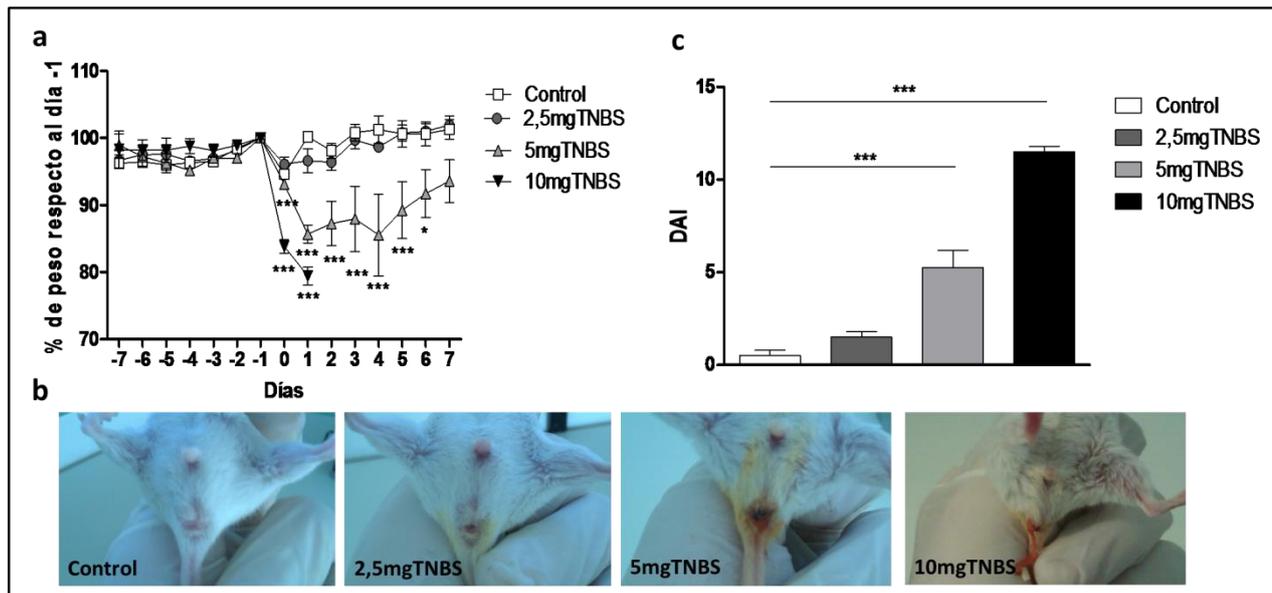
Se ensayaron diferentes dosis de TNBS en administraciones i.r. con el fin de establecer la dosis adecuada para la inducción de colitis en ratones BALB/c de 6 semanas de edad. Se instilaron 100µl de una solución de TNBS de concentración 25, 50 ó 100mg/ml (lotes 2,5mgTNBS, 5mgTNBS ó 10mgTNBS respectivamente) en etanol al 50% (**Esquema 3**). El lote Control recibió sólo 100µl del vehículo (etanol 50%). Los pesos fueron registrados diariamente en el mismo horario durante la semana previa y posterior a la instilación. Se evaluaron además parámetros clínicos como diarrea, proctitis y presencia de sangre en materia fecal. Los pesos se registraron como porcentaje respecto al día -1.



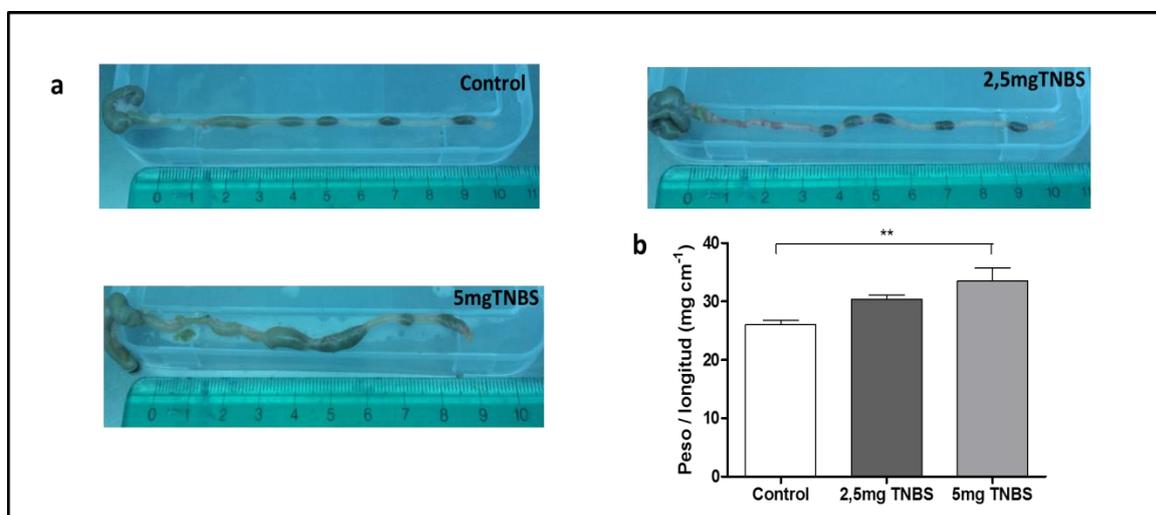
**Esquema 5. Protocolo de inducción de colitis aguda.** El día 0 los diferentes lotes recibieron una única dosis de 2,5mg 5mg o 10mg de TNBS. El grupo control sólo recibió una solución de etanol 50%. 12h antes de la instilación se retiró el alimento. El protocolo se repitió al menos dos veces.

Como puede verse en la **Figura 30a**, los animales instilados con 2,5mg de TNBS mostraron un leve descenso del peso corporal dentro de las 24-48hs posteriores a la instilación. Detectamos además materia fecal blanda en algunos animales de este lote. En cuanto a los animales que recibieron 5mg de TNBS, el descenso de peso fue significativo en los 6 días posteriores a la instilación; se detectó además diarrea acuosa y sangrado en algunos animales de este lote. En la **Figura 30b** se muestran imágenes representativas de animales de los diferentes lotes, observándose que los animales que recibieron 5 ó 10mg de TNBS mostraron proctitis, sangrado y diarrea. Considerando los parámetros enunciados en la **Tabla 2** se determinó el DAI, que mostró un incremento significativo en los animales de los lotes 5mgTNBS y 10mgTNBS respecto del lote

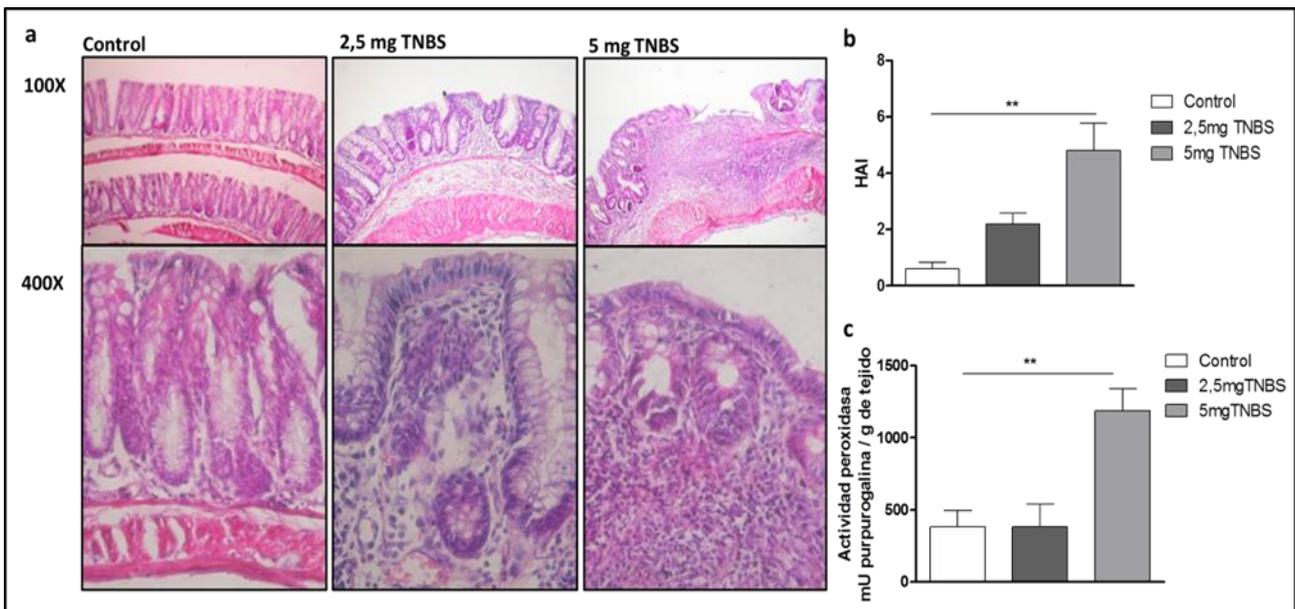
control (**Figura 30b**). Por último, el lote que recibió 10mg de TNBS mostró un rápido descenso de peso y sangrado, y los animales murieron entre las 24 y 48 horas posteriores a la instilación.



Luego del sacrificio se extrajo el colon, se midió su longitud y, luego de limpiarlo, se pesó. En la **Figura 31a** se muestran imágenes representativas del colon de animales de diferentes lotes. Los ratones que recibieron 5mg de TNBS mostraron acortamiento y engrosamiento del colon, que se cuantificó calculando la relación peso/longitud. Como se puede evidenciar en la **Figura 31b**, el colon de los animales que recibieron 5mg de TNBS mostró una relación peso/longitud significativamente mayor respecto al lote control, probablemente originado por el proceso inflamatorio.



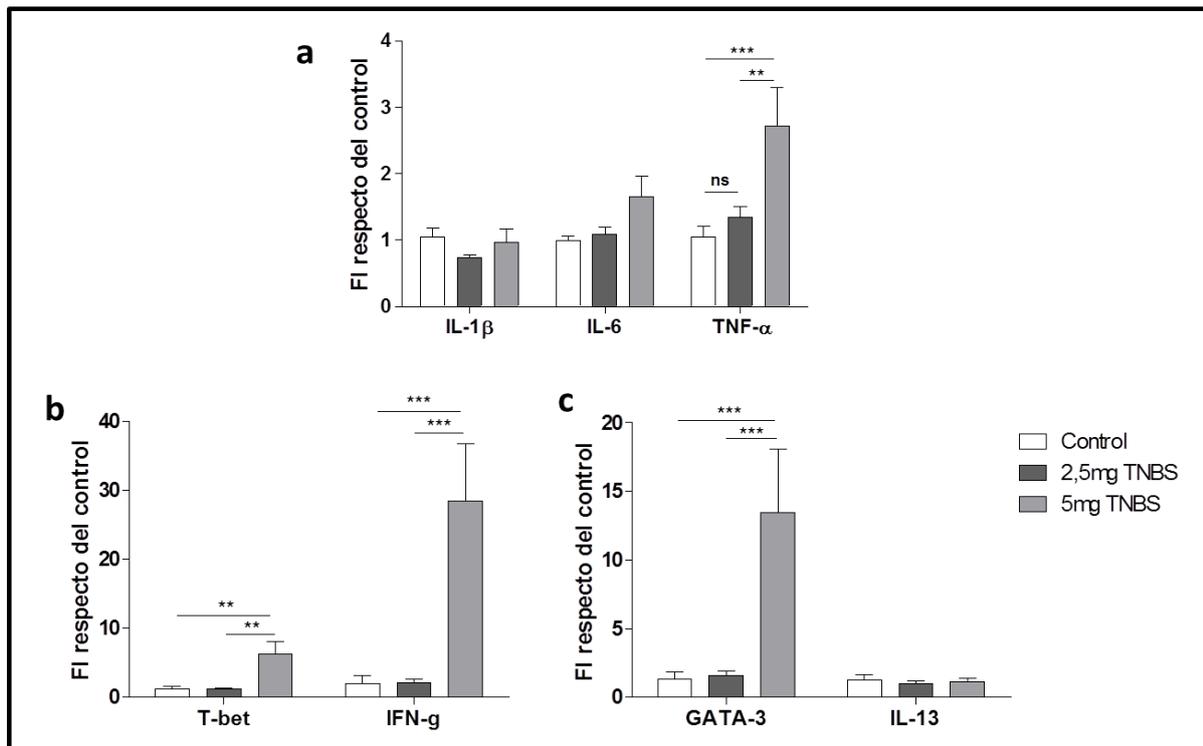
A continuación evaluamos dicha inflamación a nivel microscópico sobre cortes histológicos teñidos con H&E. En base al daño epitelial e infiltrado celular se estableció un puntaje de HAI, según los parámetros mostrados en la **Tabla 3**. En la **Figura 32a**, se muestran imágenes representativas de los cortes histológicos de colon de los animales de los diferentes lotes; los animales del lote 5mgTNBS mostraron un marcado infiltrado de células mononucleares y polimorfonucleares en todo el espesor de la pared intestinal; también se observó pérdida de células caliciformes en comparación con el lote control, edema y pérdida de criptas, lo cual arrojó valores de HAI entre 5 y 7 (**Figura 32b**). En el caso del lote que recibió 2,5mgTNBS se obtuvo un infiltrado más leve, con edema y pérdida de células caliciformes, pero afectó sólo la capa epitelial y submucosa, sin afectar la muscular. Esto nos muestra que la administración de 5mg de TNBS genera un daño local comparable al observado en pacientes con EC. Como marcador de inflamación asociado al infiltrado por neutrófilos, determinamos la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO). En la **Figura 32c**, se observa un incremento significativo de la actividad de esta enzima en el lote 5mg TNBS con respecto al lote control.



**Figura 32. Evaluación histológica del colon y de la actividad MPO.** (a) Imágenes representativas de los cortes teñidos con H&E en diferentes aumentos. (b) Índice de actividad histológica, puntaje establecido teniendo en cuenta la **Tabla 3**. (c) Determinación de la actividad de la enzima MPO en tejido colónico, en referencia a peroxidasa comercial. \*\*p<0,01 ANOVA de simple entrada.

Con el fin de evaluar la respuesta inmune asociada a este proceso inflamatorio, determinamos la expresión génica de citoquinas y factores de transcripción de interés por RT-qPCR. En particular estudiamos los genes que codifican para citoquinas de la inmunidad innata (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ) y factores de transcripción y citoquinas asociados una respuesta Th1 (T-bet e IFN- $\gamma$ ) y Th2 (GATA-3 e IL-13).

En la **Figura 33a**, se observa un incremento significativo de los niveles del transcripto correspondiente a TNF- $\alpha$  en las muestras de colon de ratones del lote 5mgTNBS, con respecto a los lotes control y 2,5mgTNBS; como así también un leve aumento, aunque no significativo, en los niveles de mRNA de IL-6. En cuanto a los niveles de transcripto de IL-1 $\beta$ , no se observan diferencias entre los lotes. Al evaluar la respuesta inmune adaptativa, detectamos un incremento significativo en los transcritos de T-bet e IFN- $\gamma$  en el lote 5mgTNBS con respecto al control (**Figura 33b**), así como un del factor de transcripción GATA-3; sin embargo, no se observó incremento de IL-13 (**Figura 33c**).



**Figura 33. Cuantificación de transcritos correspondientes a citoquinas y factores de transcripción en colon por qPCR.** Incremento relativo de los niveles de mRNA de citoquinas y factores de transcripción asociados a la inmunidad innata (a), a un perfil Th1 (b) y a un perfil Th2 (c), respecto al lote control.

Finalmente evaluamos la concentración proteica de citoquinas de la inmunidad innata, Th1 y Th2 (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-13, respectivamente). En la **Figura 34**, se puede apreciar que, a diferencia de los niveles de mRNA de IL-1 $\beta$ , los niveles proteicos están incrementados en el lote que recibió 5mg de TNBS en comparación con el lote control, lo cual es esperable ya que IL-1 $\beta$  se sintetiza como una pre-proteína que es luego clivada en presencia de un estímulo inflamatorio antes de su secreción. En cuanto a IFN- $\gamma$  también se observa un incremento significativo de los niveles proteicos al igual que los niveles de mRNA, y por último, no se observan diferencias en los niveles de IL-13.

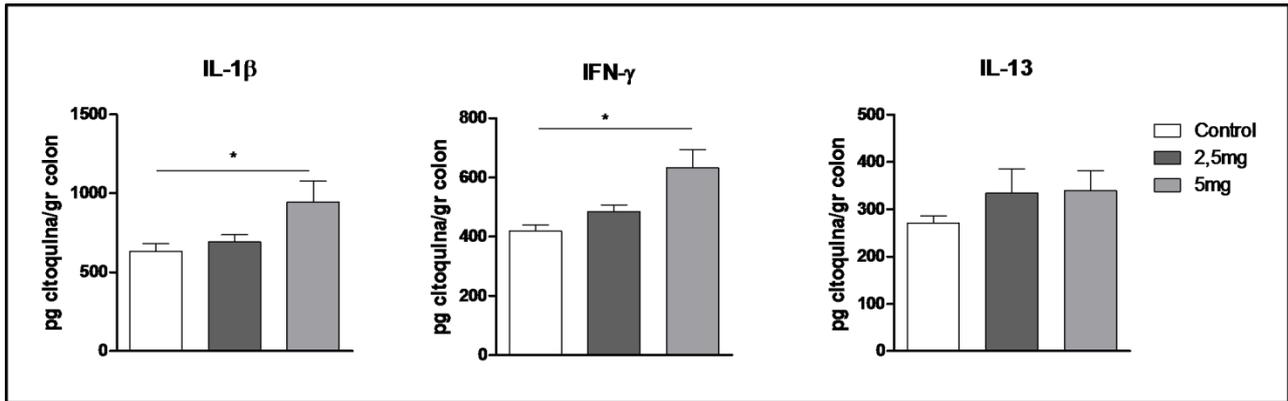


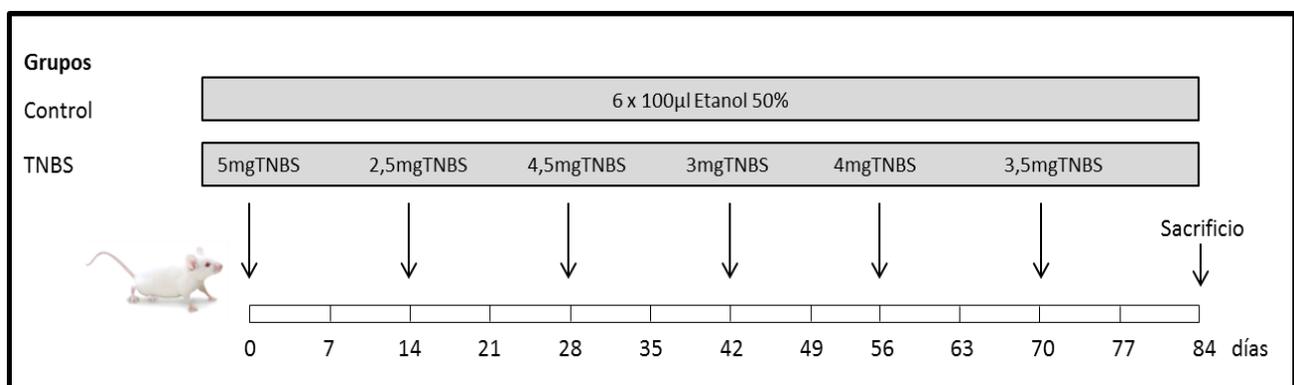
Figura 34. Cuantificación de citoquinas en colon por ELISA. Niveles proteicos de citoquinas en colon expresados como pg de citoquina/gr de tejido, determinados por ELISA. \*  $p < 0,05$  ANOVA de simple entrada.

Estos resultados en su conjunto, reflejan una marcada respuesta inflamatoria transmural (infiltrado mononuclear), con presencia de células mieloides, determinado por la actividad de MPO. En forma complementaria, se observó un marcado incremento en la expresión génica de citoquinas de la inmunidad innata y de citoquinas de perfil Th1 en el lote 5mgTNBS.

Dados los signos clínicos, el infiltrado celular observado, y el perfil de citoquinas inducido, podemos concluir que la dosis ideal para el desarrollo de un modelo agudo de colitis que simule la EC en nuestras condiciones experimentales es una única instilación intra-rectal de 5mg de TNBS.

### II.3.2.2 Modelo crónico de colitis

Habiendo establecido la dosis adecuada para el modelo agudo de colitis, procedimos a optimizar el modelo crónico. En este caso el objetivo fue generar una inflamación crónica que derive en fibrosis. Para ello fue necesario intercalar períodos de inflamación con períodos de recuperación, tal como se observa en los pacientes con EC. Luego de varios ensayos, logramos la inducción de fibrosis siguiendo el protocolo que se muestra en el Esquema 6.



Esquema 6. Protocolo de inducción de fibrosis intestinal. Los días 0, 14, 28, 42, 56 y 70, los animales de los diferentes lotes recibieron 6 dosis de 100µl de TNBS en etanol al 50%, una cada 15 días, en concentraciones variables que oscilaron entre 2,5 y 5mg de TNBS; el lote control recibió 6 dosis 100µl de etanol al 50% según correspondiera.

Ratones BALB/c de 6 semanas de edad recibieron por vía i.r. 6 dosis de 100µl de etanol 50% (lote control), o de TNBS en etanol 50% de diferentes concentraciones que oscilaron entre 2,5 y 5mg (lote TNBS); las diferentes instilaciones se realizaron cada 15 días. Los pesos fueron monitoreados 3 veces por semana, y se analizaron signos de diarrea y sangrado para establecer el DAI en los diferentes períodos.

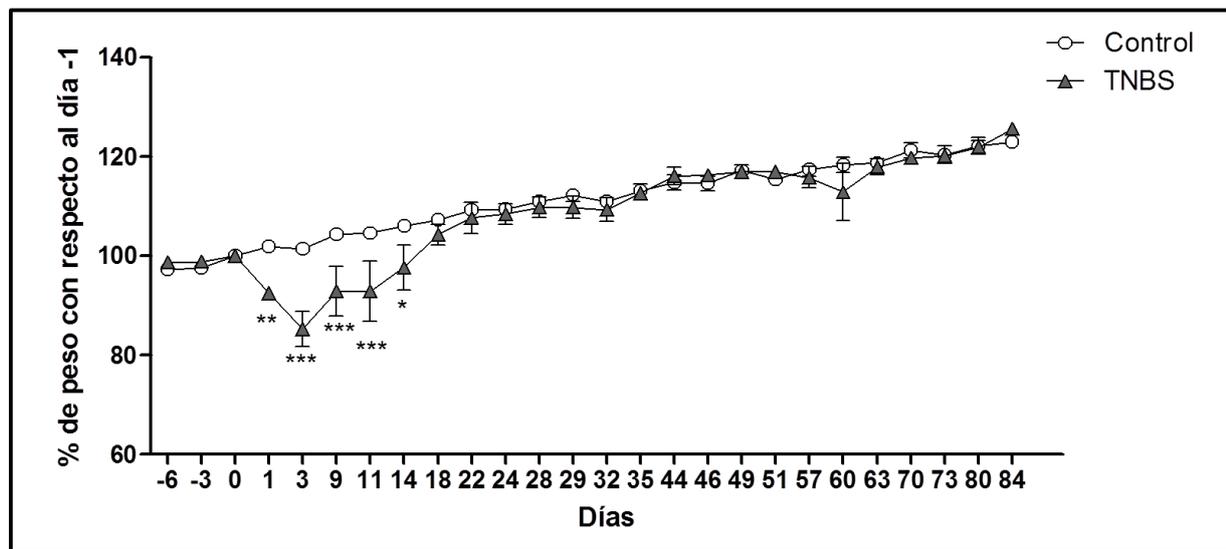
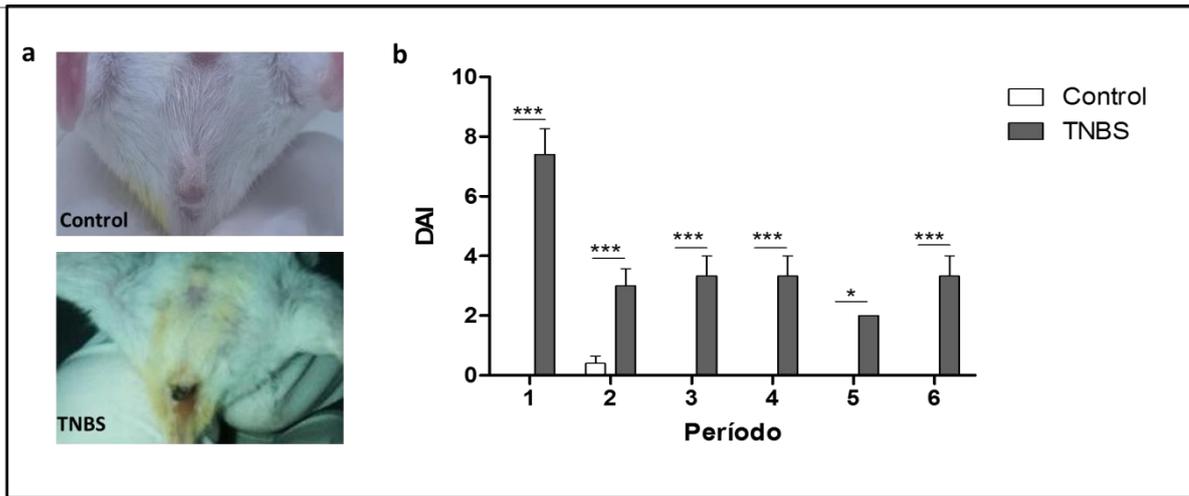


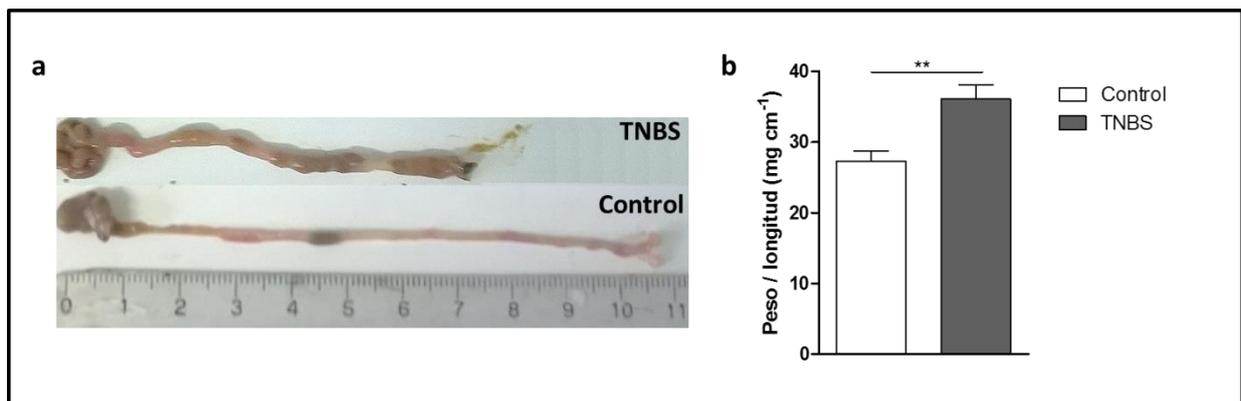
Figura 35. Variación del peso corporal respecto al día 0. Porcentaje de variación del peso de los animales de lotes control y TNBS respecto al día -1. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . ANOVA de doble entrada.

En la **Figura 35** podemos observar que los animales del lote que recibió TNBS mostraron un descenso significativo del peso luego de la primera instilación, que fueron recuperando progresivamente. El peso se estabilizó en la semana 3 y luego no mostraron diferencias significativas con respecto a los animales del lote control. Al evaluar los signos clínicos observamos que, a pesar de no haber diferencias significativas en el peso corporal con respecto al lote control, los animales del lote TNBS mostraron signos de diarrea y sangrado y baja movilidad (**Figura 36a**). Con lo cual, teniendo en cuenta los parámetros indicados en la **Tabla 2**, establecimos un puntaje de DAI en cada período instilación/recuperación, el cual mostró un marcado incremento en el lote que TNBS en comparación con el lote control, debido a la presencia de sangrando y signos de diarrea (presencia de materia fecal en la zona perianal). El mayor puntaje fue luego de la primera instilación que coincidió con la dosis más alta de TNBS, luego se siguieron viendo signos clínicos, pero en forma más leve y constante (**Figura 36b**). El lote control no sólo no mostró descenso de peso corporal, sino que tampoco presentó signos de sangrado ni de diarrea.



**Figura 36. Índice de actividad de la enfermedad, DAI.** (a) Imágenes representativas de los animales de los diferentes lotes, se observan restos de materia fecal en la zona perianal de los animales que recibieron TNBS. (b) Puntaje asignado teniendo en cuenta los parámetros indicados en la **Tabla 2**. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  ANOVA de doble entrada.

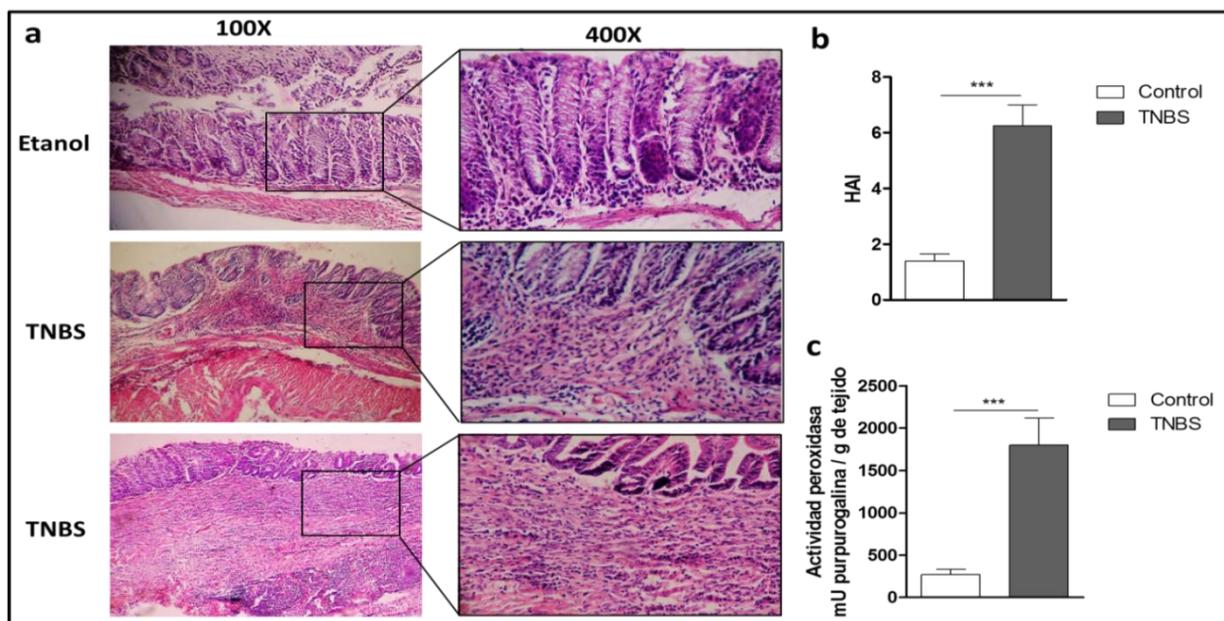
Luego de dos semanas de la última instilación, los animales fueron sacrificados, se extrajo el colon y se determinó su longitud y su peso. Se tomaron muestras para histología, extracción de RNA, extracción de proteínas y determinación de la actividad de la enzima MPO. Como se muestra en la **Figura 37a**, el colon de los animales que recibieron TNBS mostró acortamiento en comparación con el colon de los animales control, y un engrosamiento de la pared. Al calcular la relación peso/longitud del colon observamos un incremento significativo en el lote TNBS respecto al control (**Figura 37b**).



**Figura 37. Evaluación macroscópica del colon.** (a) Imágenes representativas, aspecto y longitud de colon de animales de los diferentes lotes. (b) Relación peso/longitud de colon. \*\* $p < 0,01$  test t de student.

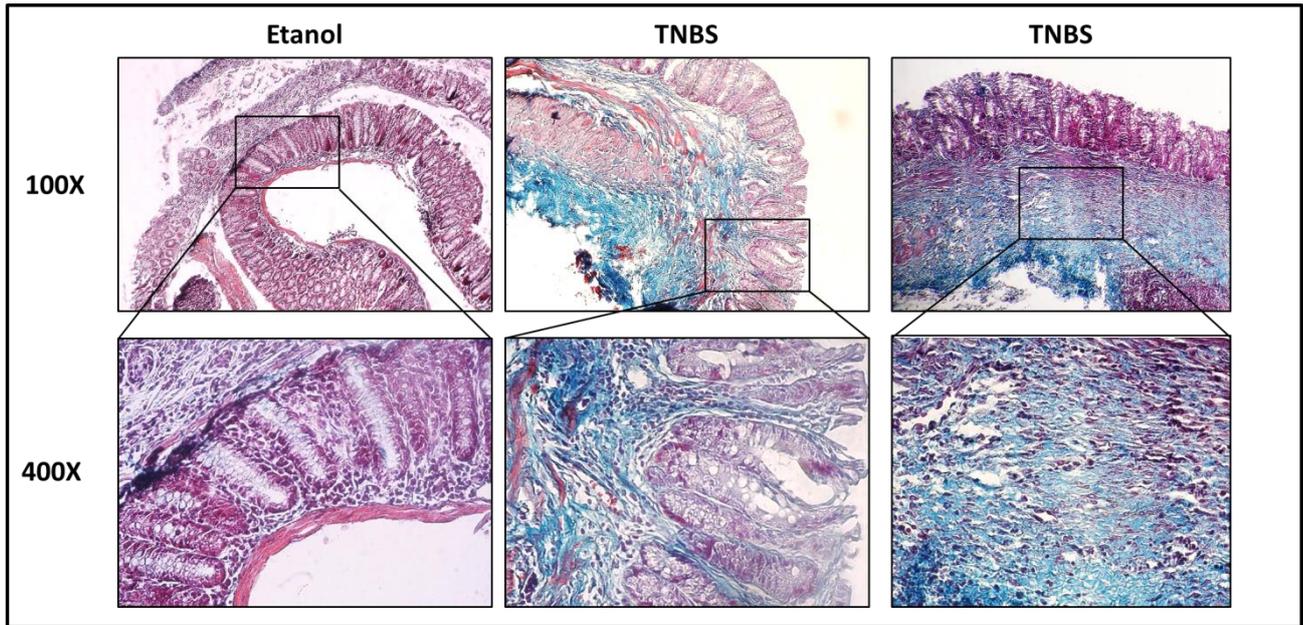
Luego de limpiarlos, pudimos observar que el colon de los animales que habían recibido TNBS no se expandía al instilar PBS, y al eliminar los restos de materia fecal no se veía disminución de la luz intestinal, lo cual asociamos a una pérdida de elasticidad probablemente causada por el desarrollo de fibrosis; lo mismo se observa en el intestino de pacientes con EC luego de extirparlos.

Para evaluar el daño tisular microscópico calculamos el HAI sobre cortes de colon teñidos con H&E. En la **Figura 38** se puede observar un marcado engrosamiento de la pared intestinal, en particular de la capa muscular, en los animales del lote TNBS, en comparación con los animales del lote control; en la zona submucosa de los animales del lote TNBS se observa infiltrado, edema y mayor síntesis de matriz extracelular (tinción rosada intensa). Al observar con mayor aumento se evidenció la presencia de células con forma de huso, compatibles con la morfología de fibroblastos. En cuanto a la estructura del epitelio intestinal, se observó que el lote que recibió TNBS presentó una marcada alteración de dicha estructura, con pérdida de células caliciformes, e incluso pérdida de criptas. Al calcular el HAI observamos que los animales tratados presentaron un HAI significativamente mayor en comparación con los controles (**Figura 38b**). Adicionalmente determinamos la actividad de la enzima MPO en colon y evidenciamos un marcado incremento de la actividad de esta enzima, asociada a un infiltrado de células mieloides, en el tejido de los animales que recibieron TNBS (**Figura 38c**).



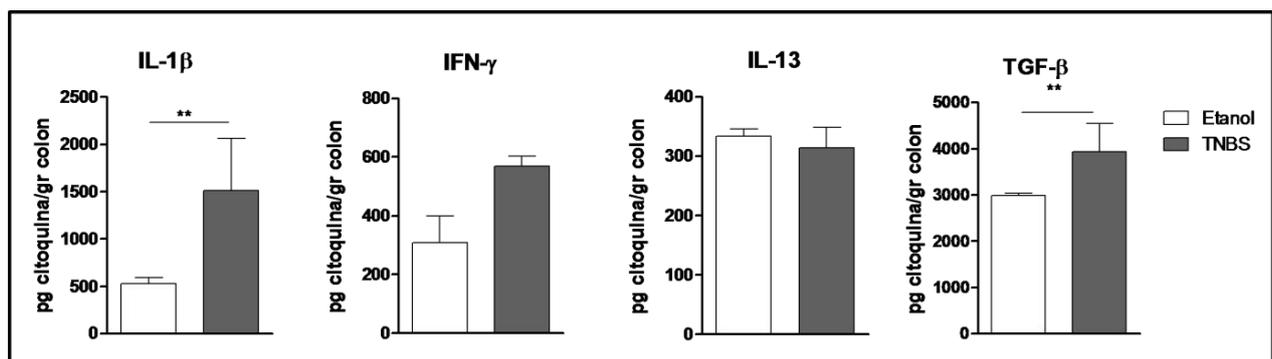
**Figura 38. Evaluación histológica del colon y de la actividad MPO.** (a) Imágenes representativas de las tinciones con Hematoxilina y Eosina de ambos lotes. (b) Gráfico de HAI calculado a partir de los parámetros mostrados en la tabla 3. (c) Actividad de la enzima MPO en tejido colónico. \*\*\* $p < 0,001$ . Test t de Student.

Para confirmar el desarrollo de fibrosis en el colon, realizamos una tinción tricrómica de Masson, que pone en evidencia la presencia de fibras de colágeno (coloración verde azulada). Como se observa en la **Figura 39**, los animales que recibieron TNBS mostraron una fuerte coloración verde azulada en todo el espesor de la pared intestinal, concordantemente con la presencia de células en forma de huso tal como se observó en los cortes teñidos con H&E.



**Figura 39. Evaluación de fibrosis intestinal por tinción tricrómica de Masson.** Imágenes representativas de tinciones tricrómicas en cortes de colon de animales de los diferentes lotes (100X y 400X). Vemos la abundante presencia de fibras de colágeno en las secciones de colon de los animales que recibieron TNBS.

Para evaluar la respuesta inmune establecida, determinamos los niveles de citoquinas en el colon. Además de las citoquinas evaluadas en el modelo agudo, determinamos los niveles proteicos de TGF- $\beta$ . Como se observa en la **Figura 40**, hay un marcado incremento en los niveles de IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  en los animales que recibieron TNBS, no así en los niveles de IL-13 que son bajos en ambos lotes. Por otro lado la concentración de TGF- $\beta$  es significativamente mayor en los animales del lote TNBS, lo cual está asociado a la fibrosis evidenciada macroscópicamente y microscópicamente.



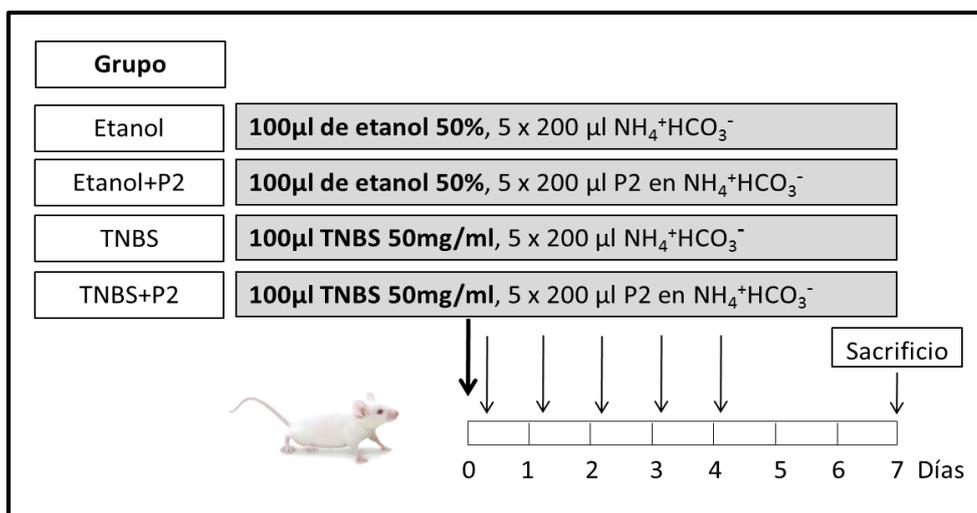
**Figura 40. Cuantificación de citoquinas en colon por ELISA.** Concentración de citoquinas en colon expresado como pg citoquina/ gr de colon. \*\*p<0,01. Test t de Student.

Con estos resultados podemos concluir que logramos optimizar un modelo crónico de colitis, con desarrollo de fibrosis intestinal, que afecta todo el espesor de la pared, y con la inducción de una respuesta inmune Th1, similar a lo observado en pacientes con EC. Cabe aclarar que niveles elevados de IL-13 sólo han sido detectados en pacientes con CU.

**II.3.2.3 Modulación del modelo de colitis aguda empleando péptidos de Amaranto**

Una vez establecidas las condiciones para el desarrollo del modelo de colitis aguda y de fibrosis intestinal, procedimos a evaluar el efecto anti-inflamatorio del péptido sintético de Amaranto, denominado P2 y de secuencia SSEDIKE, administrado por vía ig, como estrategia para la modulación de la inflamación generada.

Ratones BALB/c de 6 semanas de edad recibieron el día 0, por vía i.r., 100µl de una solución 50mg/ml de TNBS en etanol 50%, o de etanol 50% como control. Al mismo tiempo se administró durante 5 días consecutivos desde el día 0, por vía oral, 200µl de una solución 500µg/ml de P2 en buffer bicarbonato pH8, o sólo buffer bicarbonato como control; 30 minutos antes de la administración del péptido se administraron 200µl de buffer bicarbonato para aumentar el pH del estómago a fin de asegurar que el péptido llegue intacto al intestino (**Esquema 7**).

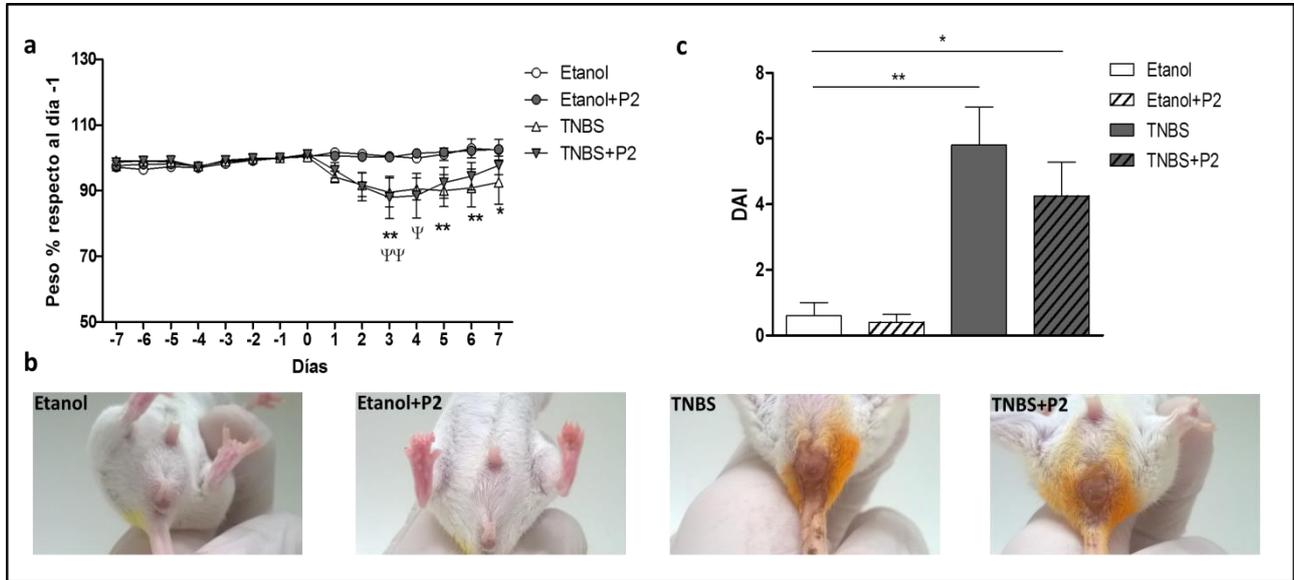


**Esquema 7. Protocolo de modulación de colitis aguda con P2.** El día 0 se administró por única vez una solución de etanol 50%, o de TNBS 50mg/ml en etanol 50% por vía intra-rectal. Luego de la instilación, se administraron 5 dosis por vía oral 200µl de una solución 500µg/ml en buffer bicarbonato de P2 (Etanol+P2 y TNBS+P2), o sólo buffer (Etanol y TNBS).

Los animales fueron pesados diariamente la semana previa y posterior a la instilación, y se evaluó el estado general, la presencia de sangrado y la consistencia de la materia fecal. En base a esos datos se graficaron los pesos como porcentaje respecto al día -1 y se calculó el índice DAI (**Figura 41**).

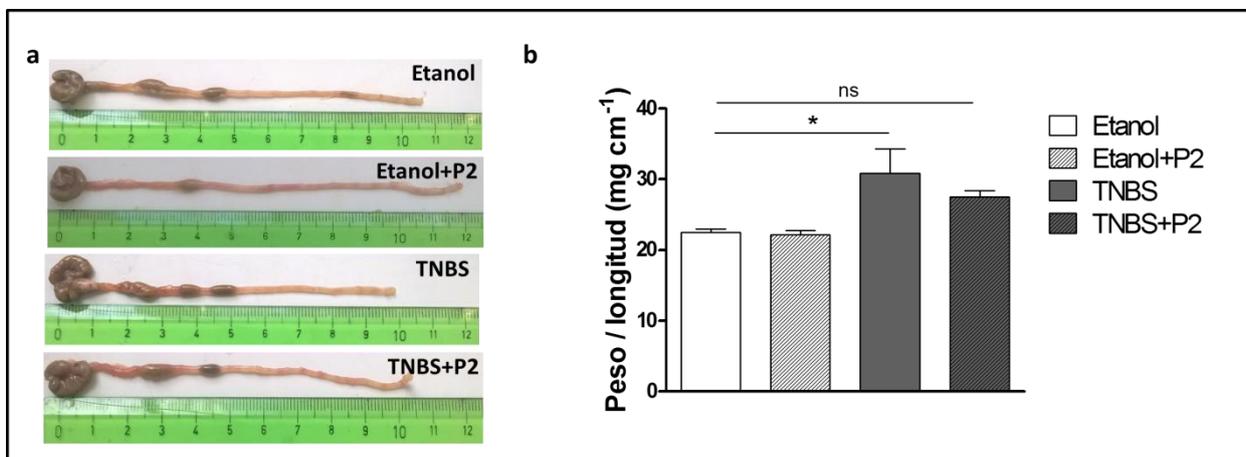
En la **Figura 41a**, se observa que los animales del lote TNBS+P2, mostraron una recuperación más rápida del peso corporal en comparación con los animales del lote TNBS. Por otro lado al evaluar la consistencia de la materia fecal y el sangrado, observamos que, si bien el lote TNBS+P2 mostró signos de diarrea los primeros días, estos signos fueron desapareciendo en

forma progresiva, y no mostraron signos de sangrado como sí lo hicieron los animales del lote TNBS (**Figura 41b**), es por eso que la diferencia de DAI del lote TNBS+P2 con respecto al lote control (Etanol) es menor que la diferencia entre el lote TNBS y el control (etanol) (**Figura 41c**).



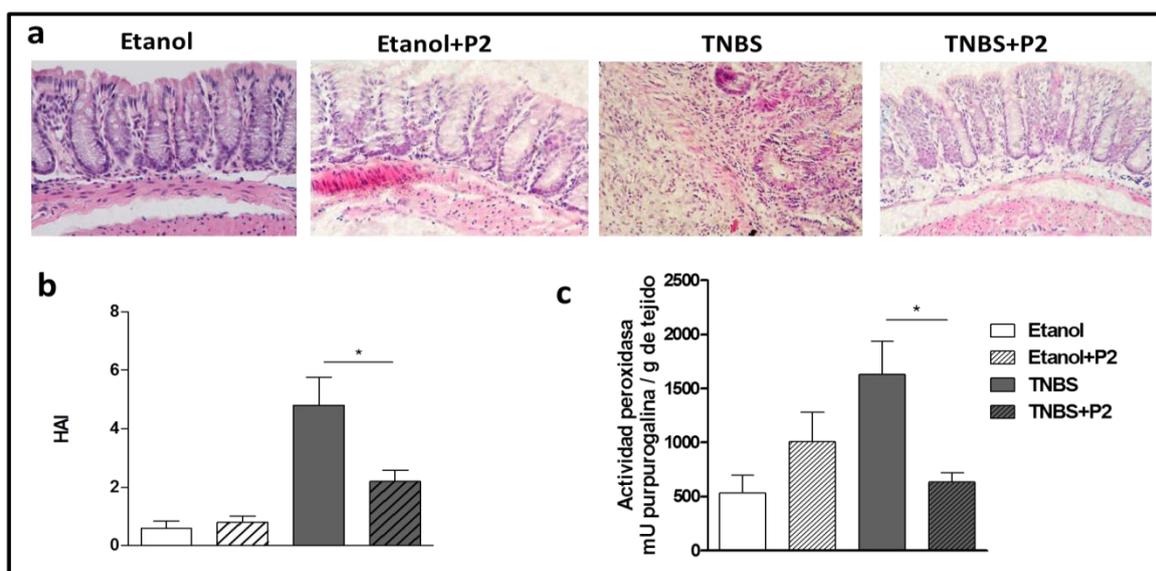
**Figura 41. Variación de pesos corporales y DAI** (a) Variación de pesos corporales respecto al día -1. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  lote TNBS vs Etanol.  $\Psi p < 0,05$   $\Psi\Psi p < 0,01$  lote TNBS+P2 vs Etanol. ANOVA de doble entrada. (b) Imágenes representativas de los animales de los diferentes lotes, se observan signos de diarrea y proctitis en los animales del lote TNBS, y signos más leves en el lote TNBS+P2. (c) Índice de actividad de la enfermedad (DAI), valores calculados teniendo en cuenta la **Tabla 2**. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . ANOVA de simple entrada.

Al día 7 los animales fueron sacrificados y se evaluó el peso y la longitud del colon. En la **Figura 42** se muestran imágenes representativas de los animales de los diferentes lotes y del colon, así como la relación peso/longitud del colon. En la **Figura 42a** observamos un menor acortamiento del colon en el lote TNBS+P2 respecto del lote TNBS, y al calcular la relación peso/longitud del colon pudimos evidenciar que la diferencia entre los lotes TNBS y Etanol es significativa, no así la diferencia entre TNBS+P2 y Etanol (**Figura 42b**).



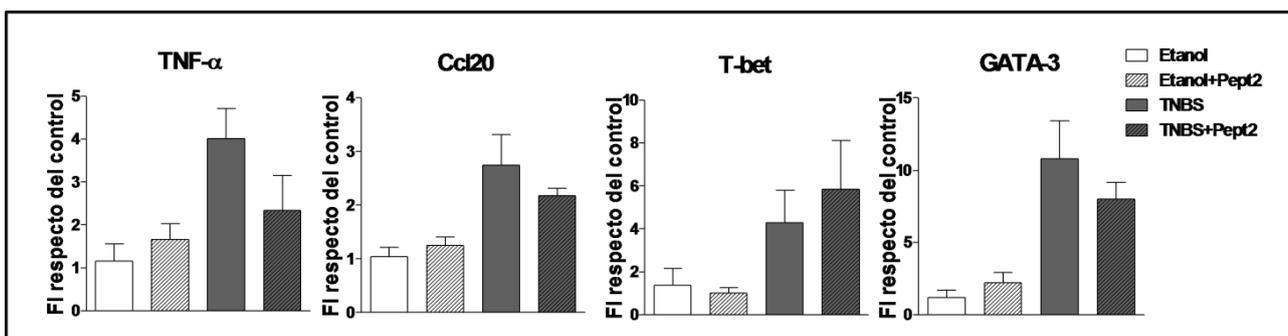
**Figura 42. Evaluación macroscópica del colon.** (a) Imágenes representativas de la longitud del colon de los animales de los diferentes lotes (b) Peso/longitud de colon expresado en  $\text{mg cm}^{-1}$  \*  $p < 0,05$  ANOVA de entrada simple.

Al evaluar el daño tisular a nivel microscópico observamos que los animales tratados con el péptido P2 mostraron un menor infiltrado y recuperación de criptas con respecto al lote no tratado (TNBS+P2 vs TNBS) (**Figura 43a**). Luego establecimos el índice de actividad histológica y evidenciamos que los animales tratados mostraron un valor menor de HAI en comparación con los animales del lote TNBS (**Figura 43b**), acompañado de una disminución de la actividad de la enzima MPO (**Figura 43c**), con respecto a los animales del lote TNBS, mostrando valores similares al lote control (Etanol).



**Figura 43. Evaluación histológica del colon y de la actividad MPO.** (a) Imágenes representativas de las tinciones con H&E de cortes de colon. (b) Gráfico de HAI calculado a partir de los parámetros mostrados en la **Tabla 3**. (c) Actividad de la enzima MPO en tejido colónico. \* $p < 0,05$ . ANOVA de simple entrada.

Por otro lado, al evaluar la modulación de la respuesta inmune a nivel molecular determinando la expresión génica de diferentes citoquinas y factores de transcripción en el colon, observamos que, si bien las diferencias no son estadísticamente significativas, hay una tendencia en el lote TNBS+P2 a disminuir la expresión génica de TNF- $\alpha$ , Ccl20 y GATA-3, en comparación con el lote no tratado (TNBS) (**Figura 44**). Estos datos indicarían una tendencia a disminuir la secreción de citoquinas pro-inflamatorias.



**Figura 44. Cuantificación de transcriptos correspondientes a citoquinas, quimocinas y factores de transcripción en colon por qPCR.** Incremento relativo de los niveles de mRNA de citoquinas y factores de transcripción asociados a la inmunidad innata (TNF- $\alpha$  y Ccl20), o a un perfil Th1 (T-bet) o Th2 (GATA-3).

Finalmente determinamos la concentración de citoquinas en tejido por ELISA, y observamos que el tratamiento con el péptido de Amaranto (lote TNBS+P2) logró reducir los niveles de IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  en colon en forma significativa, en comparación con el grupo no tratado (TNBS). En cuanto a los niveles de IL-13, a pesar de haber detectado un incremento en los niveles de transcritos de GATA-3 en los animales que recibieron TNBS, con una disminución de los mismos por el tratamiento con P2, no detectamos diferencias significativas entre los diferentes lotes (Figura 45).

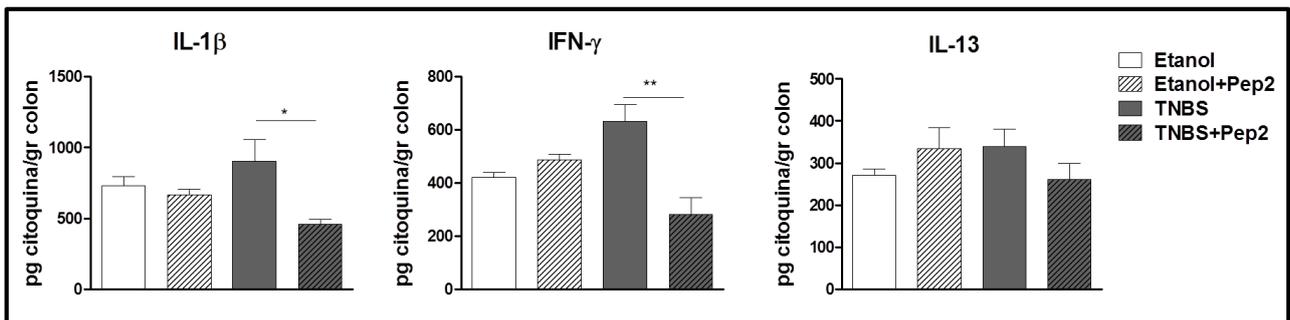


Figura 45. Cuantificación de citoquinas en colon por ELISA. Concentración de citoquinas en colon expresado como pg citoquina/ gr de colon. \*p<0,05, \*\*p<0,01. ANOVA de entrada simple.

Con los resultados aquí mostrados, podemos concluir que efectivamente, la administración por vía ig del péptido P2 de Amaranto logró modular la respuesta inflamatoria inducida por la vía i.r., mejorando los signos clínicos, reduciendo el infiltrado celular y la actividad de la enzima MPO, y también disminuyendo los niveles de citoquinas pro-inflamatorias.

Ensayos posteriores nos permitirán evaluar si el efecto es ejercido en forma local sobre los colonocitos o si se logra generar una modulación a nivel de intestino delgado que induzca un estado modulador a nivel sistémico, revirtiendo el proceso inflamatorio en colon.

### II.3.3 DISCUSIÓN

En esta etapa del trabajo logramos optimizar dos modelos de colitis, estableciendo las dosis y frecuencias óptimas en nuestras condiciones experimentales de trabajo. En el modelo de colitis aguda concluimos que la administración de una única dosis i.r. de 5mg de TNBS induce un proceso inflamatorio que se ajusta a lo observado en pacientes con EC: descenso del peso corporal, signos de diarrea, y presencia de sangre en materia fecal. A nivel histológico se observó un incremento del infiltrado mononuclear transmural, pérdida de células caliciformes y criptas, probablemente aumento de neutrófilos por el incremento marcado de la MPO, y presencia de edema. A nivel molecular detectamos un incremento significativo en el transcripto de TNF- $\alpha$ , con una tendencia al incremento de los niveles de mRNA de IL-6; al evaluar la respuesta inmune adaptativa evidenciamos una respuesta de perfil Th1, con un incremento significativo de los niveles de mRNA de T-bet e IFN- $\gamma$ . Todos estos datos mostraron que tanto histológicamente como a nivel molecular, la patología inducida es similar a lo observado en pacientes con EC, y difiere de la observada en pacientes con CU.

Por otro lado optimizamos la dosis y frecuencia de administración de TNBS, necesarias para el desarrollo de un modelo crónico de colitis. El protocolo aplicado, indujo el desarrollo de un tejido cicatrizal que terminó derivando en fibrosis intestinal, con engrosamiento y pérdida de elasticidad y presencia de engrosamiento de la capa muscular. Además observamos un incremento de producción de matriz extracelular y presencia de fibroblastos. Siendo la fibrosis intestinal una de las complicaciones más comunes y severas en los pacientes con EC, y sin que se haya logrado reducir el número de paciente que derivan en estenosis y cirugía, a pesar de los avances en los tratamientos anti-inflamatorios e inmunosupresores y su temprana implementación (Cosnes et al. 2005; Bettenworth & Rieder 2014), hemos logrado establecer este modelo de fibrosis intestinal, que nos permitirá contar con una herramienta biológica para evaluar tratamientos anti-fibrogénicos.

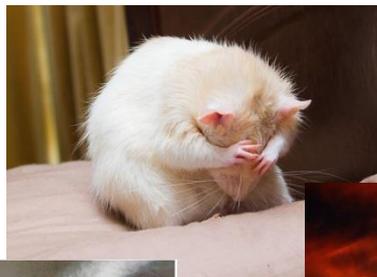
En esta sección nos propusimos además, modular la inflamación establecida en el modelo de colitis aguda inducida por TNBS. Es sabido que en este modelo el factor de transcripción NF $\kappa$ B es fuertemente activado (Neurath et al 1996), y en varios trabajos se ha planteado como estrategia terapéutica bloquear la traslocación al núcleo de componentes de esta vía (Segain et al. 2000; Lahat et al. 2007; Hanai & Sugimoto 2009; Sohub et al. 2015). Es por esto que, sabiendo por datos previos que el péptido derivado de Amaranto de secuencia SSEDIKE logra modular esta vía

de transcripción en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Moronta et al. 2016), planteamos el empleo del mismo para modular la colitis en los ratones. Como pudimos evidenciar, la administración ig del P2 de Amaranto a ratones previamente instilados con TNBS permitió que recuperaran el peso en forma más rápida que los animales no tratados, reducir la relación peso/longitud del colon, el DAI y el HAI. Observamos que los animales tratados presentan una disminución en el infiltrado celular en el colon y una disminución del edema, con una disminución en la actividad de la enzima MPO. Finalmente a nivel molecular, el tratamiento con P2 indujo una disminución, aunque no significativa, en la expresión génica de TNF- $\alpha$ , Ccl20 y GATA-3, y a nivel proteico detectamos una disminución significativa de IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ , en comparación con los animales no tratados. Con estos resultados podemos concluir que el tratamiento oral con P2 logró modular la inflamación aguda del colon. Estos resultados junto con los obtenidos previamente por el grupo, alientan al empleo de este péptido o de hidrolizados de Amaranto, como un alimento funcional para prevenir o revertir un proceso inflamatorio en el intestino delgado o en el colon.



# CAPÍTULO 4

INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES SOBRE LA INFLAMACIÓN INTESTINAL EN EL MODELO DE COLITIS





Como mencionamos anteriormente, los factores ambientales como la alimentación, el estrés, los medicamentos, el tabaco y la contaminación ambiental contribuyen como factores disparadores de las EII en individuos genéticamente predispuestos. Todos estos factores pueden actuar directamente sobre las células epiteliales intestinales, o modificar la microbiota intestinal, alterando en forma indirecta la regulación del sistema inmune local y sistémico (Rogler & Vavricka 2015).

La exposición del intestino a material particulado proveniente de la contaminación ambiental, o a micropartículas de aditivos presentes en alimentos, pasta dental, medicamentos, etc., puede generar daño a nivel intestinal (Lerner 2012). El efecto puede ser directo sobre células epiteliales intestinales causando daño mecánico, o activando células de la inmunidad innata como macrófagos, lo que desencadena una respuesta inmune inflamatoria. Asimismo el MP puede generar una disbiosis (Beamish et al. 2011). Mutlu y col. demostraron que el MP de la contaminación ambiental de Washington produce en animales un incremento en la permeabilidad intestinal por estrés oxidativo (Mutlu et al. 2011).

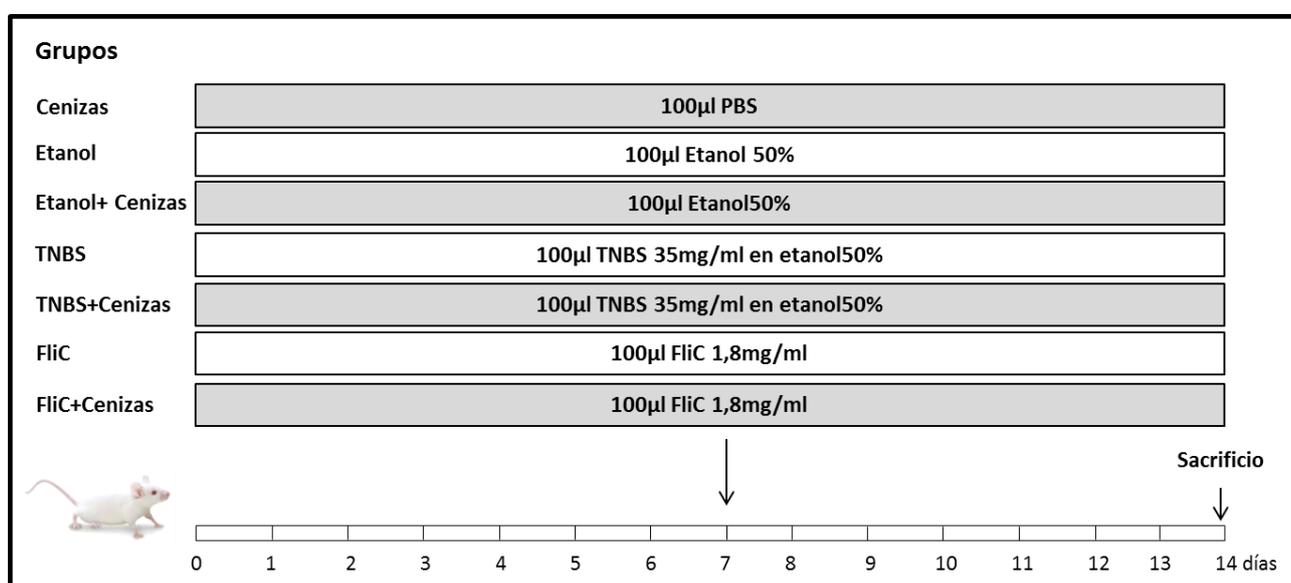
Como antecedente en nuestro país, luego de la erupción del volcán Puyehue en la Patagonia en 2011, se detectó en Buenos Aires un marcado empeoramiento de la inflamación intestinal en pacientes con EII, los cuales resultaron refractarios a los tratamientos convencionales, y muchos de ellos derivaron en cirugía. Ante esta observación del equipo de la doctora Alicia Sambuelli del “Hospital de Gastroenterología Dr. Carlos Bonorino Udaondo” (equipo con el que trabajamos en colaboración), y teniendo en cuenta que uno de los países con mayor incidencia en EII es Islandia, que presenta una incidencia anual de 16,5 cada 100.000 habitantes para CU y de 5,5 cada 100.000 habitantes para EC (Björnsson & Jóhannsson 2000), y decenas de volcanes activos, nos propusimos estudiar el efecto de la administración oral de cenizas volcánicas sobre el intestino de animales naïve o con colitis inducida por TNBS.

### II.4.1 OBJETIVOS

- ▣ Estudiar el efecto de la administración de cenizas volcánicas en agua de bebida, sobre el colon de animales naïve o con inflamación inducida por TNBS.
- ▣ Evaluar el efecto de las cenizas volcánicas sobre la permeabilidad intestinal y evaluar el efecto de la instilación de flagelina (FlC) en animales que previamente recibieron cenizas volcánicas.

## II.4.2 RESULTADOS

Ratones BALB/c de 6 semanas de edad recibieron cenizas volcánicas en el agua de bebida durante 2 semanas, preparada como se explicó anteriormente (2.1). A los 7 días de comenzada la administración de cenizas en el agua de bebida, se les instiló por vía i.r. 100µl de diferentes estímulos inflamatorios: 3,5mg de TNBS en etanol al 50%, 1,8 mg/ml de FliC en PBS, etanol 50% como control de TNBS o PBS como control de FliC (**Esquema 5**). Se empleó una cantidad de TNBS inferior a la óptima en el modelo de colitis dado que esperábamos un agravamiento del proceso inflamatorio al administrarlo junto a la ceniza volcánica.

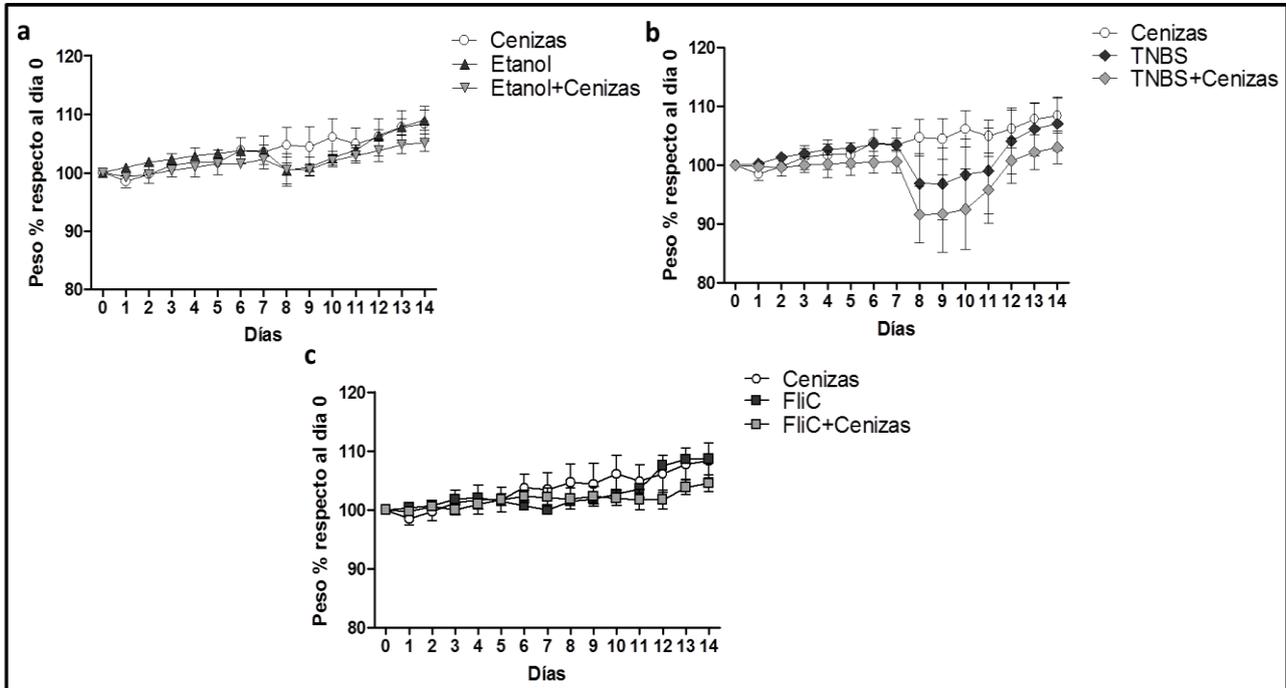


**Esquema 8. Protocolo de inducción de colitis por administración de cenizas volcánicas en el agua de bebida.** Gris, lotes que recibieron cenizas en el agua de bebida durante 2 semanas, blanco lotes que recibieron agua sin cenizas. El día 7 se administró un estímulo inflamatorio por vía intra-rectal, PBS (lote cenizas), etanol 50% (lotes Etanol y Etanol+Cenizas), 3,5mg de TNBS en etanol al 50% (lotes TNBS y TNBS+Cenizas) ó 0,18mg de FliC en PBS (lotes FliC y FliC+Cenizas).

Dos veces por día se homogeneizó el contenido de las botellas para asegurar que las cenizas queden en suspensión. Los pesos de los animales fueron monitoreados diariamente, así como los signos clínicos, la consistencia de materia fecal y la presencia de sangrado rectal.

En la **Figura 46** se muestran los pesos corporales promedio de los animales de los diferentes lotes respecto al peso corporal registrado el día 0, previo al inicio del ensayo. Como puede observarse, no hubo grandes variaciones en los pesos corporales de los animales de los diferentes lotes. Sin embargo, los animales de los lotes que recibieron TNBS mostraron un descenso marcado del peso luego de la instilación, aunque no llegó a ser significativo (**Figura 46b**), y el lote que recibió FliC y cenizas volcánicas mostró un leve descenso del peso corporal los últimos días (**Figura 46c**). En todos los casos comparamos los pesos con el lote que recibió cenizas

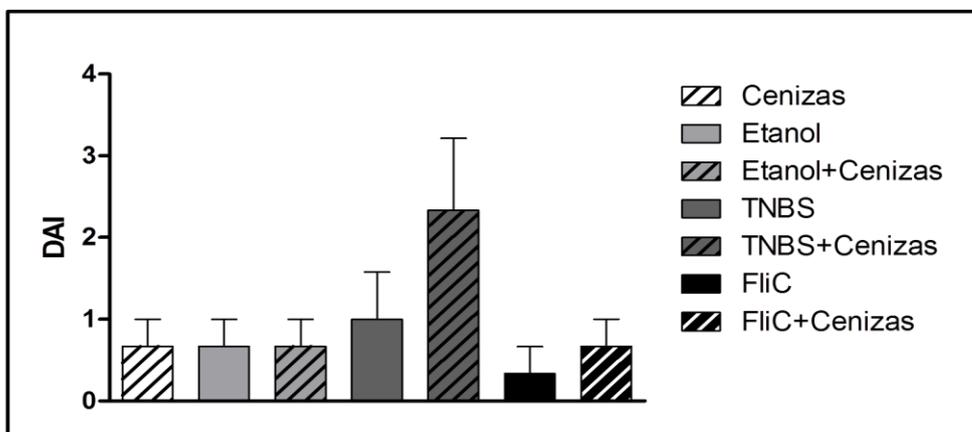
en agua de bebida y PBS por vía intra-rectal, el cual fue considerado el lote control. La sola administración de cenizas volcánicas en el agua de bebida no produjo alteraciones en el peso corporal, ni signos clínicos como diarrea o sangrado.



**Figura 46. Variación de pesos corporales respecto al día 0.** Variación de los pesos corporales de los lotes (a) Cenizas, Etanol y Etanol+Cenizas, (b) Cenizas, 3,5mgTNBS y 3,5mgTNBS+Cenizas, (c) Cenizas, FliC y FliC+Cenizas.

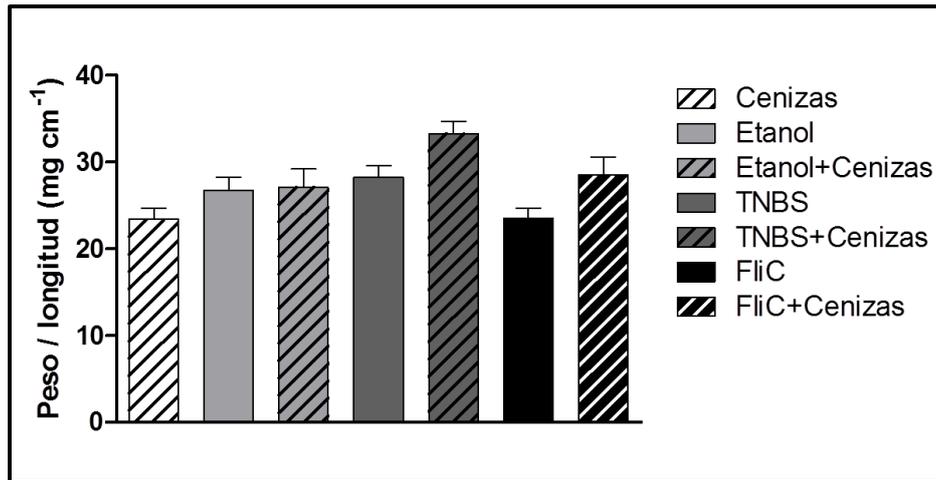
Al evaluar los demás parámetros, observamos que los animales que recibieron cenizas volcánicas en el agua de bebida, presentaron materia fecal más consistente que los animales que no recibían cenizas; la excepción fueron los animales que además recibieron TNBS. Este lote mostró además de un mayor descenso del peso corporal (aunque no significativo) y sangrado.

En la **Figura 47** se muestran los valores de DAI asignados, y podemos observar que, si bien existen diferencias en el DAI de los diferentes lotes, las mismas no son significativas.



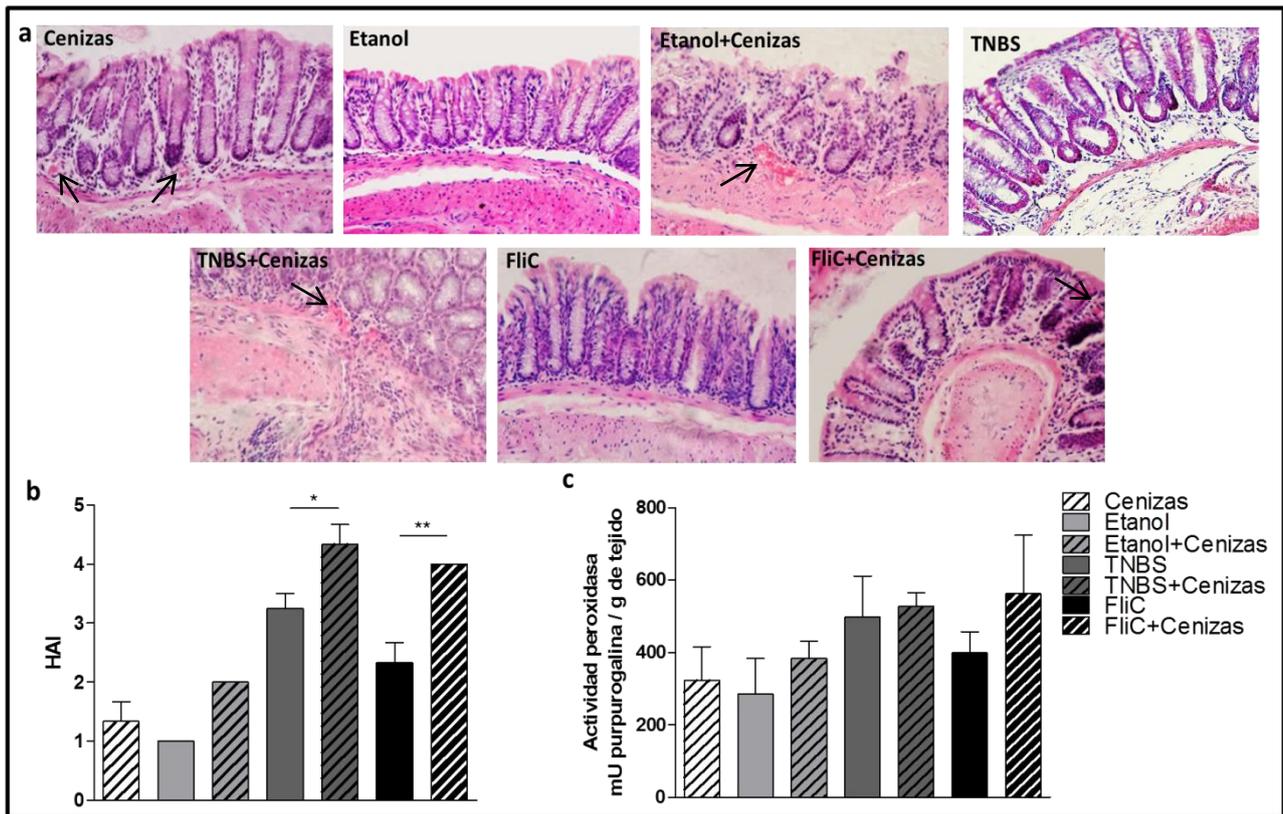
**Figura 47. Índice de actividad de la enfermedad (DAI).** Valores de DAI asignados a los animales de los diferentes lotes

Una semana después de la instilación i.r., los animales fueron sacrificados. Se analizó en forma macroscópica el colon de los animales pertenecientes a los distintos lotes. Se midió su longitud y, luego de limpiarlos con PBS estéril, se los pesó. En la **Figura 48** se muestra la relación peso/longitud de colon de los animales de los diferentes lotes. Se observó una tendencia de los animales de los lotes que recibieron cenizas en el agua de bebida a mostrar una relación peso/longitud mayor respecto de los lotes que recibieron agua sin cenizas.



**Figura 48. Evaluación macroscópica del colon.** Relación peso/longitud del colon de los animales de los distintos lotes. Los datos están expresados en  $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

Este leve aumento podría deberse a un proceso inflamatorio, por lo cual tomamos muestras de colon para realizar diferentes ensayos. En primer lugar evaluamos el colon a nivel microscópico. Cortes teñidos con H&E mostraron que los animales que recibieron agua con cenizas tenían edema, infiltrado mononuclear leve, y abundantes hematíes (**Figura 49a**) probablemente debido a hemorragias en la pared intestinal. El lote de animales que recibió TNBS mostró un marcado infiltrado y edema, con pérdida de células caliciformes, pero en el lote TNBS+Cenizas el infiltrado fue más marcado, afectando todo el espesor de la pared, con pérdida de estructura, y presencia de hematíes, siendo más severa la inflamación que la observada en los animales que sólo recibieron TNBS. Por otro lado, el lote que recibió FliC mostró un leve infiltrado, y en algunos casos edema, pero el lote que recibió FliC+Cenizas, mostró un infiltrado marcado, edema y presencia de hematíes, siendo nuevamente la inflamación más marcada que en el lote FliC (**Figura 49a**). Dada la alta carga bacteriana del colon, no es esperable que la administración de FliC produzca inflamación, sin embargo, la administración de cenizas desde una semana antes de la instilación con FliC, puede haber producido cierto daño en la mucosa que llevara a una respuesta inflamatoria al administrar FliC por vía intra-rectal.



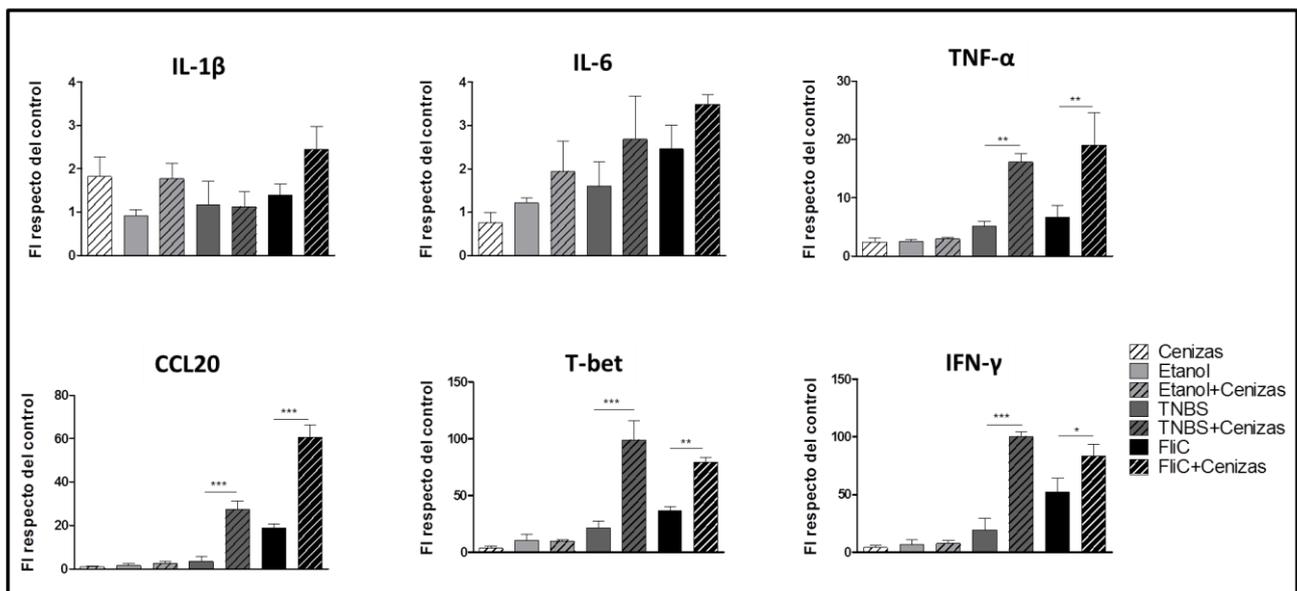
**Figura 49. Evaluación histológica del colon y de la actividad MPO.** (a) Imágenes representativas de los diferentes lotes (400X) con flechas indicamos los hematíes. (b) Gráfico de los valores de HAI asignados a los diferentes lotes según la **Tabla 3**. (c) Determinación de la actividad de la enzima MPO en tejido colónico, en referencia a peroxidasa comercial \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  ANOVA de simple entrada.

En el gráfico de la **Figura 49b** podemos observar un marcado incremento del HAI en los animales que recibieron Cenizas respecto a los que sólo recibieron agua, siendo la diferencia significativa entre los lotes TNBS vs TNBS+Cenizas, y FliC vs FliC+Cenizas. En cuanto a la actividad de la enzima MPO (**Figura 49c**), si bien no se vieron diferencias significativas entre los diferentes lotes, hay una tendencia a que los animales de los lotes que recibieron cenizas y un estímulo inflamatorio muestren una actividad de MPO mayor que los animales que sólo recibieron el estímulo correspondiente.

A continuación evaluamos los niveles de transcritos de citoquinas y factores de transcripción para caracterizar la respuesta inmunológica establecida en cada caso. Se evaluaron genes asociados a la respuesta inmune innata (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  y Ccl20), y a la inmunidad adaptativa de perfil Th1 (IFN- $\gamma$  y T-bet). En la **Figura 50** se muestran los gráficos de los incrementos relativos a ratones naïve para cada gen.

En el caso de los genes asociados a la inmunidad innata, observamos en los lotes que recibieron cenizas un leve aumento en la expresión génica de IL-1 $\beta$  e IL-6, aunque no significativo, respecto a los lotes que recibieron el mismo estímulo inflamatorio, pero agua sin cenizas. Al

evaluar los niveles de TNF- $\alpha$  detectamos un incremento significativo en el lote TNBS+Cenizas respecto al lote TNBS, y en el lote FliC+Cenizas respecto al lote FliC, siendo en ambos casos 20 veces mayor que lo observado en los animales naïve. También detectamos un incremento significativo en los niveles del transcripto de Ccl20 en las muestras de los animales de los lotes TNBS+Cenizas y FliC+Cenizas en comparación con TNBS y FliC respectivamente, siendo 40 veces mayor que en los animales naïve en el primer caso y 60 veces mayor en el segundo. Estos datos muestran que la administración de cenizas volcánicas en el agua de bebida junto con un estímulo inflamatorio por vía i.r. genera una respuesta inmune innata mucho más marcada que la sola administración del estímulo inflamatorio. Además detectamos niveles incrementados del transcripto de T-bet en los lotes TNBS+Cenizas y FliC+Cenizas en comparación con los lotes TNBS y FliC respectivamente, siendo en ambos casos casi 100 veces mayor que los niveles de mRNA de T-bet de los animales naïve. En cuanto a los niveles de IFN- $\gamma$ , lo observado fue coherente con lo visto para T-bet, los niveles del transcripto fueron significativamente mayores en los lotes TNBS+Cenizas y FliC+Cenizas comparados con los lotes TNBS y FliC respectivamente, y casi 100 veces mayor que en los animales naïve.

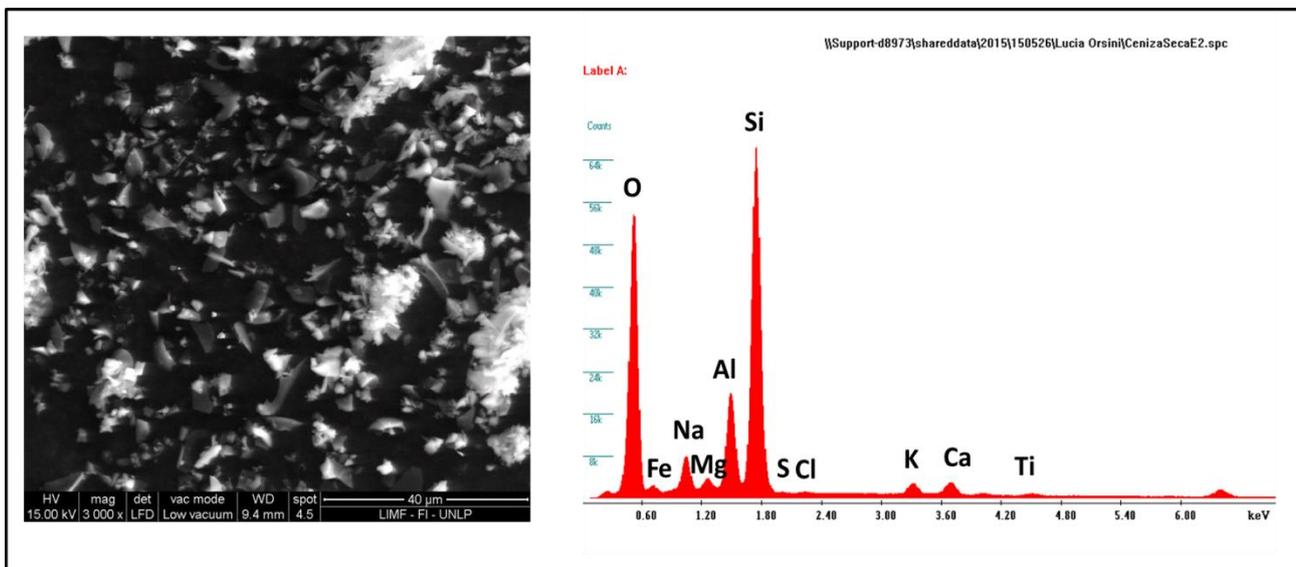


**Figura 50. Cuantificación de transcritos correspondientes a citoquinas, quimocinas y factores de transcripción en colon por qPCR.** Niveles de mRNA de citoquinas asociadas a una respuesta inmune innata (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y Ccl20), y Th1 (T-bet e IFN- $\gamma$ ). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . ANOVA de simple entrada.

Los resultados obtenidos hasta el momento muestran un marcado incremento del estado inflamatorio en los animales que recibieron cenizas en el agua de bebida junto a un estímulo inflamatorio (TNBS o FliC), en relación a los lotes que recibieron únicamente el estímulo inflamatorio.

El daño generado por las cenizas en el agua de bebida puede deberse a un daño mecánico causado por el material particulado, o a un efecto directo sobre las células epiteliales intestinales que lleve al desencadenamiento de la respuesta inmune. Para determinar el tamaño de las partículas presentes en la ceniza y su composición analizamos muestras de cenizas por microscopía electrónica de barrido y microanálisis, como fue descrito anteriormente.

Como podemos ver en la **Figura 51**, a nivel microscópico las cenizas están conformadas por material particulado de tamaño cercano a los 10µm, con bordes filosos, con lo cual podríamos sostener que ejercen un daño mecánico sobre el epitelio intestinal. Por otro lado se detectó que los elementos principales son Si y Al, los cuales se ha descrito que activan el inflammasoma, en particular NLRP3 (Willingham & Ting 2008).



**Figura 51. Evaluación microscópica de las cenizas volcánicas.** Microscopía electrónica de barrido para evaluación de tamaño, forma y composición elemental de las cenizas volcánicas.

Por lo tanto sostenemos que el MP presente en la ceniza volcánica ejerce una doble función sobre la mucosa intestinal: por un lado tiene una función mecánica de daño de la barrera epitelial, alterando la permeabilidad intestinal, y por otro, activaría el inflammasoma agravando el proceso inflamatorio. Para poder confirmar nuestra hipótesis se requieren profundizar los estudios y repetir el modelo de colitis en ratones deficientes en NLRP3.

### II.4.3 DISCUSIÓN

Los resultados aquí mostrados, permiten concluir que la administración oral de cenizas volcánicas tiene un efecto pro-inflamatorio, produciendo un marcado incremento del infiltrado en mucosa y submucosa, así como edema y presencia de hematíes posiblemente por hemorragia. Lo mismo se observó en las porciones del colon que se extirpó de los pacientes con una EII agravada como consecuencia a la exposición en Buenos Aires al material particulado conteniendo cenizas presentes en el aire. Al evaluar la respuesta a nivel molecular evidenciamos un incremento significativo en los niveles de mRNA de varias citoquinas, quimoquinas y factores de transcripción asociados a la inmunidad innata (TNF- $\alpha$ ), a la activación de la vía de NF $\kappa$ B (Ccl20) y a una respuesta inmune Th1 (T-bet e IFN- $\gamma$ ). El daño observado puede deberse tanto a un daño mecánico como a un proceso inflamatorio, es por eso que quisimos evaluar la composición química de las cenizas, así como el tamaño del material particulado. El análisis mostró que predominan las partículas menores a 10 $\mu$ m, y que el silicio y el aluminio son los elementos principales, aunque también contienen hierro, titanio, calcio, magnesio, sodio y potasio. Diferentes trabajos muestran que sales de Al y de Si activan la vía de inflammasoma NLRP3 (Dostert et al. 2008; Hornung et al. 2008) y también inducen la producción de PGE<sub>2</sub> en forma independiente de NLRP3 (Kuroda et al. 2011), con lo cual podemos sospechar que estos mecanismos pueden estar implicados en el incremento del daño e inflamación observados en los animales que recibieron cenizas volcánicas.

Estudios realizados con muestras de pacientes con EC han revelado que existe una correlación entre la gravedad de los signos de los pacientes con EC y la exposición a micropartículas ambientales (Powell et al. 2007). También se ha visto que, dada la capacidad adsorptiva de las micropartículas, pueden generar complejos con Ca y bacterias comensales, simulando la patogenicidad de los microorganismos (Ashwood et al. 2007). Sin embargo, no se ha visto un incremento en la incidencia de las EII, con lo cual se postula que, en pacientes con predisposición genética para el desarrollo de estas patologías, la ingesta de micropartículas ambientales actuaría como un disparador (Lerner 2012). Estos resultados concuerdan con lo observado en nuestro modelo, en el cual se vio un incremento del daño en animales expuestos a un estímulo inflamatorio, así como lo observado en pacientes que estuvieron expuestos a cenizas volcánicas, en los cuales se observó una agudización del proceso inflamatorio intestinal.

Con los resultados obtenidos, podemos proponer que la administración de cenizas volcánicas en el agua de bebida en animales con colitis es capaz de agravar la inflamación

intestinal. Sin embargo, la sola administración del agua con cenizas volcánicas, no logró inducir colitis. Esto nos lleva a postular que este componente ambiental sólo agrava el proceso inflamatorio en el colon cuando otro factor lo ha inducido. Para poder confirmar nuestra hipótesis, sería conveniente probar el efecto de las cenizas en animales que desarrollan colitis en forma espontánea, para observar si efectivamente generan un proceso inflamatorio más severo, y finalmente, confirmar si el efecto es vía inflamasoma por la presencia de Al, Si y Ti, en concordancia con lo descrito en bibliografía, mediante el empleo de animales deficientes en diferentes componentes del mismo.

# DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES PARTE II

---



En esta etapa del trabajo se lograron optimizar dos modelos de colitis por administración i.r. de TNBS. Un modelo agudo de inflamación con una única administración de TNBS (50mg/ml) que permite reproducir un cuadro similar al observado en pacientes con EC. En este modelo se indujo un marcado descenso del peso corporal, signos de diarrea, sangrado e incluso proctitis. Se observó además un acortamiento y aumento del peso del colon, que lo pudimos correlacionar con los resultados microscópicos, en los cuales se evidenció un marcado infiltrado, edema y alteración de la estructura epitelial, asociado a un incremento de la actividad de la enzima MPO, probablemente causado por un infiltrado de neutrófilos. A nivel molecular observamos un marcado incremento en los transcritos correspondientes a marcadores de inflamación (TNF- $\alpha$ , T-bet e IFN- $\gamma$ ) en la mucosa colónica. Los resultados observados son similares a los descritos en bibliografía para este modelo de colitis (Alex et al. 2009) y paciente con EC (Strober et al. 2002; Di Sabatino et al. 2013).

Por otro lado optimizamos un modelo crónico de colitis, logrando el desarrollo de fibrosis intestinal. En bibliografía existen diferentes esquemas de administración de TNBS para el desarrollo del modelo crónico de colitis inducido por TNBS, que consisten en la administración de la misma dosis de TNBS una vez por semana durante 5 semanas (Alex et al. 2009), o de dosis crecientes una vez por semana durante 6 semanas (Wu & Chakravarti 2007); en nuestras condiciones experimentales, luego de probar diferentes dosis y frecuencias de administración, logramos optimizar este modelo al administrar 6 dosis de concentraciones variables de TNBS, una vez cada 15 días. Luego de la primera instilación se vio un marcado descenso de peso corporal en el lote que recibió TNBS respecto del lote control y posteriormente los animales fueron recuperando su peso en forma progresiva; sin embargo, en estos animales, fueron evidentes los signos de diarrea e incluso de sangrado. Al evaluar el colon en forma macroscópica, evidenciamos una relación peso/longitud aumentada, con engrosamiento y rigidez de la pared intestinal en los animales del lote TNBS. Estas observaciones tuvieron su contraparte a nivel microscópico ya que observamos un marcado engrosamiento de la pared intestinal, con pérdida de la estructura, probablemente asociado a una pérdida de función, y mayor número de fibroblastos y fibrosis intestinal. En este modelo se observó además un incremento de la actividad de la enzima MPO, y en la producción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ . Lo más importante es que logramos reproducir lo que se observa en pacientes con fibrosis, que es el marcado incremento en los niveles de TGF- $\beta$ , factor de crecimiento de fibroblastos (Rieder & Fiocchi 2009; Biancheri,

Giuffrida et al. 2013). Como explicamos anteriormente, dado que en la actualidad la fibrosis intestinal sigue siendo una de las complicaciones más frecuentes de las EII, a pesar del avance en las terapias anti-inflamatorias y en la temprana implementación de las mismas (Bettenworth & Rieder 2014), disponer de este modelo de fibrosis intestinal es de utilidad para el estudio de estrategias que permitan prevenir el desarrollo de fibrosis o revertirla una vez establecida.

Posteriormente procedimos a evaluar el efecto anti-inflamatorio del péptido derivado de amaranto de secuencia SSEDIKE (P2) en nuestro modelo de colitis aguda. Previamente, en colaboración con el grupo de la Dra. Cristina Añón (CIDCA, CONICET/UNLP), describimos la presencia de péptidos encriptados con propiedades anti-inflamatorias en proteínas presentes en la semillas de Amaranto, con capacidad de inhibir la vías de señalización intracelular NF-KB (Trabajo de Tesis Moronta 2015; Moronta et al. 2016). Dado que esta vía de señalización está implicada en el proceso inflamatorio inducido por TNBS y en la inflamación colónica en pacientes con EC (Neurath et al. 1996), decidimos evaluar el efecto de la administración ig de P2 en nuestro modelo de colitis aguda. Los resultados hallados reflejaron una pronta recuperación del peso corporal de los animales, signos clínicos más leves en comparación con el lote que no recibió el péptido, y ausencia de sangrado. Al evaluar el colon en forma macroscópica, observamos un acortamiento menor en los animales tratados con P2 en comparación con los animales no tratados, así como una relación peso/longitud de colon menor, acompañado de una disminución del infiltrado celular, un descenso significativo de la actividad de la enzima MPO, y menor pérdida de la estructura epitelial, aunque aún con presencia de edema. A nivel molecular detectamos una menor expresión génica de marcadores de inflamación. Por lo tanto concluimos que este péptido sintético mostró ser efectivo en la modulación de la colitis experimental.

En trabajos previos se demostró que el tripéptido de secuencia KPV, porción carboxilo terminal de la hormona  $\alpha$ -melanocito estimulante ( $\alpha$ -MSH), tiene efecto antiinflamatorio *in vitro*, al inhibir las vías de señalización NFkB y MAP kinasa sobre cultivos de las líneas celulares Caco2 y Jurkat, y que además la administración ig de este péptido logra modular la respuesta inmune inflamatoria en los modelos de colitis aguda inducidos por TNBS o por DSS (Dalmaso et al. 2008). Este tripéptido ingresa a las células epiteliales intestinales a través del co-transportador H<sup>+</sup>-oligopéptido, PepT1, ubicado en la cara apical de las mismas, e inhibe la activación de NFkB y su traslocación al núcleo (Dalmaso et al 2008); si bien la expresión del transportador PepT1 es baja en células epiteliales de colon, en procesos inflamatorios crónicos, como las EII, su expresión se ha

visto incrementada (Merlin et al. 2001); este receptor también es expresado por células del sistema inmune como macrófagos intestinales o en la línea de células T humanas, Jurkat (Dalmasso et al. 2008). Por otro lado nuestros resultados previos mostraron que el péptido SSEDIKE compete con el péptido KPV por su receptor (Moronta et al. 2016). Considerando nuestros resultados previos y los del péptido KPV en el modelo de colitis, proponemos que el P2 de amaranto podría ejercer su efecto anti-inflamatorio de manera similar a KPV, ingresando a las células epiteliales colónicas a través del transportador PepT1 para inhibir la activación de NFκB. Para confirmar estos resultados es necesario profundizar los estudios mecanísticos y otros blancos celulares (macrófagos, LT de intestino delgado, etc.). Estos estudios nos permitirán definir si un hidrolizado de Amaranto o el péptido sintético SSEDIKE podrían ser empleados como un alimento funcional o un suplemento alimenticio para modular procesos inflamatorios intestinales.

Por último, evaluamos el efecto de la administración de cenizas volcánicas en el agua de bebida de animales a los que se les administró un estímulo inflamatorio por vía i.r. Siendo que los pacientes con EC desarrollan una respuesta inmune específica contra antígenos de la microbiota comensal (Macpherson et al. 1996; Strober et al. 2007), administramos además por vía intra-rectal flagelina de Salmonella (FliC). Además a otro lote de animales se les administró TNBS y cenizas volcánicas. Observamos que si bien las cenizas no fueron capaces de inducir la inflamación mucosal, se produjo un agravamiento de los signos clínicos, macroscópicos y microscópicos junto a un incremento de los marcadores inmunológicos de un proceso inflamatorio en los animales que recibieron un estímulo inflamatorio adicional. Estos hallazgos, junto a los del análisis morfológico y de la composición del material particulado, nos permitió concluir que los mismos inducirían un daño físico en el compartimento epitelial con el cual la FliC o el TNBS dispararían la respuesta inmunológica, probablemente junto a la microbiota, que finalmente producirá la inflamación en el colon. La presencia de hematíes en la submucosa y muscular de todos los animales que recibieron agua con cenizas permiten confirmar el daño con hemorragia del tejido. Por lo tanto podemos concluir que la administración de cenizas volcánicas efectivamente agravó el proceso inflamatorio generado por los diferentes estímulos, proceso que reproduce lo ocurrido en la ciudad de Buenos Aires en pacientes con EC que se volvieron activos y no respondieron al tratamiento convencional, ni a los biológicos (Infliximab o a-TNF). Restarían realizar estudios en animales deficientes en NLRP3 para confirmar el efecto adyuvante de los componentes individuales de la ceniza (Si y Al principalmente). A pesar de haberse visto una clara relación entre la contaminación ambiental y el

incremento de las EII en países con intensa actividad volcánica no existen trabajos en la literatura que muestren en forma directa esta asociación. Un único trabajo muestra el efecto de la contaminación ambiental a nivel intestinal empleando MP atmosférico, en el cual observaron un incremento de la permeabilidad intestinal y en la apoptosis de células epiteliales intestinales, un aumento de la secreción de IL-6, y un incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Mutlu et al. 2011). Por el contrario, existen múltiples trabajos que estudian el efecto del MP a nivel pulmonar; en estos trabajos se ha visto que la forma en que el MP activa el sistema inmune es vía inflamasoma, en particular activando NLRP3 de macrófagos con cristales de silicio, y sales de aluminio (Hornung et al. 2008); algo similar se ha observado en modelos de inflamación pulmonar por inhalación de asbesto y silicatos en ratones, viéndose una disminución del infiltrado en pulmones de ratones deficientes en NLRP3 expuestos a asbesto y silicato (Dostert et al. 2008). Asimismo se ha descrito la participación de especies reactivas de oxígeno en la activación de NLRP3 por cristales de silicato (Cassel et al. 2008; Dostert et al. 2008; Hornung et al. 2008).

La exposición a MP no sólo proviene de la contaminación ambiental, sino también de aditivos y colorantes presentes en diferentes productos que ingerimos diariamente. En biopsias de intestino de pacientes sanos y de pacientes con EII se ha visto la presencia de micropartículas de Si, Al y Ti en los macrófagos intestinales (Powell et al. 1996; Powell et al. 2007). Teniendo en cuenta lo observado en diferentes trabajos, tanto a nivel pulmonar como a nivel intestinal, y considerando que los componentes principales de las cenizas ejercen un efecto pro-inflamatorio, proponemos que la inhalación o ingesta de cenizas volcánicas en pacientes con EII agravaría el proceso inflamatorio, probablemente por fagocitosis del MP por los macrófagos intestinales y la posterior activación de inflamasoma, lo cual explicaría el mayor daño observado en pacientes con EII y el incremento en los casos que requirieron intervención quirúrgica en Argentina luego de la erupción del volcán Puyehue en 2011.





# DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES FINALES





En este trabajo de Tesis Doctoral se estudiaron dos patologías intestinales, alergias alimentarias y enfermedades inflamatorias intestinales, ambas asociadas a una desregulación del sistema inmune, que desencadena una respuesta inadecuada frente a Ag no-propios inocuos, como son los Ag de la dieta y los Ag de la microbiota respectivamente (MacDonald & Monteleone 2005; Pabst & Mowat 2012). Para ello utilizamos dos modelos animales: uno de alergia experimental basado en la administración ig del alérgeno (en nuestro caso leche de vaca) y TC como adyuvante mucosal pro-Th2, y otro de colitis, que consistió en la administración i.r. de ácido 2,4,6 trinitrobencensulfónico (TNBS), ambos ampliamente descritos en bibliografía (Li et al. 1999; Neurath et al. 2000; Smaldini et al. 2012).

En la **primera parte** del trabajo de tesis doctoral, se evaluaron dos estrategias terapéuticas para la inmunomodulación específica de AA. Las mismas están siendo ampliamente estudiadas como opciones terapéuticas experimentales en humanos, y apuntan al restablecimiento de la tolerancia hacia antígenos de la dieta.

La primera estrategia consistió en la administración de bajas dosis de PLV por vía oral, a fin de restablecer la tolerancia, lo que se conoce como inmunoterapia oral. Como demostramos anteriormente, la administración de bajas dosis de PLV (10µg), durante 8 semanas, permitió reducir los signos clínicos luego del DO con dosis  $10^6$  veces más altas de PLV que las utilizadas durante el tratamiento. La PC se negativizó y los niveles de IgE sérico específico a PLV, así como la secreción de IL-5 e IL-13 por esplenocitos en respuesta al estímulo con PLV disminuyeron, incluso observándose en algunos casos valores similares al lote control. Además, luego de la ITO observamos un incremento en LP de los porcentajes de células  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  productoras de IL-10, sugiriendo que estas células serían las responsables de la supresión de la respuesta inmune, y para alcanzar manifestaciones clínicas comparables a lo observado en los grupos sensibilizados expuestos a 5mg de PLV, fue necesario aumentar la dosis del DO 8 veces en los ratones tratados. Para evaluar si el restablecimiento de las Treg podía generar un entorno tolerogénico capaz de prevenir el desarrollo de alergia en nuestro modelo, transferimos células Treg generadas *in vitro* e *in vivo*, y luego les administramos PLV y TC por vía ig. Como mostramos en el **Capítulo 1**, los ratones que recibieron células Treg, ya sea generadas *in vivo* o *in vitro*, no desarrollaron alergia luego de la sensibilización con PLV+TC, como sí lo hicieron los ratones que recibieron una suspensión celular a la cual previamente se le depletaron las Treg. De esta manera estamos en

condiciones de confirmar que el incremento de la población de células Treg, luego de la ITO, permite reestablecer la tolerancia hacia los antígenos de la dieta.

Por otro lado, la segunda estrategia consistió en evaluar la capacidad inmunomoduladora de una proteína recombinante de membrana externa de *Brucella abortus* (Omp16) con capacidad adyuvante e inmunomoduladora mucosal sobre el proceso de sensibilización (Ibáñez et al. 2012; Smaldini et al. 2013). Dado que se ha descrito que la ITSL presenta menor eficiencia que la ITO en la restauración de la tolerancia decidimos estudiar esta estrategia de adicionar un adyuvante pro-Th1 en la ITSL en el modelo murino de alergia. Como se mostró en el **Capítulo 2**, la administración sl de Omp16 junto con PLV luego de la sensibilización logró modular la respuesta Th2 induciendo una respuesta de perfil Th1 ( $CD4^+IFN-\gamma^+\alpha_4\beta_7^+$ ), lo que muestra una recuperación del balance Th1/Th2. Además, y dado que se ha descrito en las AA una disminución de las células Treg, en este modelo logramos reproducir lo que se observa en los pacientes dado que los animales sensibilizados mostraron una menor frecuencia de Treg, que se incrementó en el lote de ratones tratados con PLV+Omp16. Inclusive estas células observamos que son productoras de IL-10 ( $CD4^+FoxP3^+IL-10^+$ ). Los resultados obtenidos muestran la eficacia del empleo de la vía sl para modular al sistema inmune activado en la mucosa intestinal. En cuanto a las poblaciones de DCs, detectamos en LP un incremento significativo de la población de pDC  $CD11c^+CD11b^-CD8\alpha^+$  en el lote PLV+Omp16 respecto a los demás grupos, población asociada a un perfil tolerogénico (Kang 2012). El conjunto de estos resultados, y los observados previamente en el grupo, permiten concluir que la Omp16 presenta propiedades adyuvantes mucosales capaces de modular la respuesta Th2 establecida, induciendo una respuesta inmune específica de perfil Th1, al ser administrada por diferentes vías mucosales, que revierte la reacción alérgica local y sistémica.

*Tanto la ITO como la ITSL permitieron revertir la respuesta inmune alérgica, sin embargo, consideramos que la estrategia terapéutica indicada, a fin de evitar reacciones adversas durante el tratamiento, es la ITSL por administración conjunta de PLV y Omp16, ya que las dosis de alérgeno utilizadas son mucho menores y que el uso de Omp16 permitió optimizar la ITSL, mostrando resultados comparables a los de la ITO.*

En el **Capítulo 3 (segunda parte)** optimizamos dos modelos de colitis por administración i.r. de TNBS. Un modelo de inflamación aguda inducida por una única administración de TNBS (50mg/ml), que reproduce bastante ajustadamente lo observado en pacientes con EC, y un modelo de colitis crónica con desarrollo de fibrosis intestinal.

Posteriormente, para modular la respuesta inflamatoria intestinal establecida, evaluamos el efecto anti-inflamatorio de un péptido de Amaranto y hallamos que la administración ig del péptido en animales previamente instilados con TNBS permitió una pronta recuperación del peso corporal, signos cénicos y ausencia de sangrado. Concordantemente el proceso inflamatorio se redujo en el colon y la respuesta inmune fue inhibida. Estos resultados resultan sumamente alentadores para plantear el empleo de este péptido como suplemento de un alimento funcional para controlar la inflamación intestinal. Previamente hemos confirmado que es capaz de inhibir la sensibilización alérgica en ratones (Trabajo de Tesis Moronta 2015), y aquí hemos evidenciado su acción protectora a nivel de colon. Finalmente, en el **Capítulo 4** evaluamos el efecto de cenizas volcánicas como factor ambiental agravante del proceso inflamatorio intestinal. Su administración oral produjo un agravamiento sustancial de la inflamación colónica probablemente por un efecto de daño mecánico del MP junto a un efecto adyuvante de los componentes individuales de la misma. Sin embargo por sí sola no fue capaz de inducir colitis.

*Evaluamos así el efecto de dos factores ambientales en el desarrollo de la colitis experimental: el efecto protector y anti-inflamatorio de un péptido derivado de un alimento, lo cual resalta la importancia de la dieta como factor externo modulador del proceso inflamatorio; y por otro el efecto pro-inflamatorio de las cenizas volcánicas como contaminante ambiental, que promueve los procesos de daño inducidos. Si bien existen trabajos que estudian en efecto de micropartículas presentes en alimentos sobre el daño en colon (Powell et al. 1996; Powell et al. 2007), y un trabajo que estudia el efecto de la administración ig de MP de la atmósfera de Washington en la inducción de colitis (Mutlu et al. 2011), no hay trabajos que evalúen el efecto pro-inflamatorio de las cenizas volcánicas como contaminante ambiental, con lo cual nuestros resultados son relevantes para el estudio de los factores externos disparadores o potenciadores de las EII.*

Como **perspectivas a futuro**, resta:

- Continuar evaluando los mecanismos celulares por los cuales se logra inducir tolerancia en el modelo de alergia por administración sublingual conjunta de PLV y Omp16, evaluar las poblaciones de DCs presentes en la mucosa sublingual y las poblaciones linfocitarias presentes en LP, como su migración entre las mucosas para una mejor comprensión del mecanismo protector instaurado.

- Evaluar si el efecto de anti-inflamatorio P2 es ejercido a nivel local o sistémico y confirmar si actúa únicamente sobre células epiteliales intestinales o sobre otros blancos celulares, como así también si su ingreso a la célula es a través de PepT1 .

Evaluar si la administración de cenizas volcánicas a animales deficientes en alguna de las vías de inflammasoma reduce el efecto pro-inflamatorio de las mismas, de manera de poder confirmar el efecto adyuvante de los componentes naturales del material particulado.

---

A partir de los resultados presentados en este trabajo de Tesis doctoral, se desprenden las siguientes **conclusiones finales**:

- ▣ La ITO en el modelo murino de alergia a las PLV, logró revertir la respuesta inmune alérgica de perfil Th2, a nivel local y sistémico, induciendo tolerancia oral a través de la inducción de células Treg productoras de IL-10.
- ▣ La ITSL con PLV resultó menos efectiva que la ITO en la inducción de tolerancia. Sin embargo la administración del alérgeno en simultáneo con el adyuvante mucosal Omp16 mostró una eficiencia similar a la ITO, logrando reducir los signos clínicos de hipersensibilidad, al generar una respuesta Th1 específica, e incremento en la frecuencia de células Treg.
- ▣ La administración intra-rectal de TNBS a ratones BALB/c indujo inflamación intestinal con infiltrado transmural y una respuesta inmune de perfil Th1, y las sucesivas exposiciones indujeron el desarrollo de fibrosis intestinal, compatible con EC.
- ▣ La administración ig del péptido P2 de Amaranto, fue capaz de modular la respuesta inflamatoria intestinal inducida por la administración intra-rectal de TNBS, reduciendo los niveles de citoquinas pro-inflamatorias.
- ▣ La administración oral de cenizas volcánicas en el agua de bebida, empeoraron el proceso inflamatorio inducido por TNBS, y desencadenaron una respuesta inflamatoria en animales expuestos a concentraciones intra-rectales elevadas de FliC, probablemente por activación del inflamasoma.

Por lo tanto, consideramos que los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo de Tesis serán de utilidad para comprender las bases inmunológicas de diferentes estrategia inmunomodulatorias que permiten restaurar la homeostasis intestinal a través de la inducción de tolerancia mucosal hacia antígenos dietarios y microbianos, así como para resaltar la importancia de los factores ambientales como disparadores o potenciadores de patologías inflamatorias intestinales.



# BIBLIOGRAFÍA





- Adel-Patient, K., Wavrin, S., Bernard, H., Meziti, N., Ah-Leung, S., & Wal, J.-M. **2011**. «Oral tolerance and Treg cells are induced in BALB/c mice after gavage with bovine  $\beta$ -lactoglobulin». *Allergy*, 66(10):1312–21.
- Agren, L. C., Ekman, L., Löwenadler, B., & Lycke, N. Y. **1997**. «Genetically engineered nontoxic vaccine adjuvant that combines B cell targeting with immunomodulation by cholera toxin A1 subunit». *Journal of Immunology* 158 (8): 3936-3946.
- Akdis, C. A., & Akdis, M. **2009**. «Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(4):735–46.
- Akkoc, T., Akdis, M., & Akdis, C. A. **2011**. «Update in the Mechanisms of Allergen-Specific Immunotherapy». *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 3(1), 11-20.
- Alex, P., Zachos, N. C., Nguyen, T., Gonzales, L., Chen Tian, E., Conklin, L. S., Centola, M., & Li, X. **2009**. «Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis». *Inflammatory Bowel Disease*, 15 (3), 341-352.
- Aliprantis, A. O., Yang, R. B., Mark, M. R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J. D., Klimpel, G. R., Godowski, P. & Zychlinsky, A. **1999**. «Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2». *Science*, 285 (5428), 736-739.
- Allam, J.-P., Novak, N., Fuchs, C., Asen, S., Bergé, S., Appel, T., Geiger, E., Jarema, P. & Bieber, T. **2003**. Characterization of dendritic cells from human oral mucosa : A new Langerhans' cell type with high constitutive Fc $\epsilon$ RI expression. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(1), 141-148.
- Allam, J.-P., Peng, W-M, Appel, T., Wenghoefer, M., Niederhagen, B., Bieber, T., Bergé, S., & Novak, N. **2008**. «Toll-like receptor 4 ligation enforces tolerogenic properties of oral mucosal Langerhans cells». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(2), 368-375.
- Allam, J-P., A.Würtzen, P., Reinartz, M., Winter, J., Vrtala, S., Chen, K.-W., Valenta, R., Wenghoefer, M., Appel, T., Gros, E., Niederhagen, B., Bieber, T., Lund, K., & Novak, N. **2010**. «Phl p 5 resorption in human oral mucosa leads to dose-dependent and time-dependent allergen binding by oral mucosal Langerhans cells , attenuates their maturation , and enhances their migratory and TGF- $\beta$ 1 and IL-10-producing properties». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(3), 638-646.
- Allam, J.-P., Duan, Y., Winter, J., Stojanovski, G., Fronhoffs, F., Wenghoefer, M., Bieber, T., Peng, W. M., & Novak, N. **2011**. «Tolerogenic T cells, Th1/Th17 cytokines and TLR2/TLR4 expressing dendritic cells predominate the microenvironment within distinct oral mucosal sites». *Allergy*, 66(3), 532-539.
- Alvarez, D., Arkinson, J. L., Sun, J., Walker, T., Jordana, M., Alvarez, D., Arkinson, J. L., Sun, J., Fattouh, R. Walker, T., Jordana, M. **2007**. «Th2 differentiation in distinct lymph nodes influences the site of mucosal Th2 immune-inflammatory responses». *The Journal of Immunology*, 179, 3287-3296.
- Ananthkrishnan, A. N., Mcginley, E. L., Binion, D. G., & Saeian, K. **2011**. «Ambient Air Pollution Correlates with Hospitalizations for Inflammatory Bowel Disease: An Ecologic Analysis». *Inflammatory Bowel Disease*, 17(5), 1138-1145.
- Ananthkrishnan, A. N. **2015**. «Epidemiology and risk factors for IBD». *Gastroenterology & Hepatology*, 12(4), 205-217.

## Bibliografía

María Lucía Orsini Delgado

---

- Anjuère, F., Luci, C., Lebens, M., Rousseau, D., Hervouet, C., Milon, G., Holmgren, J., Ardavin, C., & Czerkinsky, C. **2004**. «In vivo adjuvant-induced mobilization and maturation of gut dendritic cells after oral administration of cholera toxin». *Journal of Immunology*, 173 (8), 5103-5111.
- Ashwood, P., Thompson, R. P. H., & Powell, J. J. **2007**. «Fine particles that adsorb lipopolysaccharide via bridging calcium cations may mimic bacterial pathogenicity towards cells». *Experimental Biology and Medicine*, 232, 107-117.
- Barnes, P. J., & Karin, M. **1997**. «Nuclear Factor- $\kappa$ B - A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases». *The New England Journal of Medicine*, 336(15), 1066-1071.
- Baumgart, D. C., & Sandborn, W. J. **2012**. «Crohn's disease». *Lancet*, 380, 1590–605.
- Beamish, L. A., Osornio-Vargas, A. R., & Wine, E. **2011**. «Air pollution: An environmental factor contributing to intestinal disease». *Journal of Crohn's and Colitis*, 5(4), 279-286.
- Bella, S. D., Giannelli, S., Cozzi, V., Signorelli, V., Cappelletti, M., Cetin, I., & Villa, L. **2011**. «Incomplete activation of peripheral blood dendritic cells during healthy human pregnancy». *Clinical & Experimental Immunology*, 164, 180-192.
- Berin, M. C., & Sampson H. A. **2013**. «Food allergy: an enigmatic epidemic». *Trends in Immunology*. 34(8), 390-7.
- Berin, M. C. **2014**. «Future therapies for IgE-mediated food allergy». *Curr Pediatr Rep*, 2(2), 119-126.
- Berin, M. C., & Mayer, L. **2009**. «Immunophysiology of experimental food allergy». *Mucosal immunology*, 2(1), 24-32.
- Berin, M. C., & Mayer, L. **2013**. «Can we produce true tolerance in patients with food allergy?». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(1), 14-22.
- Bettenworth, D., & Rieder, F. **2014**. «Medical therapy of stricturing Crohn's disease: what the gut can learn from other organs - a systematic review». *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 7(1), 1-16.
- Beyer, K., Castro, R., Birnbaum, A., Benkov, K., Pittman, N., & Sampson, H. A. **2002**. «Food and drug reactions and anaphylaxis Human milk – specific mucosal lymphocytes of the gastrointestinal tract display a Th2 cytokine profile». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 109(4), 707-713.
- Biancheri, P., Di Sabatino, A., Corazza, G. R., & MacDonald, T. T. **2013**. «Proteases and the gut barrier». *Cell Tissue Res.*, 351, 269-280.
- Biancheri, P., Giuffrida, P., Docena, G. H., MacDonald, T. T., Corazza, G. R., & Di Sabatino, A. **2013**. «The role of transforming growth factor (TGF)- $\beta$  in modulating the immune response and fibrogenesis in the gut». *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 25(1), 45-55.
- Björnsson, S. & Jóhannsson, J. H. **2000**. «Inflammatory bowel disease in Iceland, 1990-1994: a prospective, nationwide, epidemiological study». *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 12, 31-38.
- Blázquez, A. B., & Berin, M. C. **2008**. «Gastrointestinal Dendritic Cells Promote Th2 Skewing via OX40L». *The Journal of Immunology*, 180, 4441-4450.

- Bonen, K. B. & Cho, J. H. **2003**. «The genetics of inflammatory bowel disease». *Gastroenterology*, *124*, 532-536.
- Bouma, G., & Strober, W. **2003**. «The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease». *Nature Reviews Immunology*, *3*, 521-533.
- Boyano-martínez, T., García-Ara, C., Díaz-Pena, J. M., & Martín-Esteban, M. **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*(2), 304-309.
- Boyce, J. A., Assa'ad, A., Burks, A. W., Jones, S. M., Sampson, H. A., Wood, R. A., Plaut, M., Cooper, S. F., & Fenton, M. J. **2010**. «Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: Report of the NIAID-Sponsored Expert Panel». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *126*(6), S1-S58.
- Brandtzaeg, P., Kiyono, H., Pabst, R., & Russell, M. W. **2008**. «Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue». *Mucosal immunology*, *1*(1), 31-37.
- 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*, 248-254.
- Branum, A. M., & Lukacs, S. L. **2009**. «Food allergy among children in the United States». *Pediatrics*, *124*(6), 1549-55.
- Bromander, A., Holmgren, J., & Lycke, N. **1991**. «Cholera toxin stimulates IL-1 production and enhances antigen presentation by macrophages in vitro». *Journal of Immunology*, *146* (9), 2908-2914.
- Brunner, R., Wallmann, J., Szalai, K., Karagiannis, P., Kopp, T., Scheiner, O., Jensen-Jarolim, E., & Pali-Schöll, I. **2007**. «The impact of aluminum in acid-suppressing drugs on the immune response of BALB/c mice». *Clinical & Experimental Allergy*, *37*, 1566-1573.
- Burggraf, M., Waibler, Z., Wangorsch, A., Wolfheimer, S., Kalinke, U., Vieths, S., Toda, M., & Scheurer, S. **2011**. «A fusion protein of flagellin and ovalbumin suppresses the Th2 response and prevents murine intestinal allergy». *Journal of allergy and clinical immunology*, *128*(6), 1340-1348.
- Caminiti, L., Passalacqua, G., Barberi, S., Vita, D., Barberio, G., Luca, R. D., & Pajno, G. B. **2009**. «A new protocol for specific oral tolerance induction in children with IgE-mediated cow's milk allergy». *Allergy and Asthma Proceedings*, *30*(4), 443-448.
- Campbell, J. J., Brightling, C. E., Fiona, A., Qin, S., Murphy, K. E., Hodge, M., Andrew, D. P., Wu, L., Butcher, E. C., & Wardlaw, A. J. **2001**. «Expression of Chemokine Receptors by Lung T Cells from Normal and Asthmatic Subjects». *The Journal of Immunology*, *166*, 2842-2848.
- Cassel, S. L., Eisenbarth, S. C., Iyer, S. S., Sadler, J. J., Colegio, O. R., Tephly, L. A., Carter, A. B., Rothman, P. B., Flavell, R. A., Sutterwala, F. S. **2008**. «The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(26), 9035-9040.
- Chan, V. S.-F., Nie, Y.-J., Shen, N., Yan, S., Mok, M.-Y., & Lau, C.-S. **2012**. «Distinct roles of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus». *Autoimmunity Reviews*, *11*, 890-897.

## Bibliografía

María Lucía Orsini Delgado

---

- Cianferoni, A., & Spergel, J. M. **2009**. «Food Allergy: Review, Classification and Diagnosis». *Allergology International*, 58, 457-466.
- Ceska, M. **1980**. «Radioimmunoassay of IgE using paper disks». *Methods in enzymology*, 73, 646-656.
- Cosnes, J., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L., Afchain, P., Tiret, E., & Gendre, J.-P. **2005**. «Impact of the increasing use of immunosuppressants in Crohn's disease on the need for intestinal surgery». *Gut*, 54, 237-241.
- Curotto de Lafaille, M. A., Kutchukhidze, N., Shen, S., Ding, Y., Yee, H., & Lafaille, J. J. **2008**. «Adaptive Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation». *Immunity*, 29(1), 114-126.
- Dalmasso, G., Charrier-Hisamuddin, L., Thu Nguyen, H.T., Yan, Y., Sitaraman, S. & Merlin, D. **2008**. «PepT1-mediated tripeptide KPV uptake reduces intestinal inflammation». *Gastroenterology*, 134(1), 166-178.
- Dearman, R. J., & Kimber, I. **2009**. «Animal models of protein allergenicity: potential benefits, pitfalls and challenges». *Experimental Allergy*, 458-468.
- Di Sabatino, A., Biancheri, P., Rovedatti, L., MacDonald, T. T., & Corazza, G. R. **2012**. «Recent advances in understanding ulcerative colitis». *Intern Emerg Med*, 7, 103-111.
- Di Sabatino, A., Rovedatti, L., Vidali, F., MacDonald, T. T., & Corazza, G. R. **2013**. «Recent advances in understanding Crohn's disease». *Intern Emerg Med*, 8, 101-113.
- Dillon, S. B., & MacDonald, T. T. **1985**. «Isolation and function of mucosal lymphocytes in the mouse». *Progress in clinical and biological research*, 181, 381.
- Docena, G. H., Fernandez, R., Chirido, F. G., & Fossati, C. A. **1996**. «Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk». *Allergy*, 51, 412-416.
- Dostert, C., Pétrilli, V., Bruggen, R. V., Steele, C., Mossman, B. T., & Tschopp, J. **2008**. «Innate Immune Activation Through NALP3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica». *Science*, 320, 674-677.
- Dubois, B., Joubert, G., Agüero, M. G. D., Gouanvic, M., Goubier, A., & Kaiserlian, D. **2009**. «Sequential Role of Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory T Cells in Oral Tolerance». *Gastroenterology*, 137(3), 1019-1028.
- Edwards, H. E. **1940**. «Oral desensitization in food allergy». *The Canadian Medical Association Journal*, 234-236.
- Eisenbarth, S. C., Colegio, O. R., O'Connor, W., Sutterwala, F. S., & Flavell, R. A. **2008**. «Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants». *Nature*, 453, 1122-1126.
- Enrique, E., Pineda, F., Malek, T., Bartra, J., De Mateo, A., Cerda, T., Alonso, R., de Mateo, J. A., Cerdá-Trias, T., San Miguel-Moncín, M. M., Monzón, S., García, M., Palacios, R., & Cisteró-Bahíma, A. **2005**. «Sublingual immunotherapy for hazelnut food allergy: A randomized , double-blind , placebo-controlled study with a standardized hazelnut extract». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116(5), 1073-1079.

- Eriksson, K., Fredriksson, M., Nordstro, I., & Holmgren, J. **2003**. «Cholera Toxin and Its B Subunit Promote Dendritic Cell Vaccination with Different Influences on Th1 and Th2 Development». *Infection and Immunity*, 71(4), 1740-1747.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K. W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Fioretti, M. C., Alegre, M. L., Puccetti, P. **2003**. «Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells». *Nature Immunology*, 4(12), 1206-1212.
- Fantini, M. C., Rizzo, A., Fina, D., Caruso, R., Sarra, M., Stolfi, C., Becker, C., MacDonald, T. T., Pallone, F., Neurath, M. F., & Monteleone, G. **2009**. «Smad7 Controls Resistance of Colitogenic T Cells to Regulatory T Cell-Mediated suppression». *Gastroenterology*, 136(4), 1308-1316.e3.
- Feng, T., & Elson, C. O. **2011**. «Adaptive immunity in the host-microbiota dialog». *Mucosal Immunol*, 4(1), 15-21.
- Finkelman, F. D. **2007**. «Anaphylaxis: Lessons from mouse models». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(3), 506-515.
- Fleischer, D. M., Burks, A. W., Vickery, B. P., Scurlock, A. M., Wood, R. A., Jones, S. M., Sicherer, S. H., Liu, A. H., Stablein, D., Henning, A. K., Mayer, L., Lindblad, R., Plaut, M., & Sampson, H. A. **2013**. «Sublingual immunotherapy for peanut allergy: A randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(1), 119-127.
- Gagliardi, M. C., & De Magistris, M. T. **2003**. «Maturation of human dendritic cells induced by the adjuvant cholera toxin: role of cAMP on chemokine receptor expression». *Vaccine*, 21, 856-861.
- Garrett, W. S., Gordon, J. I., & Glimcher, L. H. **2010**. «Homeostasis and Inflammation in the Intestine». *Cell*. 140(6), 859-870.
- Gearry, R. B., Irving, P. M., Barrett, J. S., Nathan, D. M., Shepherd, S. J., & Gibson, P. R. **2009**. «Reduction of dietary poorly absorbed short-chain carbohydrates (FODMAPs) improves abdominal symptoms in patients with inflammatory bowel disease — a pilot study». *Journal of Crohn's & Colitis*, 3(1), 8-14.
- Gell, P. G. H., & Coombs, R. R. A. **1963**. «Clinical aspects of immunology». *Clinical aspects of immunology*. 1st ed. Oxford, England.
- Giambartolomei, G. H., Delpino, M. V., Cahanovich, M. E., Wallach, J. C., Baldi, P. C., Velikovskiy, C. A. & Fossati, C. A. **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), 252-259.
- Giambartolomei, G. H., Zwerdling, A., Cassataro, J., Bruno, L., Fossati, C. A., & Philipp, M. T. **2004**. «Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed Brucella abortus». *Journal of Immunology*, 173(7), 4635-4642.
- Goubier, A., Dubois, B., Gheit, H., Joubert, G., Villard-Truc, F., Asselin-Paturel, C., Trinchieri, G., & Kaiserlian, D. **2008**. «Plasmacytoid Dendritic Cells Mediate Oral Tolerance». *Immunity*, 29, 464-475.
- Gramberg, J. L. V., Veer, M. J. D., Hehir, R. E. O., Meeusen, E. N. T., & Bischof, R. J. **2013**. «Use of Animal Models to Investigate Major Allergens Associated with Food Allergy». *Journal of Allergy*, 2013, 1-11.

## Bibliografía

María Lucía Orsini Delgado

---

- Griseri, T., Asquith, M., Thompson, C., & Powrie, F. **2010**. «OX40 is required for regulatory T cell-mediated control of colitis». *Journal of Experimental Medicine*, 207(4), 699-709.
- Guarner, F., Bourdet-Sicard, R., Brandtzaeg, P., Gill, H. S., McGuirk, P., van Eden, W., Versalovic, J., Weinstock, J. V., & Rook, G. A. **2006**. «Mechanisms of Disease: the hygiene hypothesis revisited». *Gastroenterology & Hepatology*. 3(5), 275-284.
- Hanai, H., & Sugimoto, K. **2009**. «Curcumin has Bright Prospects for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease». *Current Pharmaceutical Design*, 15, 2087-2094.
- Henson, M., & Burks, A. W. **2012**. «The future of food allergy therapeutics». *Semin Immunopathol*, 34, 703-714.
- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E. O., Kono, H., Rock, K. L., Fitzgerald, K. A., & Latz, E. **2008**. «Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization». *Nature Immunology*, 9(8), 847-856.
- Høst, A., Halken, S., Jacobsen, H. P., Christensen, A. E., Herskind, A. M., & Plesner, K. **2002**. «Clinical course of cow's milk protein allergy/intolerance and atopic diseases in childhood». *Pediatric Allergy and Immunology*, 13(15), 23-28.
- Hou, J. K., Abraham, B., & El-Serag, H. **2011**. «Dietary Intake and Risk of Developing Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review of the Literature». *The American Journal of Gastroenterology*, 106(4), 563-573.
- Huang, C., Wu, T., Chuà, Y., Hwang, K., Wang, C., & Peng, H. **2008**. «Effect of Neonatal Sublingual Vaccination with Native or Denatured Ovalbumin and Adjuvant CpG or Cholera Toxin on Systemic and Mucosal Immunity in Mice». *Basic Immunology*, 68, 502-510.
- Huehn, J., & Beyer, M. **2015**. «Epigenetic and transcriptional control of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells». *Seminars in Immunology*, 27(1), 10-18.
- Ibáñez, A. E., Smaldini, P., Coria, L. M., Delpino, M. V., Pacífico, L. G. G., Oliveira, S. C., Risso, G. S., Pasquevich, K. A., Fossati, C. A., Giambartolomei, G. H., Docena, G. H., & Cassataro, J. **2013**. «Unlipidated outer membrane protein Omp16 (U-Omp16) from *Brucella* spp. as nasal adjuvant induces a Th1 immune response and modulates the Th2 allergic response to cow's milk proteins». *PLoS One*, 8(7), e69438.
- Isolauri, E., Sütas, Y., Salo, M. K., Isosomppi, R., & Kaila, M. **1998**. «Elimination diet in cow's milk allergy: Risk for impaired growth in young children». *The Journal of pediatrics*, 132(6), 1004–1009.
- Izcue, A., Coombes, J. L., & Powrie, F. **2009**. «Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation». *Annual Reviews of Immunology*, 27, 313-38.
- Järvinen, K.-M., Beyer, K., Vila, L., Bardina, L., Mishoe, M., & Sampson, H. A. **2007**. «Specificity of IgE antibodies to sequential epitopes of hen's egg ovomucoid as a marker for persistence of egg allergy». *Allergy*, 62, 758-765.
- Josefowicz, S. Z., Lu, L.-fan, & Rudensky, A. Y. **2012**. «Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function». *Annual Reviews of Immunology*, 30, 531-564.

- Josefowicz, S. Z., Niec, R. E., Kim, H. Y., Treuting, P., Chinen, T., Zheng, Y., Umetsu, D. T., & Rudensky, A. Y. **2012**. «Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal T<sub>H</sub>2 inflammation». *Nature*, 482(7385), 395-399.
- Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R. K., Duerr, R. H., McGovern, D. P., Hui, K. I., Lee, J. C., Schumm, L.P., Sharma, Y., Anderson, C. A., Essers, J., Mitrovic, M., Ning, K., Cleynen, I., Theatre, E., Spain, S. L., Raychadhuri, S., Ahmad, T., Amininejad, L., Ananthakrishnan, A. N., Andersen, V., Andrews, J. M., Baidoo, L., Balschun, T., Bampton, P. A., Bitton, A., Boucher, G., Brand, S., Büning, C., Cohain, A., Cichon, S., D'Amato, M., De Jong, D., Devaney, K. L., Dubinsky, M., Edwards, C., Ellinghaus, D., Ferguson, L. R., Franchimont, D., Frasen, K., Gearry, R., Georges, M., Gieger, C., Glas, J., Harituanians, T., Hart, A., Hawkey, C., Hedl, M., Hu, X., Karlsen, T. H., Kupcinskis, L., Kugathasan, S., Latiano, A., Laukens, D., Lawrance, I. C., Lees, C. W., Louis, E., Mahy, G., Mansfield, J., Morgan, A. R., Mowat, C., Newman, W., Palmieri, O., Ponsioen, C. Y., Potocnik, U., Prescott, N. J., Regueiro, M., Rotter, J. I., Russell, R. K., Sanderson, J. D., Sans, M., Satsangi, J., Schreiber, S., Simms, L. A., Sventoraityte, J., Targan, S. R., Taylor, K. D., Tremelling, M., Verspaget, H. W., De Vos, M., Wijmenga, C., Wilson, D. C., Winkelmann, J., Xavier, R. J., Zeissig, S., Zhang, B., Zhang, C. K., Zhao, H. & The International IBD Genetics Consortium. **2012**. «Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease». *Nature*, 490(7422), 119-124.
- Jurjus, A. R., Khoury, N. N., & Reimund, J.-M. **2004**. «Animal models of inflammatory bowel disease». *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 50(2), 81-92.
- Kang, S.-jo. **2012**. «The Bloodline of CD8 $\alpha$  + Dendritic Cells». *Mol.Cells*, 34, 219-229.
- Karlsson, M. R., Rugtveit, J., & Brandtzaeg, P. **2004**. «Allergen-responsive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy». *The Journal of Experimental Medicine*, 199(12), 1679–88.
- Karlsson, M., Lundin, S., Dahlgren, U., Kahu, H., Pettersson, I., & Telemo, E. **2001**. «“Tolerosomes” are produced by intestinal epithelial cells». *European Journal of Immunology*, 31, 2892-2900.
- Kaser, A., Zeissig, S., & Blumberg, R. S. **2010**. «Inflammatory Bowel Disease». *Annual Reviews of Immunology*, 28, 573-621.
- Keet, C. A., Frischmeyer-Guerrero, P. A., Thyagarajan, A., Schroeder, J. T., Hamilton, R. G., Boden, S., Steele, P., Driggers, S., Burks, A. W., & Wood, R. A. **2012**. «The safety and efficacy of sublingual and oral immunotherapy for milk allergy». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(2), 448-455.
- Khor, B., Gardet, A., & Xavier, R. J. **2011**. «Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease». *Nature*, 474, 307-317.
- Kim, E. H., Bird, J. A., Kulis, M., Laubach, S., Pons, L., Shreffler, W., Steele, P., Kamilaris, J., Vickery, B., & Burks, A. W. **2011**. «Sublingual immunotherapy for peanut allergy: Clinical and immunologic evidence of desensitization». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), 640-646.
- Kool, M., Soulli, T., Nimwegen, M. V., Willart, M. A. M., Muskens, F., Jung, S., Hoogsteden, H. C., Hammad, H., & Lambrecht, B. N. **2008**. «Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells». *The Journal of Experimental Medicine*, 205(4), 869-882.
- Kostic, A. D., Xavier, R. J., & Gevers, D. **2014**. «The Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Current Status». *Gastroenterology*, 146(6), 1489-1499.

## Bibliografía

María Lucía Orsini Delgado

---

- Krogulska, A., Borowiec, M., Polakowska, E., Dynowski, J., Mlynarski, W., & Wasowska-Królikowska, K. **2011**. «FOXP3, IL-10, and TGF- $\beta$  Genes Expression in Children with IgE-Dependent Food Allergy». *Journal of Clinical Immunology*, 31(2), 205-215.
- Kulis, M., Gorentla, B., Burks, A. W., & Zhong, X.-ping. **2013**. «Type B CpG oligodeoxynucleotides induce Th1 responses to peanut antigens: Modulation of sensitization and utility in a truncated immunotherapy regimen in mice». *Mol. Nutr. Food Res.*, 57, 906-915.
- Kuroda, E., Ishii, K. J., Uematsu, S., Ohata, K., Coban, C., Akira, S., & Aritake, K. **2011**. «Silica Crystals and Aluminum Salts Regulate the Production of Prostaglandin in Macrophages via NALP3 Inflammasome-Independent Mechanisms». *Immunity*, 34(4), 514-526.
- Lahat, G., Halperin, D., Barazovsky, E., Shalit, I., Rabau, M., Klausner, J., & Fabian, I. **2007**. «Immunomodulatory Effects of Ciprofloxacin in TNBS-Induced Colitis in Mice». *Inflammatory Bowel Disease*, 13(5), 557-565.
- Laucat, F. R., Hermine, O., Vijay, S., Gambineri, E., Bensussan, N. C., Fischer, A., Ochs, H. D., Goulet, O., Ruemmele, F. M. **2007**. «Severe Food Allergy as a Variant of IPEX Syndrome Caused by a Deletion in a Noncoding Region of the FOXP3 Gene». *Gastroenterology*, 132, 1705-1717.
- Lerner, A. **2012**. «Aluminum as an adjuvant in Crohn's disease induction». *Lupus*, 21, 231-238.
- Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A.-K. L., & Flavell, R. A. **2006**. «Transforming Growth Factor- $\beta$  Regulation of Immune Responses». *Annual Reviews of Immunology*, 24, 99-246.
- Li, X.-M., Srivastava, K., Huleatt, J. W., Bottomly, K., Burks, A. W., & Sampson, H. A. **2003**. «Engineered Recombinant Peanut Protein and Heat-Killed *Listeria monocytogenes* Coadministration Protects Against Peanut-Induced Anaphylaxis in a Murine Model». *The Journal of Immunology*, 170(6), 3289-3295.
- Li, X.-M., Schofield, B. H., Huang, C.-K., Kleiner, G. I., & Sampson, H. A. **1999**. «A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103(2), 206-214.
- Lin, S.Y., Erekosima, N., Kim, J.M., Ramanathan, M., Suarez-Cuervo, C., Chelladurai, Y., Ward D., & Segal, J.B. **2013**. «Sublingual Immunotherapy for the Treatment of Allergic Rhinoconjunctivitis and Asthma: A Systematic Review». *Journal of the American Medical Association*, 309(12), 1278-1288.
- Lombardi, V., Speak, A. O., Kerzerho, J., Szely, N., & Akbari, O. **2012**. «CD8 $\alpha^+\beta^-$  and CD8 $\alpha^+\beta^+$  plasmacytoid dendritic cells induce Foxp3 $^+$  regulatory T cells and prevent the induction of airway hyper-reactivity». *Mucosal immunology*, 5(4), 432-443.
- Lombardi, V., Van Overtvelt, L., Horiot, S., Moussu, H., Chabre, H., Louise, A., Balazuc, A., Mascarell, L., & Moingeon, P. **2008**. «Toll-like receptor 2 agonist Pam3CSK4 enhances the induction of antigen-specific tolerance via the sublingual route». *Clinical & Experimental Allergy*, 38, 1819-1829.
- Longo, G., Berti, I., Burks, A. W., Krauss, B., & Barbi, E. **2013**. «IgE-mediated food allergy in children». *The Lancet*, 382, 1656-1664.
- Lupp, C., Robertson, M. L., Wickham, M. E., Sekirov, I., Champion, O. L., Gaynor, E. C., & Finlay, B. B. **2007**. «Host-Mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae». *Cell Host & Microbe*, 2, 119-129.

- Maazi, H., Lam, J., Lombardi, V., & Akbari, O. **2013**. «Role of plasmacytoid dendritic cell subsets in allergic asthma». *Allergy*, *68*, 695-701.
- MacDonald, T. T., Monteleone, I., Fantini, M. C., & Monteleone, G. **2011**. «Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine». *Gastroenterology*. *140*(6), 1768-75.
- MacDonald, T. T., & Monteleone, G. **2005**. «Immunity, Inflammation, and Allergy in the Gut». *Science*, *307*, 1920-1925.
- Macpherson, A., Khoo, U. Y., Forgacs, I., Philipott-Howard, J., & Bjamason, I. **1996**. «Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria». *Gut*, *38*, 365-375.
- Maldonado-López, R., De Smedt, T., Michel, P., Godfroid, J., Pajak, B., Heirman, C., Thielemans, K., Leo, O., Urbain, J., & Moser, M. **1999**. «CD8 $\alpha^+$  and CD8 $\alpha^-$  subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo». *The Journal of Experimental Medicine*, *189*(3), 587-592.
- Martorelli, A., De la Hoz, B., Ibáñez, M. D., Bone, J., Terrados, M. S., Michavila, A., Plaza, A. M., Alonso, E., Garde, J., Nevot, S., Echeverría, L., Santana, C., Cerdá, J. C., Escudero, C., Guallar, I., Piquer, M., Zapatero, L., Ferré, L., Bracamonte, T., Muriel, A., Martínez, M. I., & Félix, R. **2011**. «Oral desensitization as a useful treatment in 2-year-old children with cow's milk allergy». *Clinical & Experimental Allergy*, *41*, 1297-1304.
- Mauri, C., & Bosma, A. **2012**. «Immune Regulatory Function of B Cells». *Annual Reviews of Immunology*, *30*, 221-241.
- Mayer, L. **2003**. «Mucosal Immunity». *Pediatrics*. *111*(6), 1595-1600.
- Maynard, C. L., Harrington, L. E., Janowski, K. M., Oliver, J. R., Zindl, C. L., Rudensky, A. Y., & Weaver, C. T. **2007**. «Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3 $^+$  and Foxp3 $^-$  precursor cells in the absence of interleukin 10». *Nature Immunology*, *8*(9), 931-941.
- Mazzini, E., Massimiliano, L., Penna, G., & Rescigno, M. **2014**. «Oral Tolerance Can Be Established via Gap Junction Transfer of Fed Antigens from CX3CR1 $^+$  Macrophages to CD103 $^+$  Dendritic Cells». *Immunity*, *40*, 248-261.
- McClain, S., & Bannon, G. A. **2006**. «Animal models of food allergy: opportunities and barriers». *Current Allergy and Asthma Reports*. *6*(2), 141-4.
- Mempel, M., Rakoski, J., Ring, J., & Ollert, M. **2003**. «Severe anaphylaxis to kiwi fruit: Immunologic changes related to successful sublingual allergen immunotherapy». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *111*(6), 1406-1409.
- Merlin, D., Si-Tahar, M., Sitaraman, S. V., Eastburn, K., Williams, I., Liu, X., Hediger, M. A., & Madara, J. L. **2001**. «Colonic epithelial hPepT1 expression occurs in inflammatory bowel disease: Transport of bacterial peptides influences expression of MHC class 1 molecules». *Gastroenterology*, *120*(7), 1666-1679.
- Merrifield, R. B. **1963**. «Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide». *Journal of the American Chemical Society*, *85*(14), 2149-2154.

## Bibliografía

María Lucía Orsini Delgado

---

- Molodecky, N. A., Soon, I. N. G. S., Rabi, D. M., Ghali, W. A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H. W., & Kaplan, G. G. **2012**. «Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review». *Gastroenterology*, *142*(1), 46-54.e42.
- Monteleone, G., Kumberova, A., Croft, N. M., McKenzie, C., Steer, H. W., & MacDonald, T. T. **2001**. «Blocking Smad7 restores TGF- $\beta$ 1 signaling in chronic inflammatory bowel disease». *Journal of Clinical Investigations*, *108*, 601-609.
- Monteleone, G., Neurath, M. F., Ardizzone, S., Di Sabatino, A., Fantini, M. C., Castiglione, F., Scribano, M. L., Armuzzi, A., Caprioli, F., Sturniolo, G. C., Rogai, F., Vecchi, M., Atreya, R., Bossa, F., Onali, S., Fichera, M., Corazza, G. R., Biancone, L., Savarino, V., Pica, R., Orlando, A., & Pallone, F. **2015**. «Mongersen, an Oral SMAD7 Antisense Oligonucleotide, and Crohn's Disease». *N Engl J Med*, *372*, 1104-1113
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., & O'Garra, A. **2001**. «Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor». *Annual Reviews of Immunology*, *19*, 683-765.
- Morafo, V., Srivastava, K., Huang, C.-kang, Kleiner, G., Lee, S.-young, Sampson, H. A., & Li, X.-M. **2003**. Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential Th2-Th1 responses in C3H/HeJ and BALB/c mice». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *111*(5), 1122-1128.
- Moran, T. P., Vickery, B. P., & Burks, A. W. **2013**. «Oral and sublingual immunotherapy for food allergy: current progress and future directions». *Current Opinion in Immunology*, *25*, 1-7.
- Morgan, X. C., Tickle, T. L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K. L., Ward, D. V., Reyes, J. A., Shah, S. A., Leleiko, N., Snapper, S. B., Bousvaros, A., Korzenik, J., Sands, B. E., Xavier, R. J., & Huttenhower, C. **2012**. «Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment». *Genome Biology*, *13*(9), R79, 1-18.
- Moronta, J. **2015**. «Actividad biológica de proteínas y péptidos de amaranto. Efectos inmunomodulatorios». *Trabajo de Tesis Doctoral*, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.
- Moronta, J., Smaldini, P. L., Docena, G. H., & Añón, M. C. **2016**. «Peptides of amaranth were targeted as containing sequences with potential anti-inflammatory properties». *Journal of Functional Foods*, *21*, 463-473.
- Mullis, K. B. **1990**. «The unusual origin of the polymerase chain reaction». *Scientific American*, *262*(4), 56-61.
- Mutlu, E. A., Engen, P. A., Soberanes, S., Urich, D., Forsyth, C. B., Nigdelioglu, R., Chiarella, S. E., Radigan, K. A., Gonzalez, A., Jakate, S., Keshavarzian, A., Budinger, G. R. S., & Mutlu, G. M. **2011**. «Particulate matter air pollution causes oxidant-mediated increase in gut permeability in mice». *Particle and Fibre Toxicology*, *8*(19), 1-13.
- Narisety, S. D., Frischmeyer-guerrero, P. A., Keet, C. A., Gorelik, M., Schroeder, J., Hamilton, R. G., & Wood, R. A. **2015**. «A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of sublingual versus oral immunotherapy for the treatment of peanut allergy». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *135*(5), 1275-1282.

- Neurath, M. F., Pettersson, S., Meyer zum Büschenfelde, K.-H., & Strober, W. **1996**. «Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides for the p65 subunit of NF- $\kappa$ B abrogates established experimental colitis in mice». *Nature Medicine*, 2(9), 998-1004.
- Neurath, M. F., Fuss, I., & Strober, W. **2000**. «TNBS-Colitis». *Intern. Rev. Immunol.*, 19, 51-62.
- Neurath, M. F., Finotto, S., & Glimcher, L. H. **2002**. «The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity». *Nature Medicine*, 8(6), 567-573.
- Ng, S. C., Bernstein, C. N., Vatn, M. H., Lakatos, P. L., Loftusjr, E. V., Tysk, C., Morain, C. O., Moum, B., Colombel, J.-F. **2013**. «Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease». *Gut*, 65, 630-649.
- Nguyen, K. D., Vanichsarn, C., Fohner, A., & Nadeau, K. C. **2009**. «Selective deregulation in chemokine signaling pathways of asthma». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(4), 933-939.
- Novak, N., Valenta, R., Bohle, B., Laffer, S., Haberstock, J., Kraft, S., & Bieber, T. **2004**. «Fc $\epsilon$ RI engagement of Langerhans cell-like dendritic cells and inflammatory dendritic epidermal cell-like dendritic cells induces chemotactic signals and different T-cell phenotypes in vitro». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(5), 949-957.
- Novak, N., Bieber, T., & Allam, J. **2011**. «Immunological mechanisms of sublingual allergen-specific immunotherapy». *Allergy*, 66, 733-739.
- Nowak-Węgrzyn, A. **2003**. «Future Approaches to Food Allergy». *Pediatr*, 111(6), 1672-1680.
- Nowak-Węgrzyn, A., & Sampson, H. A. **2011**. «Future therapies for food allergies». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 558-573.
- O'Hara, A. M., & Shanahan, F. **2006**. «The gut flora as a forgotten organ». *EMBO Reports*, 7, 688-693.
- Ochando, J. C., Homma, C., Yang, Y., Hidalgo, A., Garin, A., Tacke, F., Angeli, V., Li, Y., Boros, P., Ding, Y., Jessberger, R., Trinchieri, G., Lira, S. A., Randolph, G. J., & Bromberg, J. S. **2006**. «Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts». *Nature immunology*, 7(6), 652-662.
- Okada, H., Kuhn, C., Feillet, H. & Bach, J. F. **2010**. «The “hygiene hypothesis” for autoimmune and allergic diseases: an update». *Clinical & Experimental Immunology*. 160, 1-9.
- Ordás, I., Eckmann, L., Talamini, M., Baumgart, D. C., & Sandborn, W. J. **2012**. «Ulcerative colitis». *Lancet*. 380, 1606–19.
- Pabst, O., & Mowat, A. M. **2012**. «Oral tolerance to food protein». *Mucosal Immunology*, 5(3), 232-239.
- Pajno, G. B., Caminiti, L., Ruggeri, P., Luca, R. D., Vita, D., Rosa, M. L., & Passalacqua, G. **2010**. «Oral immunotherapy for cow's milk allergy with a weekly up-dosing regimen: a randomized single-blind controlled study». *Ann Allergy Asthma Immunol.*, 105, 376-381.
- Pasquevich, K. A., Estein, S. M., García Samartino, C., Zwerdling, A., Coria, L. M., Barrionuevo, P., Fossati, C. A., Giambartolomei, G. H., & Cassataro J. **2009**. «Immunization with recombinant *Brucella* species

## Bibliografía

María Lucía Orsini Delgado

---

outer membrane protein Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells as well as systemic and oral protection against *Brucella abortus* infection». *Infection and Immunity*, 77(1), 436-445.

Pasquevich, K. A., García Samartino, C., Coria, L. M., Estein, S. M., Zwerdling, A., Ibáñez, A. E., Barrionuevo, P., Zwerdling, A., Barbosa Carvalho, N., Borkowski, J., Costa Oliveira, S., Warzecha, H., Giambartolomei, G. H., & Cassataro, J. **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-adjuvanting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis». *Journal of Immunology*, 184(9), 5200-5212.

Patriarca, G., Nucera, E., Roncallo, C., Pollastrini, E., Bartolozzi, F., De Pasquale, T., Buonomo, A., Gasbarrini, G., Di Campli, C., & Schiavino, D. **2003**. «Oral desensitizing treatment in food allergy: clinical and immunological results». *Aliment Pharmacol Ther*, 17, 459-465.

Philpott, D. J., & Girardin, S. E. **2004**. «The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection». *Molecular Immunology*, 41, 1099-1108.

Ponda, P. P., & Mayer, L. **2005**. «Mucosal Epithelium in Health and Disease». *Current Molecular Medicine*, 1, 549-556.

Powell, J. J., Ainley, C. C., Harvey, R. S. J., Mason, I. M., Kendall, M. D., Sankey, E. A., Dhillon, A. P., Thompson, R. P. H. **1996**. «Characterisation of inorganic microparticles in pigment cells of human gut associated lymphoid tissue». *Gut*, 38, 390-395.

Powell, J. J., Thoree, V., & Pele, L. C. **2007**. «Dietary microparticles and their impact on tolerance and immune responsiveness of the gastrointestinal tract». *British Journal of Nutrition*, 98, S59-S63.

Pulendran, B., Smith, J. L., Caspary, G., Brasel, K., Pettit, D., Maraskovsky, E., & Maliszewski, C. R. **1999**. «Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(3), 1036-1041.

Ray, S., Salvo, C. D., & Pizarro, T. T. **2014**. «Central role of IL-17/Th17 immune responses and the gut microbiota in the pathogenesis of intestinal fibrosis». *Current Opinion in Gastroenterology*, 30(6), 531-538.

Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P., & Ricciardi-Castagnoli, P. **2001**. «Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial to sample bacteria». *Nat Immunol*, 2(4), 361-367.

Rieder, F., & Fiocchi, C. **2009**. «Intestinal fibrosis in IBD - a dynamic, multifactorial process». *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 6, 228-235.

Rogler, G., & Vavricka, S. **2015**. «Exposome in IBD : Recent Insights in Environmental Factors that Influence the Onset and Course of IBD». *Inflammatory Bowel Disease*, 21(2), 400-408.

Rolinck-Werninghaus, C., Staden, U., Mehl, A., Hamelmann, E., Beyer, K., & Niggemann, B. **2005**. «Specific oral tolerance induction with food in children: transient or persistent effect on food allergy?». *Allergy*, 60(10), 1320- 1322.

- Rovedatti, L., Kudo, T., Biancheri, P., Sarra, M., Knowles, C. H., Rampton, D. S., Corazza, G. R., Monteleone, G., Di Sabatino, A., & MacDonald, T. T. **2009**. «Differential regulation of interleukin 17 and interferon  $\gamma$  production in inflammatory bowel disease». *Gut*, *58*, 1629-1636.
- Rupa, P., & Mine, Y. **2012**. «Oral immunotherapy with immunodominant T-cell epitope peptides alleviates allergic reactions in a BALB/c mouse model of egg allergy». *Allergy*, *67*, 74-82.
- Russell, M. W., Mestecky, J., Strober, W., Lambrecht, B. N., Kelsall, B. L., & Cheroutre, H. **2015**. «Chapter 1. Overview: The Mucosal Immune System». *Mucosal Immunology*, 4<sup>o</sup> ed.
- Saarinen, K. M., Pelkonen, A. S., Mäkelä, M. J., & Savilahti, E. **2005**. «Clinical course and prognosis of cow's milk allergy are dependent on milk-specific IgE status». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *116*(4), 869-875.
- Saloga, J., & Knop, J. **2000**. «Does sensitization through the skin occur?». *Allergy*, *55*, 905-909.
- Sampson, H. A., & Albergo, R. **1984**. «Comparison food challenges in children with atopic dermatitis». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *74*, 26-33.
- Sampson, H. A., & Ho, G. **1997**. «Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *100*, 444-451.
- Santucci, L., Fiorucci, S., Rubinstein, N., Mencarelli, A., Palazzetti, B., Federici, B., Rabinovich, G. A., & Morelli, A. **2003**. «Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice». *Gastroenterology*, *124*, 1381-1394.
- Sartor, R. B. **2004**. «Therapeutic Manipulation of the Enteric Microflora in Inflammatory Bowel Diseases: Antibiotics, Probiotics, and Prebiotics». *Gastroenterology*, *126*, 1620-1633.
- Sato, S., Yanagida, N., Ogura, K., Asami, T., Okada, Y., & Koike, Y. **2014**. «Immunotherapy in food allergy: towards new strategies». *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, *32*, 195-202.
- Savilahti, E. M., Rantanen, V., Lin, J. S., Karinen, S., Saarinen, K. M., Goldis, M., Mäkelä, M. J., Hautaniemi, S., Savilahti, E., & Sampson, H. A. **2010**. «Early recovery from cow's milk allergy is associated with decreasing IgE and increasing IgG4 binding to cow's milk epitopes». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(6), 1315-1321.
- Schöll, I., Untersmayr, E., Bakos, N., Roth-Walter, F., Gleiss, A., Boltz-Nitulescu, G., Scheiner, O., Jensen-Jarolim, E. **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), 154-160.
- Segain, J.-P., Blétière, D. R. D., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., Ferrier, L., Bonnet, C., Blottière, H. M., & Galmiche, J.-P. **2000**. «Butyrate inhibits inflammatory responses through NF $\kappa$ B inhibition: implications for Crohn's disease». *Gut*, *47*, 397-403.
- Shannon, W., Blaschek, K., & Gonzalez de Mejia, E. **2005**. «Allergic proteins in soybean: processing and reduction of P34 allergenicity». *Nutrition Reviews*, *63*(2), 47-58.

## Bibliografía

María Lucía Orsini Delgado

---

- Shreffler, W. G., Wanich, N., Moloney, M., Nowak-Węgrzyn, A., & Sampson, H. A. **2009**. «Association of allergen-specific regulatory T cells with the onset of clinical tolerance to milk protein». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(1), 43-52. American Academy of Allergy, Asthma & Immunology.
- Sicherer, S. H. **2011**. «Epidemiology of food allergy». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), 594–602.
- Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. **2006**. «Food allergy». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(2), 470-475.
- Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. **2010**. «Food allergy». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S116-S125.
- Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. **2014**. «Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(2), 291–307.
- Skripak, J. M., Nash, S. D., Rowley, H., Brereton, N. H., Oh, S., Hamilton, R. G., Matsui, Elizabeth, C., Burks, A. W., & Wood, R. A. **2008**. «A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122(6), 1154–1160.
- Smaldini, P. L. **2012**. «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». *Trabajo de Tesis Doctoral*, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.
- Smaldini, P., Curciarello, R., Candreva, A., Rey, M. A., Fossati, C. A., Petruccelli, S., & Docena, G. H. **2012**. «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*, 158(4), 335-346.
- Smaldini, P. L., Ibáñez, A. E., Fossati, C. A., Cassataro, J., & Docena, G. H. **2014**. «Oral delivery of *Brucella* spp. recombinant protein U-Omp16 abrogates the IgE-mediated milk allergy». *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10(7), 2015-2023.
- Smaldini, P. L., Orsini Delgado, M. L., Fossati, C. A., & Docena, G. H. **2015**. «Orally-Induced Intestinal CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Treg Controlled Undesired Responses towards Oral Antigens and Effectively Dampened Food Allergic Reactions». *PloS one*, 10(10), e0141116.
- Smith, T. R. F., & Kumar, V. **2008**. «Revival of CD8<sup>+</sup> Treg-mediated suppression». *Trends in Immunology*, 29, 337-342.
- Soubh, A. A., Abdallah, D. M., & El-abhar, H. S. **2015**. «Geraniol ameliorates TNBS-induced colitis: Involvement of Wnt/ $\beta$ -catenin , p38MAPK , NF $\kappa$ B , and PPAR $\gamma$  signaling pathways». *Life Sciences*, 136, 142-150.
- Staden, U., Rolinck-Werninghaus, C., Brewe, F., Wahn, U., Niggemann, B., & Beyer, K. **2007**. «Specific oral tolerance induction in food allergy in children: efficacy and clinical patterns of reaction». *Allergy*, 62(11), 1261–9.
- Strachan, D. P. **1989**. «Hay fever, hygiene, and household size». *British Medical Journal*, 299, 1259–1260.

- Strober, W., Fuss, I. J., & Blumberg, R. S. **2002**. «The immunology of mucosal models of inflammation». *Annual Reviews of Immunology*, *20*, 495-549.
- Strober, W., Fuss, I. J., & Mannon, P. **2007**. «The fundamental basis of inflammatory bowel disease». *The Journal of Clinical Investigation*, *117*(3), 514-521.
- Sun, J., Cuburu, N., Blomquist, M., Li, B., Czerkinsky, C., & Holmgren, J. **2006**. «Sublingual Tolerance Induction with Antigen Conjugated to Cholera Toxin B Subunit Induces Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Regulatory T Cells and Suppresses Delayed-Type Hypersensitivity Reactions». *Scandinavian Journal of Immunology*, *64*, 251-259.
- Sutmuller, R. P. M., Morgan, M. E., Netea, M. G., Grauer, O., & Adema, G. J. **2006**. «Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation». *Trends in Immunology*, *27*(8), 387-393.
- Syed, A., Garcia, M. A., Lyu, S.-C., Bucayu, R., Kohli, A., Ishida, S., Berglund, J. P., Tsai, M., & Maecker, H. **2014**. «Peanut oral immunotherapy results in increased antigen-induced regulatory T-cell function and hypomethylation of forkhead box protein 3 (FOXP3)». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *133*(2), 500-510.
- Takeuchi, K., Ito, K., & Namikawa, S. **1990**. «Anti-inflammatory activity of the dry distillation tar of delipidated soybean (Glyteer) (3). Effect on type I-type IV allergic reactions». *Journal of Pharmacological Sciences*, *95*(4), 149-157.
- Tan, W. C., Qiu, D., Liam, B. L., Ng, T. P., Lee, S. H., van Eeden, S. F., D'Yachkova, Y., & Hogg, J. C. **2000**. «The Human Bone Marrow Response to Acute Air Pollution Caused by Forest Fires». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *161*, 1213-1217.
- Thomson, A. W., & Knolle, P. A. **2010**. «Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment». *Immunology*, *10*(11), 753-766.
- Turcanu, V., Maleki, S. J., & Lack, G. **2003**. «Characterization of lymphocyte responses to peanuts in normal children, peanut-allergic children, and allergic children who acquired tolerance to peanuts». *Journal of Clinical Investigations*, *111*(7), 1065-1072.
- Untersmayr, E., Bakos, N., Schöll, I., Kundi, M., Roth-Walter, F., Szalai, K., Riemer, A. B., Ankersmit, H. J., Scheiner, O., Boltz-Nitulescu, G., & Jensen-Jarolim, E. **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), 656-658.
- van Eeden, S. F., Tan, W. C., Suwa, T., Mukae, H., Terashima, T., Fujii, T., Qui, D., Vincent, R. & Hogg, J. C. **2001**. «Cytokines Involved in the Systemic Inflammatory Response Induced by Exposure to Particulate Matter Air Pollutants (PM<sub>10</sub>)». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *164*, 826-830.
- Vandezande, L. M., Wallaert, B., Desreumaux, P., Tscopoulos, A., Lamblin, C., Tonnel, A. B., & Janin, A. **1999**. «Interleukin-5 immunoreactivity and mRNA expression in gut mucosa from patients with food allergy». *Clinical & Experimental Allergy*, *29*, 652-659.
- Varshney, P., Jones, S. M., Scurlock, A. M., Perry, T. T., Kemper, A., Steele, P., Hiegel, A., Kamilaris, J., Carlisle, S., Yue, X., Kulis, M., Pons, L., Vickery, B., & Burks, A. W. **2011**. «A randomized controlled study of peanut oral immunotherapy: Clinical desensitization and modulation of the allergic response». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *127*(3), 654-660.

## Bibliografía

María Lucía Orsini Delgado

---

- Vickery, B. P., Scurlock, A., Jones, S., & Burks, A. W. **2012**. «Mechanisms of Immune Tolerance Relevant to Food Allergy». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), 576–586.
- Vickery, B. P., Lin, J., Kulis, M., Fu, Z., Steele, P. H., Jones, S. M., Scurlock, A. M., Gimenez, G., Bardina, L., Sampson, H. A., & Burks, A. W. **2013**. «Peanut oral immunotherapy modifies IgE and IgG4 responses to major peanut allergens». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(1), 128-134.
- Wang, J., & Sampson, H. A. **2011**. «Food allergy». *The Journal of Clinical Investigation*, 121(3), 827–35.
- Wang, J., & Sampson, H. A. **2013**. «Oral and sublingual immunotherapy for food allergy». *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 31, 198-209.
- Wehkamp, J., Salzman, N. H., Porter, E., Nuding, S., Weichenthal, M., Petras, R. E., Shen, B., Schaeffeler, E., Schwab, M., Linzmeier, R., Feathers, R. W., Chu, H., Lima, H., Fellermann, K., Ganz, T., Stange, E. F. & Bevins, C. L. **2005**. «Reduced Paneth cell  $\alpha$ -defensins in ileal Crohn's disease». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(50), 18129-18134.
- Williams, L. M., & Rudensky, A. Y. **2007**. «Maintenance of the FoxP3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of FoxP3». *Nature Immunology*, 8(3), 277-284.
- Willingham, S. B., & Ting, J. P.-Y. **2008**. «NLRs and the dangers of pollution and aging». *Nature Immunology*, 9(8), 831-833.
- Wood, R. A., Sicherer, S. H., Burks, A. W., Grishin, A., Henning, A. K., Lindblad, R., Stablein, D., & Sampson, H. A. **2013**. «A phase 1 study of heat/phenol-killed, *E.coli*-encapsulated, recombinant modified peanut proteins Ara h1 , Ara h2 , and Ara h3 (EMP-123) for the treatment of peanut allergy». *Allergy*, 68, 803-808.
- Wu, F., & Chakravarti, S. **2007**. «Differential Expression of Inflammatory and Fibrogenic Genes and Their Regulation by NF- $\kappa$ B Inhibition in a Mouse Model of Chronic Colitis». *The Journal of Immunology*, 179, 6988-7000.
- Wu, S.-L., Chen, J.-C., Li, C.-C., Lo, H.-Y., Ho, T.-Y., & Hsiang, C.-Y. **2009**. «Vanillin Improves and Prevents Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Colitis in Mice». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 330(2), 370-376.
- Xavier, R. J., & Podolsky, D. K. **2007**. «Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease». *Nature*. 448, 427-434.
- Xu, L., Kitani, A., & Strober, W. **2010**. «Molecular mechanisms regulating TGF- $\beta$ -induced Foxp3 expression». *Mucosal Immunology*, 3(3), 230–238.
- Yamada, T., Tongu, M., Goda, K., Aoi, N., Morikura, I., Fuchiwaki, T., & Kawauchi, H. **2012**. «Sublingual Immunotherapy Induces Regulatory Function of IL-10-Expressing CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T Cells of Cervical Lymph Nodes in Murine Allergic Rhinitis Model». *Journal of Allergy*, (ID 490905), 1-11.
- Young, E. J. **1983**. «Human brucellosis». *Reviews of Infectious Diseases*. 5(5), 821-842.

Zhan, Y., Kelso, A., & Cheers, C. **1993**. «Cytokine production in the murine response to *Brucella* infection or immunization with antigenic extracts». *Immunology*. 80(3), 458-464.

Zheng, Y., & Rudensky, A. Y. **2007**. «Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage». *Nature Immunology*, 8(5), 457-462.

