

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. Carlos A. Fossati y la co-dirección del Dr. Guillermo H. Docena en el Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune (LISIN) de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

La Plata, Noviembre de 2011.

A mis amores, Juan, Polo y Leandro, mis ojos de cielo...

“...Si el sol que me alumbra se apagara un día
Y una noche oscura ganara mi vida,
Tus ojos de cielo me iluminarían,
Tus ojos sinceros, mi camino y guía...”
 (“Ojos de cielo” de V. Heredia)

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer muy especialmente a toda la gente del LISIN, con quienes día a día compartimos la mesada, y mucho mas....

- A Alberto y a Guillermo, que me dirigieron, gracias por la libertad para trabajar, por enseñarme, por escucharme, por acompañarme en este camino ayudándome de muy diversas formas... gracias por esta experiencia de vida única, por la paciencia, la mirada siempre positiva...
- A Fernando, gracias por estar siempre dispuesto a escuchar...por estar atento a la "persona"...por preguntar, por los consejos, las charlas de temas de todo tipo.
- A Martín por estar siempre dispuesto a colaborar con su mejor sonrisa
- A María, y a Paula, quienes me recibieron en la "Cátedra de Inmuno" (como se llamaba en aquel entonces...) de la mejor manera posible, y que me ayudaron de tan diversas maneras y desde hace tanto...
- A las chichis del "alergo team", Pao, y Rena... gracias por su generosidad, su aguante, por estar siempre dispuestas a ayudar, los consejos, los mates y las charlas post seminarios... con quienes compartí mucho más que el tema de trabajo y las horas en el bioterio.... gracias por la ayuda, y el empujoncito necesario.... Pero principalmente gracias por ser mis amigas.
- A Maru, por los consejos certeros, por la ayuda, las charlas y tantas otras cosas...
- A todos los "lisinos" y a los "ex-lisinos" que por diversos motivos ya no pertenecen al staff estable del laboratorio.... con quienes, durante mi estadía en el laboratorio he compartido no sólo la mesada, sino también charlas, mates, consejos, cadenas de mail inigualables, asados, congresos, y los tan necesarios "afterlabs"!!....en fin gracias por todo Belu, Ro, Loli, Ceci, Facu, Vani, Yessi, Yani, Nico, Gri, Agus,

Hernán, David, Juan, Romi A., Costi, Coqui, Nati, Dom, Ezequiel, Flor, Paula B, Vero, Deliana, Paula R.

- A mis nuevos compañeros del IMBICE, quienes me recibieron con gran calidez haciéndome sentir como en casa de inmediato, compartiendo conmigo mucho mas que los experimentos, gracias Ana, Bamba, Guille y Lu.
- A mis amigas con quienes compartí la facu y ahora comparto mi vida, las quiero mucho...Mai, Daco y Cali.
- A mi amiga de la infancia, mi hermana de la vida... Caro.
- A Stella, mi suegra, que me dio una mano gigante en este último tramo.
- Para mi Norte, mi familia a quien amo profundamente, por orientarme en todo momento, por mostrarme que cosas son realmente importantes en la vida, y darme fuerzas siempre para seguir adelante, Juan, Poli y Lean...mis amores!! A mi hermano por la ayuda con el diseño y la informática, gracias por estar cerca. Y a mis papis quienes siempre estuvieron para apoyarme, para acompañarme y ayudarme en **todo siempre**, de la manera más generosa y con todo el amor y la comprensión... por hacerme sentir que estaban siempre a la mano a pesar de los kilómetros!!

ÍNDICE:

ABREVIATURAS	9
BREVE INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES.....	11
INTRODUCCIÓN.....	13
1.- ALERGIA	15
1. a- Reacciones de hipersensibilidad: definiciones y aspectos generales	15
2.- ALERGIA ALIMENTARIA	22
2. a- Sistema Inmune de mucosas, tolerancia oral y alergia	26
3.- GENERALIDADES SOBRE ALERGENOS.....	30
4.- DIAGNÓSTICO DE LAS ALERGIAS ALIMENTARIAS.....	31
5.- TRATAMIENTOS	35
6.- MODELOS ANIMALES DE ALERGIA ALIMENTARIA	38
6. a- Adyuvantes	42
6. b- Modulación de la respuesta inmune. Usos terapéuticos	45
7.- ALERGIA A PROTEINAS DE SOJA: REACTIVIDAD CRUZADA.....	48
7. a- Proteínas de soja. Generalidades.....	49
7. b- Alergia a proteínas de soja.....	51
MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
1- PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS:	57
2- PLANES DE SENSIBILIZACIÓN	58
2 a-Pruebas <i>in vivo</i>	62
2 a-1) Análisis de los signos clínicos inducidos en el desafío oral	62
2 a-2) Prueba cutánea.....	63
2 a-3) Prueba de transferencia cutánea pasiva (TCP) o Anafilaxia cutánea pasiva (APC)	64
2 a-4) Prueba de hipersensibilidad retardada (DTH)	65
2 b-Técnicas <i>in vitro</i> :	65
2 b-1) Determinación, por ELISA de captura, de IgE total en suero	65
2 b-2) Determinación, por EAST, de IgE específica en suero	66
2 b-3) Determinación, por ELISA indirecto, de IgG1, IgG2a e IgG2b específicas en suero.....	67
2 b-4) Determinación de los niveles plasmáticos de histamina por ELISA.....	67

2 b-5) Medida de la proliferación antígeno-específica de esplenocitos.....	68
2 b-6) Medida de los niveles de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo de los esplenocitos.....	69
3- ANÁLISIS ESTADÍSTICO:	70
RESULTADOS Y CONCLUSIONES	71
<i>Capítulo I</i>	73
1.- Evaluación de la respuesta INMUNE anti-PLV obtenida en ratones de la cepa BALB/c	73
1.1.- PLAN DE INMUNIZACIÓN UTILIZANDO $Al(OH)_3$	73
1.2.- PLAN DE INMUNIZACIÓN UTILIZANDO DISTINTOS ADYUVANTES. COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ESPECÍFICA OBTENIDA	83
1.3.- PLAN DE INMUNIZACIÓN UTILIZANDO TOXINA COLÉRICA	94
1.4.- PLAN DE INMUNIZACIÓN UTILIZANDO TOXINA COLÉRICA VS $Al(OH)_3$; COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA OBTENIDA.....	101
1.5.- PLAN DE INMUNIZACIÓN UTILIZANDO TOXINA COLÉRICA E $Al(OH)_3$ DE MANERA SIMULTANEA.....	107
<i>Capítulo II.....</i>	111
2.- Evaluación deL uso de distintos agentes inmunomodulatorios en el modelo murino de alergia alimentaria a plv	111
2.1.- EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO CON <i>BRUCELLA ABORTUS</i> INACTIVADA CON CALOR POR VÍA SUBCUTÁNEA	111
2.2.- EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO CON PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE MEMBRANA DE <i>BRUCELLA ABORTUS</i> POR VÍA INTRANASAL.....	119
2.3.- EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO CON PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE MEMBRANA DE <i>BRUCELLA ABORTUS</i> POR VÍA SUBCUTÁNEA.	127
<i>Capítulo III</i>	136
3.1.- UTILIZACIÓN DEL MODELO MURINO DE ALERGIA ALIMENTARIA PARA LA EVALUACIÓN DE LA REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE ALERGENOS DE LECHE DE VACA Y SOJA.....	136
DISCUSIÓN.....	147
CONCLUSIONES FINALES.....	159
APÉNDICE	163
BIBLIOGRAFÍA	167

ABREVIATURAS

Ac: Anticuerpo

AFC: Adyuvante de Freund Completo

AFI: Adyuvante de Freund Incompleto

Ag: Antígeno

AHR: Hiper reactividad de las vías aéreas

ALV: Alergia a leche de vaca

APC: Anafilaxia cutánea pasiva

BSA: Seroalbumina bovina

Con A: Concanavalina A

CPA: Célula Presentadora de Antígeno

DO: Densidad optica

DTH: Prueba de hipersensibilidad retardada

ID: Intradérmica

IG: Intragástrica

IN: Intranasal

IP: Intraperitoneal

LT: Linfocito T

PC: Prueba cutánea

PLV: Proteínas de leche de vaca

PP: Placas de Peyer

PS: Proteínas de soja

SC: Subcutánea

TC: Toxina Colérica

TCP: Transferencia cutánea pasiva

TLR: Receptores tipo Toll

TMB: Tetrametilbenzidina

Tregs: Células T regulatorias

TSLP: Linfopoyetina del estroma tímico

β-Lg: β- Lactoglobulina

BREVE INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES

Las alergias alimentarias se han convertido en uno de los problemas sanitarios prioritarios en muchos países, debido a la severidad con la que pueden presentarse (la anafilaxia es la principal causa de visitas en la sala de emergencias) y al dramático aumento en su incidencia en las últimas décadas. Se estima que en la población general aproximadamente entre el 4 y el 8% de los niños, y entre el 1 al 3 % de los adultos, tienen alergia alimentaria. Actualmente el único tratamiento efectivo consiste en la erradicación de la dieta de el/los alérgenos perjudiciales, siendo bastante frecuentes las reacciones ocasionadas por la ingestión accidental de los mismos. Con el fin de profundizar en la comprensión de los mecanismos moleculares de esta patología y para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, los modelos animales de alergia alimentaria constituyen una herramienta biológica de gran relevancia.

Siendo la alergia a leche de vaca la causa más común de alergia alimentaria en lactantes y niños, y debido a la existencia de pacientes que presentan intolerancia a los sustitutos lácteos empleados (hidrolizados extensivos de proteínas de leche de vaca o fórmulas a base de proteínas de leche de soja o sus derivados), es que nos planteamos, en el presente trabajo de tesis estudiar las condiciones que permitan obtener un modelo murino de alergia alimentaria para este alimento, que represente de manera satisfactoria la patología observada en humanos. El mismo nos permitirá en un futuro ahondar en el estudio de los mecanismos celulares y moleculares de esta patología, en la evaluación de nuevos alimentos hipoalérgicos, o en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

OBJETIVOS GENERALES

- Obtener y caracterizar un modelo murino de alergia alimentaria a leche bovina, a través de la aplicación de diferentes planes de inmunización en ratones de la cepa BALB/c.
- Validar este modelo como herramienta biológica, a partir de su aplicación al estudio de diversos aspectos de esta patología, en particular:
 - Estudio de la reactividad cruzada in vivo entre soja y proteínas de leche de vaca, para la evaluación de nuevas formulas hipoalergénicas.
 - Evaluación del efecto inmunomodulador de distintos agentes con potencial capacidad para revertir la respuesta inmune Th2 antígeno específica, para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

INTRODUCCIÓN

1.- ALERGIA

1. a- Reacciones de hipersensibilidad: definiciones y aspectos generales

La inmunidad adaptativa desempeña importantes funciones de defensa del huésped contra las infecciones microbianas. Sin embargo, bajo determinadas circunstancias, se generan respuestas inmunes que puede tener efectos nocivos contra antígenos (Ag) inocuos (propios o extraños), ocasionando daño en los tejidos, patologías graves, e incluso la muerte. En estos casos el sistema inmune se activa en forma inadecuada o no se regula correctamente, de ahí la denominación de **reacción de hipersensibilidad** para definir este tipo de mecanismos. Cuando el Ag es una proteína extraña inocua presente en el medio ambiente, en general no relacionada con antígenos microbianos, la respuesta se denomina **alergia**, y en este caso en particular al Ag se lo denomina **alergeno**; si se trata de un Ag de un tejido propio, se denomina **autoinmunidad**.

En este contexto las **enfermedades alérgicas** son la manifestación clínica producto de una falla en los mecanismos de activación o regulación de la respuesta inmune frente a antígenos inocuos ampliamente distribuidos en el medio ambiente. Este tipo de respuestas inapropiadas fueron clasificadas clínicamente por Gell y Coombs en la década del 60¹ y actualmente se mantienen los cuatro tipos de reacciones descriptos clínicamente: mecanismos de hipersensibilidad tipo I, II, III y IV. Originalmente fueron descriptos cinco tipos de reacciones de hipersensibilidad, aunque el tipo V luego fue incluido en el tipo II. Actualmente se conocen detalladamente los mecanismos moleculares y celulares que las originan y podemos decir que las reacciones tipo I, II y III están mediadas por anticuerpos, mientras que la tipo IV está mediada por células. Sin embargo en todas ellas el mecanismo efector responsable en última instancia de la alteración tisular es la inflamación, proceso en el que pueden participar distintos tipos de células. El tipo de mecanismo de hipersensibilidad involucrado en la patología determinará las células que intervengan y las características histopatológicas del proceso inflamatorio. Otro elemento común e indispensable en estos mecanismos, para que se manifiesten clínicamente, es que el contacto con el Ag debe producirse en forma repetitiva.

Estos mecanismos de hipersensibilidad no sólo están involucrados en las reacciones alérgicas o autoinmunes como se ha mencionado, sino que también comúnmente se observan en infecciones crónicas, reacciones de rechazo de trasplantes, etc. Pero aquí sólo abordaremos su análisis desde el punto de vista de las reacciones alérgicas. Como se mencionó anteriormente, una reacción alérgica puede ser causada por cualquiera de los 4 mecanismos, e inclusive es común que varios mecanismos se presenten en forma simultánea o secuencial en el tiempo. Esto determina que en numerosas ocasiones se identifique más de un elemento inmunopatogénico, células y/o moléculas, lo cual puede dificultar el diagnóstico y por lo tanto el tratamiento.

Las respuestas caracterizadas por producción de anticuerpos **IgE**, sensibilización de **mastocitos**, activación de linfocitos T helper CD4⁺ de fenotipo Th2 (**LT Th2**) y reclutamiento de **eosinófilos**, son claramente observadas en las **reacciones de hipersensibilidad tipo I** o **inmediatas** (comúnmente llamadas **reacciones alérgicas**). Suele referirse a estas reacciones como las más frecuentes (60-80% de los casos), aunque este hecho puede deberse a un problema diagnóstico, ya que estos mecanismos de hipersensibilidad son los que experimentalmente suelen evidenciarse en forma más directa.

Para que se produzca una **reacción alérgica** es indispensable que el individuo se encuentre sensibilizado, es decir que haya estado expuesto previamente al Ag. La sensibilización implica la entrada del **alergeno** al organismo a través de alguna de las mucosas (vías aéreas, tracto gastrointestinal o piel), el reconocimiento por el sistema inmune y la posterior generación de una respuesta inmune inadecuada específica. Esta implica la producción de manera exacerbada de Ac del isotipo **IgE** específicos del alergeno que se unen a los receptores de alta afinidad (en **basófilos**, **mastocitos** y **eosinófilos**) y de baja afinidad (principalmente en células dendríticas y macrófagos) generando lo que se denominan **células sensibilizadas**. Las sucesivas exposiciones a través de las mucosas al mismo alergeno, desencadenarán una reacción alérgica por reconocimiento del mismo a través de las células sensibilizadas. Estas células al activarse (requieren que una misma molécula de alergeno sea capaz de unir y reclutar al menos dos complejos IgE/IgE Rc) liberan el contenido de sus gránulos citosólicos en forma inmediata. Dado que las principales sustancias que se encuentran en los mismos tienen una importante función proinflamatoria (entre las cuales la histamina juega un rol fundamental) se genera un proceso inflamatorio intenso e inmediato. Paralelamente se induce la síntesis de una serie de

mediadores pro-inflamatorios (prostaglandinas y leucotrienos) cuya función será sostener este 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. Cuando estos eventos se producen reiteradamente, el proceso inflamatorio puede llegar a alterar la histología y la fisiología del tejido y del órgano, principalmente si intervienen células como eosinófilos o neutrófilos. En este caso estamos ante una **reacción alérgica**. Por lo tanto una reacción de este tipo requiere de una fase de sensibilización y una posterior efectora (en la **figura 1** puede verse a modo de ejemplo las fases para el desarrollo de la alergia alimentaria). Asimismo es importante tener en cuenta que el proceso inflamatorio inducido por la fase efectora consta de dos fases: una inmediata (a los 30-60 minutos de la exposición al alérgeno) y una tardía (a las 24-72 hs de la exposición original).

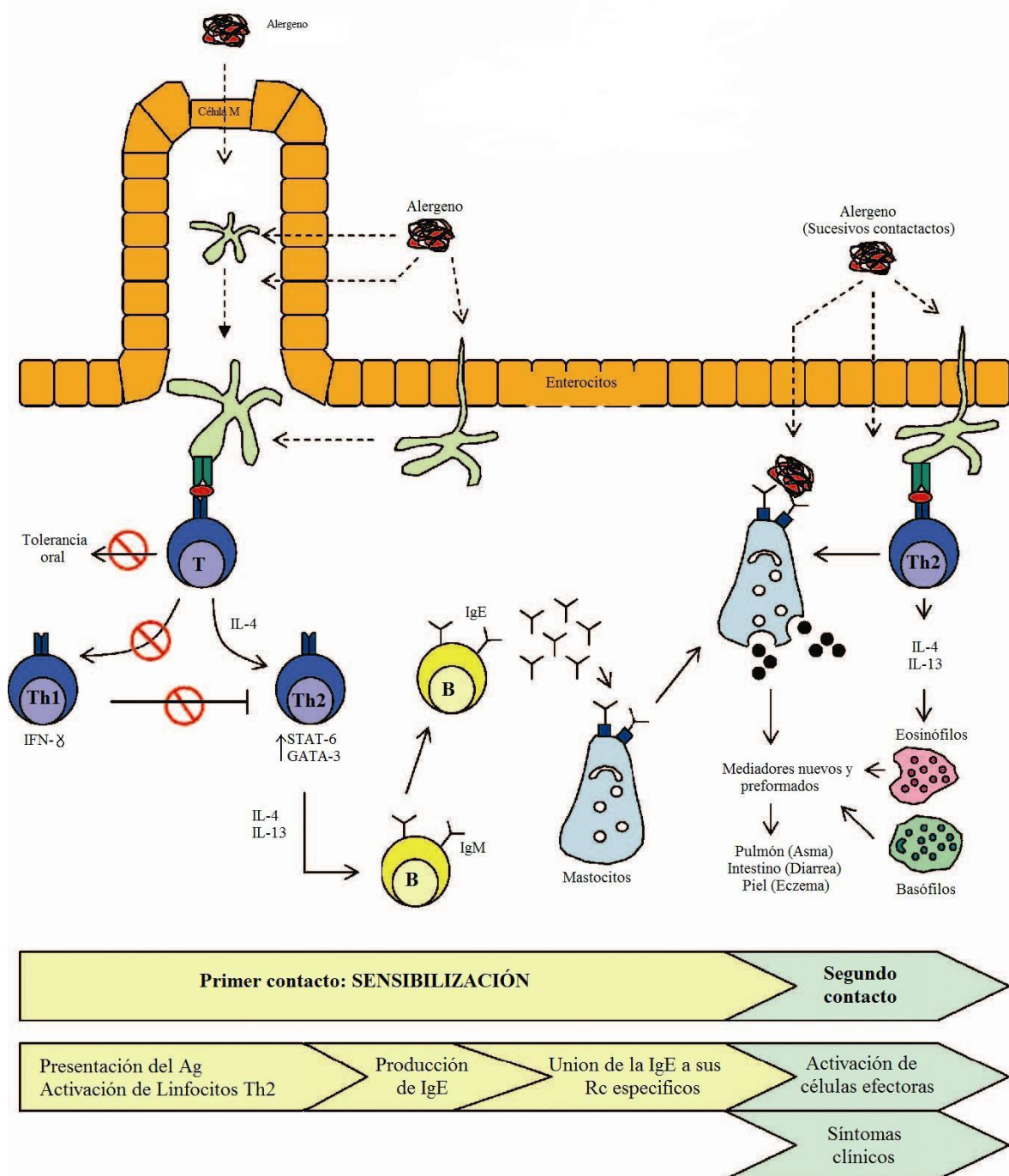


Figura 1: Mecanismo General de las reacciones alérgicas. (Extraído de G. Priault y C. Nagler-Anderson, 2005, Immunological Reviews).

Se denomina **atopía** a la tendencia personal o familiar a sintetizar anticuerpos IgE en cantidades anormalmente elevadas y a desarrollar signos clínicos tales como asma, rinoconjuntivitis, eczema/dermatitis en respuesta a la exposición a alergen². Por lo tanto

las alergias atópicas pueden manifestarse a través de un heterogéneo y muchas veces poco específico conjunto de signos clínicos, los cuales varían en intensidad desde manifestaciones severas las cuales muchas veces pueden ser fatales (anafilaxia sistémica* o asma severo) a reacciones localizadas como las observadas en rinitis alérgica, dermatitis atópica, eczema, o alergia alimentaria.

En conjunto las enfermedades alérgicas, y las atópicas en particular, constituyen las inmunopatologías que con mayor incidencia y prevalencia se presentan en el mundo, principalmente en países desarrollados o poblaciones con hábitos de vida occidental. Si bien los mecanismos celulares que gobiernan las reacciones alérgicas no se conocen completamente, se sabe que tanto factores genéticos como ambientales juegan un papel fundamental en su expresión. Su prevalencia se ha incrementado dramáticamente en las últimas dos décadas, hallándose en la bibliografía internacional valores de prevalencia de hasta un 20-30 % de la población en países desarrollados⁵⁻⁷, siendo en los Estados Unidos la sexta causa que ocasiona una enfermedad crónica. Si bien aquí no vamos a ahondar en detalles con respecto a la fisiopatogenia de las enfermedades alérgicas, se ha mencionado anteriormente que se trata de patologías multifactoriales con una presentación clínica heterogénea y variable. Desde hace varias décadas numerosos trabajos han establecido que estas patologías tienen una **base poligénica de predisposición** (la gran mayoría de los genes polimórficos detectados están relacionados con la activación de los LT) junto a una serie de **factores ambientales disparadores** (cuya acción puede explicarse parcialmente a través de la “Hipótesis de la higiene”)⁸. La interacción entre estos distintos factores determina que actualmente en un importante porcentaje de la población, la exposición a alérgenos inocuos genere una exacerbada activación de mecanismos inmunes Th2-dependientes, probablemente debido a fallas en la activación o regulación de los mismos⁹⁻¹¹. El marcado incremento en la incidencia de este tipo de enfermedades en las últimas décadas no puede atribuirse a cambios en la constitución genética de los individuos, por lo cual las causas deberían encontrarse en los factores ambientales disparadores. Aunque estas enfermedades no están directamente relacionadas con la

* La anafilaxia es una reacción alérgica sistémica, severa y potencialmente fatal que ocurre de manera abrupta luego del contacto con el alérgeno³. Se produce debido a la liberación, mediada por IgE, de potentes mediadores presentes en mastocitos de diversos tejidos y basófilos periféricos, los cuales son responsables de los aspectos patofisiológicos que caracterizan la respuesta anafiláctica. Esta, típicamente involucra los sistemas cutáneo, respiratorio, cardiovascular y gastrointestinal. Sin embargo se han descrito casos de anafilaxia donde no se ha podido encontrar al alérgeno ni a la IgE responsable⁴.

presencia de microorganismos, éstos están íntimamente involucrados en la inducción y regulación de los mecanismos inmunológicos específicos de los alérgenos. Así, la **hipótesis de la higiene** refiere que una menor exposición a microorganismos intracelulares patógenos, cuyo control se ejerce mediante mecanismos Th1-dependientes, en los últimos tiempos ha sido determinante en la mayor instauración de mecanismos Th2-dependientes frente a la exposición a alérgenos¹². Por el contrario, la exposición a microorganismos comensales es esencial para el desarrollo del sistema inmune asociado a las mucosas, principalmente a través de la producción de citoquinas inmunosupresoras como IL-10 o TGF- β ⁸. De esta manera, la presencia de microorganismos procarióticos favorece el desarrollo de tolerancia a los Ag inocuos presentes en estas mucosas (flora comensal y antígenos del medio ambiente y dietarios)^{13,14}. Se ha observado que la flora comensal en niños con alergia alimentaria difiere de la de un individuo no alérgico^{13,15,16}.

Se denomina “**marcha atópica**” al desarrollo en el tiempo de los distintos signos clínicos en un determinado individuo¹⁷. Como puede observarse (**figura 2**) es común que el proceso de atopía se inicie desde el nacimiento a través de manifestaciones en el tracto gastrointestinal y en la piel (alergia alimentaria). Sin embargo, se está revisando este concepto ya que se están observando modificaciones en la presentación clínica, aunque no ahondaremos aquí en su discusión.

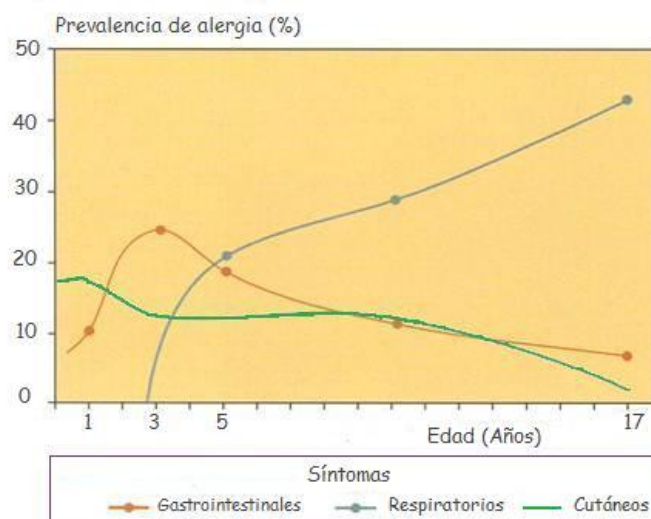


Figura 2: Marcha atópica. Las manifestaciones de las enfermedades atópicas presentan picos de prevalencia a diferentes edades. (Extraído de U.M. Saarinen & M. Kajosaari. 1995. Lancet).

Una forma práctica de clasificar al conjunto de las reacciones alérgicas se realiza teniendo en cuenta si están mediadas o no por anticuerpos IgE. Sin embargo, en muchos casos es difícil establecer si la presencia de IgE constituye la causa de estas patologías o es la consecuencia de las mismas. A pesar de ello evidenciar experimentalmente la presencia de anticuerpos IgE específicos de un determinado alérgeno es importante desde el punto de vista diagnóstico, terapéutico y pronóstico, ya que las reacciones IgE-dependientes son las que producen signos clínicos más inmediatos y severos (anafilaxia). Los avances producidos en las metodologías experimentales han posibilitado caracterizar las reacciones no mediadas por IgE y de esta manera se ha determinado que células como LT CD8+, macrófagos o neutrófilos pueden ser centrales en la fisiopatogenia de estos procesos¹⁸⁻²¹. Inclusive, como se mencionó anteriormente, es posible que se presenten en forma simultánea, mecanismos IgE-mediados e IgE-no mediados. En conjunto todas estas situaciones determinan la gran heterogeneidad en la presentación clínica de las enfermedades alérgicas, y la necesidad de realizar un diagnóstico diferencial para arribar a un correcto abordaje terapéutico. En la **tabla 1** se muestran algunos ejemplos de enfermedades mediadas por IgE, no mediadas por IgE y mixtas.

Tabla 1: Ejemplos de enfermedades alérgicas teniendo en cuenta su clasificación de acuerdo al mecanismo fisiopatogénico involucrado.

No mediadas por IgE	Mixtas	Mediadas por IgE
Constipación crónica, enterocolitis y proctitis, síndrome intestino irritable, Enfermedad celíaca.	Gastroenteropatía eosinofílica (esofagitis, gastritis, enterocolitis, proctitis).	Hipersensibilidad inmediata, Síndrome de alergia oral.
Asma intrínseca, otitis, hemosiderosis pulmonar inducida por alimentos.	Alveolitis, asma.	Asma extrínseca, rinitis alérgica, broncoespasmo, otitis media, anafilaxia general e inducida por ejercicio asociada a alimentos.
Dermatitis herpetiforme, psoriasis, dermatitis de contacto.	Dermatitis atópica, eczema atópico.	Dermatitis atópica, urticaria aguda, angioedema, exantemas.
Vasculitis, reacciones anafilactoideas.	Vasculitis	Angioedema, shock anafiláctico, hipotensión, muerte.

2.- ALERGIA ALIMENTARIA

En el resumen publicado del “2008 Workshop on Food Allergy Clinical Trials Design” organizado de manera conjunta con el “National Institute of Allergy and Infectious Diseases” y el “US Food and Drug Administration” se define a la alergia alimentaria como **“una reacción adversa a los alimentos mediada por el sistema inmune, por lo cual representa sólo una fracción de las reacciones adversas a los alimentos”**²².

Las alergias alimentarias, al igual que las enfermedades alérgicas y las enfermedades atópicas, han incrementado su prevalencia en las últimas décadas, por lo cual constituyen un problema sanitario a nivel mundial²³. En la población general aproximadamente entre el 4 y el 8% de los niños, y entre el 1 al 3 % de los adultos, tienen alergia alimentaria²⁴⁻²⁶. Principalmente se manifiesta en la primera infancia con signos clínicos asociados al tracto gastrointestinal y en la piel. Sin embargo, en los últimos años, se ha observado que las alergias alimentarias se encuentran fuertemente asociadas a reacciones severas o anafilaxia, siendo la principal causa de emergencias en numerosos países²⁷.

Dado que numerosos mecanismos pueden dar origen a reacciones adversas causadas por alimentos (toxicidad intrínseca del alimento, fallas metabólicas o fallas inmunológicas), el diagnóstico diferencial es fundamental para establecer los valores de prevalencia e incidencia en términos generales, y para instaurar una terapia específica en función del paciente. Keil²³ sostiene que desde la perspectiva de la salud pública, es necesario contar con estimaciones de la prevalencia de las enfermedades alérgicas basadas en criterios diagnósticos objetivos, más que cuestionarios subjetivos que conducen a sobreestimar la prevalencia de la patología y generan incertidumbre entre los profesionales de la salud, los productores de alimentos y las políticas sanitarias. Por otro lado, un mal diagnóstico de la patología puede tener implicancias físicas, psicológicas y económicas en cuanto a la calidad de vida que llevará el individuo, dado que como se mencionó anteriormente el principal riesgo de las enfermedades alérgicas es la aparición de reacciones anafilácticas, además de generar trastornos dietarios y de hábitos de vida en general.

La prevalencia de la alergia alimentaria puede ser variable dependiendo de la región, pero si está claro que se ha incrementado^{28,29}, y en términos generales va a depender de los

hábitos dietarios de la población en análisis³⁰. Las diferencias geográficas podrían deberse a diferencias en el contenido de micro y macronutrientes en la dieta y en los alérgenos. En este sentido, actualmente los estudios están centrados en 3 hipótesis³¹:

1. **hipótesis de la dieta lipídica:** la reducción del consumo de grasas animales y el aumento en el consumo de margarinas y aceites vegetales (lo que implica un cambio en el consumo de ácidos grasos poliinsaturados, aumento del consumo de los ω -6 y la reducción de los ω -3) tiene un impacto en el aumento de las alergias.
2. **hipótesis antioxidante:** ciertos antioxidantes como la vitamina C y el β -caroteno podrían tener efectos antiinflamatorios protectivos en las alergias, y especialmente en el asma, y su contenido en las dietas ha disminuido.
3. **hipótesis de la vitamina D:** tanto el exceso como el déficit de vitamina D en la dieta parecerían tener efectos en el aumento de las enfermedades alérgicas.

Dado que algunos de los principales factores predisponentes a una enfermedad alérgica son la exposición y la edad, la leche de vaca (LV) constituye el principal alérgeno alimentario en numerosas regiones. Por ejemplo en Estados Unidos, además de la leche bovina y el huevo de gallina es muy importante el maní, y luego la soja, trigo, nueces, pescados y moluscos. En Europa son importantes las alergias alimentarias a manzana, sésamo, mostaza, lupines, cítricos, chocolates, avellanas, frutillas, kiwi y tomate, entre otros³²⁻³⁶. En términos generales, más allá de la importancia de la constitución genética del individuo y sus hábitos dietarios, es relevante tener en cuenta que cualquier antígeno puede ser potencialmente alérgico, siempre y cuando tenga propiedades inmunogénicas y antigénicas. Más de 150 alimentos han sido descriptos como alérgicos, sin embargo sólo 8 de ellos han sido descriptos como los responsables de originar el 70-90 % de las alergias alimentarias, y por lo tanto deben ser indicados en la composición de un alimento. Estos son leche (y sus derivados), huevo (y productos a base de huevos), pescados (y productos a base de pescados), crustáceos (langosta, camarón, cangrejo), cereales que contienen gluten (trigo, cebada, centeno, avena), soja (y productos a base de soja), maní (y productos a base de maní) y frutas secas (nueces, avellanas, castañas y almendras)³⁷. Luego, la Unión Europea a este listado le agregó otros alérgenos que deben ser incluidos en el etiquetado de

un alimento (apio, mostaza, sésamo, lupino, moluscos), y aditivos como anhídrido sulfuroso y sulfito.

Como se mencionó anteriormente las alergias alimentarias se presentan principalmente en la población pediátrica y constituye el primer indicio de una enfermedad alérgica en la marcha atópica. Para ciertos alérgenos, esta condición puede ser persistente (se manifiesta desde la niñez y no se autolimita) o manifestarse en la edad adulta. Para la mayoría de los alérgenos la alergia alimentaria se resuelve antes de los 5 años de edad²⁵, aunque el proceso de atopía puede manifestarse en otras mucosas con otros signos clínicos.

De acuerdo al mecanismo fisiopatogénico involucrado, las alergias alimentarias pueden ser clasificadas como:

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

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

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

Por lo tanto las alergias alimentarias también constituyen un conjunto muy variado de síndromes, cuya presentación clínica se ha modificado en los últimos tiempos, considerando los alérgenos que las desencadenan y la gravedad de los síntomas con que se manifiestan. Es común por ejemplo observar reacciones de anafilaxia frente a ciertos alérgenos que en otros tiempos producían reacciones más leves^{10,38,39}. Tampoco se puede dejar de considerar que influyen los métodos de preparación de los alimentos, la pureza de

los mismos, la edad de incorporación de ciertos alimentos con la dieta, el incremento en el empleo de antiácidos y la exposición a cremas o medicamentos que contienen alérgenos alimentarios en su composición³¹.

No se encuentra completamente dilucidada la razón por la cual la alergia alimentaria se manifiesta preferentemente en la niñez. Se puede inferir que el contacto temprano con antígenos dietarios a través de la mucosa gastrointestinal determina una marcada sensibilización en este sitio anatómico. Además es importante tener en cuenta que existe una inmadurez inmunológica en la mucosa gastrointestinal, debida a una inmadurez anátomo-histológica, al establecimiento de la flora comensal intestinal y la incipiente interacción entre ésta y los elementos del sistema inmune que comienzan a poblar la mucosa⁴⁰. Asimismo se debe considerar que la sensibilización a través del ingreso de antígenos por la piel es importante en la instauración de los signos clínicos como la dermatitis. Por ejemplo, numerosas cremas y aceites frecuentemente empleados a edades tempranas contienen alérgenos de LV³¹. Asimismo las células inmunes que se originan en una determinada mucosa pueden alojarse en otras mucosas relacionadas y esto podría explicar porque un antígeno que ingresa por tracto gastrointestinal suele ocasionar síntomas en el árbol respiratorio³⁰. En estos mecanismos quemoquinas, receptores de quemoquinas y moléculas de adhesión participan de los procesos de tráfico celular específicos para cada población celular.

Como se mencionó anteriormente la LV es el principal alérgeno alimentario en el mundo. La prevalencia de la alergia a leche de vaca (**ALV**) oscila entre un 2-5 % en la población pediátrica^{28,41}. La mayoría de los niños con ALV no mediada por IgE pierden tal sensibilidad al tercer año de vida, pero entre 10% y 25% de los niños con ALV dependiente de IgE mantienen la reactividad en años subsiguientes, además el 50% de ellos desarrollan sensibilidad hacia otros alimentos^{42,43}. 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. Las alergias a maní y las frutas secas tienen un desarrollo más prolongado, suelen ser persistentes y observarse en adultos⁴⁴⁻⁴⁶. Las posibilidades de perder sensibilidad a maní y a alérgenos de sésamo es de sólo el 20%, y aproximadamente el 10% para frutas secas^{33,47}. También se ha descrito que las características del alérgeno determinan una temprana o tardía instauración de la tolerancia oral. El reconocimiento de epítopes conformacionales determina que se adquiera

tolerancia a edades tempranas. Por el contrario el reconocimiento de epitopes secuenciales en caseínas determina la persistencia de la alergia a leche de vaca^{48,49}.

Sin embargo, mas allá de la instauración de los procesos de tolerancia oral que permiten restituir los mecanismos inmunorregulatorios con la edad, aún en individuos alérgicos o atópicos, en la mucosa gastrointestinal puede recuperarse la capacidad de inhibir las reacciones de hipersensibilidad, pero en las otras mucosas la situación es diferente y es probable que los alergenos continúen generando reacciones inflamatorias. Tal es así que la sensibilización a LV o huevo en la primera infancia está asociada con mayor riesgo de sensibilización a alergenos ambientales y el desarrollo de asma³⁶. Es decir, que una temprana sensibilización a través del tracto gastrointestinal permite poner en evidencia la predisposición individual a sufrir enfermedades alérgicas, que se manifestará de distinta manera a lo largo de su vida de no mediar un correcto manejo terapéutico. Por lo tanto, una sintomatología gastrointestinal inicial, que suele presentarse simultáneamente con manifestaciones dermatológicas, va a continuarse en el tiempo con una sensibilización por alergenos inhalatorios y las consiguientes manifestaciones clínicas del tipo rinitis, asma, etc.

2. a- Sistema Inmune de mucosas, tolerancia oral y alergia

Las mucosas constituyen la principal vía de ingreso de la mayoría de los antígenos que el sistema inmune debe enfrentar. La principal razón que permite explicar este fenómeno es que en estos sitios anatómicos se produce un intenso intercambio de nutrientes o gases. Para maximizar la eficiencia de estos procesos las mucosas tienen un área efectiva que supera holgadamente la superficie corporal. La superficie cubierta por la piel en un individuo adulto es de aproximadamente 2 m², siendo la superficie de las mucosas alrededor de 200 veces mayor. Entre éstas, las mucosas del árbol respiratorio y la del tracto gastrointestinal son las de mayor área efectiva. Además, el intestino humano tiene una longitud de 2-3 metros y la absorción de nutrientes se da principalmente en el primer tramo.

Por otro lado, y aprovechando esta importante propiedad absorptiva, la mucosa intestinal representa una puerta de entrada al organismo para numerosos microorganismos patogénicos. Sin embargo en el lumen del intestino grueso existe una importante flora comensal, muy rica tanto en variedad como en cantidad de microorganismos procarióticos, cuya función primordial es degradar componentes de los alimentos que permanecen intactos luego del procesamiento en el intestino delgado, y de esta manera facilitar su absorción. Sorpresivamente estos microorganismos no ingresan a través de la mucosa y permanecen en el lumen, donde encuentran todos los elementos necesarios para su replicación.

La mucosa constituye la barrera que separa el medio interno del organismo con el medio externo donde se encuentran estos microorganismos y los antígenos del medio ambiente y de la dieta. Dado que todos estos componentes son antigénicos para el sistema inmune, es necesario que en las mucosas exista un sistema inmune asociado que controle la composición antigénica del contenido del lumen por un lado, y el pasaje de antígenos a través de la barrera epitelial por otro. De esta manera, las mucosas se encuentran sometidas permanentemente a un extenso desafío antigénico, existiendo una gran variedad y cantidad de células del sistema inmune, muchas de las cuales presentan características fenotípicas y funcionales que las hace únicas en el organismo. Es importante resaltar que en el intestino se encuentra el 70-80% de los LB y LT del organismo.

En este escenario tan particular, el sistema inmune de la mucosa gastrointestinal es el encargado de discernir entre inducir mecanismos de tolerancia (frente a antígenos de la dieta que son necesarios absorber, o de la flora comensal que son necesarios preservar en el medio externo) o de activación inmunológica (frente a antígenos o microorganismos patogénicos). La compleja interacción molecular y celular que se establece en las mucosas permite mantener un estado de homeostasis en el cual el sistema inmune es capaz de diferenciar y “clasificar” a los distintos antígenos con el fin de decidir qué tipo de mecanismo efector activar cuando sea necesario. En este proceso es fundamental la participación de las células epiteliales y de los distintos elementos de la inmunidad innata, para luego inducir la inmunidad adaptativa en los diferentes sitios inductivos de las mucosas (ganglios regionales⁵⁰). Por lo tanto, las células del sistema inmune que se encuentran en el epitelio de las mucosas están ubicadas en el sitio donde se produce la exposición temprana a los distintos antígenos. Recientes evidencias experimentales han

demostrado que las células epiteliales interactúan con otras células de la inmunidad innata y adaptativa constituyendo un elemento esencial en el inicio de la respuesta inmune^{51,52}.

Se denomina **tolerancia oral** al conjunto de mecanismos que median la inducción de tolerancia o “falta de respuesta” frente a antígenos que ingresan por la vía oral, que si ingresaran por otra vía inducirían mecanismos de activación. De esta manera, en un individuo normal la tolerancia oral es la que posibilita que no se inicien mecanismos inmunes efectores frente a antígenos de la dieta y de la flora comensal. En individuos alérgicos, y por razones aún no completamente comprendidas, el balance entre los estados de tolerancia y activación no funciona adecuadamente, existiendo evidencias experimentales que apoyan tanto la hipótesis de una tolerancia deficiente como de una activación aberrante frente a antígenos de la dieta o alergenicos alimentarios. Lo que si está claro es que en individuos susceptibles, los linfocitos Th2 específicos de los alergenicos son centrales en la inmunopatogenia de las enfermedades IgE-mediadas⁵³. En consecuencia, en un individuo con alergia alimentaria se producen fallas en el reconocimiento inmune de los alergenicos, y en lugar de inducirse mecanismos de tolerancia, se activan mecanismos Th2-dependientes, responsables de la síntesis exacerbada de anticuerpos IgE específicos.

Con respecto a la inmunidad innata, los alergenicos no son reconocidos por sus células, dado que no son componentes procarióticos (no contienen ligandos de receptores de la inmunidad innata), sino que se trata de antígenicos inocuos. Por lo tanto, la no activación de la inmunidad innata determina que la respuesta inmune esperable sea la inducción de tolerancia. Sin embargo, se ha encontrado que en algunas reacciones alérgicas, la mucosa produce (principalmente las células epiteliales) en forma exacerbada una quemoquina llamada TSLP (linfopoyetina del estroma tímico). Esto refleja que la inmunidad innata también está involucrada en la respuesta frente a alergenicos. Se ha demostrado la participación de TSLP en distintas reacciones de hipersensibilidad que involucran la piel, el árbol respiratorio o el tracto gastrointestinal⁵⁴⁻⁵⁶ tanto en humanos como en modelos animales^{54,57,58}. Ratones transgénicos para TSLP presentan una inflamación sistémica, principalmente en pulmón u órgano-específica dependiendo del promotor empleado⁵⁹. Además se ha hallado que su expresión está asociada a NF-KB⁶⁰. Por otro lado, TSLP mapea en una zona cercana al clúster de citoquinas Th2 e IL-4R en el cromosoma 5⁶¹ y se han detectado polimorfismos en pacientes asmáticos, lo cual podría estar relacionado con una mayor o menor susceptibilidad de ciertos individuos al asma atópico⁶²⁻⁶⁴.

Por lo tanto una susceptibilidad genética relacionada con un funcionamiento anómalo de la inmunidad innata o adaptativa puede ser la causa de un mal funcionamiento del sistema inmune de mucosas. La pérdida de la homeostasis frente a antígenos inocuos de la dieta y la generación de LT específicos para los mismos pueden ser los responsables de la inducción de un proceso inflamatorio local, que puede afectar otras mucosas a través del tráfico de células entre ellas. Un mejor conocimiento de los complejos mecanismos que operan en las mucosas puede resultar atractivo para identificar blancos terapéuticos a los cuales dirigir estrategias novedosas de inmuno-intervención.

En los últimos años se ha postulado que la exposición temprana por vía oral a los alimentos podría prevenir el desarrollo de alergia alimentaria bajo ciertas circunstancias. La Academia Americana de Pediatría (AAP) ha modificado su posición original⁶⁵, argumentando que no se sabe con certeza si algunos aspectos de la restricción dietaria tendrían un efecto benéfico en la prevención de las alergias, desechando de esta manera las recomendaciones realizadas a favor de una dieta de restricción.

Actualmente se postula que la sensibilización a los alimentos ocurriría como consecuencia del ingreso de bajas dosis de antígenos por vía cutánea, y que el consumo temprano de proteínas induciría el proceso de tolerancia oral. De esta manera las células de Langerhans serían las principales células en generar una respuesta Th2 con la consiguiente producción de IgE. El consumo de grandes cantidades de antígenos por vía oral inducirían tolerancia, y se ha propuesto que se producirían en la mucosa del tracto gastrointestinal respuestas inmunes en las que participarían células Th1 y células T regulatorias. Dependiendo del orden en el cual se produzcan estos eventos y el balance entre la exposición cutánea y oral determinarían si el niño desarrollará alergia o tolerancia. Esto parece indicar que la restricción dietaria de un alergen que se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente podría ocasionar la aparición de reacciones alérgicas para el mismo. Esta teoría podría explicar algunos de los aspectos de las enfermedades alérgicas, como por ejemplo la asociación entre eczema severo en la infancia y el desarrollo subsecuente de alergia alimentaria³¹.

Como se mencionó anteriormente, no está establecido en humanos si las reacciones alérgicas son la consecuencia de una respuesta exacerbada del sistema inmune a alergen o si se producen por la falta de tolerancia a los mismos. Empleando modelos animales se ha observado que la transferencia adoptiva⁶⁶, de células CD4⁺CD25⁺ suprimían la

eosinofilia inducida por la exposición a un determinado antígeno en las vías aéreas. Por otro lado, animales knock out para FOXP3, o pacientes con mutaciones en FOXP3 que desarrollan espontáneamente una patología muy grave llamada Síndrome Poliendocrinopatológico ligado al X (IPEX), presentan una depleción en el número de células regulatorias $CD4^+CD25^+$. Los animales presentan un proceso inflamatorio generalizado, mientras que los pacientes desarrollan una enfermedad autoinmune (tiroiditis, diabetes tipo I, inflamación intestinal) junto a signos clínicos relacionados con enfermedades alérgicas (eczema severo, trastornos gastrointestinales, etc.) altos niveles de IgE y eosinofilia. Estos hallazgos han llevado a pensar que los Treg pueden estar asociados a procesos de alergia. Además, se ha observado⁶⁷ que los niños que revierten su alergia a proteínas de leche de vaca incrementan sus células $CD4^+CD25^+$ circulantes, en comparación con los que mantienen un alergia clínica activa. Sin embargo el bajo número de Treg en niños con alergia no puede ser la única causa de sus síntomas. También se ha evidenciado que la funcionalidad de los Treg se encuentra alterada en individuos atópicos⁶⁸.

Por otro lado, existen trabajos que demuestran que las células dendríticas están alteradas en pacientes alérgicos aunque no está claro si se trata de una condición general para estos individuos. Se ha observado que las células dendríticas plasmacitoides presentan defectos funcionales en individuos atópicos, aunque se encuentran en igual número que individuos normales⁶⁹. Cuando estas células son enfrentadas *in vitro* a CpG secretan menor cantidad de IFN- γ , a pesar que expresan niveles similares de TLR9 en superficie. A esta subpoblación de células dendríticas se le han asignado propiedades tolerogénicas⁷⁰.

3.- GENERALIDADES SOBRE ALERGENOS

Si bien cualquier Ag puede comportarse *a priori* como un alérgeno, como mencionamos anteriormente, son pocos los alérgenos alimentarios responsables de la gran mayoría de las alergias alimentarias: huevo, leche de vaca, maní, frutas secas, pescados, mariscos, soja y trigo. Existen algunas características que son comunes a los alérgenos:

- Son proteínas o glicoproteínas inmunogénicas con un peso molecular entre 10 y 50 KDa
- Son inocuos y de amplia distribución en la naturaleza
- Generalmente son hidrosolubles, lo que facilita su ingreso a las mucosas
- Muchos son relativamente estables y resistentes a la desnaturalización o hidrólisis por enzimas digestivas

Sin embargo no es sólo la naturaleza del alérgeno lo que define sus propiedades antigénicas e inmunogénicas, sino que diversos factores asociados a la exposición y al individuo deben ser tenidos en cuenta al momento de analizar los patrones de sensibilización. Por ejemplo, tanto la permeabilidad intestinal como la digestibilidad de los Ag dietarios son factores importantes que pueden influir en el desarrollo de una respuesta inmune contra estos. Untersmayr y otros⁷¹, estudiaron en ratones BALB/c el efecto de antiácidos empleados en el tratamiento de trastornos dispepticos en la alergenicidad de proteínas de la dieta. Observaron que la co-administración del alérgeno con los antiácidos resultó en un incremento significativo en los niveles de IgE específica, en la proliferación de LT, y en la cantidad de eosinófilos y mastocitos presentes en la mucosa gastrointestinal.

Además, la integridad de la barrera intestinal influye en la velocidad de absorción de proteínas. A pesar de que se ha descrito un aumento en la absorción de proteínas en individuos con alergia alimentaria, aún no se conoce fehacientemente si el aumento en la permeabilidad es una causa primaria en el desarrollo de la alergia, o si se trata de un fenómeno secundario⁷². Se ha demostrado que la presencia de IL-13 altera la expresión de las distintas proteínas que intervienen en las uniones estrechas, induciendo un incremento en Claudina 2⁷³.

4.- DIAGNÓSTICO DE LAS ALERGIAS ALIMENTARIAS

El diagnóstico de la alergia alimentaria comienza con la investigación de la historia clínica del paciente, el examen físico y los antecedentes familiares. El objetivo en primera instancia es distinguir si la reacción que presenta el paciente tiene una base inmunológica o

no, ya que a pesar de que estas últimas presentan características clínicas e historia diferentes, pueden erróneamente diagnosticarse como alergia alimentaria^{36,74}.

En muchos casos la historia clínica permite arribar a un diagnóstico de alergia alimentaria para un determinado alimento y en otros no es directa la asociación de la sintomatología con la participación del sistema inmune y la presencia de un alimento como disparador del proceso. En estos casos es necesario recurrir a pruebas complementarias *in vivo* y/o *in vitro* dependiendo de cada caso en particular. Comúnmente se realizan pruebas desafiando la piel del paciente con el alérgeno sospechoso, y se realizan pruebas serológicas para cuantificar anticuerpos IgE totales, e identificar la presencia de IgE específica para el alimento en cuestión. Una prueba que resulta muy importante una vez identificado el alimento nocivo consiste en eliminarlo de la dieta y observar la desaparición de los síntomas. Se realiza en forma domiciliaria y muchas veces suele ser concluyente para el diagnóstico. Con estos tres tipos de pruebas se puede llegar al diagnóstico en el 90 % de los casos y de esta manera evitar realizar la supresión y desafío oral en forma estandarizada bajo la supervisión de un médico alergista (DBPCFC)³⁰. Sin embargo, en determinados casos se debe recurrir al desafío o prueba de provocación, como ensayo de referencia o “gold standard” para la confirmación de las reacciones mediadas por IgE. Esta prueba debe realizarse en establecimientos hospitalarios, y dado lo costoso y tedioso que significa su implementación suele realizarse sólo ocasionalmente y en determinados centros.

Describiremos brevemente en que consisten estas pruebas:

- Las **pruebas cutáneas (PC)** que actualmente se realizan en su gran mayoría por la técnica de “**skin prick test**” (SPTs) analizan la presencia de anticuerpos IgE específicos en mastocitos cutáneos. Consiste en inocular una cantidad muy pequeña de un extracto que contiene el alérgeno en la piel del antebrazo empleando una lanceta calibrada para tal fin. Se emplean controles negativo (solución fisiológica) y positivo (histamina), y se observa a los pocos minutos la aparición de una reacción inflamatoria en la zona de inoculación. Se las cuantifica midiendo el diámetro en milímetros del halo y la roncha que se produce. Son fáciles de realizar, seguras y de bajo costo, y sus resultados pueden obtenerse en minutos. Poseen excelente sensibilidad y una precisión predictiva negativa superior al 90%, mientras que son poco específicas y la precisión predictiva positiva es de aproximadamente 50-85% dependiendo del sistema. Es decir, que una PC negativa es un buen método para

descartar una alergia alimentaria mediada por IgE, mientras que un resultado positivo no predice la reactividad clínica con precisión⁷⁵. Una variante frecuentemente empleada es el **Prick-to-Prick** que consiste en emplear el alimento natural en lugar del extracto alérgico, en los casos que se pretende evaluar la presencia de mastocitos sensibilizados específicos de antígenos sensibles a la degradación por aire, luz o temperatura.

- La determinación serológica de **anticuerpos IgE específicos** de proteínas alimentarias se realiza mediante inmunoensayos del tipo ELISA en los cuales se sensibiliza la fase sólida con el alérgeno purificado o con un extracto proteico que contiene al/los alérgeno/s alimentario/s (ELISA indirecto). Luego se enfrenta con un anticuerpo primario (suero del paciente) y se revela la presencia de IgE específica del alérgeno mediante el empleo de un Ac secundario conjugado a una enzima (a-IgE-fosfatasa alcalina por ejemplo). También existen variantes metodológicas donde los anticuerpos IgE del suero son capturados por un anticuerpo anti-IgE inmovilizado en fase sólida, y luego la detección y cuantificación se realiza con un reactivo que posee el alérgeno unido a biotina o a una enzima (ELISA de CAPTURA), o bien, los anticuerpos del suero se enfrentan en fase fluida con el alérgeno marcado, y luego se capturan los complejos antígeno-anticuerpo, detectándose la cantidad de complejos inmunes formados mediante un anticuerpo anti-IgE marcado. En todos los sistemas comerciales comúnmente utilizados, basados en antígenos inmovilizados, se convierten los datos de densidad óptica generados por el ensayo en unidades de masa de IgE alérgeno-específica dada en Unidades Internacionales por ml de suero o plasma (UI/ml)⁷⁵. Tal como ocurre con las PC, los valores predictivos de la cuantificación de IgE específica, varían con el alimento en estudio, la edad de los pacientes o la historia de reacciones previas. Se ha reportado que valores elevados de los niveles de IgE se correlacionan con una mayor probabilidad de manifestar reacciones clínicas, pero generalmente no guardan correlación con la gravedad de la reacción. Por otro lado, una disminución en la concentración de IgE específica en el tiempo se asocia con mayores chances de revertir la alergia²⁵. La obtención de antígenos recombinantes, anticuerpos monoclonales a-IgE de elevada especificidad, mejores sistemas de detección y la posibilidad de automatización han determinado que este tipo de pruebas sean ampliamente utilizadas en la especialidad, dado que además no implican riesgo alguno para el paciente. Sin embargo en estos ensayos se determinan una variable indirecta dado que la IgE soluble

no es la que está directamente implicada en la activación de las células sensibilizadas al reconocer al alérgeno.

Este tipo de pruebas suelen tener una sensibilidad y especificidad muy variables (50-90%) dependiendo de las características y elementos utilizados en el ensayo.

- Las **pruebas de desafío oral** son muy importantes como pruebas confirmatorias por su elevada sensibilidad y especificidad. Pueden realizarse en forma **abierta** (Open food Challenge), **simple-ciego** o **doble ciego (DBPC) contra placebo (DBPCFC)**. Esta última es la prueba estandarizada y recomendada como prueba confirmatoria. Todas estas pruebas de provocación es conveniente que se realicen en forma hospitalaria, por los riesgos que implica enfrentar al paciente con el alérgeno nocivo. A pesar de ser el test de referencia, algunas variables del ensayo aún no han sido estandarizadas: estado en que se administra el alimento (líquido o sólido), dosis mínimas y máximas (dependerán del paciente, resultados de la prueba cutánea, etc.), matriz en la cual se administra el alimento, etc. Cuando el desafío ciego resulta negativo debe confirmarse administrando en forma abierta una porción de alimento en su forma natural para descartar un resultado falso negativo del desafío, esto ocurre aproximadamente en un 1% á 3% de los casos^{25,75}. Los inconvenientes derivados de su implementación y el riesgo que implica para el paciente determinan que sólo se realice en determinadas ocasiones. Es importante la supervisión de un especialista médico para identificar los signos clínicos asociados a la exposición al alérgeno, y especialmente evidenciar la aparición de los mismos a los minutos.

Para las **enfermedades no mediadas por IgE** las herramientas diagnósticas de laboratorio son muy limitadas, y en estos casos el desafío oral controlado es necesario para confirmar la alergia y la identidad del alimento alérgico³⁶, siendo de gran importancia la evaluación del tiempo transcurrido entre el contacto con el alérgeno y la aparición de los síntomas (horas-días). En aquellos casos en que se justifique realizar biopsias duodenales o colónicas para descartar otras patologías, los análisis histológicos pueden arrojar información muy importante sobre las células presentes en la mucosa gastrointestinal⁷⁶.

Actualmente existen nuevas metodologías para el diagnóstico de alergias alimentarias, algunas de las cuales se están aplicando a nivel asistencial, mientras que otras se encuentran en fase de optimización y validación. Dado que no es el objetivo de este trabajo describir detalladamente las técnicas diagnósticas solo serán mencionadas: prueba

de degranulación de basófilos, microarrays con péptidos, ensayos de proliferación de LT Ag-específicos^{77,78}, etc.

5.- TRATAMIENTOS

Para el **tratamiento** de las alergias alimentarias, actualmente lo más efectivo es la **eliminación estricta del alérgeno ofensivo de la dieta** en el menor tiempo posible, sobretodo antes de los 2 años de edad o hasta la instauración de los mecanismos de tolerancia. En el caso de los niños alérgicos, este proceso de maduración intestinal suele retrasarse con respecto a un niño no alérgico. En el caso de la ALV este período de restricción dietaria constituye una tarea compleja para el paciente, para los padres y para el médico alergista, ya que no existe un procedimiento único o estandarizado, pudiendo variar en cada caso en particular. Además, no existe en nuestro medio una gran variedad de sustitutos lácteos y distintos estudios han demostrado que salvo las formulaciones a base de aminoácidos, los hidrolizados o las leches de otras especies de mamíferos no han probado ser muy eficientes. Todos estos factores impactan en forma directa sobre la calidad de vida del paciente. Si el paciente tiene menos de 2 años de edad se debe reemplazar la LV por un sustituto que asegure un correcto crecimiento pondo-estatural. Esto suele no ser sencillo y existen distintos abordajes para la prevención o tratamiento. La prevención puede iniciarse con una dieta libre de leche en la madre embarazada (contradictorio según algunos trabajos³¹), en casos severos inclusive deben restringirse otros alérgenos alimentarios (huevo, soja) durante el período de lactancia, y continuar con la lactancia más allá de los 6 meses de edad. Para el tratamiento de niños con sospecha o diagnóstico de alergia a leche de vaca se reemplaza la leche por un sustituto (hidrolizados extensivos, leches de otras especies animales, fórmulas de aminoácidos o a base de proteínas de soja o arroz) o se pueden emplear probióticos y prebióticos, aunque con resultados muy dispares en todos los casos^{79,80}.

Los sustitutos con los que se han logrado los mejores resultados son hidrolizados extensivos de caseínas bovinas o de proteínas del suero de LV^{19,81}, y las fórmulas a base de aminoácidos individuales. Fórmulas a base de proteínas de soja son empleadas en el

tratamiento de la alergia a leche de vaca. Sin embargo actualmente se ha desestimado su uso en la prevención en niños con alto riesgo de alergia por la diversidad de efectos adversos que pueden ocasionar^{82,83}. En pacientes alérgicos a LV no está indicado su empleo antes de los 2 años de edad. Se ha observado que entre el 15-40% de los pacientes alérgicos a leche de vaca desarrollan una intolerancia a este sustituto sin haber estado previamente sensibilizados a la soja⁸⁴⁻⁸⁷.

En la terapia de reemplazo es fundamental la educación del paciente. Para ello, los pacientes y su entorno familiar deben ser educados sobre la composición de los alimentos. Aquí los puntos más vulnerables son incompleta rotulación de los alimentos (no está contemplado en el código alimentario argentino la indicación de alérgenos presentes en la composición de un determinado alimento), la presencia de contaminantes o adulterantes en un alimento, un manual de buenas prácticas en la industria alimenticia que contemple este punto, la posibilidad de contaminación cruzada entre alimentos en restaurantes o casas de elaboración de comidas, etc. En caso de una ingesta accidental y la inducción de un proceso anafiláctico, la terapia de emergencia consiste en la administración de epinefrina inyectable.

La **terapia farmacológica** consiste en el tratamiento de los síntomas. Los anti-histamínicos permiten eliminar los síntomas inflamatorios a través del bloqueo de la acción de la histamina. Son frecuentemente empleados en el síndrome de alergia oral y para tratar dermatitis mediadas por IgE^{25,30,36}. También es común el uso de corticoides (no se describe su mecanismo de acción, ya que excede el alcance de esta tesis).

Adicionalmente a la eliminación del estímulo antigénico la **inducción de tolerancia** parece ser un procedimiento terapéutico muy promisorio, aunque estamos todavía lejos de su optimización. Existen distintas variantes, que se encuentran en etapa de experimentación clínica y pre-clínica, dirigidas a tratar las alergias alimentarias empleando los alérgenos. La **inmunoterapia** o **desensibilización alérgico específica** tiene como objetivo alterar la respuesta alérgica a la/s proteína/s causal/es, evitando la inducción de una respuesta activa frente a la exposición natural al alimento alérgico. La inmunoterapia Ag-específica puede estar dirigida a generar una respuesta inmune mediada por linfocitos Treg (TOLERANCIA), o generar una respuesta específica Th1, en lugar de una respuesta inmune Th2 (INMUNOMODULACION). Se han estudiado distintas variantes en cuanto a dosis de Ag, frecuencia, empleo de adyuvantes, vías de

administración, etc. de las cuales las vías oral y sublingual han resultado ser las más eficientes y seguras⁸⁸. La inmunoterapia subcutánea con alérgenos se ha probado con maní y ha demostrado ser parcialmente efectiva y con elevado riesgo de efectos adversos^{88,89}. La inmunoterapia por vía oral se basa en la exposición gradual a la proteína nativa en forma repetitiva en la mucosa oral y ha resultado efectiva en la no inducción de una respuesta alérgica aguda, simultáneamente con la inducción de los mecanismos de tolerancia oral. La terapia sublingual ha sido mayormente evaluada para el tratamiento de alergias respiratorias y hay pocos estudios en alergias alimentarias, pero con resultados prometedores. En cambio, existe una gran cantidad de estudios sobre la inmunoterapia oral para alergias alimentarias, donde el alérgeno alimentario es ingerido en cantidades gradualmente crecientes durante meses. A pesar de que se han reportado varios estudios de inmunoterapia oral en pacientes, con resultados variables, claramente se necesita conocer más acerca de la seguridad, eficacia y mecanismos de este tipo de terapias³⁰. Una alternativa para evitar los efectos adversos de la inmunoterapia consiste en emplear proteínas modificadas, o péptidos en lugar del alérgeno natural, los cuales poseen la capacidad de estimular células T sin activar mastocitos^{30,90,91}. Se han empleado vacunas de DNA plasmídico donde se inyecta el gen que codifica para el alérgeno, para su producción endógena, junto a secuencias CpG inmunoestimuladoras que constituyen ligandos de TLR9 (inductores de respuestas Th1-dependientes). Estas estrategias sólo se han evaluado en modelos murinos y se encuentran en etapas muy tempranas de validación^{30,89}.

Las terapias **no alérgeno-específicas** actúan sobre mediadores inmunes, anticuerpos IgE y citoquinas, para modular o interrumpir la respuesta alérgica. Los **anticuerpos anti-IgE** se unen a la IgE impidiendo su unión al receptor de alta afinidad. Ha resultado ser efectivo en asma y rinitis alérgica⁹², mientras que en alergia alimentaria sólo ha sido evaluado en alergia al maní⁹³ y se requiere profundizar los estudios para concluir sobre su efectividad en este tipo de patologías.

En general las terapias que emplean **citoquinas** y **anticuerpos humanizados** o **quiméricos anti-citoquinas** actúan interrumpiendo las señales inflamatorias, y no han mostrado ser eficientes en estas enfermedades dado que modulan mecanismos del sistema inmune necesarios para la defensa frente a microorganismos. Además por las funciones pleiotrópicas de las citoquinas y la redundancia de las mismas, es complicado evitar reacciones adversas durante el tratamiento. También se han estudiado en modelos animales

hierbas medicinales chinas anti-alérgicas, con resultados promisorios en alergia alimentaria a maní y leche de vaca^{30,36}.

El conocimiento alcanzado sobre los mecanismos inmunes implicados en la patogénesis de las enfermedades alérgicas, gracias al desarrollo de nuevas técnicas y modelos animales, ha permitido plantear estas nuevas terapias. Sin embargo, como se ha mencionado, el único tratamiento eficazmente empleado actualmente es la eliminación del estímulo inmunológico.

6.- MODELOS ANIMALES DE ALERGIA ALIMENTARIA

El desarrollo de distintos modelos animales de alergia ha permitido estudiar y comprender aspectos moleculares y celulares que gobiernan las reacciones alérgicas, predecir reacciones alérgicas que podrían ser originadas por alimentos potencialmente alergénicos y desarrollar nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento y prevención de las enfermedades alérgicas⁹⁴. Ratones, ratas, cerdos y perros entre otros animales han sido utilizados como modelos para el estudio de las enfermedades alérgicas, y cada modelo ha contribuido en menor o mayor grado al conocimiento actual sobre estas enfermedades.

La relevancia de los modelos animales de alergia alimentaria que incluyen a los animales pequeños de laboratorio (ratones, ratas, cobayos), respecto a los animales domésticos (perros, cerdos), se debe en gran parte a la mejor caracterización inmunológica de los mismos, a su fácil manipulación y mantenimiento bajo condiciones ambientales definidas, y su relativo bajo costo, lo que permite un mayor grado de flexibilización en cuanto al diseño de protocolos. Una ventaja sustancial para el uso de ratones consiste en la gran diversidad de cepas existentes, y el extenso conocimiento actual sobre las características genéticas de las mismas, lo cual posibilita su manipulación. Sin embargo el hecho de utilizar animales obtenidos por endocría puede no ser representativo de la respuesta observada frente a algunos alérgenos, comparado con lo que ocurre en humanos. Esto se debe principalmente a la restricción por HLA para montar una respuesta IgE específica contra ciertos alérgenos. Este hecho limita sin duda la posibilidad de emplear este tipo de modelos como herramientas para evaluar la alergenicidad de nuevas

proteínas⁹⁵. No siempre se encuentra una cepa capaz de responder frente a una proteína y en forma Th2- o IgE-dependiente. Además se debe ser cauto en la interpretación de los resultados obtenidos en los experimentos con roedores, debido a que existen importantes diferencias anatómicas, fisiológicas, e inmunológicas entre estos animales y el hombre^{96,97}. Sin embargo, a pesar de que ninguno de los modelos murinos desarrollados hasta la actualidad refleja completamente el amplio rango de manifestaciones clínicas que se observan en esta patología en humanos, muchos reproducen en forma parcial distintos aspectos de la misma. No debemos dejar de tener presente que las alergias alimentarias constituyen un espectro heterogéneo de enfermedades alérgicas, con formas variables de presentación clínica.

Con el avance de la biotecnología, y la introducción al mercado de productos modificados genéticamente, se torna necesaria la evaluación del potencial alergénico de nuevas proteínas mediante el empleo de herramientas *in vivo*, como lo son los modelos animales, a pesar de la divergencia biológica entre las distintas especies. En este campo, los modelos animales constituyen una valiosa herramienta, ya que permiten estudiar el potencial impacto que genera la introducción en la dieta de alimentos modificados, incluso en aquellos casos en los cuales se evalúan estrategias para reducir su alergenicidad, o la evaluación del efecto que tiene el procesamiento de los alimentos en su potencial alergénico⁹⁸.

En la literatura encontramos ejemplos de modelos murinos de alergia alimentaria utilizando diferentes cepas entre las que podemos citar: BALB/c, DBA/2, C3H/HeJ, BDF-1, y C57/Bl6. Las cepas BALB/c y C3H/HeJ son las que más ampliamente se han empleado.

Dado que en ratones no se producen en forma espontánea reacciones alérgicas es necesario el empleo de protocolos de sensibilización para inducir la síntesis de anticuerpos IgE. En ratones la respuesta natural frente a un antígeno que ingresa por vía oral es la inducción de tolerancia⁹⁹. Consecuentemente, uno de los principales obstáculos surgidos en el desarrollo de estos modelos es la marcada tendencia innata que presentan a desarrollar tolerancia¹⁰⁰. Por lo tanto es necesario utilizar adyuvantes para inducir una activación inmunológica en los animales. Los primeros en ser aplicados para generar la fase inductora fueron adyuvantes administrados por vía sistémica (Hidróxido de Aluminio, Toxina pertussis o AFC). Posteriormente, se han descrito modelos animales en los cuales la

ruptura de la tolerancia se consigue mediante el uso de adyuvantes mucosales, o a través de la manipulación de la funcionalidad de la barrera epitelial; incluso se han utilizado algunos alérgenos con capacidad adyuvante. Uno de los adyuvantes mucosales más empleados actualmente, es la Toxina Colérica (TC), que ha demostrado ser un buen inductor de mecanismos Th2, como se verá más adelante. La administración del alérgeno por vía mucosal permitió evidenciar la fase efectora, con los signos clínicos característicos de una reacción alérgica. Por lo tanto este tipo de modelos deben ser más profundamente empleados para el estudio de aspectos moleculares y celulares de la fase efectora. Sin embargo, el mayor conocimiento de los mecanismos desencadenados por nuevos adyuvantes mucosales, y su empleo en los modelos de alergia alimentaria han posibilitado mejorar (en el sentido de hacerlos más semejantes a lo que ocurre en humanos con una susceptibilidad genética y que desarrollan las reacciones alérgicas en forma natural al ser expuestos al alérgeno) la fase efectora de los mismos. También es posible encontrar en la bibliografía modelos de alergia alimentaria en los cuales la administración repetitiva de proteínas altamente inmunogénica por vías mucosales, sin el empleo de adyuvantes, genera la síntesis de anticuerpos IgE específicos. Por ejemplo, Kazue y col.¹⁰¹ desarrollaron un modelo en el cual se induce una respuesta Th2-específica en ratones DBA/2 contra caseína bovina, cuando esta se administra como un componente de la dieta en ausencia de adyuvantes.

Snider y col.¹⁰² mostraron que cuando se administra por vía oral a ratones C3H/HeJ TC junto al Ag lisosoma de huevo de gallina u ovoalbúmina, se observa un aumento en los niveles de IgE sérica específica, acompañado de una respuesta anafiláctica cuando los animales son desafiados con el alérgeno por vía sistémica, o de una respuesta de hipersensibilidad intestinal cuando el desafío se realiza por vía oral. Li y colaboradores^{103,104} modificaron este protocolo para desarrollar modelos de anafilaxia a proteínas de leche de vaca y de maní. La administración por vía oral de varias dosis del Ag junto a TC resulta en la producción de IgE específica y la aparición de signos de anafilaxia sistémica caracterizados por un aumento en los niveles plasmáticos de histamina, y una disminución en la temperatura corporal. También observaron¹⁰⁴ una extensa degranulación de mastocitos cutáneos.

En otro modelo de alergia intestinal¹⁰⁵, ratones de la cepa BALB/c fueron inoculados intraperitonealmente con OVA adsorbida en Alumbre de Potasio-Aluminio, y luego

desafiados repetidas veces con OVA por vía oral, obteniéndose una inflamación intestinal asociada con una respuesta Th2 local y sistémica, con un incremento en el número de eosinófilos y mastocitos intestinales, y diarrea aguda como signo clínico principal.

Morafo y col.¹⁰⁶ compararon la respuesta inmune en modelos de alergia alimentaria desarrollados en ratones de las cepas BALB/c y C3H/HeJ. Observaron una respuesta muy diferente siendo los de la última cepa más reactivos. Ellos atribuyen esta diferencia a la falta de receptores funcionales TLR4, cuya activación genera una inmunidad innata y adaptativa Th1-dependiente. Por lo tanto, dependiendo de la cepa es posible desarrollar modelos animales más o menos intensos en cuanto a los signos clínicos que desarrollan al enfrentarlos a los alérgenos por distintas vías mucosales. El cultivo de esplenocitos mostró una respuesta predominantemente Th1 en los ratones BALB/c (IFN- γ) la cual podría ser responsable de inhibir una reacción de hipersensibilidad Th2 mediada. Los niveles de IL-10, fueron mayores en la llamada cepa respondedora (C3H/HeJ), sugiriendo que esta citoquina regulatoria está asociada con las reacciones alérgicas Th2, más que con reacciones de supresión. De manera interesante, la presencia de IgE específica en los ratones BALB/c no se pudo asociar a los signos clínicos observados, como suele ocurrir en humanos. Los autores concluyen que la respuesta a la ingestión del Ag por vía oral para inducir susceptibilidad o tolerancia a las alergias alimentarias esta directamente ligada a una predisposición genética predominante hacia un perfil Th1 o Th2. Sin embargo, en estudios^{100,107-112} realizados por otros grupos con protocolos muy similares, los ratones BALB/c se comportan como respondedores. El grupo de Adel-Patient¹⁰⁷, observó en estos animales un aumento en los niveles séricos de IgE e IgG1 específicos, con especificidad similar a la observada en humanos. En el sobrenadante de cultivo de los esplenocitos evidenciaron citoquinas características del perfil de respuesta Th2 (IL-4 e IL-5), pero no de IFN- γ . La presencia de altos niveles de histamina en la materia fecal al momento del desafío oral fue interpretada como un marcador de anafilaxia gastrointestinal. También se observó anafilaxia sistémica, la cual probablemente se deba a un aumento en la permeabilidad intestinal, lo que permitió que el Ag se traslocará rápidamente a través de la barrera intestinal. Estas aparentes contradicciones ilustran las dificultades que implica desarrollar un modelo satisfactorio y reproducible de alergia alimentaria.

Otra forma de romper la tolerancia oral consiste en la alteración de la digestión de los alimentos utilizando antiácidos. El tratamiento de ratones con antiácidos como sucralfato,

ranitidina u omeprazol, inducen la sensibilización de estos frente a alérgenos dietarios de pescado⁷¹ u OVA¹¹³. De esta manera parecería ser que la disminución del pH intestinal permite que Ag fácilmente digeribles accedan al sistema inmune de mucosas, remarcando la importancia de la digestión como una manera de prevenir la sensibilización.

Por otro lado, la piel es un sitio donde frecuentemente se manifiestan síntomas en pacientes con alergia alimentaria. Una explicación posible de este hecho podría ser que la sensibilización se haya producido inicialmente a través de la misma con la inducción de células T específicas del Ag. Gonipeta y col¹¹⁴, inmunizaron ratones BALB/c por vía transdérmica con proteínas del suero de la leche de vaca sin adyuvante, observando niveles séricos incrementados de IgE e IgG1 específicos, y la aparición de signos clínicos indicativos de anafilaxia e hipotermia tras el desafío oral con el Ag de interés. También observaron que los esplenocitos de los ratones sensibilizados producían niveles elevados de IL-4 cuando eran cultivados. Queda aún definir si esta vía de sensibilización podría ser una vía importante para la inducción de alergia alimentaria en humanos.

6. a- Adyuvantes

La mayoría de las proteínas se comportan como inmunógenos muy pobres cuando son administradas por vía ig, produciendo una respuesta inmune o tolerogénica, conocida como tolerancia oral¹¹⁵. Actualmente existen evidencias experimentales que indican que las alergias alimentarias son el resultado de fallas a nivel de los mecanismos regulatorios. Por lo tanto inducir en animales un proceso alérgico significa evadir la tolerancia oral y para ello es necesario el empleo de adyuvantes. En este sentido se requieren moléculas con potencial adyuvante que induzcan una respuesta inmune con un fenotipo Th2 para generar un estado de sensibilización. Igualmente hay que tener en cuenta que los adyuvantes representan una condición experimental artificial que no necesariamente refleja la respuesta del sistema inmune que lleva al desarrollo de, en este caso, una patología alérgica.

Como mencionamos anteriormente, se han caracterizado nuevos adyuvantes mucosales con capacidad de activar la inmunidad innata e inducir la maduración de las

células presentadoras de antígenos (CPA)¹¹⁶. Muchos de estos son agonistas de los receptores tipo Toll (TLR), pero otros, como la TC se unen a otros tipos de receptores presentes en la membrana de células de la inmunidad innata. La TC está compuesta por las subunidades A y B, pertenece al grupo de las toxinas hetero-hexaméricas del tipo AB₅ al igual que la enterotoxina lábil (LT) de la *Escherichia coli* enterotóxica. Como se muestra en la **figura 3** está formada por un pentámero simétrico de subunidades B idénticas, que rodean un poro central. La subunidad A está compuesta por dos dominios con funciones diferentes, el dominio A1 que contiene la actividad enzimática y el A2 que consiste en una α -hélice unida a una cola que se extiende a través del poro.

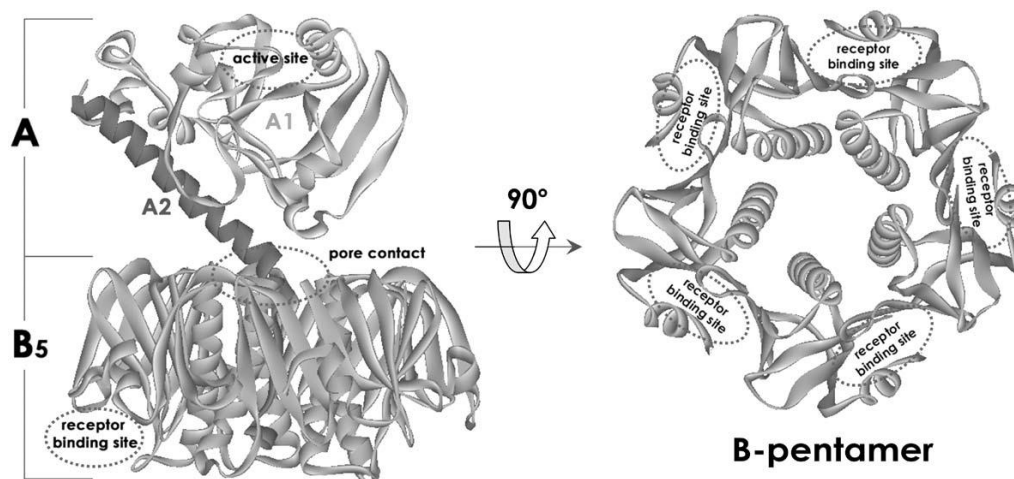


Figura 3: Estructura de la TC. (Extraído de E. Fan y col. 2004. Int. Journal of Microbiology)

La TC se une a su receptor natural, el gangliósido GM1, presente en la superficie de todas las células nucleadas, incluyendo los enterocitos, por la parte inferior del pentámero B. Luego es endocitada y posteriormente el fragmento A1 de la subunidad A activa la proteína G de la adenilato ciclasa, aumentando los niveles de AMP cíclico intracelulares. En contraste con otros productos bacterianos que actúan como adyuvantes a través del reconocimiento de los TLR, la TC no activa la vía de NF- κ B, pero igualmente es capaz de activar a las células dendríticas (CD). Gagliardi y col.¹¹⁷ observaron que la TC es capaz de estimular la maduración *in vitro* de CD y macrófagos, induciendo la expresión en la superficie de las células de moléculas de MHC clase II y moléculas coestimuladoras. Estas células en estas condiciones son capaces de activar células T CD4⁺ CD45RA⁺ naive, y la posterior secreción de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-13).

La administración del Ag junto a la subunidad B de la TC no sensibiliza a los animales¹⁰², indicando que la subunidad A enzimática tiene un rol importante en su acción como adyuvante.

Se ha demostrado que la administración por vía oral de TC junto a una proteína en ratones induce la secreción intestinal de IL-1 α , la activación local de CD y LT, y la generación de procesos inflamatorios frente a sucesivas exposiciones al alérgeno¹¹⁶. La administración oral de TC estimula la migración y maduración de las CD gastrointestinales de la mucosa a los ganglios mesentéricos. Se ha demostrado la participación de los mismos en la activación y diferenciación de los LT Th2 específicos del antígeno^{110,118,119}.

Existen otros productos bacterianos, que poseen capacidad adyuvante. Ganeshan y col.¹²⁰ emplearon la enterotoxina B del *Staphylococcus aureus* junto a OVA o maní para sensibilizar ratones, observando una respuesta Th2 específica con signos de anafilaxia tras el desafío oral, y eosinofilia en sangre e intestino. Esta enterotoxina es una causa común de contaminación en los alimentos, y la bacteria es un comensal frecuente en las vías aéreas, pudiendo por lo tanto jugar un rol en la sensibilización en las enfermedades alérgicas en humanos.

Respecto a los adyuvantes sistémicos, el Hidróxido de Aluminio, es el único adyuvante cuyo uso en humanos está permitido por la U.S.A. Food and Drug Administration (FDA)¹²¹. A pesar de utilizarse desde hace más de 70 años, y de que algunos trabajos recientes han aportado datos para dilucidar los eventos moleculares y celulares involucrados en su mecanismo de acción, el mismo aún sigue siendo incierto. Se sabe que los adyuvantes que contienen Aluminio estimulan preferentemente respuestas inmunes del tipo Th2 de manera independiente de IL-4, IL-6, e IL-13. Sokolovska y col.¹²² observaron que estos adyuvantes aumentan la presentación de Ag a los linfocitos T, la expresión de moléculas coestimuladoras (CD86) y la secreción de IL-1 β y de IL-18. La inhibición de la secreción de estas citoquinas demuestra que estos cambios son los responsables de la diferenciación a un perfil Th2. Recientemente dos grupos^{123,124} demostraron de manera independiente, que el Hidróxido de Aluminio activa a Nlrp3 (NODlike receptor, pyrin domain containing 3) el cual se asocia a la molécula adaptadora ASC y a caspasa-1 para dar lugar a un complejo proteico denominado inflamasoma, responsable de la inducción IL-1 β . Sin embargo, este adyuvante no puede activar la transcripción de citoquinas *in vitro*. En consecuencia, no está claro de que manera el

inflammasoma puede disparar sus efectos adyuvantes sobre la respuesta inmune. Posteriormente Kool y col.¹²⁵ hallaron que este adyuvante induce la proliferación de los LT específicos para el Ag en los ganglios en respuesta a la producción local de ácido úrico, que sería responsable de la activación del Nlrp3. Recientemente, Flach y col.¹²⁶ describieron que los cristales de Hidróxido de Aluminio se unen a esfingomielina y colesterol en la membrana plasmática de las CD, estimulando la fagocitosis del Ag, aumentando la expresión de MHC II, ICAM-1 y moléculas coestimuladoras en la superficie, y activando LT CD4+ específicos del Ag.

6. b- Modulación de la respuesta inmune. Usos terapéuticos

Como se mencionó previamente, no existe una terapia eficiente para tratar o prevenir la alergia alimentaria, por lo cual un importante número de investigaciones se están llevando a cabo empleando modelos animales de la patología.

Uno de los protocolos terapéuticos que se encuentra bajo evaluación implica la alteración en los niveles de diversas citoquinas involucradas en la patogénesis de las enfermedades alérgicas. Si bien los resultados encontrados han sido variables, y como se mencionó previamente, el éxito de los mismos se encuentra en tela de juicio. En un modelo de anafilaxia al maní en ratones C3H/HeJ, los animales fueron tratados con IL-12 recombinante murina, como profilaxis (administrada simultáneamente a la sensibilización) o como terapia (3 semanas después de la sensibilización)¹²⁷. En ambos casos se observó una marcada reducción de los niveles de histamina en plasma, y una reducción acorde en los signos de anafilaxia. El bloqueo con Ac anti IL-4 en ratones reduce la hiper reactividad de las vías aéreas (AHR), la eosinofilia y la metaplasia de las células de Goblet después del desafío con el Ag. Sin embargo en humanos este protocolo no resultó efectivo¹²⁸. Los Ac anti IL-5 reducen la eosinofilia pulmonar y la AHR¹²⁹. La realización de nebulizaciones con IFN- γ , causa en ratones sensibilizados, un descenso en la producción de IgE y de la inflamación de las vías aéreas, normalizando las funciones pulmonares, pero su administración parenteral no mostró diferencias con los controles¹³⁰.

También se ha sugerido que el uso de formulas de hierbas medicinales por vía oral podría ser útil para el tratamiento de las alergias. Li y col.¹³¹ observaron una disminución en el score de síntomas, en los niveles de histamina e IgE sérica específica para maní, una supresión de la proliferación de células T específicas de maní y de la producción de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) tras realizar un tratamiento terapéutico con una fórmula de hierbas medicinales por vía oral en un modelo murino de alergia al maní. Posteriormente en un trabajo de Srivasta y col.¹³² mejoraron esta formula y observaron que la misma confería protección por 5 semanas posteriores al tratamiento.

En los últimos tiempos también han adquirido relevancia las terapias probióticas para tratar distintas patologías. Los probióticos son suplementos alimenticios que contienen microorganismos vivos que producen efectos benéficos para la salud¹³³, por ejemplo en la prevención de las enfermedades alérgicas⁷⁹. La administración de bacterias probióticas (*Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus casei*¹³⁴, *Lactobacillus casei* cepa Shirota¹³⁵, *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium longum*¹³⁶ o de leche fermentada con bacterias lácticas¹³⁷ resulta útil en la prevención de las enfermedades alérgicas *in vivo* (modelos animales de alergia alimentaria). Asimismo la administración por vía oral de *Lactococcus lactis* modificado genéticamente para secretar IL-10, previo a la sensibilización de los ratones con TC junto al antígeno (β -lactoglobulina), puede prevenir una reacción anafiláctica en animales sensibilizados y puede inhibir casi completamente la producción de anticuerpos IgE e IgG1 específicos del alérgeno. Además estos microorganismos inducen un fuerte aumento en los niveles de IgA en materia fecal, que se aproximan a los niveles hallados en ratones tolerantes a este antígeno¹³⁸.

Algunos estudios epidemiológicos y experimentales recientes parecerían indicar que la infección con ciertos helmintos intestinales podría conferir protección contra desordenes alérgicos, mediante la inducción de mecanismos inmunosupresores que podrían involucrar la producción de IL-10 y/o células T regulatorias^{139,140}. Por ejemplo, muestran que en los niños infectados con helmintos intestinales o *Schistosoma spp.* se observa una reducción en la incidencia de enfermedades alérgicas, observándose una relación inversa entre el grado de infección con estos parásitos y una PC positiva, lo cual se asocia con los niveles elevados de IL-10 presentes en el suero de los pacientes¹⁴¹. Estos estudios se encuentran respaldados por numerosos trabajos, en los cuales se pudo observar que la infección de ratones con diversos parásitos (*Strongyloides stercoralis*, *Heligmosomoides polygyrus*,

Nippostrongylus brasiliensis, *Litomosoides sigmodontis* o la cercaria macho del *Schistosoma mansoni*) disminuyen la respuesta alérgica¹⁴⁰.

Sin embargo en otros estudios, se observó que ciertos helmintos (en particular *Ascaris spp.*, pero también *Brugia malayi*, *Toxocara canis* y *Trichinella spiralis*) favorecían o exacerbaban las respuestas alérgicas. A pesar de estos ejemplos, la mayoría de los trabajos sugieren que algunas clases de helmintos suprimen el desarrollo de este tipo de respuestas en animales, y también posiblemente en humanos. De esta manera, los helmintos producen cierta clase de sustancias que podrían interferir directamente con la respuesta alérgica o con el desarrollo de respuestas Th2 específicas de alérgenos. La explicación que más frecuentemente ha sido propuesta es que las infecciones con helmintos inducen la producción de células T con funciones inmunorregulatorias capaces de suprimir las reacciones alérgicas (podría ser que los helmintos activen la inmunidad innata a través de TLR 2 y consecuentemente generen una respuesta Th1 contra-regulatoria de la Th2)¹⁴². En base a estas observaciones ha comenzado a planificarse el primer ensayo clínico para el tratamiento de las enfermedades alérgicas y para su prevención mediante el empleo de estos parásitos, o algunos de sus derivados. Entre los candidatos se encuentran el *Necator americanus*¹⁴³ y el *Trichuris suis* que infecta los cerdos y ha demostrado ser efectivo y seguro en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria gastrointestinal^{144,145}. Es necesario identificar cuales son los componentes de estos parásitos involucrados en los efectos antialérgicos. Sin embargo, quedan muchos puntos que deben ser considerados, como los efectos adversos que el uso de productos derivados de helmintos podrían ocasionar (inmunosupresión general, efectos tóxicos, reacciones anafilácticas, reactividad cruzada entre los alérgenos y los productos de los parásitos). Esta terapia debería sea mas segura, rentable y eficaz que las terapias que existen en la practica actual para ser implementada, con lo cual aún queda mucho por investigar y discutir en este tema.

Otras estrategias utilizadas para prevenir o para inducir una desensibilización contra el alérgeno de interés, involucran el uso de microorganismos. Por ej. se ha observado que la administración de *Lactococcus lactis* modificado genéticamente para producir β -Lactoglobulina¹⁴⁶ (β -Lg), uno de los alérgenos mayores de la leche de vaca; o como se mencionó anteriormente IL-10¹³⁸, tendrían un efecto protector en la inducción de modelos animales de alergia alimentaria. Li y col¹⁴⁷ evaluaron la eficacia de la desensibilización por vía subcutánea de *Listeria monocytogenes* inactivada por calor, encontrando que la misma

podía reducir la severidad de los signos de anafilaxia observados en ratones sensibilizados con proteínas de maní. En un trabajo de Eigenmann y col.¹⁴⁸ evaluaron el uso de dos cepas no virulentas de *Salmonella typhimurium* para inducir la inmunomodulación de la respuesta inmune en un modelo murino de alergia alimentaria. La administración de las bacterias atenuadas por vía intragástrica previo a la sensibilización indujo un descenso en la producción de IgE e IgG1 específicas para el alérgeno, correlacionando esta inhibición con la atenuación de los signos de anafilaxia. Wu y col.¹⁴⁹ también pudieron ver que la administración por vía oral de una cepa atenuada de *Salmonella typhimurium* suprimía significativamente la inflamación de las vías aéreas y la respuesta inmune Th2 en un modelo murino de asma. También se ha visto que algunas *Mycobacterias* tienen propiedades inmunomodulatorias, pudiéndose utilizar en la prevención y el tratamiento de las enfermedades alérgicas en modelos animales¹⁵⁰. En este sentido varios estudios demuestran que el *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin pueden inhibir¹⁵¹ o prevenir^{151,152} el desarrollo de respuestas inmunes Th2 en modelos murinos de asma.

Uno de los tratamientos más prometedores como estrategia para una inmunoterapia Ag-específica, consiste en el uso patrones moleculares asociados a patógenos, como por ej. motivos CpG bacterianos. La aplicación de los mismos junto con el Ag, antes o durante la sensibilización, puede inducir un cambio en el perfil de respuesta de Th2 a Th1^{153,154}. Este tipo de terapia mostró ser útil en diversos protocolos. En un estudio¹⁵⁵, se inmunizaron ratones con CpG unido a un Ag de maní por vía intranasal, luego fueron sensibilizados por vía ig con el mismo alérgeno, observándose una reducción en los síntomas y los niveles de histamina. Resultados similares se han obtenido en un modelo de alergia a β -galactosidasa, cuando la inyección del CpG se realizó por vía intradérmica¹⁵⁶.

7.- ALERGIA A PROTEINAS DE SOJA: REACTIVIDAD CRUZADA

La soja (*Glycine max*) es en la actualidad la principal fuente de proteínas y aceites del mundo (en el 2008 el consumo de soja alcanzó el 68% de las proteínas totales consumidas¹⁵⁷). Las proteínas de soja son ampliamente utilizadas en productos alimenticios debido a sus excelentes propiedades funcionales y nutricionales, tales como la

solubilidad, formación de espumas, emulsificación, gelificación, y su alto contenido de aminoácidos esenciales. Además, la soja se utiliza también en la actualidad en la industria farmacéutica y cosmética, entre otras. Uno de los principales obstáculos que limitan el uso de productos a base de soja es la presencia de proteínas alergénicas, ya que se trata de uno de los principales alérgenos alimentarios (está incluida en el grupo de los ocho alimentos responsables de ocasionar el 90 % de las alergias alimentarias en niños^{24,48})

7. a- Proteínas de soja. Generalidades

La soja pertenece a la familia de las leguminosas. Es particularmente rica en proteínas con alto valor biológico y por lo tanto actualmente constituye un componente importante en nuestra dieta. La facilidad de su cultivo y su elevado valor comercial ha determinado que Argentina sea el tercer productor mundial de soja.

Las proteínas presentes en las semillas de soja pertenecen a tres grupos según su función: las de reserva, las estructurales y las proteínas biológicamente activas. Las primeras son las mayoritarias, su función es servir como fuente de carbono y nitrógeno para el crecimiento y desarrollo de la semilla durante la germinación. Las proteínas biológicamente activas son distintas enzimas, como inhibidor de tripsina, lipoxigenasa, hemaglutinina, β -glucosidasa, β -amilasa, citocromo c, fosfatasa.

Las proteínas de las semillas pueden clasificarse según distintos criterios:

-solubilidad en agua: aproximadamente el 90% de las proteínas son globulinas solubles en soluciones salinas, mientras que el 10% restante son albúminas solubles en agua¹⁵⁸.

-coeficiente de sedimentación de Svedberg: mediante técnicas de ultracentrifugación las globulinas de soja pueden clasificarse en 4 fracciones: 2S, 7S, 11S y 15S^{159,160}. En cada una de estas fracciones podemos encontrar distintas proteínas.

-reactividad inmunoquímica: mediante inmunoensayos empleando antisueros específicos podemos clasificar las proteínas de semillas en glicinina, α -conglucina, β -conglucina y γ -conglucina¹⁶¹.

La fracción 2S (8-22 % de la proteína soluble) corresponde a la α -conglucina. En la fracción 7S (corresponde al 35 % de la proteína soluble) podemos encontrar a la β -conglucina, la γ -conglucina y la globulina 7S básica. La fracción 11S (31-52 % de la proteína soluble de soja) está compuesta principalmente por la glicina y suele denominarse globulina 11S. La fracción 15S (5% de la proteína extraíble total) no se ha caracterizado exhaustivamente y se considera que está formada por polímeros de otras proteínas de soja (**tabla 2**). Por lo tanto las globulinas mayoritarias en las semillas son las fracciones 7S y 11S.

Tabla 2: Clasificación de las globulinas de soja

Fracción (según coeficiente de sedimentación)	Fracción (según inmunoquímica)	Proteína total (%)	Componentes principales	Peso molecular (kDa)
2S	α -conglucina	8 a 22	Inhibidores de tripsina	8; 21.5
			Citocromo C	12
7S	β -conglucina γ -conglucina globulina 7S básica	35	Hemaglutininas	110
			Lipooxigenasas	102
			β -Amilasas	61,7
			Globulina 7S	180-210
11S	glicina	31	Globulina 11S	300-380
15S	---	11	-	600

Las proteínas de soja fueron incorporadas como proteínas alimentarias en humanos desde los inicios del siglo XX¹⁶² y como reemplazo de la leche de vaca 20 años más tarde¹⁶³. Actualmente y por el elevado valor nutritivo de las mismas, se emplean formulas a base de proteínas de soja desde los primeros años de vida en distintos países. Las proteínas de soja presentan menor contenido de aminoácidos con nitrógeno y en carnitina respecto a las proteínas de la leche de vaca, por lo cual para asegurar un adecuado crecimiento es necesario incluir suplementos de metionina y L-carnitina¹⁶⁴. Pero lo más importante, y a tener en cuenta al momento de indicirlas, es su alto contenido de fitoestrógenos o isoflavonas, aluminio y fitatos. Esto ha restringido su empleo a casos en que sean estrictamente necesarias¹⁶⁵.

En el caso de pacientes con ALV es frecuente el empleo de fórmulas a base de soja como reemplazo dietario para prevenir reacciones alérgicas, sin embargo, actualmente se ha desestimado el uso de las mismas^{83,166}. Previo a la introducción en el mercado de

hidrolizados proteicos de leche de vaca, las fórmulas a base de soja fueron la única opción para niños alérgicos a leche de vaca. Sin embargo, se ha descrito que entre un 15-45% de los pacientes alérgicos a leche bovina muestran una intolerancia a proteínas de soja, aun sin haber sido previamente expuesto a proteínas de soja^{84,86,87,167,168}. Inclusive, la gran exposición en los últimos años a proteínas de soja ha determinado una gran sensibilización a estas proteínas, con el consiguiente aumento en el número de pacientes alérgicos a la soja. Un problema adicional de la alimentación con proteínas de soja es la sensibilización cruzada con el maní. Se han descrito alergenos de reactividad cruzada entre ambos sistemas, lo cual puede determinar que ciertos pacientes sensibilizados a la soja desarrollen reacciones severas al ingerir maní¹⁶⁹. En el año 2010 se concluyó el trabajo denominada DRACMA (Diagnosis and Rationale for Action Against Cow's Milk Allergy)²¹ en el que se desestima la indicación de fórmulas con proteínas de soja en niños alérgicos, antes de los 6 meses de edad.

7. b- Alergia a proteínas de soja

Desde la década de los 80 se ha descrito la frecuente aparición de reacciones alérgicas producidas por alergenos presentes en la soja. Esto puede deberse al gran consumo por parte de la población general, inicialmente en Asia y USA, pero luego extendido a países europeos, y actualmente al resto del mundo. En la actualidad los productos de soja son ampliamente utilizados en la industria alimenticia por sus diversas y valiosas propiedades funcionales (ya mencionadas previamente), por lo cual se lo consume como aceite, harina, “leche”, productos fermentados, etc. Además el bajo costo que implica su producción, comparado con otras fuentes proteicas, ha determinado que se emplee en una gran variedad de productos procesados: alimenticios (productos cárnicos, salsas, panificados, etc.), cosméticos, y otras aplicaciones industriales. Este contexto ha determinado que gran parte de la población en general esté expuesta a proteínas de soja.

Como se mencionó anteriormente desde hace aproximadamente 3 décadas la literatura internacional^{37,170} refleja la aparición de un alergeno alimentario a tener en cuenta. Sin embargo, no existe información epidemiológica concluyente y se estima que la

alergia a soja se observa principalmente en niños con dermatitis atópica¹⁷¹. Se ha estimado una prevalencia de 0,3 a 0,4 % en la población general¹⁵⁸, de 6 % en los niños atópicos y de un 14 % en los niños con alergia a leche de vaca¹⁷². Se considera un alérgeno importante en adultos (aunque no existen datos de prevalencia), como aeroalérgeno en zonas rurales y urbanas donde se cultiva esta leguminosa y la población vive en zonas aledañas a los silos de almacenamiento¹⁷³.

Las semillas de soja tienen aproximadamente un 37% en proteínas. Se han caracterizado más de 50 proteínas, de las cuales aproximadamente 20 han sido descritas como alérgenos (www.allergome.org). Muchos de estos alérgenos han sido clonados y se dispone de los mismos en forma recombinante. Esto ha permitido contar con valiosa información sobre su conformación, mapeo de epítopes, propiedades biológicas, etc. Sin embargo, la información sobre su relevancia clínica en pruebas de desafío oral es escasa, lo cual dificulta interpretar los datos hallados *in vitro*. Por otro lado, la soja ha sido incluida en el listado que la FDA y la Unión Europea ha elaborado sobre los 8 alimentos que producen el 90% de las alergias alimentarias en el mundo.

El uso ampliamente difundido de la soja y su incorporación en alimentos procesados representa una peligrosa fuente de alérgenos ocultos. Por esto su eliminación de la dieta es compleja, situación que se ve agravada cuando el etiquetado de los alimentos, como en muchos países, implica el rotulado de los alérgenos presentes en los componentes, pero no de los alérgenos ocultos en los ingredientes que lo componen¹⁷⁴.

Las manifestaciones clínicas de la alergia a soja pueden variar desde leves a severas^{175,176}, pudiéndose presentar como dermatitis atópica, asma o diarrea y dolor abdominal. Sin embargo, no se han descrito reacciones severas como consecuencia del desafío oral en DBPCFC¹⁷⁷.

Los alérgenos de la soja han sido clasificados como aeroalérgenos o alérgenos alimentarios. Los primeros han sido descritos desde hace varias décadas¹⁷⁸; la sensibilización se produce por vía inhalatoria y son responsables de inducir reacciones asmáticas. Se los considera importantes causantes de asma ocupacional¹⁷⁹ y se encuentran principalmente en la cáscara de la semilla^{170,173}. Los alérgenos alimentarios se encuentran en el cuerpo de la semilla y su importancia como alérgenos parece residir en la reactividad cruzada con otros alérgenos relacionados filogenéticamente, como maní y abedul^{45,180,181}, y no relacionados como leche de vaca^{167,168}. Por lo tanto, a pesar que existe la alergia a soja

primaria, se considera que una gran proporción de pacientes alérgicos a la soja presentan una sensibilización primaria a maní, abedul o leche de vaca. Asimismo es importante mencionar que en 2-29% de pacientes con asma, la sensibilización se produce por ingestión de los alergenos.

En la Argentina se ha producido en las ultimas dos décadas, un crecimiento significativo y sostenido del cultivo de soja, así como del desarrollo de los medios para el transporte, almacenamiento, procesamiento y comercialización de los granos. Esto ha ocasionado un importante aumento en el número de individuos expuestos a antígenos provenientes de la soja, que se traduce en una mayor sensibilización con el consiguiente desencadenamiento de síntomas respiratorios en individuos atópicos al estar expuestos a sus alergenos^{182,69}. A pesar que se han descripto aproximadamente 20 alergenos en la soja, la IUIS ha aceptado oficialmente como alergenos solo 6 proteínas (Gly m 1, Gly m 2, Gly m 3, Gly m 4, Gly m 5 y Gly m 6), lo cual refleja un escaso conocimiento de las propiedades alergénicas de sus proteínas¹⁸¹. Numerosos trabajos demuestran que existe un patrón IgE de reconocimiento de los alergenos muy diverso, siendo en muchos casos dificultoso identificar el alergeno principal¹⁸³. Se ha descripto a los principales alergenos de la soja en las globulinas 7S y 11S.

La alergia a leche bovina es la principal alergia alimentaria en el mundo⁴¹, siendo en nuestro país un problema creciente que en los últimos años ha cobrado una inusitada importancia. Desde el punto de vista terapéutico, como ya se ha mencionado, el único tratamiento efectivo es la eliminación del alergeno de la dieta y, dependiendo de la edad del paciente, su reemplazo por una fuente proteica que asegure un adecuado crecimiento. En nuestro país la alergia a soja ha adquirido trascendencia en los últimos años debido a la utilización de formulas a base de soja como sustitutos de la leche bovina, por su menor costo, aceptable palatabilidad y disponibilidad comercial. También es importante la incorporación de proteínas de soja en una amplia variedad de alimentos procesados¹⁶⁷. Se ha observado que estos pacientes no toleran las fórmulas de soja, aún sin estar previamente sensibilizados a sus proteínas. Nuestro grupo ha trabajado desde hace varios años en este problema, y luego de descartar la posible contaminación o adulteración con proteínas bovinas de estas fórmulas disponibles en el mercado local, hemos identificado y caracterizado alergenos de soja de reactividad cruzada con caseínas de origen bovino. Inicialmente se identificó una globulina 11S (A₅A₄B₃) no descripta como alergeno de la

soja, y posteriormente a la subunidad α de la β -conglucina (globulina 7S) como alérgenos de reactividad cruzada. Recientemente hemos identificado a P34 (alérgeno principal de la soja, globulina 7S) como un nuevo alérgeno de reactividad cruzada^{167,168,184}. Estos resultados inmunoquímicos permitirían explicar la intolerancia clínica observada en niños alérgicos a la leche de vaca que son tratados con fórmulas a base de soja. Sin embargo, resta aún confirmar la relevancia clínica de estos hallazgos. Hemos planteado el empleo de un modelo de alergia alimentaria a leche bovina en ratones para estudiar *in vivo* la importancia de la reactividad cruzada detectada *in vitro*. La importancia de aplicar este tipo de modelos animales es que se puede controlar la sensibilización. En este caso, animales sensibilizados a proteínas de leche de vaca son desafiados oralmente con proteínas de soja y se analiza la aparición inmediata de signos clínicos, la presencia de anticuerpos IgE, IgG o linfocitos T con capacidad de reconocimiento de alérgenos de la soja. Esto junto a las pruebas cutáneas inducidas por alérgenos de soja constituyen evidencias inequívocas de la importancia biológica de los epitopes B y T de reactividad cruzada entre estos sistemas proteicos no relacionados filogenéticamente. Este tipo de estudios empleando modelos animales son muy importantes para obtener datos preliminares sin tener que recurrir a pacientes y poner en riesgo la salud de los mismos.

MATERIALES
Y
MÉTODOS

1- PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS:

Proteínas de leche de vaca (PLV): Para la preparación de los extractos proteicos acuosos se utilizó leche descremada en polvo de origen comercial (Molico o Svelty, Nestle). Se prepararon soluciones de distinta concentración según el método a emplear en PBS, buffer fosfato pH 7.4 o buffer bicarbonato pH 8.4. Se agitó hasta lograr la máxima disolución y se filtró. Las proteínas totales se cuantificaron según se describe más adelante.

Proteínas de soja (PS): Para la preparación de los extractos proteicos se emplearon semillas de soja comerciales (*Glycine max.* L. Merr variedad Asgrow). Las semillas de soja se molieron y se disolvieron en una solución al 0.14 % p/v de NaHCO₃ a 90°C. Se homogeneizó con un homogeneizador ULTRATURRAX 20000, se enfrió hasta llegar a temperatura ambiente y se centrifugó a 5000 xg durante 20 minutos a 20°C. Se descartó el precipitado y se volvió a centrifugar el sobrenadante a 14000 xg 15 minutos a 4°C. Se extrajeron los lípidos con cloroformo durante 8 horas a 4°C, utilizando una relación fase acuosa : cloroformo de 2:1. Finalmente la fase acuosa fue dializada durante toda la noche a 4°C contra agua bidestilada, utilizando una membrana de 2 kDa de punto de corte. Se cuantificaron las proteínas totales según se describe más adelante. Los extractos se conservaron a -20°C hasta su utilización.

Proteínas de *Brucella abortus*: A través de una colaboración con el grupo de la Dra. Juliana Cassataro (Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, FMED-UBA) se emplearon las proteínas de membrana OMP-16 y OMP-19, obtenidas en forma recombinante a partir de bacterias *E.coli* BL21 (DE3) transformadas con la construcción pET-U-Omp16 o pET-U-Omp19, con restos de histidinas. Las proteínas recombinantes fueron expresadas, aisladas por sonicación y purificadas por cromatografía de afinidad empleando resinas de Ni-NTA. Estos componentes fueron detoxificados con Polimixina B, lográndose un contenido < 0,25 unidades de endotoxina /ug de proteína¹⁸⁵, el cual fue determinado con el test de *Limulus ameobocyte*¹⁸⁶. Las proteínas se conservaron a -20°C hasta su utilización.

Cuantificación de proteínas: La concentración de proteínas totales en los extractos crudos de soja, de leche de vaca y en las fracciones de proteínas recombinantes purificadas se determinó por micrométodo de Lowry¹⁸⁷ ó mediante el método de ácido Bicinónico (*Pierce BCA Protein Assay*), empleando seroalbúmina bovina como estándar de proteínas para la curva de calibración en ambos casos.

2- PLANES DE SENSIBILIZACIÓN

A fin de obtener las condiciones experimentales adecuadas que permitieran lograr una activación inmunológica compatible con una respuesta inmune Th2 en ratones, se realizaron distintos planes de inmunización. Un esquema general del mismo puede observarse en la **figura 1**. Este esquema consta de tres etapas:

- I. SENSIBILIZACIÓN
- II. DESAFÍO ORAL
- III. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

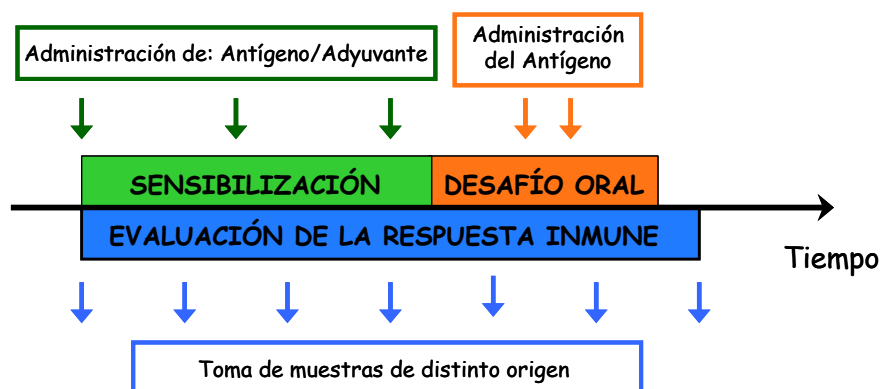


Figura 1: Esquema general de trabajo seguido durante los distintos planes de inmunización de los ratones.

I. SENSIBILIZACIÓN

Para la optimización de la primera etapa del esquema mostrado se evaluaron las siguientes variables:

- **Ratones:** Se utilizaron ratones hembras de entre 4 y 6 semanas de edad de las cepas: BALB/c, BALB/c-*nude*.
- **Antígenos:** proteínas de leche de vaca (PLV), leche de soja y Ovo albúmina (OVA). Las concentraciones proteicas empleadas variaron dependiendo de la vía de administración empleada.
- **Adyuvantes:** Hidróxido de Aluminio (Al(OH)₃), Adyuvante de Freund Completo (AFC), e Incompleto (AFI), Toxina Colérica (TC), y Lipopolisacáridos de *Escherichia coli* 026:B6 (LPS) (Sigma).
- **Vías de administración:** intragástrica (ig), intraperitoneal (ip), subcutánea (sc), intranasal (in), intradérmica (id) y endovenosa (ev).
- **Frecuencia de administración:** dependiendo de la vía de administración utilizada y de la sustancia administrada (antígeno sólo o con adyuvante) la frecuencia entre las inoculaciones varió entre 2 y 10 días.

Los ratones de la cepa BALB/c y BALB/c-*nude*, fueron adquiridos con certificado de salubridad para gérmenes específicos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinaria de la UNLP.

Todos los animales fueron mantenidos en el Bioterio del LISIN con foto período natural, en ambiente con temperatura de entre 18°C y 24°C, con disponibilidad de agua y alimento estériles *ad limitum*. El alimento balanceado usado (Cooperación, para rata y ratón, Cooperativas Argentinas) poseía proteína bruta (mínimo) 10%, extracto etéreo (mínimo) 5%, fibra cruda (máximo) 6%, minerales totales (máximo) 10%, Calcio 1,3%, Fósforo (disponible) 0,8%, humedad (máxima) 12%. Este alimento no contenía en su composición proteínas de leche de vaca.

Los ratones fueron sensibilizados en los sucesivos experimentos utilizando distintas vías para su inoculación en función del adyuvante a utilizar.

Cuando se utilizó TC como adyuvante, la vía elegida para realizar la sensibilización fue la ig. De esta manera, mediante una sonda metálica, se administró el antígeno y/o el adyuvante (dependiendo de que lote de animales se tratase) directamente en el estómago de los animales. Al utilizar esta vía de inoculación se tomaron los siguientes recaudos:

- * Los animales fueron dejados sin alimento durante las 2 horas previas al experimento
- * Treinta minutos antes de la sensibilización se le administró a cada ratón 200 μ l de una solución de NaHCO_3 al 3 % con el fin de disminuir la acidez estomacal.
- * Todas las soluciones se prepararon utilizando como buffer NaHCO_3 al 3 %.

Al utilizar como adyuvantes Hidróxido de Aluminio, AFC, o AFI la vía de administración fue la ip. El antígeno y/o el adyuvante fueron inoculados en la cavidad abdominal utilizando una aguja de 20 G. Para minimizar la posibilidad de causar lesiones en los órganos de la cavidad peritoneal los animales fueron inclinados a fin de favorecer el desplazamiento del paquete intestinal en dirección a la cabeza.

La inoculación por vía sc se realizó en el lomo de los animales utilizando una aguja de 20 G. Para la administración in, se depositaron con una pipeta automática iguales volúmenes de la solución conteniendo el antígeno y/o el adyuvante en cada narina de los animales. La inyección por vía iv se realizó en una de las venas de la cola utilizando una aguja de 25 G. Para realizar esta intervención los animales se inmovilizaron utilizando una trampa de confección casera.

II. DESAFÍO ORAL

Una vez concluido el plan de inmunización los animales fueron desafiados con el antígeno en cuestión con el fin de analizar los signos clínicos locales y sistémicos inducidos como consecuencia de la sensibilización previa. Para esto se les administró únicamente el antígeno por vía intragástrica utilizando una sonda metálica.

Los síntomas clínicos indicadores de la inducción de reacciones IgE-mediadas aparecen entre los 15 a 30 minutos posteriores a la ingestión del antígeno y alcanzan un pico aproximadamente 45 minutos después de la aparición del primer síntoma. Los

animales fueron observados durante la hora y media siguiente al desafío oral. Como se describe mas adelante a cada signo clínico se le asignó un score clínico por distintos observadores a modo doble ciego, de manera de semi-cuantificar la respuesta clínica al desafío oral.

III. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

A lo largo del plan de inmunización se tomaron muestras de diverso tipo (plasma, suero, órganos) y a distintos tiempos en función del parámetro a analizar. Para evaluar diferentes aspectos de la respuesta inmune se aplicaron distinto tipo de ensayos:

a- Pruebas *in vivo*

- Análisis de los signos clínicos inducidos post-desafío oral
- Prueba cutánea (PC)
- Prueba de transferencia cutánea pasiva (TCP)
- Prueba de Hipersensibilidad retardada (DTH)

b- Pruebas *in vitro*

- Evaluación de la respuesta inmune humoral: se midieron los niveles séricos de anticuerpos totales y específicos para PLV de distintitos isotipos por medio de ensayos inmunoenzimáticos (IgE total por ELISA de captura, IgE específica por EAST, e IgG1, IgG2a e IgG2b específicos por ELISA indirecto).
 - Cuantificación de parámetros séricos relacionados con anafilaxia: determinación de los niveles plasmáticos de histamina utilizando un ELISA competitivo.
 - Evaluación de la respuesta inmune celular: medida de la proliferación celular por incorporación de timidina tritiada en cultivos de esplenocitos. Cuantificación, por ELISA de captura de las citoquinas presentes en los sobrenadantes.

c- Análisis histológicos:

Las muestras obtenidas a partir de distintos órganos (ganglio, bazo, hígado, pulmón, corazón, e intestino distal y proximal) fueron mantenidas en formol y sometidas a los procesos clásicos de inclusión en parafina y coloración con hematoxilina-eosina. Se evaluó principalmente la aparición de signos inflamatorios.

2 a- Pruebas *in vivo*

2 a-1) Análisis de los signos clínicos inducidos en el desafío oral

Para la evaluación de los signos clínicos, se utilizó un “score” de síntomas, que consiste en asignar, de manera arbitraria, un puntaje a los signos clínicos observados de acuerdo a la intensidad de los mismos. Para esta tarea se contó con la colaboración de distintos observadores que en forma independiente y sin saber a que lote pertenecía cada animal, registraron los signos clínicos inducidos.

De esta manera se asignaron los siguientes puntajes:

Tabla 3: Escala de puntajes utilizada para evaluar la intensidad de los signos clínicos observados en el desafío oral.

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 la frecuencia respiratoria
3	respiración dificultosa, cianosis alrededor de la boca y cola
4	inactividad posterior a un estímulo, convulsiones
5	Muerte

Se graficó el número de animales que presentaron cada uno de los valores del score, para todos los lotes. Por otro lado se sumaron los puntos otorgados a cada animal, y con estos valores se calculó el promedio y la DS para cada lote de animales.

2 a-2) Prueba cutánea

Brevemente, esta prueba consiste en revelar la presencia de IgE específica unida a los receptores de alta afinidad en la superficie de los mastocitos de la piel. Se inocula el antígeno por vía sc y si es reconocido por anticuerpos IgE específicos en células sensibilizadas, se produce la activación de las mismas con la consiguiente liberación de los mediadores pro-inflamatorios presentes en sus gránulos. Este mecanismo se pone en evidencia mediante la administración iv de Azul de Evans que al llegar a la zona inflamada se extravasa e invade el tejido circundante, lo cual se traduce en una coloración azul de la piel. Este resultado es válido sólo si se observa la extravasación del colorante a los minutos de inoculado el Ag por vía sc e implica la inducción de un proceso inflamatorio mediado por IgE.

Un día antes de la prueba los ratones fueron afeitados en sus flancos derecho e izquierdo. Posteriormente se inoculó en la zona afeitada por vía sc 50 µl de la solución del antígeno a evaluar, control negativo (solución fisiológica) o control positivo (histamina Alergo-Pharma). La cantidad de antígeno a utilizar se determinó por titulación, encontrándose que para este modelo 4 mg /ml de PLV era la concentración óptima que produce reacción positiva en animales sensibilizados, y negativa en los lotes control. Inmediatamente a la inoculación sc se procedió a la inyección iv de 100 µl de Azul de Evans. Se evaluaron distintas concentraciones de Azul de Evans (0,5 %; 0,25 %; 0,1 % en solución fisiológica) y se eligió la de 0,25 % como la óptima para visualizar la reacción inflamatoria (animales del lote sensibilización), sin que se observen falsos positivos en los animales del lote control.

Luego de 15-45 minutos se observó la aparición de una roncha azul en la zona de inoculación que se consideró positiva cuando el tamaño de su diámetro fue mayor a 3 mm. En numerosas ocasiones se observó la coloración azul no sólo en la zona de inoculación sino también en zonas alejadas (orejas, hocico, boca, patas, etc.), lo cual se interpretó como una reacción inflamatoria sistémica.

2 a-3) Prueba de transferencia cutánea pasiva (TCP) o Anafilaxia cutánea pasiva (APC)

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

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

Estos ensayos permitieron encontrar las condiciones óptimas para realizar la TCP en animales de los lotes control o sensibilizados, la cual se describe a continuación:

Ratones BALB/c sin sensibilizar fueron afeitados en sus flancos derecho e izquierdo, e inoculados por vía sc con 50 µl del suero a testificar diluido 1:5 en solución fisiológica. Este suero proviene de animales sensibilizados contra PLV o de los controles (ratones inoculados solamente con el antígeno o con el adyuvante, y ratones sin inocular). Luego de 24 horas, se les inyectó por vía iv PLV (200 µg) diluidas en Azul de Evans al 0,25 % p/v (volumen final de 100µl). Observándose a los 15-45 minutos aproximadamente, cuando la reacción es positiva la aparición de color azul en la zona de la piel donde se inoculó el suero. Al igual que en la PC, en esta prueba también observamos en numerosas ocasiones la extravasación del colorante en zonas alejadas al sitio de inoculación sc (ya que dependiendo de la concentración de anticuerpos presentes suero inoculado, estos pueden difundir por toda la superficie de la piel).

Una reacción positiva significa que el suero inyectado sc contiene anticuerpos que se unen a los receptores de alta afinidad en los mastocitos cutáneos, posteriormente el Ag inoculado por vía iv junto al colorante alcanza la zona de la piel y si es reconocido por la IgE y la misma es puenteada, se produce la activación celular, liberación del contenido de los gránulos del mastocito y la consiguiente extravasación del colorante. Si por el contrario se observa una reacción negativa significa que el suero no contiene IgE o que el Ag no es específico de la IgE.

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

2 a-4) Prueba de hipersensibilidad retardada (DTH)

Los ratones previamente sensibilizados fueron inoculados por vía id (almohadilla plantar) con 50 µl del antígeno de interés (20 µg de PLV) en una de sus patas traseras y con 50 µl de solución fisiológica en la otra, como control negativo. Pasadas 48/72 hs, se midió, empleando un calibre digital (precisión 0,01 mm), la altura y el ancho de la palma plantar trasera. Se calculó y graficó el incremento del pliegue cutáneo plantar en mm. Alternativamente, con estos valores se calculó el perímetro de la pata (aproximando el perímetro de un corte transversal de la pata a una elipse). Luego se calculó para cada ratón la diferencia entre los perímetros de la pata desafiada con el antígeno y la inoculada con solución fisiológica. Finalmente se graficó la media de estas diferencias para cada uno de los grupos.

2 b- Técnicas *in vitro*:

Estudio de la respuesta inmune humoral

2 b-1) Determinación, por ELISA de captura, de IgE total en suero

Para la determinación de la IgE total sérica se desarrolló un ELISA de captura utilizando dos anticuerpos monoclonales, de origen comercial, específicos para la cadena ϵ de ratón.

Se sensibilizaron placas de poliestireno (NUNC, Maxisorp) con 100 μ l (0.2 μ g /fosa diluido en buffer de sensibilización[†]) del anticuerpo monoclonal anti-IgE de ratón (BD Pharmigen), y se incubó 1 hora a 37°C. Posteriormente se incubó con la solución de bloqueo (suero equino al 5% en solución fisiológica) durante 1 hora a 37°C, luego con 100 μ l del suero de ratón (primer anticuerpo) diluido 1:20 con diluyente (suero equino al 3% en solución fisiológica) 1 hora a 37°C, y a continuación con 100 μ l del anticuerpo secundario (anticuerpo monoclonal anti-IgE de ratón biotinilado-BD Pharmigen, 0,2 μ g /fosa diluido con el diluyente) durante 1 hora a 37°C, y finalmente se incubó con 100 μ l Streptavidina conjugada a peroxidasa (PIERCE, 1:1000) durante 30 minutos a 37°C. Para el desarrollo de color se agregaron 100 μ l de la solución de sustrato para peroxidasa, OPD-H₂O₂) y luego de 20 minutos se detuvo la reacción con 50 μ l de H₂SO₄ 2 N. Se midió densidad óptica (DO) a 490 nm empleando un lector de microplacas de ELISA Sirio S, SEAC.

2 b-2) Determinación, por EAST, de IgE específica en suero

Para la determinación de la IgE específica en el suero de los ratones, se emplearon discos de papel de filtro (Whatman N° 540) activados con CNBr¹⁸⁸. Para esto, se sumergieron 20 g de discos de papel de 5 mm de diámetro en una solución conteniendo 20 g de BrCN en 500 ml de agua destilada, bajo campana. Se llevó a pH=10,5 con NaOH 1M. Luego se realizaron lavados sucesivos utilizando las siguientes soluciones: NaHCO₃ 0,005 M, agua destilada, acetona 25 %, acetona 50 %, acetona 75 %, y acetona 100 %. Los discos de papel se secaron a temperatura ambiente y se guardaron a -20°C hasta su utilización.

Para la sensibilización de los papeles, éstos se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente con los diferentes extractos proteicos conteniendo 1 mg /ml de proteína en buffer 0,1 M Carbonato/Bicarbonato pH=8.5 según el método de Ceska¹⁸⁸. Luego, fueron lavados con buffer de sensibilización y bloqueados con una solución 0.05 M de etanolamina en el mismo buffer, durante 2 horas a temperatura ambiente. Los papeles sensibilizados y bloqueados se guardan en la heladera en PBS con azida sódica hasta su utilización (no más de 1 mes).

[†] Para ver la composición de los buffers y soluciones utilizadas ir al Apéndice

Se incubó cada disco sensibilizado y bloqueado, con 50 μ l de suero de ratón sin diluir, durante 16 horas a 4°C. Luego de realizar los lavados, los papeles se incubaron con 50 μ l del anticuerpo monoclonal anti-IgE de ratón biotinilado (BD Pharmigen), llevado a una concentración de 2 μ g/ml con diluyente para EAST, durante 5 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 agregó la solución de sustrato para fosfatasa alcalina (p-nitrofenil fosfato), deteniéndose la reacción 20 minutos más tarde con 100 μ l de EDTA 0.1 M. Se midió la absorbancia a 405 nm en el lector de microplacas (Sirio S, SEAC).

2 b-3) Determinación, por ELISA indirecto, de IgG1, IgG2a e IgG2b específicas en suero

Se sensibilizaron placas de poliestireno (NUNC, Maxisorp) con 1 μ g /fosa de PLV diluida en buffer de sensibilización. Se incubó con solución de bloqueo (suero equino al 5% en PBS) y luego se agregaron 100 μ l de los sueros a analizar diluidos 1:200 en diluyente incubándose durante 1 hora a 37°C. Luego se adicionaron 100 μ l del antisuero anti-isotipo específico de ratón obtenido en oveja (Dako, 1:2000), durante 1 hora a 37°C, y finalmente se incubó con un antisuero anti γ -globulina de oveja conjugado a peroxidasa (Jackson, 1:10000, 100 μ l) durante 1 hora a 37°C. Se agregaron 100 μ l de solución de sustrato para peroxidasa (OPD-H₂O₂) y se detuvo la reacción con 50 μ l de H₂SO₄ 2 N. Se midió densidad óptica a 490 nm con el lector de microplacas.

2 b-4) Determinación de los niveles plasmáticos de histamina por ELISA

Treinta minutos después del desafío oral, se recolectó sangre en tubos conteniendo 20 μ l de heparina sódica (5000 U por ml, Abbott) diluida 1/5 en solución fisiológica. Las muestras luego de extraídas se mantuvieron a 4 °C y separándose el plasma dentro de los 30 minutos posteriores. El mismo se guardó a -20°C hasta su utilización.

Para la medición de los niveles plasmáticos de histamina se utilizó un Kit comercial (Veratox, de Neogen Corp.), que consiste en un ELISA competitivo.

Se mezclaron 100 µl de las muestras de plasma o de los controles (0, 2.5, 5, 10, 20 y 50 ppm de histamina), con 100 µl del conjugado (histamina conjugada con Horseradish Peroxidase (HRP)). Se tomaron 100 µl de la mezcla y se adicionaron a los pocillos con el anticuerpo anti-histamina unido. Los pocillos fueron incubados 10 minutos a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se realizaron los lavados. Luego se agregaron 100 µl del sustrato cromógeno provisto por el fabricante, se dejó proceder la reacción durante 10 minutos a temperatura ambiente, pasados los cuales se agregaron 100 µl de la solución de parada también provista por el fabricante. Se midió DO a 620 nm utilizando el lector de microplacas.

Estudio de la respuesta inmune celular

2 b-5) Medida de la proliferación antígeno-específica de esplenocitos

Se obtuvo el bazo de los ratones sensibilizados o controles, y luego de su disgregación se preparó una suspensión celular de manera de tener 2×10^5 células por fosa. Se incubó en medio RPMI 1640 (JRH BIOSCIENCE) con 50 U /ml de Penicilina (Bagó) y 50 µg /ml de Estreptomina (Bagó), y suplementado con suero fetal bovino (Gibco) al 10 %, a 37°C en atmósfera controlada (5% de CO₂). Cada condición se analizó por triplicado.

Para optimizar el ensayo se probaron distintas concentraciones de PLV (1000 µg /ml), caseína (200 µg /ml), β-lactoglobulina (200 µg /ml), o extracto de proteínas de soja (4500 µg /ml) (entre paréntesis se indican las concentraciones óptimas).

Como controles negativos se emplearon esplenocitos de ratones de los lotes control o cultivados sólo con RPMI suplementado, mientras que el control positivo fue realizado en presencia de ConA (Sigma, 5 µg /ml), que también fue titulada. Los cultivos en presencia de los distintos Ag se incubaron durante 6 días, mientras que el control con Con A se incubó durante 2 días. Dieciocho horas antes de la lectura se agregó a cada fosa la timidina H³ (Perkin Elmer, 1 µCi /por fosa de cultivo). Se cuantificó la proliferación celular a través de la medida de incorporación de marca radioactiva, para lo cual se cosecharon las células, se lisaron, lavaron y filtraron empleando una membrana de nylon. Finalmente se colocó el disco de nylon conteniendo el DNA de cada fosa de cultivo en

líquido de centelleo y se empleó un contador de centelleo (Perkin Elmer Tri Carb 2810 TR) para medir las emisiones- γ .

2 b-6) Medida de los niveles de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo de los esplenocitos

A partir de las suspensiones celulares obtenidas de bazo, se incubaron en medio RPMI 1640 (JRH BIOSCIENCE) con 50 U /ml de Penicilina (Bagó) y 50 μg /ml de Estreptomina (Bagó) suplementado con suero fetal bovino (Gibco) al 10 %, a razón de 4×10^6 células por fosa en un volumen final de 1 ml. Se cultivaron a 37° C bajo atmósfera controlada (CO_2 al 5%), en presencia del antígeno (las cantidades de antígeno son las mismas que las mencionadas en el ensayo de proliferación), o en medio RPMI solamente (control negativo) durante 72 horas; o en presencia de ConA (Sigma, 5 μg /ml) durante 48 horas (control positivo).

Se tomaron los sobrenadantes de cultivo y se cuantificaron las citoquinas secretadas utilizando un ELISA de captura comercial. Se cuantificaron los niveles de IL-5 (Invitrogen), IFN- γ (Invitrogen) e IL-13 (R&D Systems), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

Para la cuantificación de IL-5 e I IFN- γ se sensibilizaron placas de poliestireno (NUNC, Maxisorp) con 100 μl de anticuerpo anti-IL-5 de ratón, o anti-IFN- γ de ratón (1 μg /ml para ambas), diluidos en buffer sensibilización, durante toda la noche a 4°C. Las fosas se bloquearon con la solución de diluyente durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubaron con 100 μl de las diluciones de los estándares o de las muestras, junto con 50 μl del anticuerpo secundario específico (anti-IL-5 de ratón biotinilado, 0.1 μg /ml; o anti- IFN- γ de ratón biotinilado, 0.125 μg /ml, diluidos en la solución de diluyente), durante toda la noche a 4°C. Luego se incubaron con 100 μl de streptavidina conjugada a peroxidasa (0.15 μg /ml), durante 45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se agregó la solución de sustrato/cromógeno (OPD- H_2O_2) y se detuvo la reacción con 50 μl de H_2SO_4 2 N. Se midió DO a 490 nm en el lector de microplacas.

Para la cuantificación de la IL-13, se sensibilizaron placas de poliestireno (NUNC, Maxisorp) con 100 μl del anticuerpo anti-IL-13 de ratón obtenido en rata (4 mg /ml en

buffer PBS) durante toda la noche a temperatura ambiente. Se bloquearon con 300 μ l de solución diluyente 1 hora a temperatura ambiente. Luego se agregaron 100 μ l de las distintas diluciones de los estándares o de las muestras y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con 100 μ l del suero de cabra anti-IL 13 de ratón biotinilado (200 ng /ml), y con streptavidina conjugada a peroxidada (1:200) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se agregó el sustrato para peroxidasa y luego de detener la reacción se midió DO a 450 nm.

3- ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Para el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com. Se utilizaron los siguientes tests: One-way ANOVA, Two-way ANOVA, y Test de Student.

Contamos además con la colaboración de la Lic. María Inés Urrutia, del CeSPI, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, para el asesoramiento y procesamiento estadístico de los resultados obtenidos.

RESULTADOS
Y
CONCLUSIONES

Capítulo I

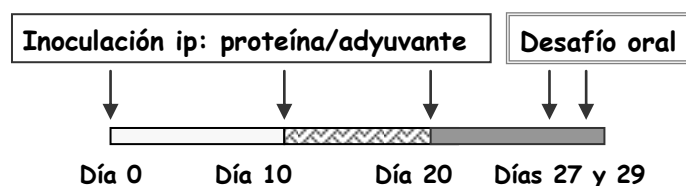
1.- EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ANTI-PLV OBTENIDA EN RATONES DE LA CEPA BALB/C

1.1.- PLAN DE INMUNIZACIÓN UTILIZANDO $\text{Al}(\text{OH})_3$

Teniendo en cuenta las cualidades del $\text{Al}(\text{OH})_3$ como adyuvante pro-Th2, se evaluó la capacidad del mismo para inducir una respuesta IgE-mediada contra PLV en ratones de la cepa BALB/c.

Los ratones de 5 semanas de edad fueron agrupados en distintos lotes: lote de animales sensibilizados (inoculados con el antígeno y el adyuvante), lotes control (inoculados solamente con el adyuvante, o con PLV).

Se realizaron varias inoculaciones por vía intraperitoneal, seguidas por el desafío oral a través de la administración de PLV por vía intragástrica, como se observa en el siguiente esquema:



Esquema 1

Días 0, 10 y 20: se inocularon por ratón

15 μg de PLV + 1 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$, el día 0; y 15 μg de PLV + 0.5 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$, los días 10 y 20, para el lote de animales denominado **SENSIBILIZACIÓN**.

1 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$, el día 0; y 0.5 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$, los días 10 y 20, para el lote de animales denominado **CONTROL DE ADYUVANTE**.

15 μg de PLV para el lote de animales denominado **CONTROL DE ANTÍGENO**.

Días 27 y 29: desafío oral: administración de 30 mg de PLV.

Caracterización de la respuesta inmune

1.1. a- Pruebas *in vitro*

• **Detección de anticuerpos séricos**

Se analizaron las muestras de suero obtenidas a lo largo del experimento para la detección de anticuerpos totales y específicos de distinto isotipo contra PLV, con el fin de emplearlos como parámetros de una respuesta inmune Th1 o Th2.

En la **figura 1** se muestran los resultados de IgE total correspondientes a un plan de sensibilización representativo de los distintos que se realizaron en las mismas condiciones experimentales. Pueden observarse los resultados individuales obtenidos para cada uno de los animales del lote denominado sensibilización (**a**), del lote control de adyuvante (**b**), y del lote control de antígeno (**c**). En la **figura 1 d**, se grafican los valores promedios con las desviaciones estándar, obtenidos para cada grupo, y como puede observarse se alcanzan niveles de IgE total sérica estadísticamente diferentes al comparar los animales del grupo sensibilizado y los de los grupo control tanto para el día 30 como para el día 53 ($p < 0,001$). En el lote control de adyuvante se observa una gran variabilidad en los valores obtenidos a lo largo del experimento (**figura 1 b**), y si bien se observa que en algunos animales aumentan los niveles de IgE total, este aumento no es significativo para el día 30 o el 53 respecto al día 0. En el grupo sensibilizado si se observa un aumento estadísticamente significativo de la IgE total a lo largo del tiempo [p (Sens día 0 vs día 30) $< 0,001$; y p (Sens día 0 vs día 53) $< 0,001$].

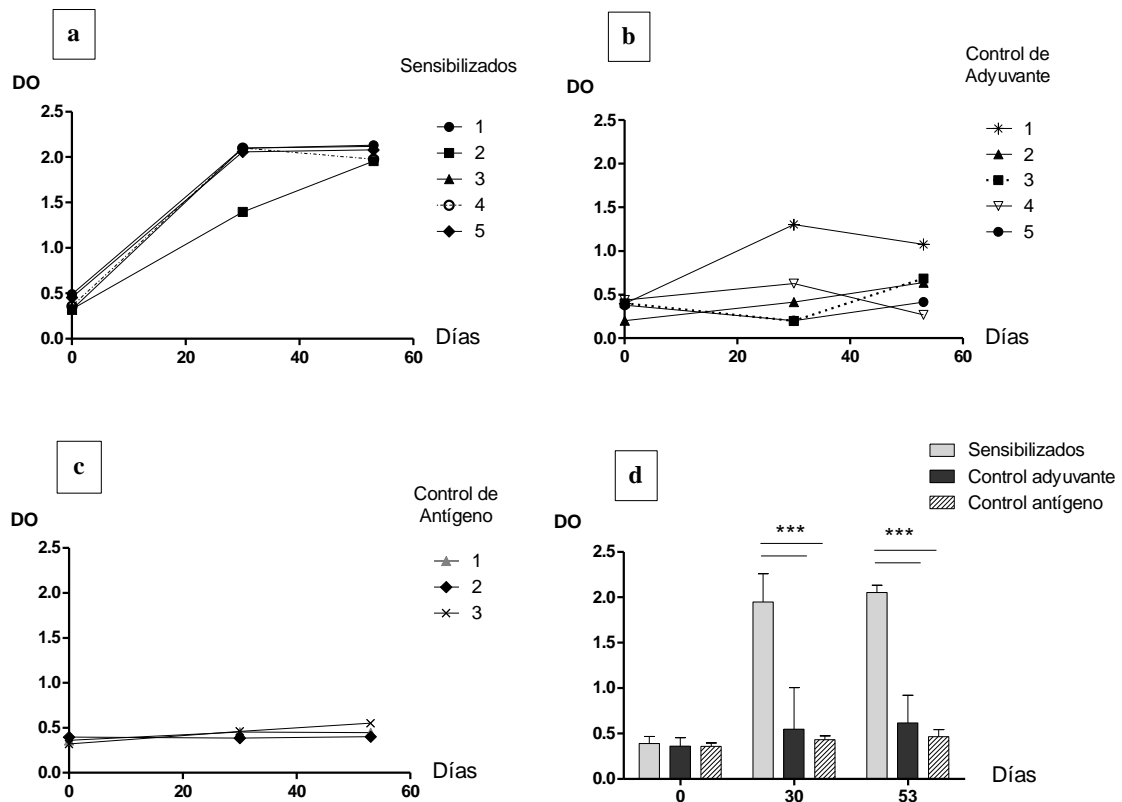


Figura 1. IgE total medida por ELISA de captura. Valores obtenidos para cada animal individual del lote de ratones sensibilizados (a), lote control adyuvante (b), y lote control de antígeno (c). En d) se muestran los valores promedios \pm DS para cada uno de estos grupos. (***) $p < 0,001$). Estos resultados corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Los niveles séricos de IgE específica para PLV medidos por EAST se muestran en la **figura 2**, donde nuevamente **2a** corresponde a los animales del lote sensibilización, mientras que **2b** y **2c** corresponden a los animales de los grupos control de adyuvante y antígeno respectivamente. En la **figura 2 d** se muestran los valores promedio obtenidos para cada grupo. Nuevamente se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de animales sensibilizados y ambos controles tanto para el día 30 como el 53 ($p < 0,001$).

En el grupo control de adyuvante se observa un aumento estadísticamente significativo entre el día 0 y el día 53 ($p < 0,05$). Sin embargo, consideramos que la diferencia entre las densidades ópticas medias representativas de los niveles de IgE específica para este grupo [media (día 0) = 0,28 y media (día 53) = 0,41] no tiene relevancia biológica. Además para el grupo de animales sensibilizados el valor de p entre el día 0 y el día 53 es $< 0,001$, es decir que la diferencia es al menos 20 veces mayor a la observada

para el grupo control de adyuvante. La diferencia entre los valores medios de densidad óptica entre los días antes mencionados para el lote sensibilización (diferencia en $DO = 0,45$) sí podría tener relevancia biológica.

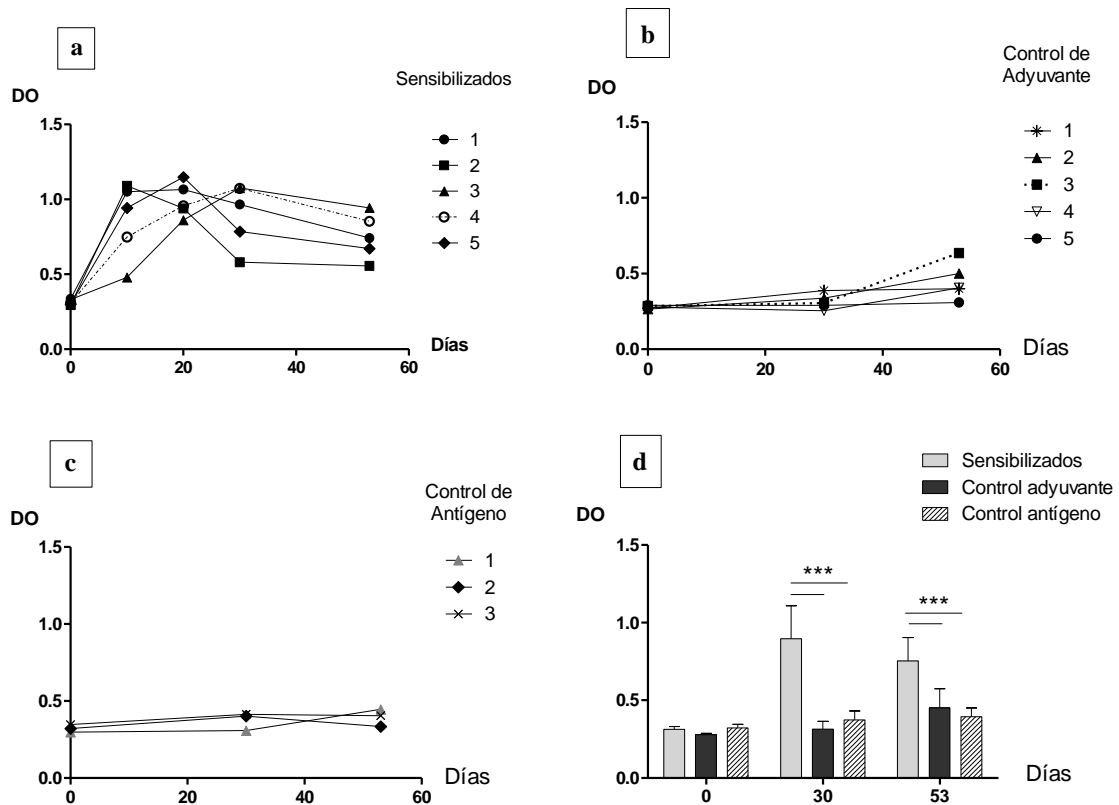


Figura 2. IgE específica para PLV medida por EAST. Valores obtenidos para cada animal individual del lote ratones sensibilizados (a), lote control adyuvante (b), y lote control de antígeno (c). En d) se muestran los valores promedio de $DO \pm DS$ para cada uno de estos grupos. (***) $p < 0,001$). Estos resultados corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Estos resultados muestran que el protocolo de inmunización empleado es adecuado para la generación de una respuesta con niveles elevados de IgE total e IgE específica para PLV en ratones de la cepa BALB/c.

También se analizó la presencia de distintas subclases de IgG en el suero de los animales. En la **figura 3** se grafican los niveles de IgG1 específica para PLV; en la **figura 4** los niveles de IgG2a específica y en la **figura 5** los de IgG2b específica, medidos por ELISA indirecto.

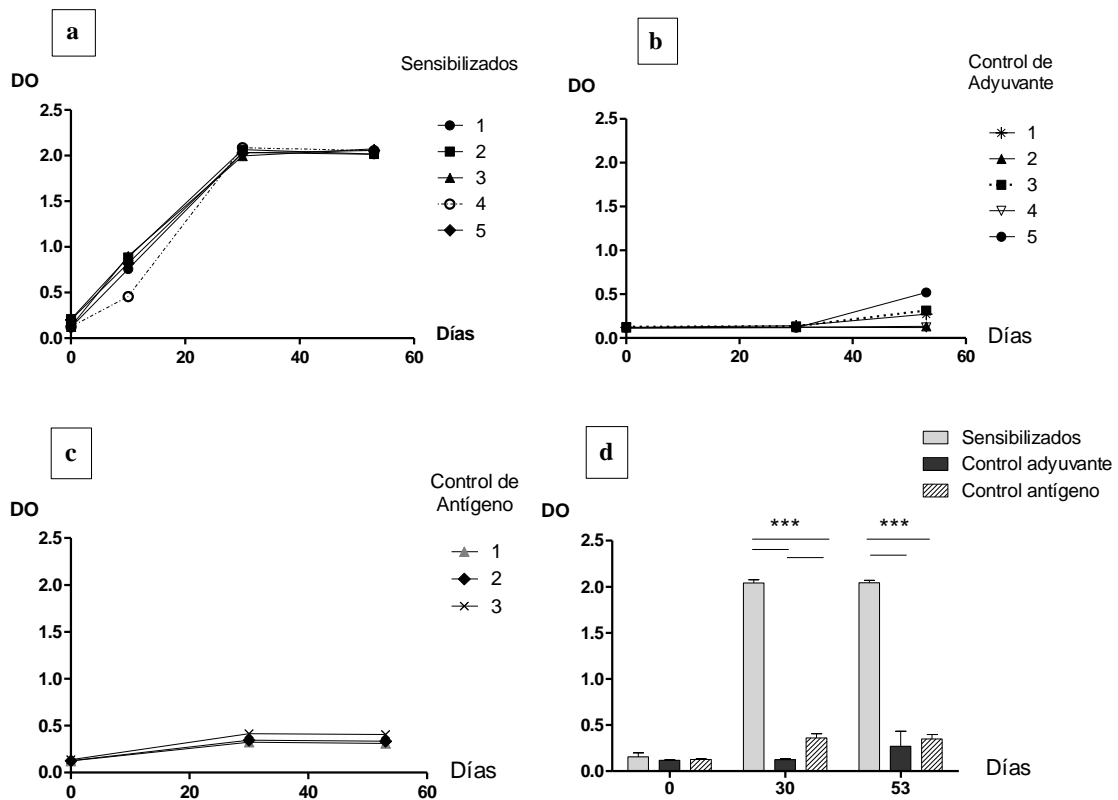


Figura 3. IgG1 específica para PLV medida por ELISA indirecto. En a) b) y c) se muestran las curvas correspondientes a animales individuales, pertenecientes a los lotes de ratones sensibilizados, control de adyuvante y control de antígeno respectivamente. En d) se muestran los valores promedios \pm DS para cada uno de estos grupos. (***) $p < 0,001$). Estos resultados corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes.

En la **figura 3**, se observa un aumento muy significativo en los niveles de IgG1 específica para PLV en el grupo de animales sensibilizados con respecto a los controles. Si bien el día 30 se observa que p (Control de adyuvante vs Control de antígeno) es < 0.001 , los niveles de IgG1 específica para el grupo de animales sensibilizados son claramente superiores. Al día 53, se pueden observar diferencias altamente significativas entre el grupo sensibilización y los grupos controles, pero ya no se observan diferencias significativas entre los grupos control (**figura 3 d**).

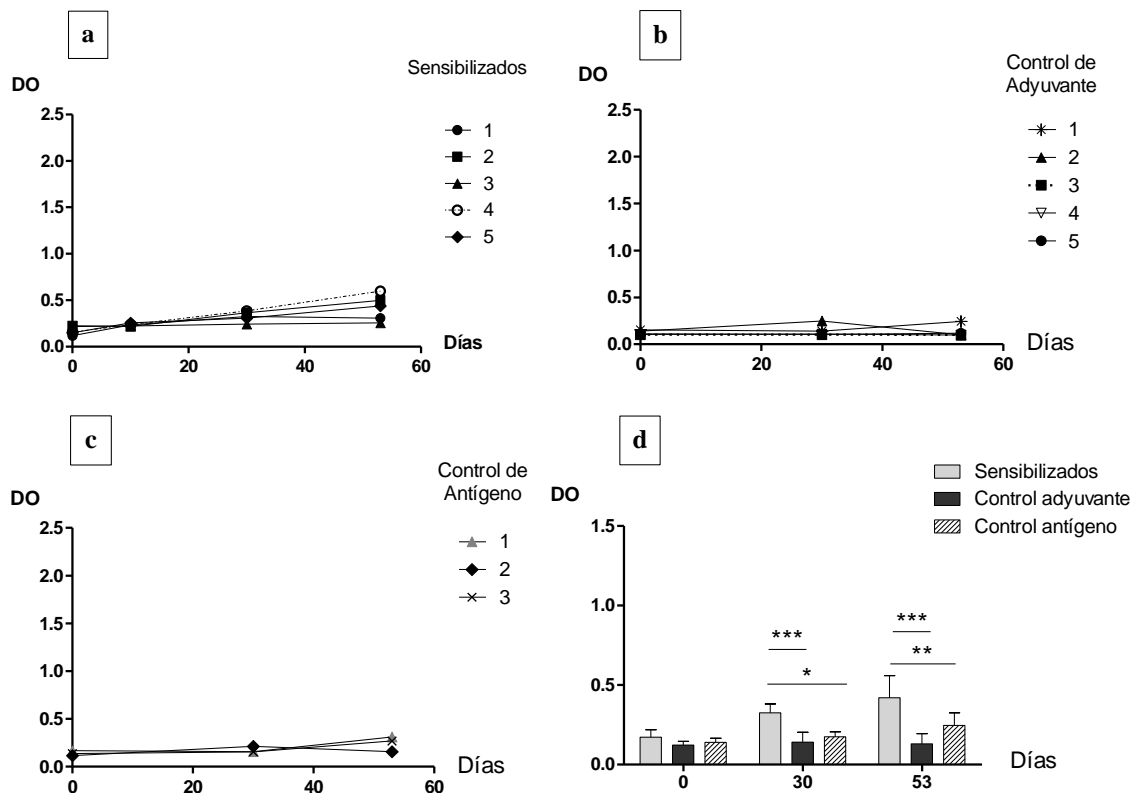


Figura 4. IgG2a específica para PLV medida por ELISA indirecto. En a) b) y c) se muestran las curvas correspondientes a animales individuales, pertenecientes a los lotes de ratones sensibilizados, control de adyuvante y control de antígeno respectivamente. En d) se muestran los valores promedios \pm DS para cada uno de estos grupos. (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; y * $p < 0,05$). Estos resultados corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Con respecto a los niveles de IgG2a específica, si bien se observa un aumento estadísticamente significativo en el grupo de animales sensibilizados, respecto a los controles (**figura 4 d**), los niveles de este anticuerpo son significativamente inferiores a los encontrados para la IgG1 específica, como se puede ver más adelante en la **figura 6**.

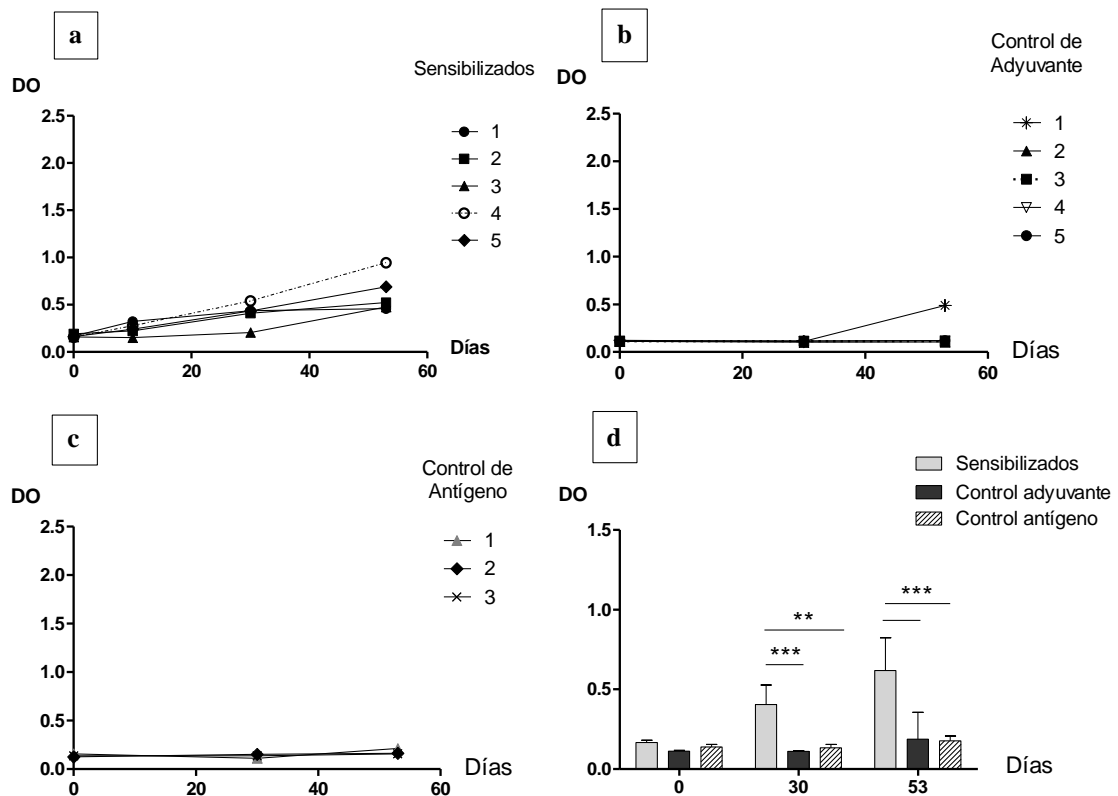


Figura 5. IgG2b específica para PLV medida por ELISA indirecto. En a) b) y c) se muestran las curvas correspondientes a animales individuales, pertenecientes a los lotes de ratones sensibilizados, control de adyuvante y control de antígeno respectivamente. En d) se muestran los valores promedios \pm DS para cada uno de estos grupos. (***) $p < 0,001$; y ** $p < 0,01$). Estos resultados corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Con respecto a la IgG2b específica se observa (**figura 5 d**) un incremento en los niveles de esta inmunoglobulina en el grupo de animales sensibilizados, respecto a los controles. No observándose ninguna variación significativa en los grupos controles a lo largo del tiempo.

En la **figura 6**, se observan los valores de DO obtenidos para los distintos isotipos de IgG específica medidos el día 53. Como puede observarse los niveles de IgG1 específica son muy superiores a los de IgG2a e IgG2b, en el grupo de animales sensibilizados.

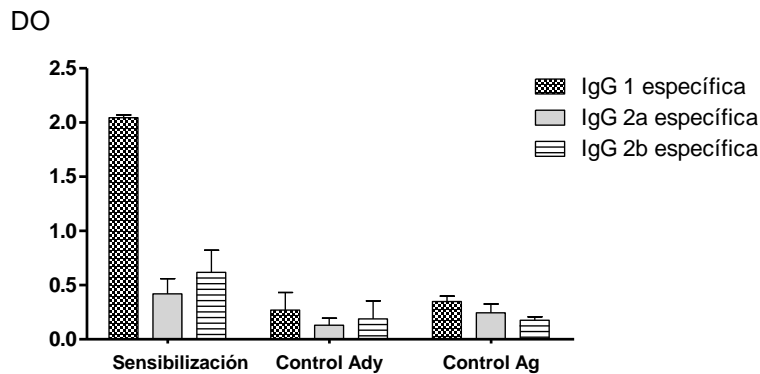


Figura 6. IgG1, IgG2a, e IgG2b específica para PLV medidas por ELISA indirecto. Datos correspondientes al día 53 del plan de sensibilización, para los lotes de ratones sensibilizados, control de adyuvante, y control de antígeno.

Teniendo en cuenta los incrementos hallados en los niveles séricos de IgE e IgG1 específicos cuando aplicamos este plan de inmunización podemos concluir que el perfil de activación inducido es compatible con una respuesta de tipo Th2. Además es importante destacar la gran variabilidad individual observada en todos los anticuerpos medidos en el lote de animales sensibilizados.

1.1. b- Pruebas *in vivo*

• Análisis de los signos clínicos locales y sistémicos inducidos luego del desafío oral

Se analizó la aparición de signos clínicos a los 15-30 minutos del desafío oral en los ratones de los diferentes lotes. Como se describió anteriormente se asignaron distintos scores clínicos en función de la gravedad de los síntomas considerando signos locales y sistémicos. Como puede observarse en la **figura 7** en el lote de animales sensibilizados los signos clínicos observados con mayor frecuencia fueron: disminución en la actividad física, incluso ante un estímulo externo, aumento en el rascado y frotado de la nariz y aparición de temblores. En los animales pertenecientes a los grupos controles, se observó una reducción en la actividad de un animal (en uno de los tres experimentos realizados), mientras que en el resto de los animales no se observó ningún comportamiento atípico o compatible con una reacción inflamatoria inducida por un mecanismo IgE-dependiente. En la **figura 7** se muestran los resultados correspondientes a un experimento representativo.

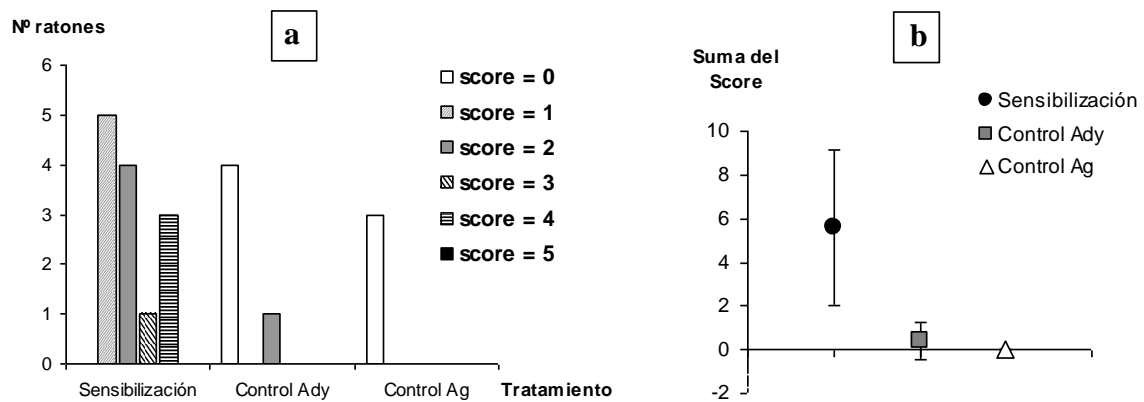


Figura 7. Signos clínicos locales y sistémicos inducidos luego del desafío oral. En **a**) se grafica el número de animales que presenta cada uno de los signos (según lo descrito en materiales y métodos) en cada grupo, y en **b**) se muestra el promedio \pm DS de la suma de los scores obtenidos para cada ratón dentro de los grupos. Estos resultados corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que en el lote de animales sensibilizados, en los que logró evidenciarse una respuesta Th2-dependiente, los signos clínicos observados serían compatibles con reacciones alérgicas mediadas por IgE.

1.1. c- Análisis histológicos

Luego del desafío oral los animales fueron sacrificados y se realizaron estudios histológicos convencionales sobre muestras obtenidas de ganglio, bazo, hígado, pulmón, intestino proximal y distal, y corazón. La principal diferencia observada entre los animales sensibilizados y los animales control radica en el hallazgo de signos de activación inmunológica en el bazo. En intestino se observó hiperplasia linfoidea, no hay atrofia de las vellosidades ni infiltrados mononucleares, en hígado se observaron microgranulomas como signo de toxicidad del adyuvante administrado por vía intraperitoneal, y en pulmón no se observó remodelamiento tisular, ni la presencia de infiltrados celulares en la mucosa bronquial (**figura 8**).

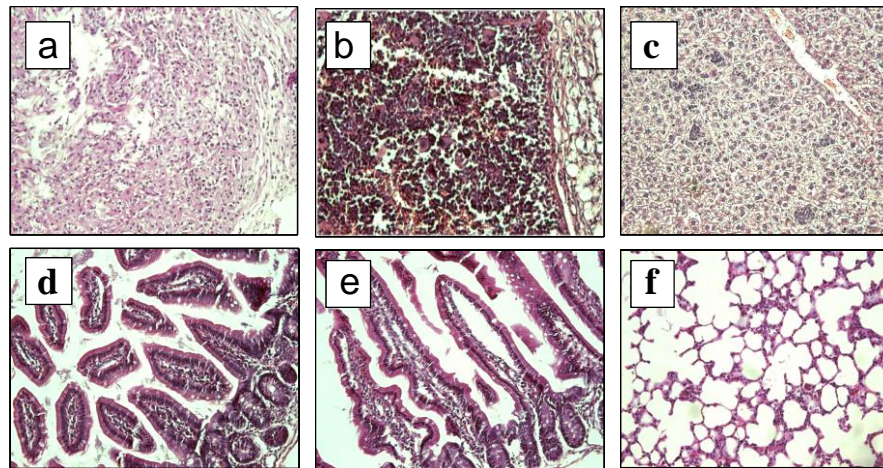


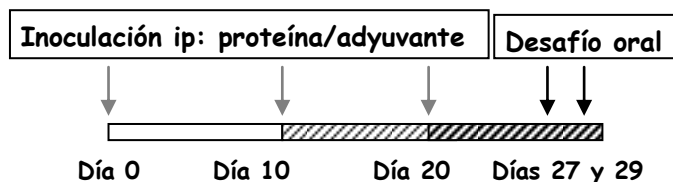
Figura 8: Estudios histológicos de muestras incluidas en parafina de animales pertenecientes al grupo **sensibilización**, teñidos con Hematoxilina-Eosina. Los diferentes órganos estudiados son: **a)** ganglio, **b)** bazo, **c)** hígado, **d)** intestino proximal, **e)** intestino distal, y **f)** pulmón. Estos resultados corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes.

En conclusión, no se observa la inducción de un marcado proceso inflamatorio en ninguno de los órganos estudiados, aunque la hiperplasia linfoidea observada en bazo e intestino es compatible con la activación de mecanismos inmunológicos.

1.2.- PLAN DE INMUNIZACIÓN UTILIZANDO DISTINTOS ADYUVANTES. COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ESPECÍFICA OBTENIDA

Con el fin de evaluar la distinta capacidad que tienen diferentes adyuvantes de inducir una respuesta inmune específica contra PLV, se realizaron diferentes planes de inmunización utilizando como adyuvantes Al(OH)₃, AFC (adyuvante de Freund completo) o AFI (adyuvante de Freund incompleto) en base al esquema mostrado previamente. Las cantidades de adyuvante y de antígeno se modificaron para optimizar la obtención de la respuesta deseada. De esta manera, se redujo la cantidad de Al(OH)₃ para disminuir la toxicidad observada y se incrementó la cantidad de antígeno administrado en el desafío oral para aumentar la intensidad de los signos clínicos inducidos.

El plan que se aplicó se observa en el **esquema 2**:



Esquema 2

Días 0, 10 y 20: se inocularon por ratón:

15 µg de PLV + 0.5 mg de Al(OH)₃, para el grupo denominado **Al(OH)₃**

15 µg de PLV + 0.1 ml de AFC, para el grupo denominado **AFC**

15 µg de PLV + 0.1 ml de AFI, para el grupo denominado **AFI**

Días 27 y 29: desafío oral: administración de 50 mg de PLV.

Se incluyeron lotes de ratones inoculados con cada uno de los adyuvantes exclusivamente (control de adyuvante) siguiendo el mismo esquema descripto.

Caracterización de la respuesta inmune

1.2. a- Pruebas *in vitro*

• Detección de anticuerpos séricos

La eficiencia del plan de inmunización aplicado fue seguida a través de la determinación de anticuerpos séricos totales y específicos.

En la **figura 9** se presentan los resultados obtenidos para IgE total. Se observa un aumento en los niveles de IgE total con respecto a los controles, para todos los adyuvantes. Siendo este aumento más rápido y homogéneo para los animales sensibilizados utilizando como adyuvante el $Al(OH)_3$.

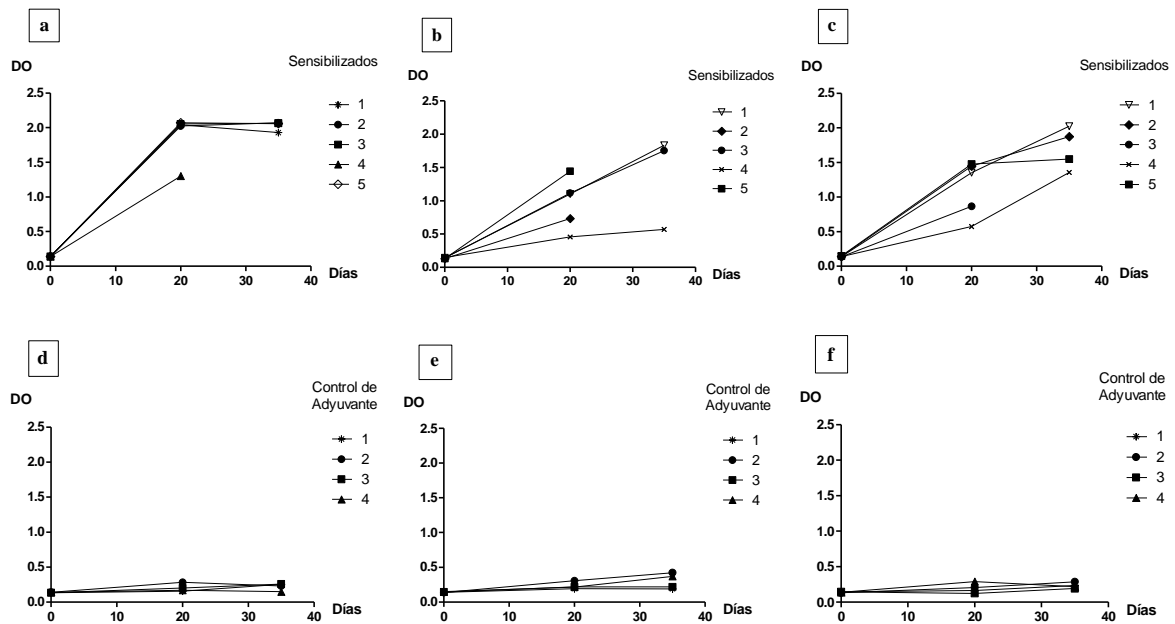


Figura 9. IgE total medida por ELISA de captura. En el panel superior se muestran los resultados obtenidos a partir de los lotes de animales sensibilizados con: **a)** $Al(OH)_3$, **b)** AFC, y **c)** AFI como adyuvantes. En **d)**, **e)**, y **f)** se observan los controles respectivos utilizando solamente cada uno de los adyuvantes. Los resultados mostrados corresponden a un experimento representativo, de tres esquemas de inmunización realizados.

Comparando los resultados obtenidos en los lotes control respecto de los sensibilizados, puede observarse en todos los casos un marcado incremento en los niveles de IgE total sérica. Cabe destacar nuevamente la gran variabilidad en los resultados obtenidos, en especial cuando utilizamos como adyuvantes AFC o AFI. Para una mejor visualización, se muestran los promedios de estos resultados en la **figura 10**.

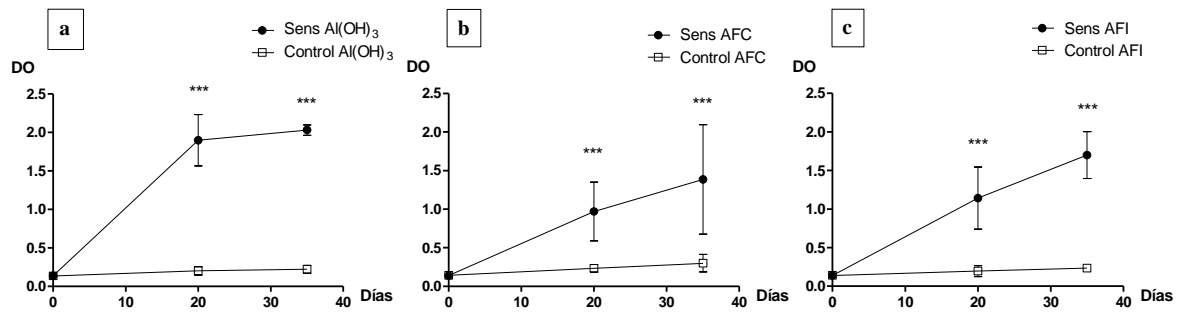


Figura 10. Valores promedio de la IgE total obtenidos por ELISA de captura para los animales sensibilizados utilizando: a) Al(OH)₃, b) AFC y c) AFI, como adyuvantes. (*) p < 0,001), de tres esquemas de inmunización realizados.**

Los niveles de IgE específica para PLV aumentaron significativamente durante el transcurso del plan de inmunización en el grupo de animales sensibilizados, con respecto a los valores obtenidos en los lotes control, según puede verse en la **figura 11**. En ésta, además de los resultados individuales obtenidos para cada animal, incluimos los gráficos de los valores promedio para una mejor visualización de los resultados:

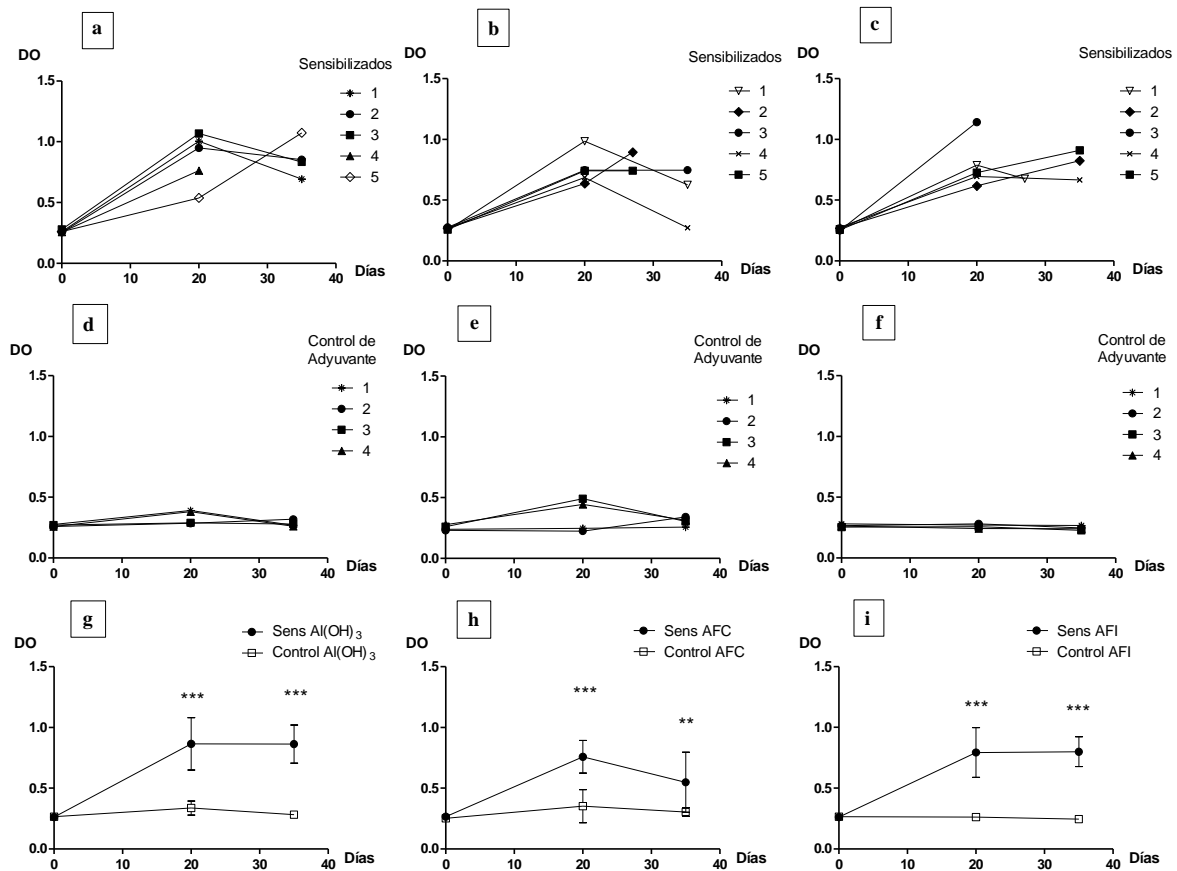


Figura 11. IgE específica medida por EAST. Valores obtenidos para cada animal individual de los lotes de ratones sensibilizados utilizando **a)** Al(OH)₃, **b)** AFC, y **c)** AFI, y en **d)**, **e)**, y **f)** se observan los controles respectivos. En **g)**, **h)**, e **i)** pueden observarse los promedios ± DS obtenidos con cada uno de estos adyuvantes. (***) $p < 0,001$; y **) $p < 0,01$). Estos resultados corresponden a un experimento representativo de tres esquemas de inmunización realizados.

Como puede observarse, los tres adyuvantes originan un aumento estadísticamente significativo en los niveles de IgE total y específica, sin embargo cuando se utiliza AFC la diferencia entre los valores medios de DO para la IgE específica el día 35 (**figura 11 h**) carecería de relevancia biológica (diferencia en los valores medios de DO= 0,24), mientras que cuando se utiliza Al(OH)₃ o AFI, se obtienen diferencias en las DO medias superiores a 0.4 para el día 35; las cuales sí pueden ser de importancia biológica.

En la **figura 12** se muestran los promedios de los valores obtenidos de DO para la determinación sérica de IgG1 (**a, b y c**), IgG2a (**d, e y f**) e IgG2b (**g, h e i**) específicas contra PLV correspondientes a un experimento representativo de 3 realizados. Con el fin de facilitar el análisis de los resultados, en esta figura mostramos sólo los gráficos de los promedios.

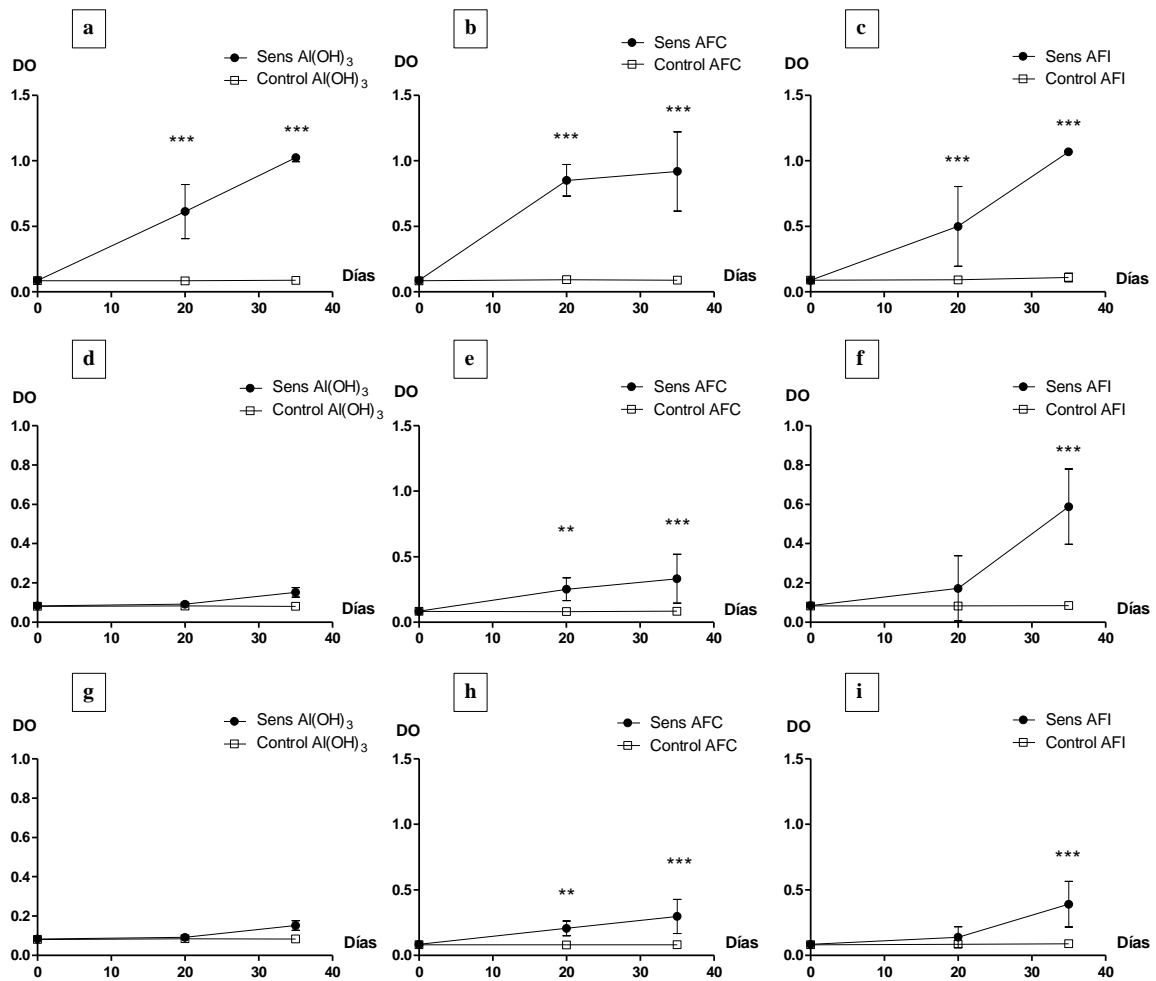


Figura 12. Valores promedio de las DO \pm DS correspondientes a lo isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b específicos para PLV obtenidos por ELISA indirecto. En a), b) y c) se muestran los resultados de IgG1; en d), e), y f) se muestra los valores de IgG2a; y en g), h) e i) las DO obtenidas para IgG2b, para los animales sensibilizados utilizando Al(OH)₃, AFC, y AFI. (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; y * $p < 0,05$). Estos resultados corresponden a un experimento representativo, de tres esquemas de inmunización realizados.

Como puede verse en las **figuras 12 a, d, y g**, cuando se utiliza como adyuvante Al(OH)₃ se observa un aumento estadísticamente significativo en los niveles de IgG1 específica, pero no se observa aumento significativo en los niveles de IgG2a o IgG2b específica. En cambio en los ratones sensibilizados con AFC y AFI, se puede observar un aumento estadísticamente significativo en los niveles de estas tres subclases de IgG específicas.

Por lo tanto y como era de esperarse, se observa un aumento en los niveles de los distintos isotipos de anticuerpos específicos estudiados, en respuesta a la activación

inmunológica inducida con el uso de los tres adyuvantes. En el caso del $\text{Al}(\text{OH})_3$ los anticuerpos que aumentan son compatibles con un perfil de activación Th2-dependiente, como habíamos mostrado anteriormente. Con los adyuvantes de Freund completo e incompleto, se observa un aumento significativamente estadístico en los niveles de todos los isotipos específicos analizados, incluida la IgE.

Estas diferencias pueden apreciarse mejor en la **figura 13**. En esta figura no se indicaron las diferencias estadísticas para facilitar su interpretación. Con respecto a los valores de IgE específica para PLV (**figura 13 a**) se observan diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) el día 35 entre el grupo sensibilizado con $\text{Al}(\text{OH})_3$ y el AFC, y diferencias significativas ($p < 0,05$) el día 35 para los ratones sensibilizados utilizando AFC y AFI. En la **figura 13 b**, se observan los valores de DO obtenidos para la IgG1 específica en estos grupos. En este caso sólo se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre los animales inoculados utilizando AFC y AFI para el día 20. En la **figura 13 c**, se observa un aumento en los niveles de IgG2a el día 35 cuando se utiliza como adyuvante AFI, con $p < 0,001$ cuando se lo compara con el grupo en el cual se utilizó $\text{Al}(\text{OH})_3$, y con $p < 0,01$ cuando se lo compara con los resultados obtenidos cuando se utiliza AFC. Además, este día puede observarse que también hay diferencias con relevancia estadística cuando se comparan los lotes sensibilizados con $\text{Al}(\text{OH})_3$ y AFC ($p < 0,05$). Con respecto a la IgG2b (**figura 13 d**), se observa que el mayor aumento de esta se produce en el grupo sensibilizado utilizando AFI ($p < 0,001$ respecto al grupo de $\text{Al}(\text{OH})_3$, para el día 35), sin embargo no hay diferencias significativamente estadísticas entre este grupo y el grupo en el cual se utilizó AFC. El día 35 se observa un aumento en el grupo AFC ($p < 0,05$) respecto al grupo de $\text{Al}(\text{OH})_3$.

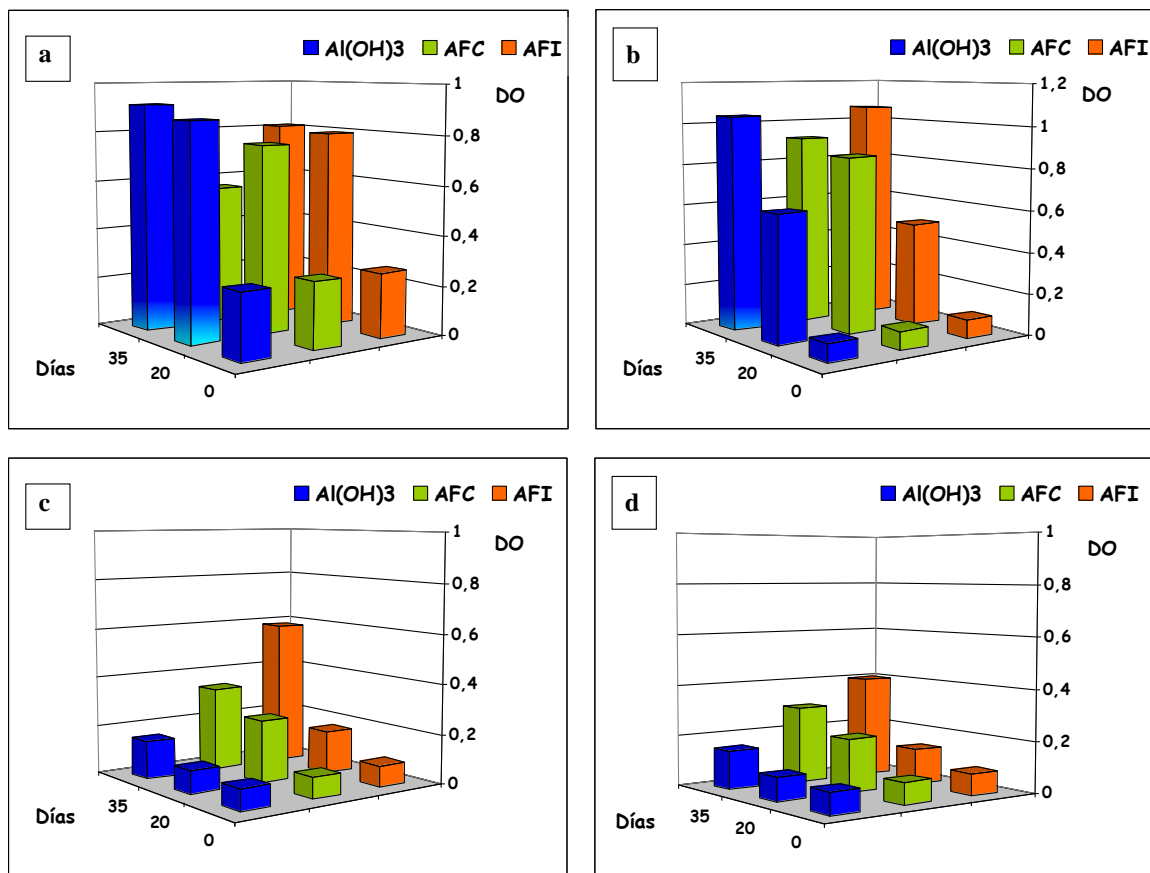


Figura 13. Gráficos comparativos de los distintos isotipos específicos al emplear diferentes adyuvantes. Están representados los valores de DO promedio obtenidos para distintos isotipos en los lotes de animales sensibilizados utilizando Al(OH)₃, AFC, o AFI. En a) IgE específica, en b) IgG1 específica, en c) IgG2a específica y en d) IgG2b.

Como se mencionó anteriormente, podemos concluir que con los tres adyuvantes se observa una activación inmunológica específica para PLV la cual se refleja en el aumento en los niveles séricos de distintos anticuerpos. Este incremento es compatible con un perfil de activación Th2 (aumento de IgE e IgG1 específicas, pero no de IgG2a específica) cuando el adyuvante utilizado es el Al(OH)₃, efecto que se evidencia mas notoriamente a partir del día 20 luego de iniciado el esquema de inmunización, y alcanza un máximo de respuesta al día 35.

• **Ensayos de proliferación celular**

Una vez concluido el desafío oral, se sacrificaron los ratones de cada lote, se extrajeron los bazo, y se obtuvo una suspensión celular de esplenocitos a partir de cada

uno de los animales. Con el fin de evaluar el índice de proliferación linfocitario antígeno-específico se cultivaron los esplenocitos en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. En la **figura 14** se muestran los resultados obtenidos en función de la incorporación de timidina tritiada para uno de los ensayos de proliferación celular, luego del esquema de inmunización empleando $\text{Al}(\text{OH})_3$ como adyuvante. De manera similar, también se observó proliferación antígeno específica en los animales pertenecientes a los lotes sensibilizados utilizando AFC y AFI, pero no en los animales de los lotes control (resultados no mostrados).

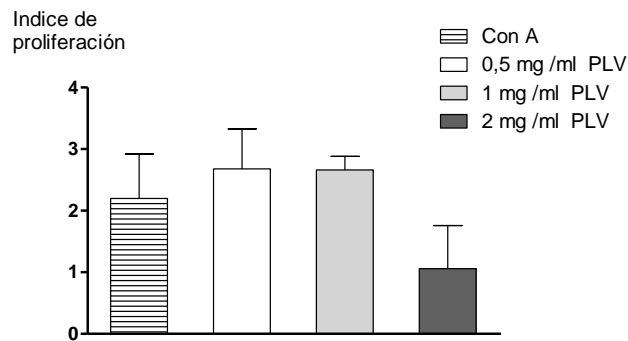


Figura 14. Índice de proliferación por incorporación de timidina tritiada en el ensayo de proliferación celular. Cada columna corresponde a distintas condiciones de estimulación en los cultivos celulares. El índice de proliferación fue calculado respecto a los valores obtenidos en las fosas controles con medio de cultivo únicamente. Estos resultados corresponden a un experimento representativo correspondiente al lote de animales sensibilizados utilizando $\text{Al}(\text{OH})_3$ como adyuvante.

Se evaluó el efecto del agregado de distintas cantidades de PLV ($500 \mu\text{g}/\text{ml}$, $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$ y $2000 \mu\text{g}/\text{ml}$) a los cultivos, en la proliferación antígeno-específica de los esplenocitos observándose un efecto dosis respuesta inverso. Por lo tanto se logró evidenciar la presencia de LT específicos de PLV en el bazo de los animales sensibilizados.

La disminución del índice de proliferación a medida que aumenta la cantidad de proteínas en el cultivo, puede deberse a que con mayor cantidad de antígeno la velocidad de crecimiento del cultivo aumenta tempranamente, encontrándose al momento de la incorporación de timidina una mayor proporción de células muertas por apoptosis post-activación.

Por lo tanto, concluimos que los esquemas de inmunización utilizados generan en esta cepa de ratones LB y LT específicos para PLV que se pueden evidenciar en forma sistémica.

1.2. b- Pruebas *in vivo*

• **Análisis de los signos clínicos locales y sistémicos inducidos luego del desafío oral**

Luego del desafío oral se observó en la mayoría de los ratones pertenecientes a los grupos de animales sensibilizados una disminución en la actividad física, inclusive en respuesta ante un estímulo externo, y un aumento en el rascado y frotado de la nariz. En algunos experimentos se observó la muerte de animales luego del desafío oral en los lotes de ratones sensibilizados (20-60% de los animales), probablemente por anafilaxia específica, aunque no podemos descartar el efecto de la toxicidad de los adyuvantes, especialmente en el caso de los animales inoculados con AFC. En los ratones pertenecientes a los grupos controles, sólo se observó una reducción en la actividad de algunos animales, mientras que en el resto de los animales no se observó ningún comportamiento atípico. Estos resultados son mostrados en la **figura 15**.

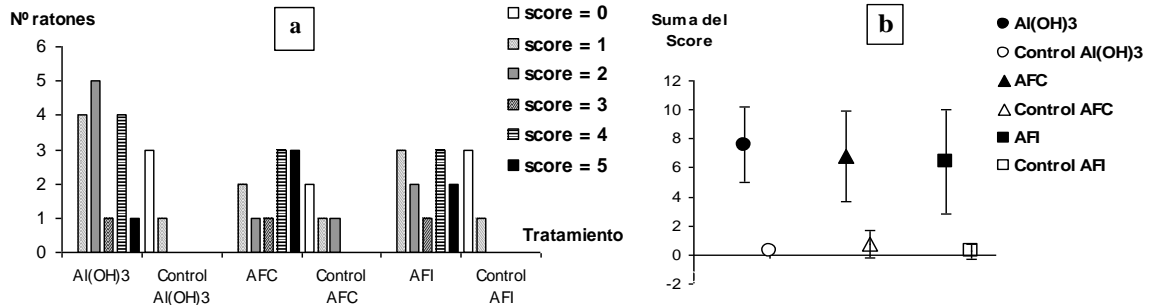


Figura 15. Signos clínicos locales y sistémicos inducidos luego del desafío oral. En **a)** se grafica el número de animales que presenta cada uno de los signos (según lo descrito en materiales y métodos) en cada grupo, y en **b)** se muestra el promedio y la DS de la suma de los scores obtenidos para cada ratón dentro de los grupos. Estos resultados corresponden a un experimento representativo, de tres realizados.

Dado que la aparición de los signos clínicos se cuantificó a los minutos del desafío oral deducimos que los mismos se deben a la inducción de mecanismos IgE-mediados inducidos por PLV.

• **Prueba Cutánea y Transferencia Cutánea Pasiva**

Para la confirmación *in vivo* de la inducción de una respuesta Th2-dependiente con la producción de anticuerpos séricos de isotipo IgE se realizó la prueba cutánea y la transferencia cutánea pasiva. Cuando se realizó la PC con PLV en animales sensibilizados se obtuvieron resultados positivos en la zona de inoculación del antígeno, observándose una mancha de color azul con un diámetro mayor a los 3 mm. La reacción producida en los ratones pertenecientes al lote de animales inoculados con leche y Al(OH)₃, resultó ser de mayor intensidad en comparación con los otros adyuvantes empleados (la extravasación del colorante excedió los sitios donde se inoculó el antígeno) (**figura 16 a y b**). Por el contrario, cuando se aplicó la PC a los animales pertenecientes a los grupos control, se obtuvieron resultados negativos (**figura 16 c**).

Para realizar la TCP, se preparó previamente un pool con sueros de ratones pertenecientes al lote de animales inoculados con Al(OH)₃ y PLV. Se seleccionaron sueros que en el ensayo de IgE específica para PLV por EAST dieron valores de DO mayor a 0.9 (**figura 16 e y f**). Asimismo, se preparó un pool de sueros negativos para IgE total y específica, a partir de sueros de animales pertenecientes a los lotes control.

Como controles negativos, además de emplear el pool de sueros negativo (**figura 16 g**), se inoculó Azul de Evans sin PLV, Azul de Evans junto a un antígeno no relacionado (*Dermatofagoides pteronissimus* u OVA, **figura 16 h**), o se inoculó Azul de Evans junto a PLV sin la previa inoculación del pool de sueros conteniendo IgE específica. Todos estos controles dieron resultados negativos como era de esperarse.

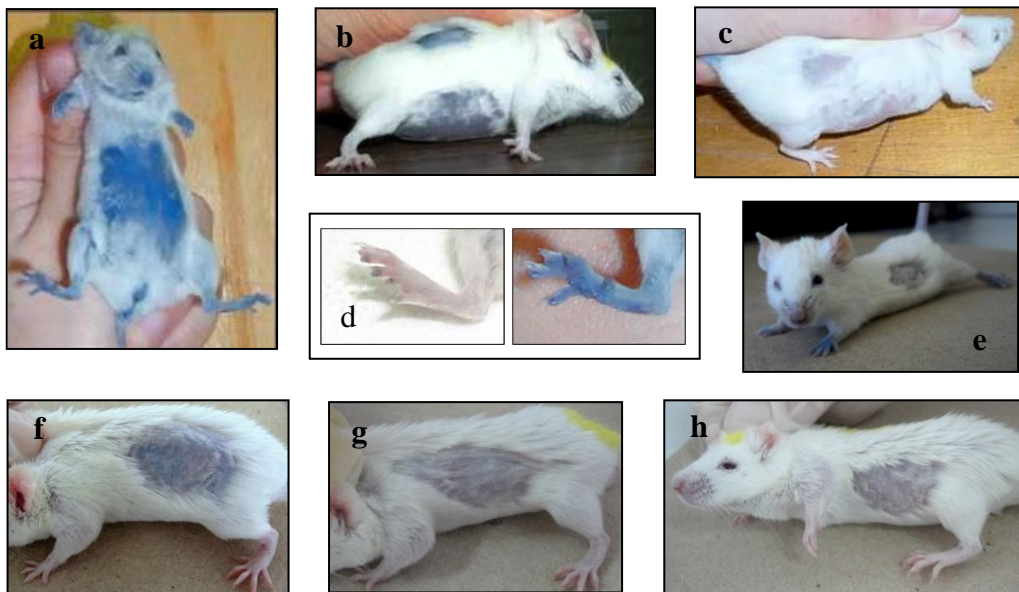


Figura 16. Resultados de la Prueba Cutánea y la Transferencia Cutánea Pasiva en ratones sensibilizados utilizando distintos adyuvantes. En **a)** resultados de la PC en animales sensibilizados utilizando $\text{Al}(\text{OH})_3$, en **b)** AFC, y **c)** ratón del grupo control de adyuvante. En **d)** se observa en detalle las patas de los animales mostrados en **a)** y **c)**. En **e)** y en **f)** se observan los resultados positivos de la TCP en animales inoculados previamente con el pool de sueros con IgE específica elevada, en **g)** de animales inoculados con un pool de sueros de los animales control de adyuvante, y en **h)** uno de los animales inoculado con el pool de suero con IgE específica elevada y luego con Azul de Evans junto a *Dermatofagoides pteronissimus*.

Podemos concluir hasta aquí, que, observamos un aumento en los niveles de anticuerpos específicos de isotipos compatible con una activación Th2, siendo el mismo más evidente cuando se utiliza $\text{Al}(\text{OH})_3$ como adyuvante, como ya mencionamos anteriormente. Los animales de este grupo mostraron una respuesta con menor variabilidad que la observada en los lotes de animales sensibilizados utilizando AFC o AFI.

Además pudimos observar una correlación satisfactoria entre las pruebas *in vitro* humorales y celulares y las pruebas *in vivo*.

Los signos clínicos observados después de realizar el desafío oral son similares cuando se utiliza cualquiera de los tres adyuvantes, indicando que la ingesta de PLV produce en estos animales una reacción adversa compatible con una alergia alimentaria.

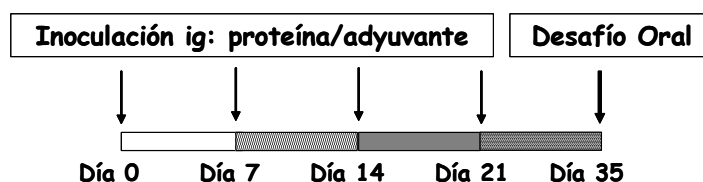
Teniendo en cuenta estas consideraciones y el hecho de que el $\text{Al}(\text{OH})_3$ es el más inocuo de estos adyuvantes, concluimos que en BALB/c el empleo de $\text{Al}(\text{OH})_3$ por vía ip junto a PLV es la manera más eficaz de inducir una sensibilización sistémica Th2-dependiente con la producción de anticuerpos IgE específicos.

1.3.- PLAN DE INMUNIZACIÓN UTILIZANDO TOXINA COLÉRICA

Con el fin de inducir una activación inmune directamente en el tracto gastrointestinal, a diferencia de las anteriores inmunizaciones sistémicas, decidimos emplear un adyuvante mucosal. Para ello, utilizamos Toxina Colérica (TC), la cual, como es sabido, es capaz de inducir una respuesta marcadamente Th2.

Ratones BALB/c hembras, de 4 semanas y media de edad, fueron agrupados en lotes diferentes de la siguiente manera: grupo de sensibilización, grupos control de adyuvante (animales inoculados solamente con TC) y de proteína (animales inoculados sólo con PLV).

El plan de inmunización consistió en la administración por vía intragástrica 4 µg de TC junto con 20 mg de PLV (directamente en el estómago). Se realizaron 3 inoculaciones, separadas por 10 días entre sí. A los 15 días de haber terminado la sensibilización se realizó el desafío oral únicamente con PLV. Posteriormente, y con el fin de obtener una respuesta inmune de mayor intensidad se realizaron nuevos planes de sensibilización aumentando la dosis de TC administrada (10 µg por inoculación), el número de inoculaciones (4 en total) y acortando el tiempo entre las inoculaciones (a 7 días). En definitiva se optimizó la sensibilización al siguiente esquema:



Esquema 3

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

10 µg de TC + 20 mg de PLV, para el grupo denominado **Sensibilización**

10 µg de TC, para el grupo denominado **Control de adyuvante**

20 mg de PLV, para el grupo denominado **Control de antígeno**

Desafío oral: administración de 2 dosis de 20 mg de PLV cada una, dejando entre estas inoculaciones que transcurran 30 minutos.

Caracterización de la respuesta inmune

1.3. a- Pruebas *in vitro*

• **Detección de anticuerpos séricos**

Se determinaron los niveles de los distintos isotipos de anticuerpos específicos de PLV. En la **figura 17** se muestran los promedios obtenidos para la IgE, la IgG1 y la IgG2a específicas para PLV. Se observa una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo sensibilización y los dos controles para los parámetros IgE e IgG1 específicos, pero no así para IgG2a. Además las diferencias entre los grupos control tampoco son significativas para ninguno de estos isotipos (**figura 17**).

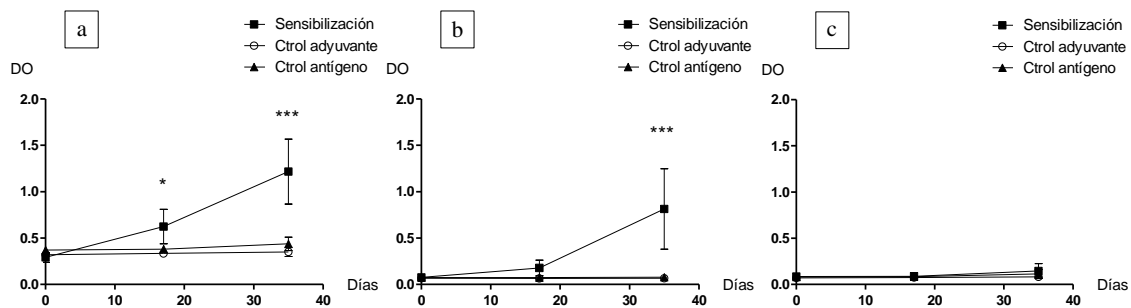


Fig. 17. Isotipos específicos séricos medidos por EAST y ELISA indirecto. Valores promedios de DO \pm la DS obtenidos de los sueros de los ratones pertenecientes al grupo sensibilizado con TC y leche bovina, y para los lotes control de adyuvante y antígeno. En **a)** IgE, en **b)** IgG1, y en **c)** IgG2a. (***) $p < 0,001$; * $p < 0,05$). Estos resultados corresponden a un experimento representativo.

Este aumento en los niveles séricos de IgE e IgG1 específicas para PLV en el grupo de animales sensibilizados, sin elevación de la IgG2a específica, es compatible con la inducción de una respuesta inmune Th2 específica.

• **Medida de los niveles séricos de histamina**

Treinta minutos después de haber concluido la administración por vía ig del antígeno correspondiente al desafío oral, se extrajo sangre de los ratones, a fin de obtener plasma para cuantificar los niveles de histamina en los mismos, utilizando un ELISA competitivo comercial.

Como puede observarse en la **figura 18**, se obtuvieron diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) en los niveles de histamina plasmática entre el grupo sensibilización y los grupos controles.

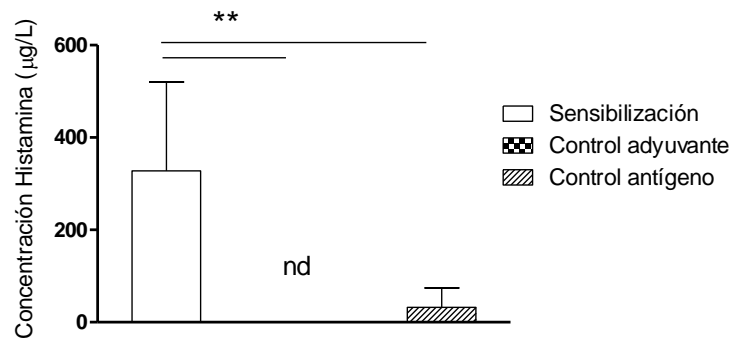


Figura 18: Concentración de histamina plasmática medida por ELISA de captura. Valores correspondientes a los ratones pertenecientes a los lotes sensibilizados y controles. Histograma del promedio \pm DS. (** $p < 0,01$).

El aumento en el nivel de histamina en los ratones sensibilizados con TC y PLV, indican que se produjo una activación específica de mastocitos y basófilos (probablemente a nivel intestinal y sistémico, respectivamente) durante el desafío oral con leche bovina que se puede evidenciar en forma sistémica.

• **Cuantificación de las citoquinas presentes en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos**

Animales de distintos lotes fueron sacrificados luego del desafío oral, se aislaron los bazos, y a partir de las suspensiones de esplenocitos se realizaron cultivos en presencia de PLV, o β -Lg. Se incluyeron un control negativo (medio de cultivo RPMI 1640 únicamente) y un control positivo (ConA). Previamente se tituló la concentración de ConA a incluir en el cultivo de manera de inducir proliferación en 48 hs.

A partir de los sobrenadantes de estos cultivos se midieron los niveles de IL-5, IL-13, e IFN- γ (**figura 19**). Como puede verse, los niveles de IL-5 y de IL-13 fueron significativamente superiores en el grupo de animales sensibilizados respecto al lote de ratones control de adyuvante, ya sea cuando utilizamos PLV o β -Lg como estímulos. En cambio, no se observan diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IFN- γ presentes en los cultivos de esplenocitos de ratones sensibilizados en comparación con ratones del lote control de adyuvante.

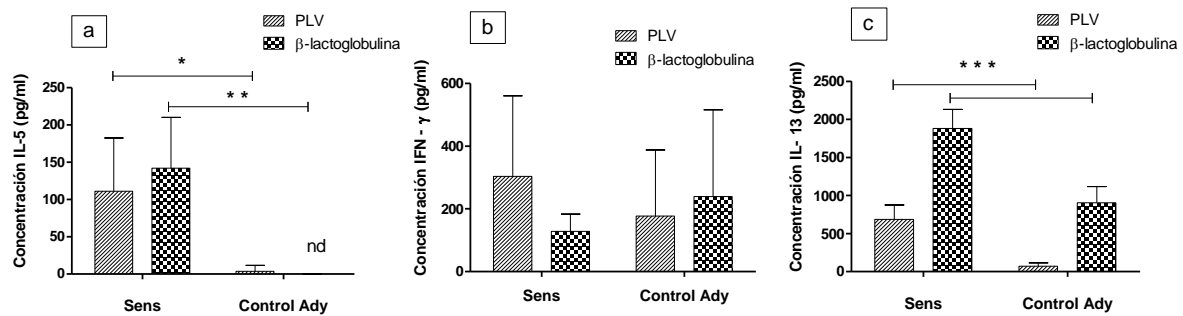


Figura 19. Concentración de citoquinas medidas por ELISA de captura. Concentración de IL-5 (a), IFN- γ (b), o IL-13 (c) en los sobrenadantes de cultivos de esplenocitos en presencia de PLV o β -Lg. Histogramas de los valores medios \pm SD. Estos resultados corresponden a un experimento representativo.

De esta manera la diferencia en los niveles de IL-5 e IL-13, en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos, indican la presencia de linfocitos T específicos de PLV diferenciados a un fenotipo Th2. Estos resultados demuestran junto a los mostrados anteriormente del incremento en la secreción de anticuerpos específicos IgE e IgG1 en el lote de animales sensibilizados con TC, que el esquema de sensibilización aplicado genera una activación inmunológica Th2-dependiente.

1.3. b- Pruebas *in vivo*

• Análisis de los signos clínicos locales y sistémicos inducidos luego del desafío oral

Una vez concluido el desafío oral se registró la aparición de signos clínicos compatibles con un proceso inflamatorio local o sistémico en los distintos animales pertenecientes a cada lote. Nuevamente distintos operarios realizaron la observación en jaulas no identificadas con el lote al cual pertenecen los animales. No se observaron modificaciones significativas en el comportamiento o en el aspecto de los animales de los grupos control. En el grupo de animales sensibilizados se observó un aumento en el rascado de la nariz y cabeza en la mayoría de los animales, enrojecimiento e hinchazón alrededor de la nariz, la boca y los ojos, y baja actividad con dificultad para respirar en algunos animales. También se observó en animales pertenecientes a este grupo, una disminución en la actividad post estímulo. En la **figura 20** se muestra el score de signos clínicos para los animales de cada lote en un experimento representativo.

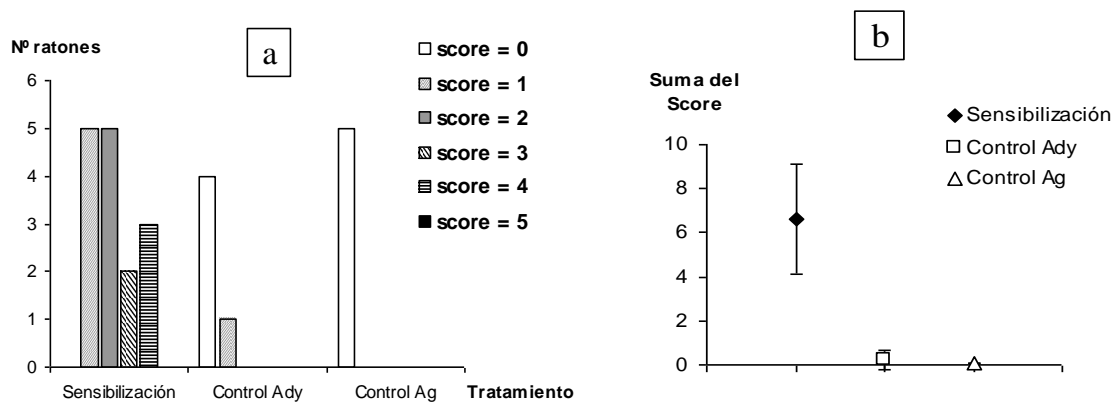


Figura 20. Signos clínicos locales y sistémicos inducidos luego del desafío oral. En a) se grafica el número de animales que presenta cada uno de los signos en cada grupo, y en b) se muestra el promedio \pm DS de la suma de los scores obtenidos para cada ratón dentro de los grupos. En c) se muestra en detalle un ratón perteneciente al grupo de animales sensibilizados con TC junto a PLV (a la derecha) en el cual se observó enrojecimiento e hinchazón alrededor de la boca y la nariz tras el desafío oral, respecto de un ratón del grupo control (izquierda). Corresponden a resultados de un experimento representativo.

Claramente puede observarse la mayor aparición de signos clínicos en el grupo de animales sensibilizados por vía ig con TC junto a PLV. La severidad de los síntomas observados en estos animales se correlaciona con el aumento en los niveles plasmáticos de histamina detectado, que se producen tras el desafío oral con proteínas de leche de vaca, debido a que la misma junto a otros mediadores es responsable de la anafilaxia que se observa en las reacciones alérgicas.

• **Prueba Cutánea y Transferencia Cutánea Pasiva:**

Se realizó la PC con PLV en animales pertenecientes a los distintos lotes, observándose una extravasación inmediata del colorante en la piel en todos los animales del grupo sensibilizado. En algunos animales se observó una extravasación extendida más allá del sitio de inoculación del Ag (**figura 21 a, b y e**). En los animales de los distintos lotes control se observaron resultados negativos para todos los animales (**figura 21 c y d**).

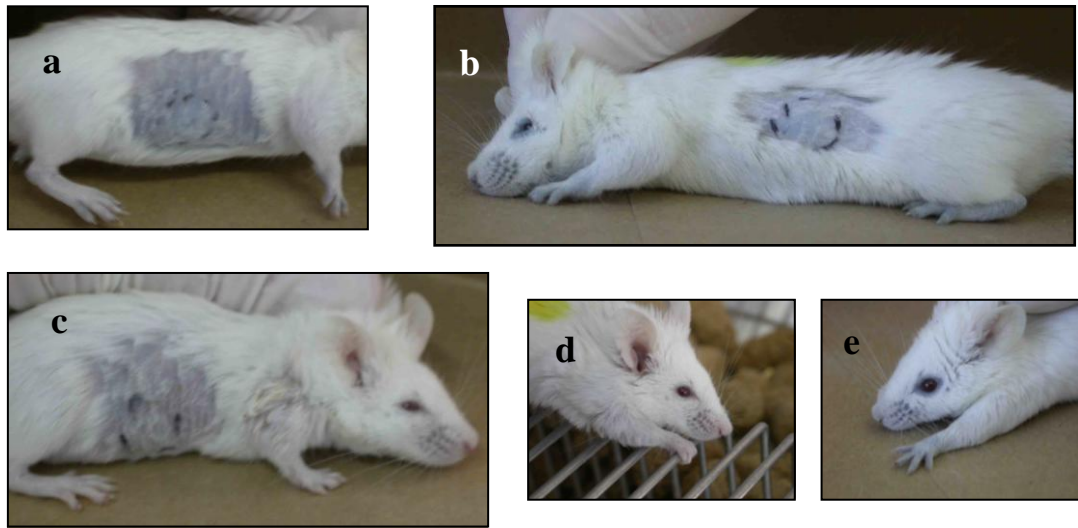


Figura 21. Resultado de la prueba cutánea en animales pertenecientes a distintos lotes. En a), b) y e) se muestran resultados positivos, con extravasación de Azul de Evans a toda la piel y mucosas en b) y e). En c) y d) se muestran dos PC negativas. Estos resultados corresponden a un experimento representativo

En la TCP, se inocularon ratones BALB/c no sensibilizados con suero de animales perteneciente al lote sensibilización (con y sin pre-calentamiento previo a 56°C), o de los lotes control de antígeno/adyuvante. Se observó la aparición de la coloración azul en la piel a los 15-30 minutos y los resultados obtenidos se resumen en la **tabla 4**.

Tabla 4: Resultados de la Transferencia Cutánea Pasiva

Suero donador	Extravasación del Azul de Evans	
	Sin tratamiento térmico	Tratamiento térmico a 56°C
Grupo sensibilizado	+	-
Grupo control adyuvante	-	-
Grupo control Ag	-	-

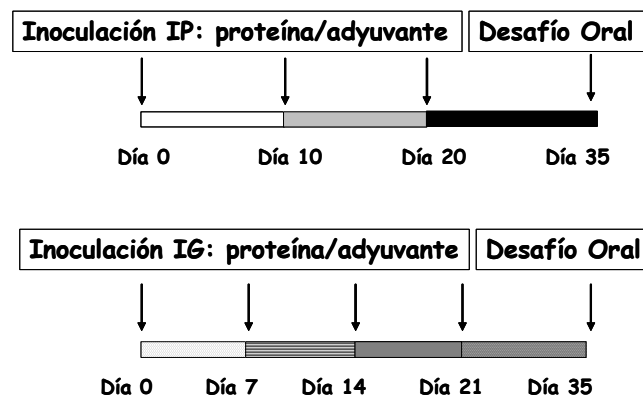
Como puede observarse en la **tabla**, el suero proveniente de animales sensibilizados es el único que produjo reacción positiva, la cual se negativiza cuando el suero es calentado a 56°C, lo cual sugiere que la extravasación del colorante es un proceso mediado por IgE. En el grupo de animales inoculados con suero proveniente de los lotes control de adyuvante y control de Ag se observaron resultados negativos.

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

Bajo estas condiciones experimentales concluimos que la administración intra-gástrica de toxina colérica como adyuvante mucosal junto a PLV induce una activación inmunológica específica para PLV en intestino. Al caracterizar esta respuesta observamos que tanto los ensayos *in vitro*, como las pruebas *in vivo* indican que se trata de una respuesta compatible con un perfil de activación T Th2 específico para PLV.

1.4.- PLAN DE INMUNIZACIÓN UTILIZANDO TOXINA COLÉRICA VS $Al(OH)_3$; COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA OBTENIDA

Debido a que se observó una activación Th2 específica contra PLV, cuando se utilizó como adyuvante por vía ip $Al(OH)_3$, así como cuando se administró TC por vía ig, decidimos comparar la respuesta inmune inducida entre estos dos protocolos. Con este fin diseñamos el siguiente plan de trabajo: ratones BALB/c hembras, de 4 semanas y media de edad, se agruparon en 4 lotes: animales sensibilizados por vía intragástrica (denominado **Sens IG**) utilizando TC, o por vía intraperitoneal utilizando $Al(OH)_3$ (denominado **Sens IP**), y animales a los que sólo se les administró cada adyuvante (**Control IP** y **Control IG**).



Esquema 4

Inoculación por vía intraperitoneal: los días 0, 10 y 20 se inocularon por ratón:

15 μ g de PLV + 0.5 mg de $Al(OH)_3$, para el grupo **Sensibilización IP**

0.5 mg de $Al(OH)_3$, para el grupo **Control IP**

Inoculación por vía intragástrica: los días 0, 7, 14 y 21 se inocularon por ratón:

10 μ g de TC + 20 mg de PLV, para el grupo **Sensibilización IG**

10 μ g de TC, para el grupo denominado **Control IG**

Desafío oral: administración de 2 dosis de 20 mg de PLV cada una, dejando pasar 30 minutos entre ambas.

Caracterización de la respuesta inmune

1.4. a- Pruebas *in vitro*

• **Detección de anticuerpos séricos**

En la **figura 22** se muestran los valores de IgE específica para PLV individuales de todos los animales involucrados en un experimento representativo de varios realizados, y en la **figura 23** se observan los valores promedio de los mismos. Se observa para los dos protocolos de sensibilización aumentos específicos en los niveles de este anticuerpo, no pudiéndose apreciar una diferencia significativa entre estos dos grupos (**figura 23 c**).

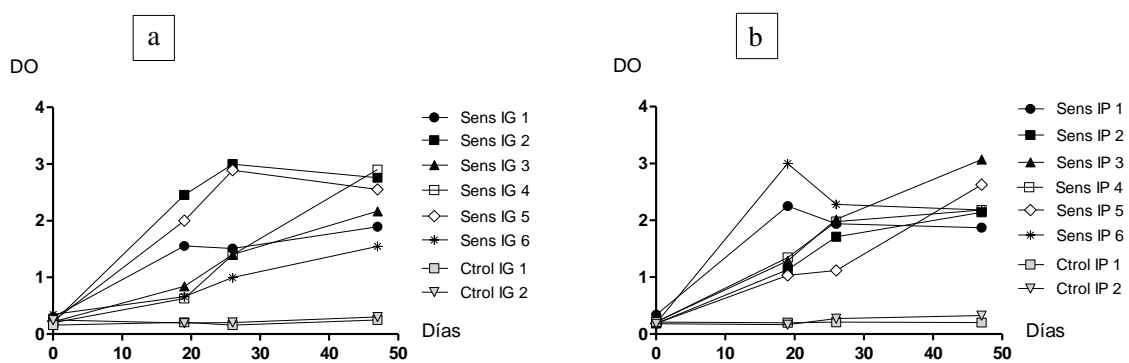


Figura 22. IgE específica para PLV medida por EAST para los lotes de ratones inoculados por distintas vías. Resultados individuales obtenidos para los ratones sensibilizados; en a) por vía intragástrica (IG), y en b) por vía intraperitoneal (IP). Se muestran los resultados correspondientes a un experimento representativo.

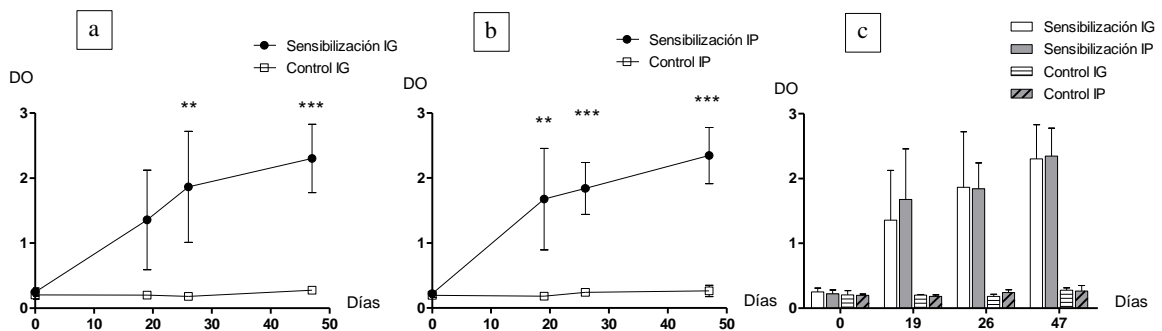


Figura 23. Promedios de los valores de DO \pm DS, obtenidos en la determinación de IgE específica para PLV. En a) animales inoculados por vía intragástrica (IG), en b) por vía intraperitoneal (IP), y en c) gráfico de barras comparativo de los resultados mostrados en a y b. (*) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$**

En las **figuras 24 y 25** se pueden ver los valores de DO obtenidos a lo largo del experimento para los anticuerpos específicos contra PLV de los isotipos IgG1 e IgG2a.

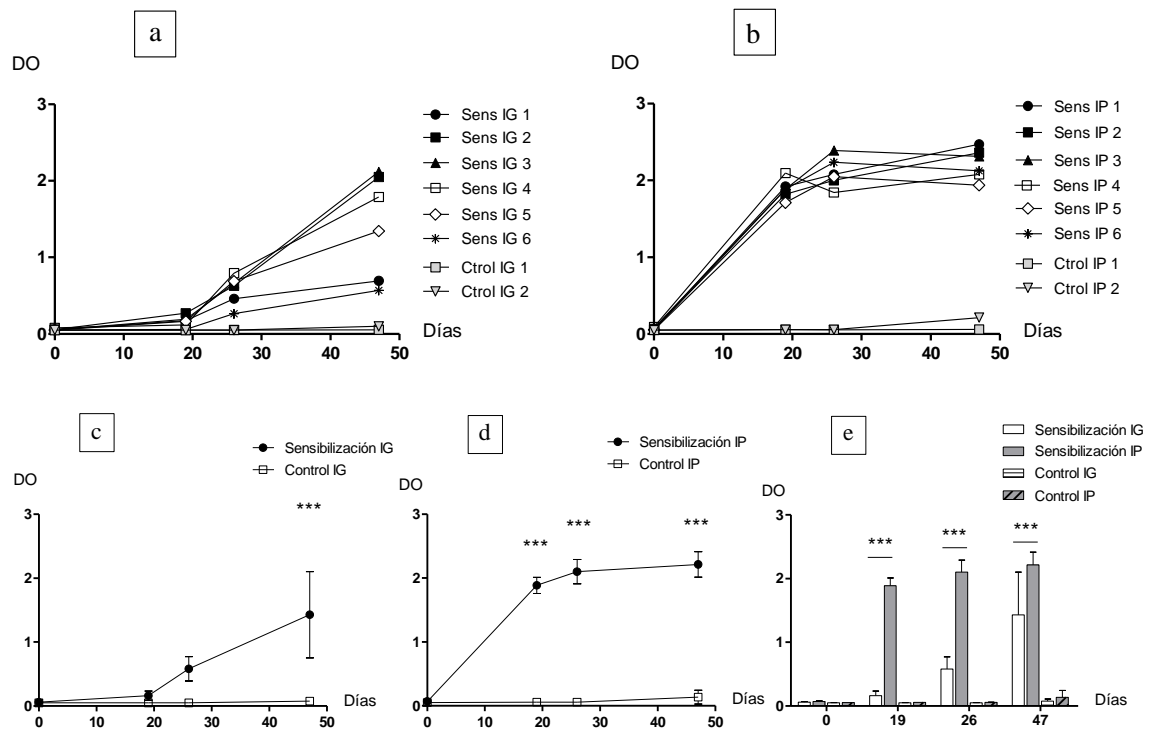


Figura 24. Determinación de IgG1 específica para PLV medida por ELISA. En a) y b) se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los animales del grupo sensibilizados usando TC (vía ig) y $Al(OH)_3$ (vía ip) respectivamente (junto con sus controles). En c) y d) se muestran los resultados promedio \pm DS, de estos grupos y en e) gráfico de barras comparativo de los resultados mostrados en c) y d). (***) $p < 0,001$. Se muestran los resultados correspondientes a un experimento representativo

Como se desprende de los mismos, el aumento en los valores de IgG1 específica es más notorio (se observan valores más elevados tempranamente, los cuales además muestran menor variabilidad) en el grupo sensibilizado utilizando como adyuvante $Al(OH)_3$, si bien el aumento en los niveles de este anticuerpo es significativo en los dos grupos de animales sensibilizados respecto de sus controles ($p < 0,001$ el día 47, tanto para el grupo **Sens IG** respecto a su control, como para el grupo **Sens IP** respecto a su control, **figura 24 c y d**).

Con respecto a la IgG2a específica, se observa un aumento estadísticamente significativo en los niveles de la misma, para el grupo **Sens IP** (**figura 25 d**). En cambio en el grupo **Sens IG**, no se observan diferencias significativas respecto a su control para ningún día (**figura 25 c**). El día 47 la DO media para el grupo **Sens IP** es 9,4 veces mayor a la DO media del grupo **Sens IG** ($p < 0,001$; **figura 25 e**).

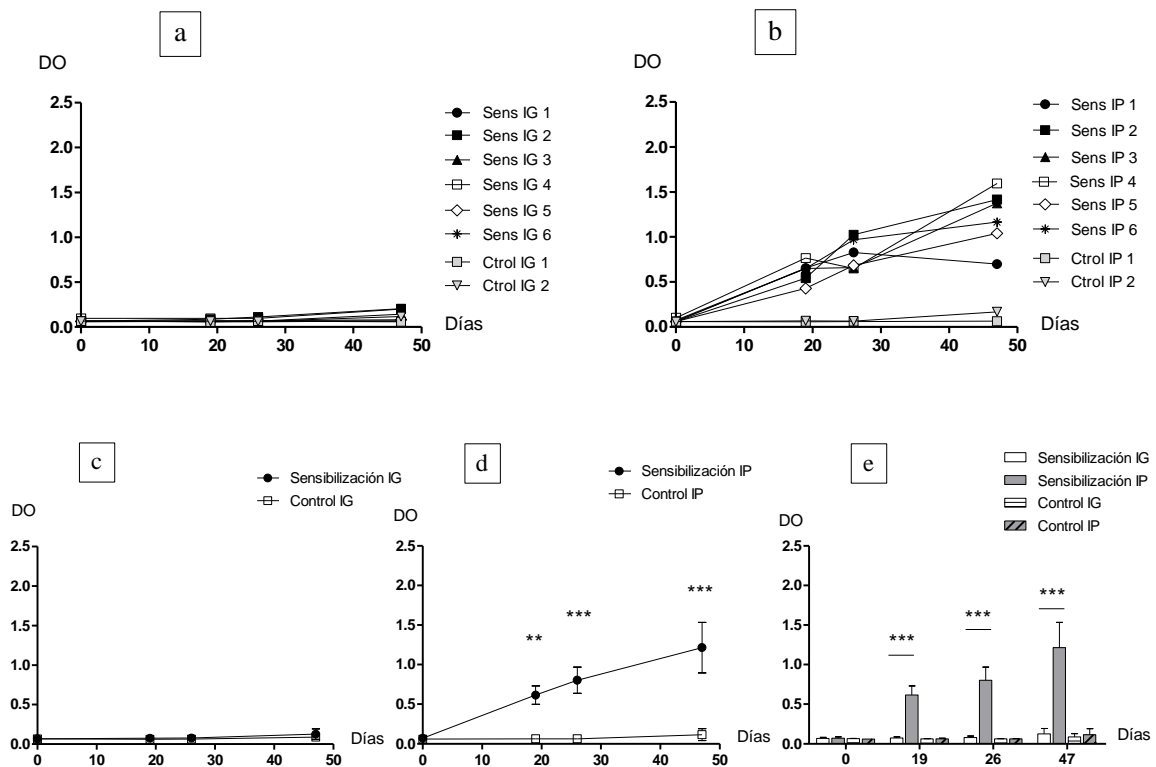


Figura 25. Determinación de IgG2a específica para PLV medida por ELISA. En a) y b) se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los animales del grupo sensibilizados usando TC y $Al(OH)_3$ respectivamente (junto con sus controles). En c) y d) se muestran los resultados promedio \pm DS de estos grupos, y en e) gráfico de barras comparativo de los resultados mostrados en c) y d). Se muestran los resultados correspondientes a un experimento representativo

Por lo tanto el $Al(OH)_3$ parecería inducir un aumento en los niveles de los anticuerpos específicos para PLV de todos los isotipos analizados, mientras que el uso de la TC ocasionaría un aumento más selectivo en los mismos, ya que se observa que predominan los anticuerpos compatibles con un perfil de activación Th2. De esta manera la administración de TC por vía mucosal genera una respuesta humoral claramente Th2.

Previamente en esta tesis se mostró, que de las respuestas observadas cuando se utilizaron planes de inmunización con adyuvantes por vía ip, la inducida por el $Al(OH)_3$ era la que mejor se aproximaba a un perfil de activación Th2. Pero al comparar su desempeño como activador de una respuesta inmune Th2 específica con la TC (según lo visto recientemente), se observó que la respuesta humoral inducida por este adyuvante mucosal genera un perfil humoral que refleja mejor la activación Th2.

1.4. b- Pruebas *in vivo*

• Análisis de los signos clínicos locales y sistémicos inducidos luego del desafío oral

Posteriormente al desafío oral, se comparó el comportamiento de los animales pertenecientes a los dos planes de inmunización, siendo este muy similar en los lotes sensibilizados. Se observó un aumento en el rascado y frotado de la nariz (con enrojecimiento alrededor de la nariz y la boca), una marcada disminución de la actividad y animales con el pelo erizado en ambos lotes de animales sensibilizados. En el grupo **Sensibilización IG**, la mayoría de los animales presentaron dificultad para respirar, y algunos de estos mostraron además inactividad posterior a un estímulo externo, denotando malestar general el cual se prolongó durante las siguientes 2 horas. En el lote **Sensibilización IP** también se observaron ratones con dificultades para respirar e inactividad post estímulo, pero estos animales se recuperaron más rápidamente.

En la **figura 26** se muestra el resultado del score de signos clínicos para los animales pertenecientes a cada lote.

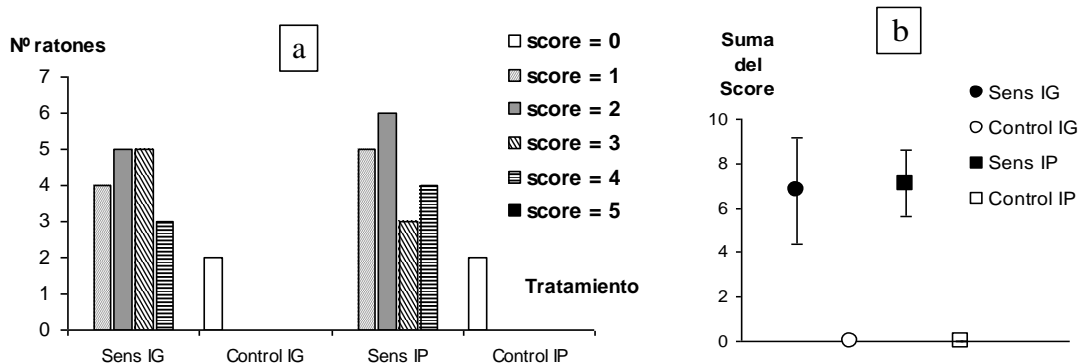


Figura 26. Signos clínicos locales y sistémicos inducidos luego del desafío oral. En **a)** se grafica el número de animales que presenta cada uno de los signos en cada grupo, y en **b)** se muestra el promedio y la DS de la suma de los scores obtenidos para cada ratón dentro de los grupos. Se graficaron los resultados de un experimento representativo.

Claramente puede apreciarse un mayor score clínico en los animales pertenecientes a los lotes sensibilizados, lo que se correlaciona con la aparición de signos inflamatorios

asociados a la presencia de anticuerpos específicos del isotipo IgE. No se observan diferencias al comparar entre sí los lotes **Sens IG** y **Sens IP**.

• **Prueba Cutánea:**

Todos los animales sensibilizados presentaron una PC positiva cuando fueron inoculados por vía sc con PLV (**figura 27 b y c**). Además, en alguno de estos animales se observó extravasación del colorante a toda la piel y mucosas (**figura 27 b**), lo cual sugiere la inducción de un proceso sistémico. En los lotes controles todos los animales mostraron resultados negativos para esta prueba (**figura 27 a**).

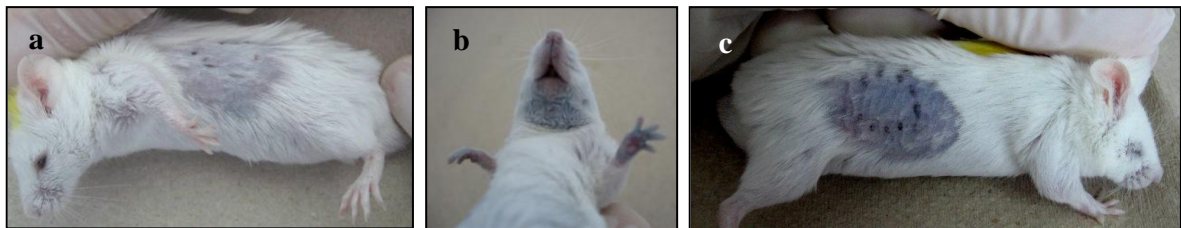


Figura 27. Resultado de la prueba cutánea en animales pertenecientes a distintos lotes. En **a**) se observa una prueba negativa para un animal del grupo control de adyuvante, y en **b**) se muestra un resultado positivo, con extravasación de Azul de Evans a toda la piel y mucosas de un ratón perteneciente al grupo Sensibilización IG y en **c**) un resultado positivo obtenido en un ratón del lote Sensibilización IP. Estos resultados corresponden a un experimento representativo

Por lo tanto podemos concluir que la sensibilización con TC como adyuvante genera una activación inmunológica muy similar a la inducida cuando se utiliza $Al(OH)_3$.

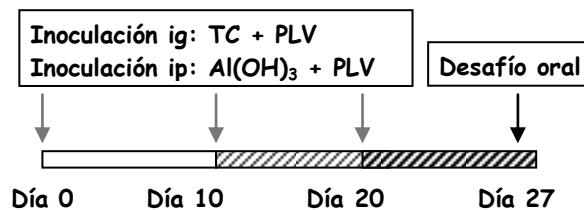
Si bien la respuesta observada presenta mayor dispersión cuando se utiliza TC, el uso de este adyuvante mucosal presenta la ventaja de activar directamente el sistema inmune de mucosas. Además este adyuvante induce una respuesta claramente Th2-dependiente. Esto convertiría al modelo en una mejor aproximación a la alergia alimentaria observada en humanos.

1.5.- PLAN DE INMUNIZACIÓN UTILIZANDO TOXINA COLÉRICA E Al(OH)_3 DE MANERA SIMULTANEA

Con la finalidad de inducir una respuesta inmune de mayor intensidad decidimos inocular a los ratones de manera simultánea utilizando dos vías distintas: la ip empleando Al(OH)_3 y la ig con toxina colérica.

Ratones BALB/c hembras de 5 semanas de edad fueron divididos en 3 grupos. En uno de estos (**Grupo Sensibilización IP + IG**) los animales fueron inoculados de manera simultánea por vía ip (Al(OH)_3 y PLV) e ig (TC junto a PLV), en otro a los ratones sólo se les administró Al(OH)_3 y PLV por vía ip. (**Grupo Sensibilización IP: Al(OH)_3 y PLV**), y al tercer grupo a los que se les administró sólo TC por vía oral (**Grupo Control adyuvante**).

A continuación se detalla un esquema del plan de inoculación utilizado:



Esquema 5

Para los tres grupos las inoculaciones se realizaron los días 0, 10 y 20.

Grupo Sensibilización IP + IG: Se inocularon por ratón:

15 μg de PLV + 0.5 mg de Al(OH)_3 , por vía intraperitoneal

10 μg de TC + 20 mg de PLV, por vía intragástrica

Grupo Sensibilización IP: Se inocularon por ratón:

15 μg de PLV + 0.5 mg de Al(OH)_3 , por vía intraperitoneal

Grupo Control adyuvante: Se inocularon por ratón:

10 μg de TC, por vía intragástrica

Desafío oral: administración de 20 mg de PLV por animal.

Los animales se agruparon en lotes de 5 animales cada uno.

Caracterización de la respuesta inmune

1.5.a- Pruebas *in vitro*

• **Detección de anticuerpos séricos**

En la **figura 28** pueden observarse los resultados obtenidos para la detección de los distintos anticuerpos séricos totales y específicos para PLV, a lo largo del plan de inmunización.

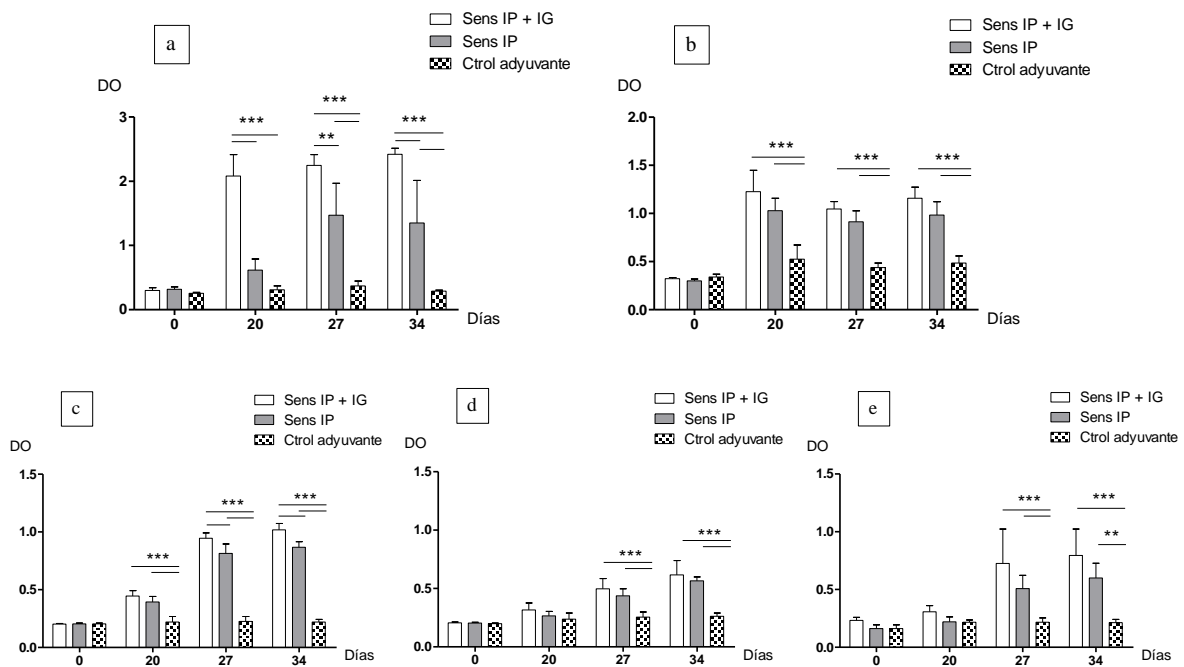


Figura 28. Isotipos específicos séricos medidos por EAST y ELISA indirecto a lo largo del plan de inmunización. En a) IgE total, en b) IgE esp., c) IgG1 esp., d) IgG2a esp., y e) IgG2b esp. para PLV. (** $p < 0,01$; y *** $p < 0,001$). Se graficaron los resultados de un experimento representativo.

Como puede observarse se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar cada grupo sensibilizado con el control, para todos los isotipos analizados.

Cuando se compararon los animales sensibilizados simultáneamente por vía ig e ip con respecto a los animales inoculados por vía ip, sólo se observaron diferencias con relevancia estadística para la detección de IgE total (**figura 28 a**, días 20, 27 y 34) y de IgG1 específica para PLV (**figura 28 c**, días 27 y 34). Sin embargo la diferencia entre los valores promedio para las DO obtenidas en este último caso (IgG1 específica), probablemente carece de relevancia biológica. Las diferencias entre los valores medios obtenidos para la IgE total son mayores. No se observaron diferencias estadísticamente

significativas entre los dos lotes de animales sensibilizados para la IgE, IgG2a e IgG2b específicas para PLV.

1.5. b- Pruebas *in vivo*

• Análisis de los signos clínicos locales y sistémicos inducidos luego del desafío oral

Una vez concluido el desafío oral, se registraron y cuantificaron los signos clínicos (figura 29). El comportamiento de los animales sensibilizados fue muy similar en ambos grupos. Los signos que con mas frecuencia se observaron en los animales sensibilizados fueron: aumento en el rascado de la nariz y cabeza, enrojecimiento alrededor de la nariz y pelo erizado. Además algunos animales en cada uno de los grupos sensibilizados, mostraron inactividad posterior a un estímulo, y dificultad para respirar. No se observaron modificaciones significativas en el comportamiento o en el aspecto de los animales del grupo control.

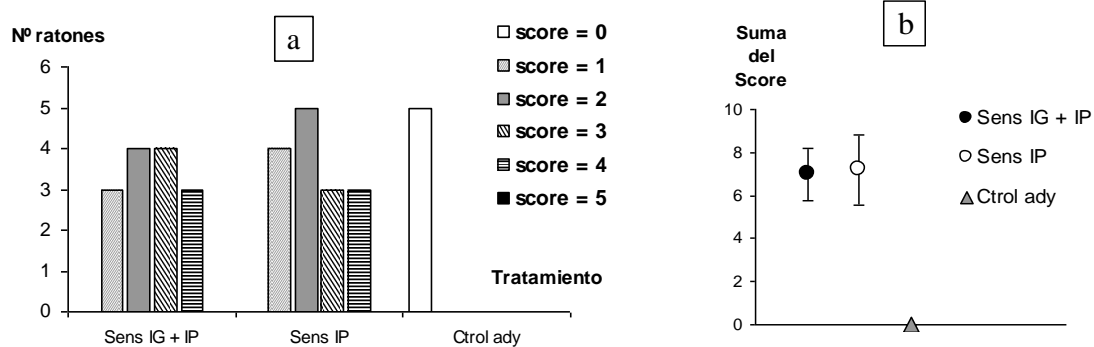


Figura 29. Signos clínicos locales y sistémicos inducidos luego del desafío oral. En a) se grafica el número de animales que presenta cada uno de los signos en cada grupo, y en b) se muestra el promedio \pm DS de la suma de los scores obtenidos para cada ratón dentro de los grupos. Se graficaron los resultados de un experimento representativo.

En base a estos resultados, podemos decir que, en estas condiciones, la inoculación simultánea por vía ig (TC + PLV) e ip ($\text{Al}(\text{OH})_3$ + PLV), ocasionó una respuesta que no presentó diferencias significativas a la respuesta observada cuando se utilizó el protocolo de inoculación por vía ip solamente ($\text{Al}(\text{OH})_3$ + PLV). Tanto en un ensayo *in vitro* (detección de anticuerpos sérico específicos) como en una prueba *in vivo* (observación de los signos

clínicos locales y sistémicos post desafío oral) la respuesta observada fue muy similar, por lo cual decidimos finalizar en este punto la caracterización de la respuesta inmune, ya que este nuevo protocolo no aportaba ninguna ventaja sustancial que se reflejara a nivel sistémico.

Podemos concluir según lo expuesto hasta este momento, en que es posible inducir una respuesta inmune específica, compatible con un perfil Th2 cuando utilizamos $\text{Al}(\text{OH})_3$ por vía ip o cuando administramos TC por vía ig. Como mostramos anteriormente esta respuesta Th2-dependiente es más clara cuando utilizamos TC. Cabe resaltar que este adyuvante actúa directamente sobre el sistema inmune de la mucosa gastrointestinal (sobre enterocitos¹⁸⁹ y sobre células dendríticas^{110,118}), lo cual representa una mejor aproximación del modelo a lo que se observa en una alergia alimentaria en humanos.

También pudimos observar que el uso simultáneo de estos dos adyuvantes actuando por distintas vías no conduce a una mejora sustancial en la respuesta inmune obtenida comparado con el protocolo de inmunización por vía ip exclusivamente.

Capítulo II

2.- EVALUACIÓN DEL USO DE DISTINTOS AGENTES INMUNOMODULATORIOS EN EL MODELO MURINO DE ALERGIA ALIMENTARIA A PLV

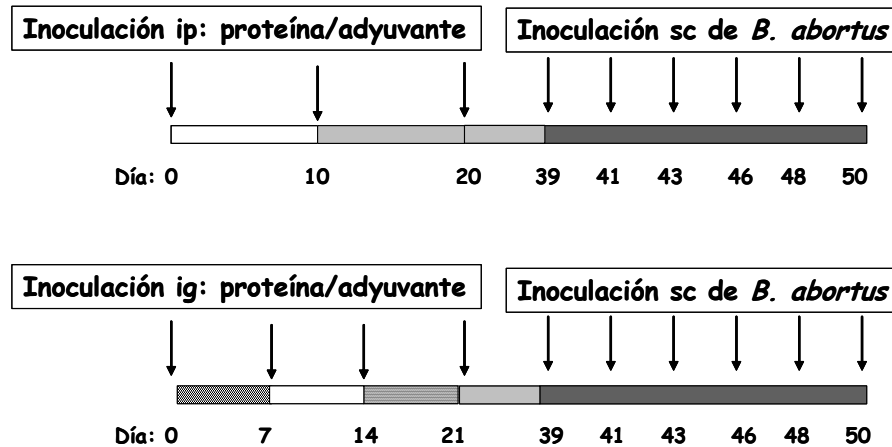
Mediante la aplicación de diferentes protocolos inmunomodulatorios en animales sensibilizados se ha logrado revertir la activación inmunológica Th2 específica y la aparición de signos clínicos compatibles con una reacción alérgica. Se han empleado plásmidos bacterianos que contienen los genes para distintos alérgenos¹⁹⁰, o citoquinas Th1 recombinantes^{127,138}, o se han administrado oligonucleótidos (conteniendo secuencias CpG) junto a los alérgenos^{153,191}, alérgenos mutados¹⁹²⁻¹⁹⁴, bacterias probióticas¹³⁴ o bacterias enteras muertas como adyuvantes pro-Th1^{135,147,195}. En todos los casos lo que se busca es inducir una respuesta inmune Th1-dependiente específica del antígeno que module o inhiba la respuesta Th2 previamente inducida. Aquí proponemos emplear componentes de membrana de *Brucella abortus* que se ha demostrado constituyen agonistas TLR (TLR 2 y TLR 4) capaces de inducir una respuesta inmune Th1^{186,196,197}.

2.1.- EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO CON *BRUCELLA ABORTUS* INACTIVADA CON CALOR POR VÍA SUBCUTÁNEA

Dado que se desconoce si *Brucella abortus* o componentes de la misma ejercen algún efecto pro-o anti-inflamatorio sobre un modelo murino de alergia alimentaria, decidimos aplicar un protocolo de modulación empleando la bacteria entera. Para tal fin, una vez realizados los protocolos de sensibilización se aplicó por vía sc *B. abortus* inactivada por calor junto a PLV.

En la primera fase del plan de inmunización se sensibilizaron los animales (BALB/c de 5 semanas) utilizando dos protocolos ya descritos (**sección 1.4** de esta tesis). Brevemente, los animales fueron divididos inicialmente en 4 grupos como se puede ver en

el **esquema 6 (Sens IG, Control IG, Sens IP, Control IP)**. Concluida esta etapa, cada uno de estos lotes fue subdividido en dos grupos, el de los animales inyectados por vía sc con *B. abortus* inactivada con calor junto a PLV (**T**: Tratamiento), y el de los animales inyectados con solución fisiológica (control del tratamiento):



Esquema 6

Sensibilización:

Inoculación por vía intraperitoneal: los días 0, 10 y 20 se inocularon por ratón:

15 µg de PLV + 0.5 mg de Al(OH)₃, para el grupo **Sens IP**

0.5 mg de Al(OH)₃, para el grupo **Control IP**

Inoculación por vía intragástrica: los días 0, 7, 14 y 21 se inocularon por ratón:

10 µg de TC + 20 mg de PLV, para el grupo **Sens IG**

10 µg de TC, para el grupo denominado **Control IG**

Tratamiento:

Inoculación por vía subcutánea: los días 39, 41, 43, 46, 48, y 50 se inocularon por ratón:

10⁸ bacterias + 20 µg de PLV, agregar a los grupos antes mencionados: “+ T”

Solución fisiológica (SF), los nombres de los grupos permanecen invariantes.

Caracterización de la respuesta inmune

2.1. a- Pruebas *in vitro*

• **Detección de anticuerpos séricos**

En la **figura 30 a y b**, se muestran los resultados obtenidos para la detección de IgE específica en los animales sensibilizados por vía ig, y en la **c y d** para los ratones sensibilizados por vía ip. Para facilitar la visualización de los resultados graficamos por separados los animales que recibieron el tratamiento con *B. abortus*, de aquellos que no lo recibieron.

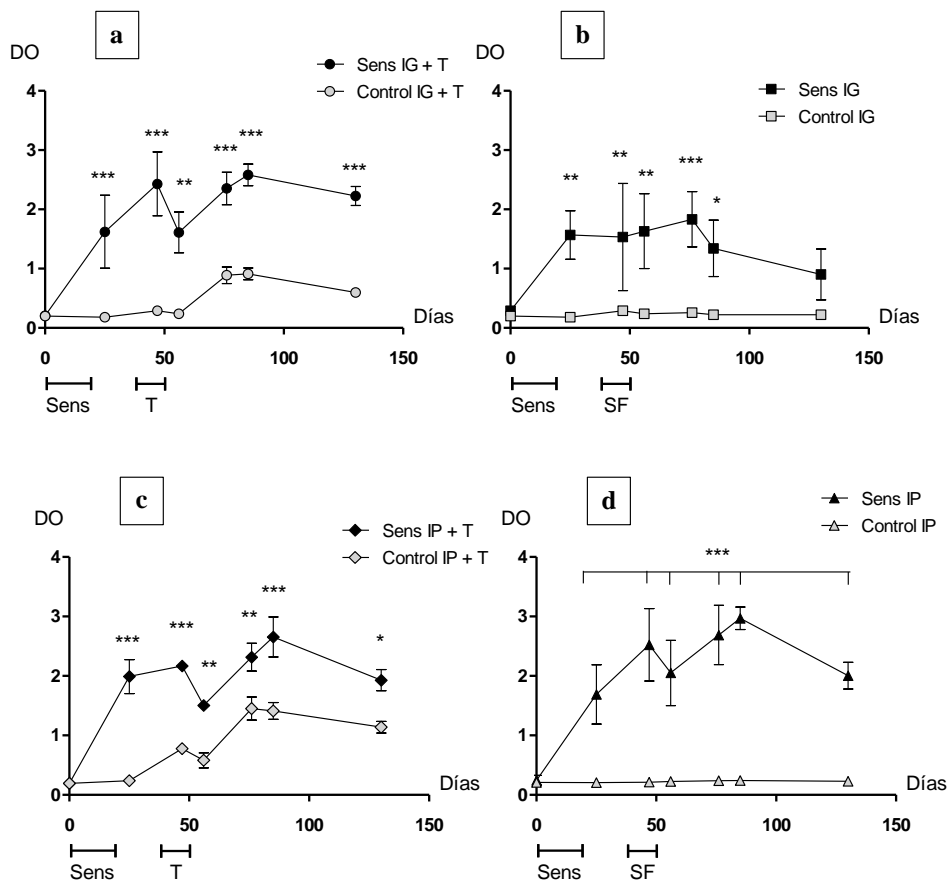


Figura 30. IgE específica para PLV medida por EAST. Valores medios de DO \pm SD, de los animales sensibilizados por vía ig (a y b) o por vía ip (c y d) y sus respectivos controles. En a y c, se muestran los lotes que recibieron el tratamiento con *B. abortus* inactivada por calor (T), y en b y d los que fueron inoculadas con solución fisiológica (SF) por vía sc como control del tratamiento. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Sens: corresponde al período en el que se realizó la sensibilización con adyuvante+PLV o su Control T: corresponde al período de inoculación de *B. abortus* +PLV o con SF (Control de este tratamiento)

Por cuestiones metodológicas, se analizaron separadamente los animales inoculados por vía ig (sensibilizados y control) de aquellos inoculados por vía ip (sensibilizados y control). En la **figura 30** y en **tabla 5** se muestra la significación estadística de los resultados hallados.

Tabla 5. Análisis estadístico de los niveles séricos de IgE específica para los distintos lotes de animales

Día	Sens IG vs Sens IG + T	Control IG vs Control IG + T	Sens IP vs Sens IP + T	Control IP vs Control IP + T
0	ns	ns	ns	ns
25	ns	ns	ns	ns
47	*	ns	ns	ns
56	ns	ns	ns	ns
76	ns	ns	ns	***
85	**	ns	ns	***
130	***	ns	ns	*

ns: no significativo; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

Puede observarse (como se mostró previamente en esta tesis) que ambos planes de sensibilización, ya sea por vía ig o ip, inducen aumentos estadísticamente significativos en los valores de IgE específica. El tratamiento con la bacteria junto a PLV produce en los animales sensibilizados por vía ig un aumento significativo el día 47 en los niveles de este anticuerpo (**Tabla 5**, columna **Sens IG vs Sens IG + T**), luego se observa una caída rápida el día 56 (**figura 30 a**), posteriormente un aumento hasta alcanzar un pico el día 85 seguido de una lenta disminución, siendo los niveles de IgE este día y el 130 estadísticamente mayores que los niveles encontrados en los ratones sensibilizados y tratados con solución fisiológica (**Tabla 5**). Sin embargo, no se observa el mismo comportamiento en los animales sensibilizados por vía ip, donde los niveles de IgE muestran la misma tendencia, reciban o no el tratamiento con la bacteria (**Tabla 5**, columna **Sens IP vs Sens IP + T**), no observándose diferencias estadísticamente significativas ninguno de los días estudiados.

En los animales control de sensibilización, el tratamiento con la bacteria junto a PLV produce aumento en los niveles de IgE específica el cual es estadísticamente significativo para el control ip (lote **Control IP + T**, respecto al **Control IP**), y sigue esa tendencia en el lote control ig (lote **Control IG + T**, respecto al **Control IG**) aunque la misma no sea estadísticamente significativa (la diferencia entre las medias de DO es de aproximadamente 0,6 el día 85 y 0,4 el 130).

Por lo tanto, el tratamiento con *B. abortus* junto a PLV por vía sc produce un aumento en los niveles de IgE específica para PLV en los ratones no sensibilizados (lotes **Control IG + T** y **Control IP + T**) y en los sensibilizados por vía ig (lote **Sens IG + T**).

De manera similar se realizó un análisis de los resultados obtenidos para la determinación de los niveles séricos de IgG1 e IgG2a específicas para PLV.

En la **figura 31** y en la **tabla 6** se muestran los resultados y el análisis estadístico realizado para la determinación de IgG1 específica para PLV.

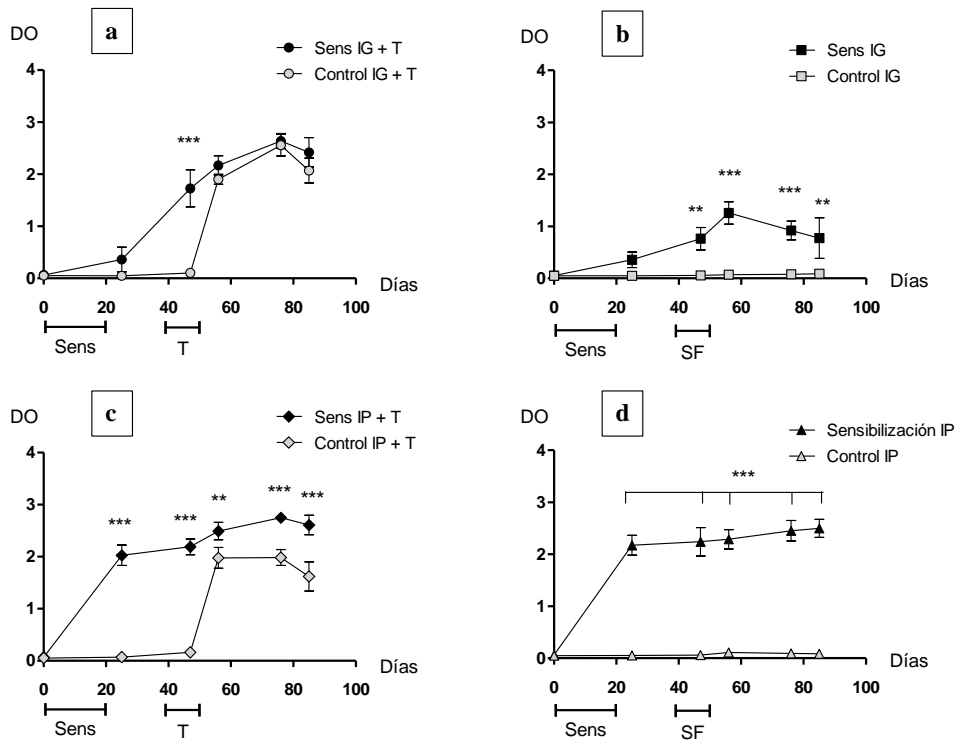


Figura 31. IgG1 específica para PLV medida por ELISA. Valores medios de DO \pm SD de los animales sensibilizados por vía ig (**a** y **b**) o por vía ip (**c** y **d**) y sus respectivos controles. En **a** y **c**, se muestran los lotes que recibieron el tratamiento (T), y en **b** y **d** los que fueron inoculadas con solución fisiológica (SF) por vía sc como control del tratamiento. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Sens: corresponde al período en el que se realizó la sensibilización con adyuvante+PLV o su Control

T: corresponde al período de inoculación de *B. abortus* +PLV o con SF (Control de este tratamiento)

El tratamiento con *B. abortus* junto a PLV produce un aumento en los niveles IgG1 específica para PLV en los ratones sensibilizados por vía ig (**Tabla 6; Sens IG** respecto a **Sens IG + T**) y en los animales no sensibilizados (**Tabla 6; Control IG + T** respecto a **Control IG**). El aumento en los valores de DO para este anticuerpo en este grupo (**Control IG + T**) a partir del día 56 no muestra diferencias estadísticamente significativas respecto al lote **Sens IG + T** (**figura 31 a**), siendo estos valores estadísticamente superiores a los observados en el grupo **Sens IG** (animales sensibilizados por vía ig con TC + PLV, análisis estadístico no mostrado).

En los animales sensibilizados por vía ip no se observa que el tratamiento con *B. abortus* origine un aumento en los niveles de IgG1 específica, ya que no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos **Sens IP + T** y **Sens IP** (Tabla 6).

El tratamiento con la bacteria junto a PLV produjo un marcado aumento en los niveles de este isotipo en el grupo de animales **Control IP + T**, respecto de los animales control que recibieron solución fisiológica por vía sc (Tabla 6). Estos valores de IgG1 específicos para PLV no fueron superiores a los obtenidos mediante la sensibilización por vía ip utilizando Al(OH)₃ como adyuvante (**Sens IP**, análisis estadístico no mostrado).

Tabla 6: Análisis estadístico de los niveles séricos de IgG1 específica para los distintos lotes de animales.

Día	Sens IG vs Sens IG + T	Control IG vs Control IG + T	Sens IP vs Sens IP + T	Control IP vs Control IP + T
0	ns	ns	ns	ns
25	ns	ns	ns	ns
47	***	ns	ns	ns
56	***	***	ns	***
76	***	***	ns	***
85	***	***	ns	***

ns: no significativo; *** p < 0.001

En la **figura 32** se muestran los gráficos de los valores medios de DO para la detección de IgG2a específica para PLV.

Como puede verse, la sensibilización por vía ig no produce aumento en los niveles de IgG2a específica para PLV (**figura 32 b**, y resultados ya mostrados), pero si los induce la inoculación por vía sc de *B. abortus* junto a PLV (**figura 32 a**). Este aumento se produce de manera muy similar independientemente de si fueron sensibilizados contra las PLV por vía ig, o no.

Por el contrario, la sensibilización por vía ip produce aumentos estadísticamente significativos en los niveles de IgG2a (**figura 32 a y b**, y previamente en esta tesis). El tratamiento con *B. abortus* y leche bovina por vía sc también induce aumento en los niveles de este anticuerpo (**tabla 7**, **Control IP + T** respecto a **Control IP**, y **Sens IP + T** respecto

a **Sens IP**), no observándose diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos que recibieron este tratamiento, una vez concluido el mismo (**figura 32 c**).

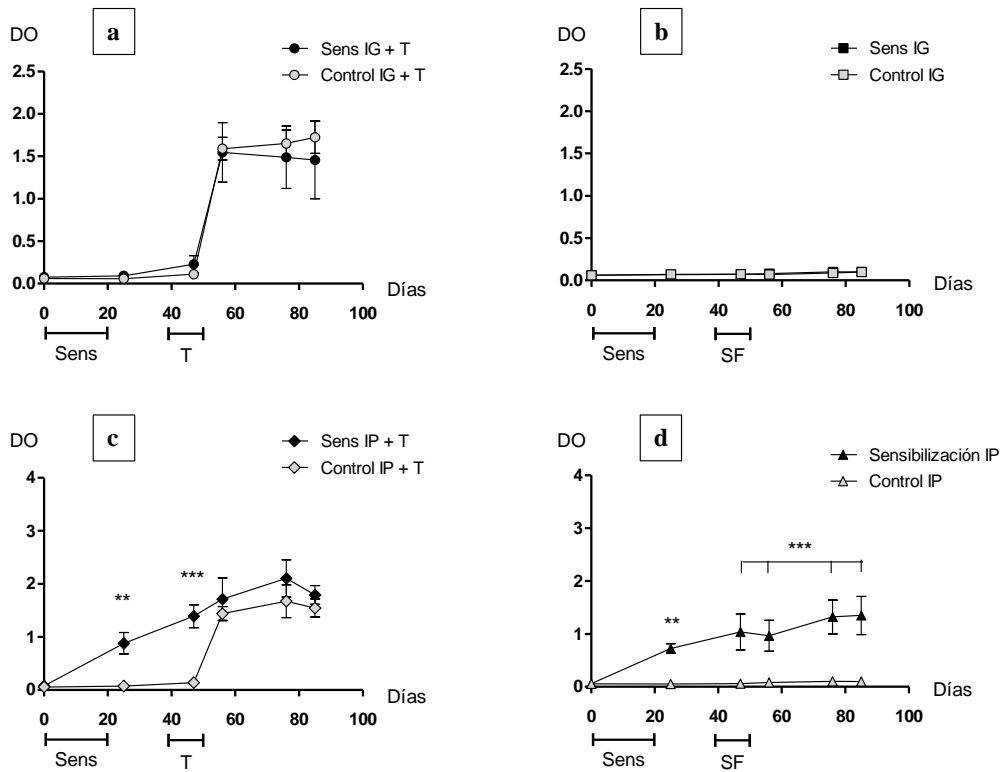


Figura 32. IgG2a específica para PLV medida por ELISA. Valores medios de DO \pm SD obtenidos en los animales sensibilizados por vía ig (**a** y **b**) o por vía ip (**c** y **d**) y sus respectivos controles. En **a** y **c**, se muestran los lotes que recibieron el tratamiento (T), y en **b** y **d** los que fueron inoculadas con solución fisiológica (SF) por vía sc como control del tratamiento. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Sens: corresponde al período en el que se realizó la sensibilización con adyuvante+PLV o su Control

T: corresponde al período de inoculación de *B. abortus* +PLV o con SF (Control de este tratamiento)

Tabla 7. Análisis estadístico de los niveles séricos de IgG2a específica para los distintos lotes de animales.

Día	Sens IG vs Sens IG + T	Control IG vs Control IG + T	Sens IP vs Sens IP + T	Control IP vs Control IP + T
0	ns	ns	ns	ns
25	ns	ns	ns	ns
47	ns	ns	ns	ns
56	***	***	**	***
76	***	***	***	***
85	***	***	ns	***

ns: no significativo; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Podemos concluir que el tratamiento realizado (inoculación con *B. abortus* inactivada por calor por vía sc) induce un aumento en los niveles de IgE específica para PLV en los animales sensibilizados por vía ig con TC junto a PLV, siendo el mismo estadísticamente significativo los días 47, 85 y 130. Si bien en los animales que no fueron previamente sensibilizados por vía ig, se observa un aumento en los valores de este isotipo específico, esto representa sólo una tendencia (carece de relevancia estadística).

Este tratamiento induce también un aumento en los niveles de IgG1 e IgG2a específicas para PLV tanto en los ratones sensibilizados por vía ig (**tablas 6 y 7, Sens IG + T** respecto a **Sens IG**), como en aquellos que habían recibido sólo el control de adyuvante (**tablas 6 y 7, Control IG + T** respecto a **Control IG**).

Respecto a los animales que fueron sensibilizados por vía ip con Al(OH)₃ y PLV se observa que este tratamiento con *B. abortus* no induce un aumento significativo en los valores de IgE e IgG1 específica, pero si produce un aumento en los niveles IgG2a específica respecto de los animales sensibilizados que no recibieron el tratamiento (**Sens IP + T** respecto a **Sens IP**).

En los animales control de sensibilización que recibieron el tratamiento se observa un aumento en los niveles de estos tres isotipos específicos respecto de los animales que no fueron sensibilizados ni recibieron el tratamiento.

De esta manera podemos concluir que *Brucella abortus* inactivada por calor, cuando es inoculada por vía sc junto a PLV bajo este esquema de trabajo, ejerce un efecto adyuvante el cual se manifiesta a través del aumento inducido en los niveles de los tres isotipos específicos analizados. Además en los animales previamente sensibilizados por vía ig este tratamiento induce un incremento en la producción de anticuerpos de los tres isotipos analizados, mientras que en los animales sensibilizados por vía ip sólo se observa un aumento en la producción de IgG2a en los animales que recibieron el tratamiento respecto de aquellos que no lo recibieron. Esta diferencia se debe posiblemente al hecho de que la sensibilización con Al(OH)₃ por vía ip tenga un mayor poder adyuvante, que la sensibilización lograda con TC.

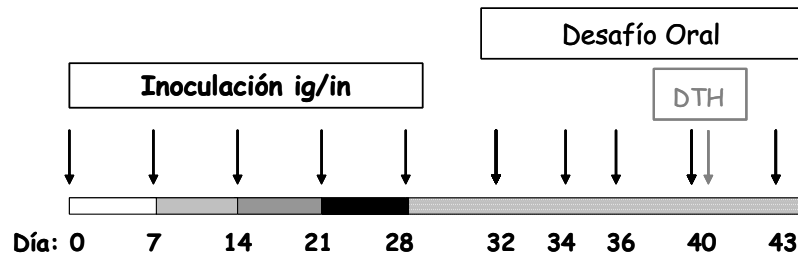
2.2.- EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO CON PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE MEMBRANA DE *BRUCELLA ABORTUS* POR VÍA INTRANASAL

Con el fin de lograr una activación inmunológica específica de PLV empleando componentes bacterianos provenientes de *B. abortus* capaces de inducir una inmunidad Th1 se decidió administrar proteínas recombinantes por distintas vías mucosales en animales previamente sensibilizados. El grupo de trabajo de la Dra. Cassataro, previamente demostró que la producción de citoquinas proinflamatorias por monocitos, macrófagos y CD es inducida por las lipoproteínas de Brucella (L-OMP16 y L-OMP-19), más que por su LPS^{196,197}, siendo capaces de inducir citoquinas con alto poder inflamatorio como IL-6, IL-1 β y TNF- α . También encontraron que estos componentes de la membrana eran capaces de inducir una respuesta inmune protectora frente a un desafío con *B. abortus* virulenta, sin la necesidad de la adición de adyuvantes externos. Esta respuesta fue independiente de la lipidación de las proteínas, sugiriendo que las porciones proteicas de Omp16 y Omp19 tienen actividad inmunoadyuvante^{185,198}.

Por lo tanto aquí emplearemos estas proteínas de membrana externa de *B. abortus* con el fin de inducir una respuesta inmune específica de PLV capaz de modular la respuesta Th2 previamente inducida en la sensibilización mucosal. Para tal fin se administraron por vía intranasal OMP-16 y OMP-19 simultáneamente con el protocolo de inducción de una respuesta Th2 específica para PLV utilizando TC por vía ig.

Se emplearon ratones BALB/c de 5 semanas de edad, agrupados en lotes de 5 animales cada uno. Todos los animales fueron inoculados simultáneamente por vía ig (TC y PLV) y por vía in. Dependiendo de la proteína a administrar por vía in, los animales fueron divididos en 4 lotes, como puede observarse en el **esquema 7**. Como agentes inmunomoduladores se administraron las proteínas recombinantes OMP-16 y OMP-19 de *B. abortus* y LPS de *Escherichia coli*. A estos lotes de animales se los denominó **Trat-OMP-16**, **Trat-OMP-19** y **Trat-LPS** respectivamente. También se incluyó un grupo control al cual se le administró únicamente PLV por vía in, denominado **Control Ag**.

Además se incrementó el número de desafíos orales con el Ag, con la intención de intensificar la magnitud de los signos clínicos observados.



Esquema 7:

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

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

Dependiendo del lote, se inocularon por vía in los mismos días

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

4 µg de PLV + 50 µg de OMP-19, para el grupo denominado **Trat -OMP-19**.

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

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

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

Caracterización de la respuesta inmune

2.2. a- Pruebas *in vitro*

• **Detección de anticuerpos séricos**

En la **figura 33** se muestra el comportamiento de la IgE específica para PLV en cada uno de los lotes de ratones a lo largo del tiempo. Se observa un aumento en los niveles de IgE específica, estadísticamente significativo para todos los lotes excepto para el grupo **Trat-LPS**. El día 0 no se observan diferencias con relevancia estadística entre los distintos grupos. El día 27 se observa un aumento en los niveles de este anticuerpo para el grupo tratado con OMP-19 respecto al lote **Control Ag** ($p < 0,01$) y respecto al lote **Trat-LPS** ($p < 0,05$) (resultados no mostrados). El día 39 los grupos **Trat-OMP-16** ($p < 0,01$), **Trat-OMP-19** ($p < 0,05$) y **Control Ag** ($p < 0,01$), presentan niveles estadísticamente superiores a los del grupo **Trat-LPS** para la IgE específica (resultados no mostrados).

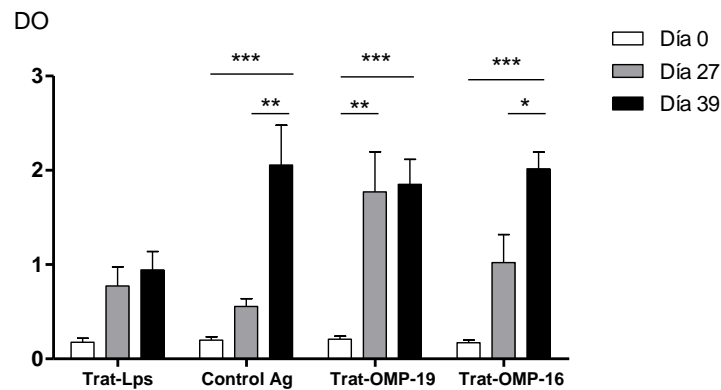


Figura 33. IgE específica para PLV medida por EAST. El histograma muestra los valores medios de DO \pm SD. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Por lo tanto, podemos inferir que el uso de las proteínas OMP-16 y OMP-19 cuando son administradas por vía in en estas condiciones experimentales, no modulan la activación inmunológica en comparación con la administración del antígeno en los días analizados. Sin embargo, los resultados del lote de animales tratados con LPS parecen indicar que LPS por vía in inhibe el aumento sérico de IgE específica.

En la **figura 34 a** se observan los resultados obtenidos para la determinación de IgG1 específica para PLV. En todos los grupos estudiados se produce un aumento estadísticamente significativo de este anticuerpo a lo largo del tiempo ($p < 0,001$ entre el día 27 y el día 39). No existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos para ninguno de los tiempos analizados, es decir, todos los grupos muestran un comportamiento similar con respecto a este isotipo.

En la **figura 34 b** se muestran los resultados obtenidos para la determinación de IgG2a específica para PLV. En este caso tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos analizados en ninguno de los días estudiados, sin embargo sí se observan aumentos estadísticamente significativos para los lotes **Trat-OMP19** y **Trat -LPS** a medida que transcurre el tiempo ($p < 0,01$ entre el día 27 y el 39).

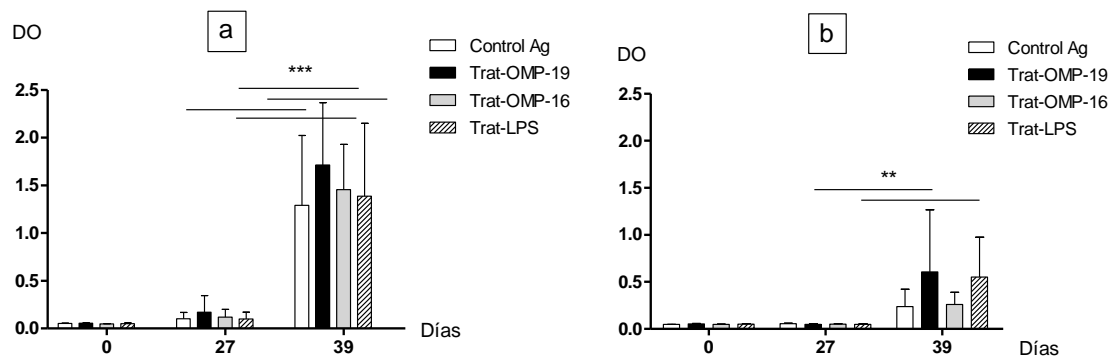


Figura 34. Valores de IgG1 e IgG2a específicos para PLV obtenidos por ELISA: Se muestran las $DO \pm SD$ correspondientes a la detección de **a)** IgG1 específica; y **b)** IgG2a específica. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Si bien se observa un aumento en los niveles de IgG1 específica en el grupo de ratones tratados con LPS, este grupo no muestra aumento en los valores de IgE específica, pero sí se observa un aumento en los niveles de IgG2a a lo largo del tiempo, siendo el comportamiento de este grupo el que más se aproxima a un perfil de activación Th1. En el grupo tratado con OMP-19 se observa un aumento en los niveles de estos 3 anticuerpos específicos con lo cual no podemos concluir que predomine un perfil de activación Th1 o Th2. En el resto de los lotes (**Trat-OMP-16** y **Control Ag**) se observa un aumento en los niveles de IgE específica y de IgG1 específica y no se observan diferencias significativas para la IgG2a, indicando que se trataría de un perfil de activación Th2.

Podemos concluir que bajo estas condiciones experimentales, OMP-16 junto con el antígeno no produce una respuesta sérica distinta a la que produce la administración del antígeno solo, o la respuesta que se observa cuando se tratan los ratones con TC junto a PLV solamente (ya descrita con anterioridad en esta tesis). La administración de LPS junto con PLV inhibe la producción de IgE específica inducida por TC. En cambio cuando utilizamos OMP-19 se observa una situación intermedia donde estarían activadas tanto la respuesta Th1 como la Th2.

• **Cuantificación de las citoquinas presentes en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos**

Luego del desafío oral se sacrificaron los animales, se aislaron los bazos, se obtuvieron suspensiones celulares de esplenocitos de cada animal y se cultivaron en presencia del Ag específico (PLV o β -Lactoglobulina (β -Lg)). Se incluyeron como control negativo medio RPMI 1640 (72 horas) y como control positivo ConA (24 horas).

Se cuantificaron los niveles de IL-5, e IFN- γ por ELISA en los sobrenadantes de cultivo de los esplenocitos (**figura 35**). Se puede observar que IL-5 muestra los valores más bajos en el grupo **Trat-LPS**, observándose diferencias estadísticamente significativas sólo entre este grupo y el **Trat-OMP-19** (**figura 35 a**). Cuando utilizamos β -Lg como estímulo no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, sin embargo los valores más altos de IL-5 se encontraron en los grupos tratados por vía in con OMP-16 y OMP-19 y nuevamente valores menores para **Trat-LPS**.

Al analizar la secreción de IFN- γ , se observó una respuesta más elevada cuando se utilizó β -Lg como estímulo. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos en respuesta a ambos estímulos.

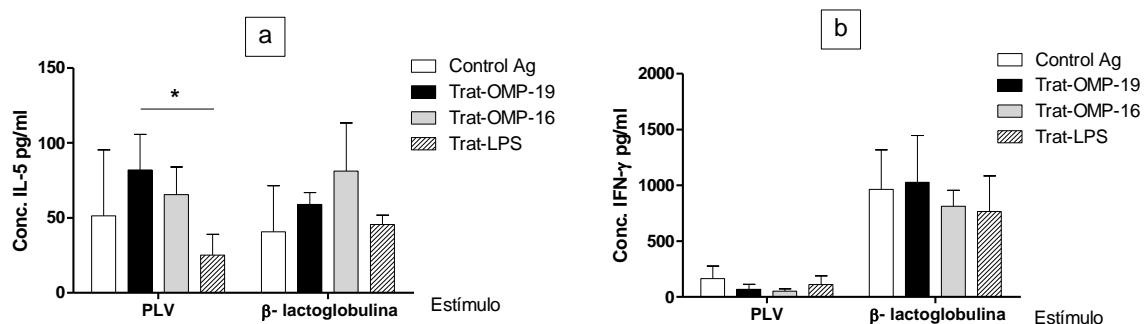


Figura 35. Concentración de citoquinas medidas por ELISA de captura. Corresponden a IL-5 (a), e IFN- γ (b) en los sobrenadantes de cultivos de esplenocitos en presencia de PLV o β -lactoglobulina. (* $p < 0,05$).

Como se desprende de la figura sólo se observan diferencias significativas para IL-5 cuando se modula con LPS por vía in, por lo cual este podría ser un marcador de modulación de la activación T.

2.2. b- Pruebas *in vivo*• Análisis de los signos clínicos locales y sistémicos inducidos luego del desafío oral

Una vez concluida la sensibilización junto al tratamiento inmunomodulador los animales fueron desafiados con el antígeno en cuestión, por vía intragástrica, con el fin de analizar los signos clínicos locales y sistémicos inducidos. Se realizaron 5 desafíos orales, en los cuales los signos clínicos observados fueron muy similares para cada uno de los lotes. En la **figura 36** se muestran los resultados obtenidos tras realizar el último desafío oral.

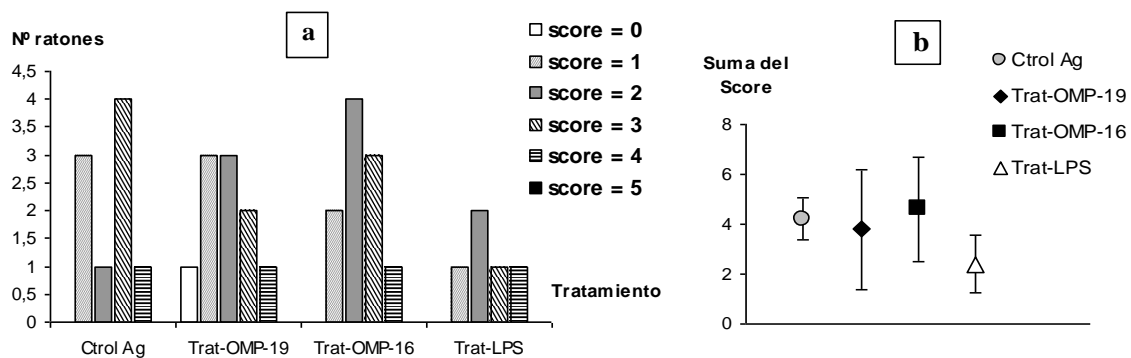


Figura 36. Signos clínicos locales y sistémicos inducidos luego del desafío oral. En **a)** se grafica el número de animales que presenta cada uno de los valores del "score" (para cada uno de los lotes), y en **b)** se muestra el promedio \pm la DS de la suma de los "scores" obtenidos para cada ratón dentro de los grupos.

En los animales pertenecientes a los lotes **Control de Ag**, **Trat-OMP-16** y **Trat-OMP-19** los signos observados fueron muy similares, aumento del rascado, enrojecimiento e hinchazón alrededor de la nariz y la boca, y en algunos animales aumento de la frecuencia respiratoria, baja actividad general, incluso en algunos casos con inactividad frente a un estímulo. Como puede verse en la **figura 36 b)**, el promedio de la suma de los "scores" obtenidos para cada animal, fue muy similar en estos tres grupos ($4,2 \pm 0,84$; $3,8 \pm 2,4$; y $4,6 \pm 2,07$, para los lotes **Control de Ag**, **Trat-OMP-16** y **Trat-OMP-19** respectivamente). Siendo estos valores menores a los observados en repetidas ocasiones cuando los animales son sensibilizados con TC junto a PLV ($6,6 \pm 2,5$ como un resultado representativo de varios experimentos). Un resultado aún menor para el promedio de los "scores" se obtuvo en los animales tratados con LPS ($2,4 \pm 1,14$), donde los signos observados fueron más

leves que en el resto de los grupos, observándose algunos animales que mostraron un aumento en el rascado de la cabeza, hinchazón alrededor de los ojos y en un sólo caso inactividad posterior a un estímulo. Podría inferirse por lo tanto, que en este lote tratado con LPS en forma simultánea a la sensibilización los signos clínicos compatibles con una respuesta alérgica son más leves.

• **Prueba de Hipersensibilidad retardada (DTH)**

Se empleó la prueba de hipersensibilidad retardada o DTH como prueba *in vivo* para evaluar la inducción de mecanismos Th1-dependientes. Brevemente los ratones fueron inoculados por vía id con PLV en la almohadilla plantar en una de sus extremidades traseras y con solución fisiológica en la otra. Pasadas 72 horas, se calculó la diferencia en la inflamación entre la pata inoculada con PLV y la pata inyectada con solución fisiológica a partir de la medida de la altura de la palma plantar trasera. En la **figura 37** se muestran los resultados obtenidos para esta prueba.

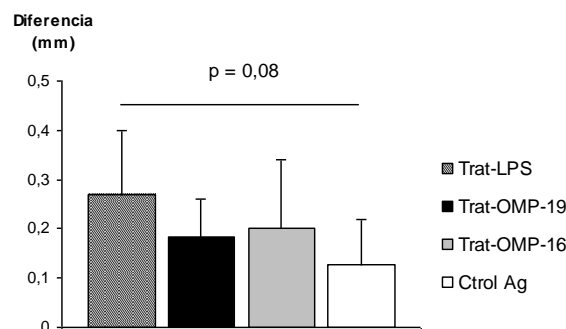


Figura 37. Resultados de la DTH en los distintos lotes de animales. Se grafica la diferencia en el incremento cutáneo plantar de grosor entre las patas traseras, a las 72 hs de inoculado el Ag. Se inoculó en cada animal una pata con PLV y la otra con solución fisiológica (p calculada utilizando el Test de Student).

Como puede observarse, el valor más alto para esta prueba se obtuvo en el grupo de animales tratados con LPS y el mas bajo en el grupo al cual se les administró solamente el Ag (p= 0,08 entre estos dos grupos, cuando se utiliza el test de Student para calcular la diferencia entre ellos). Estos resultados nuevamente sugieren que el tratamiento con LPS simultáneo a la sensibilización induce mecanismos pro-inflamatorios específicos para PLV Th1-dependientes.

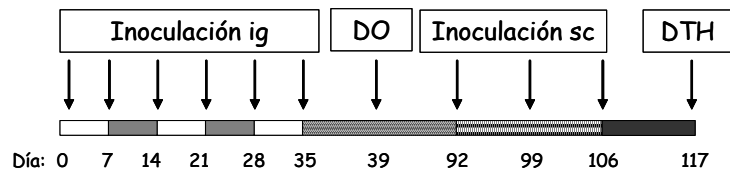
En conclusión, mediante este protocolo de inmunización y modulación, evaluamos el uso de agentes bacterianos como inmunomoduladores de la respuesta Th2 específica inducida por administración de TC junto a PLV por vía ig. Resumiendo, observamos que las proteínas de membrana de *B. abortus* OMP-16 y OMP-19, que se ha demostrado en otros sistemas, que inducen una respuesta inmune celular Th1-dependiente, aquí no logran inhibir la instauración de una respuesta Th2-dependiente inducida en la mucosa gástrica. Sin embargo, se observan algunas diferencias con respecto al control negativo (sólo con PLV), tal como el aumento en los niveles de la IgG2a específica en el grupo Trat-OMP19, o la menor producción de IFN- γ por los esplenocitos del grupo Trat-OMP-16 respecto de los cultivos del lote **Control de Ag.** Por el contrario, logramos modular la respuesta Th2, a través de una respuesta Th1-dependiente, al co-sensibilizar los animales con LPS por vía in. En este caso se evidenció una menor producción de IgE específica, mayor concentración sérica de IgG2a específica, menor intensidad de los signos clínicos observados post desafío oral, y DTH más elevada, resultados que en conjunto son claros indicadores de la inducción de una respuesta específica mediada por la activación de LT Th1.

2.3.- EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO CON PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE MEMBRANA DE *BRUCELLA ABORTUS* POR VÍA SUBCUTÁNEA.

Dado que no se obtuvieron resultados concluyentes al administrar las proteínas de *B. abortus* OMP-16 y OMP-19 por vía in, decidimos estudiar su posible capacidad inmunomodulatoria al administrarlas por vía sc junto a PLV en animales previamente sensibilizados con TC y PLV por vía ig.

Ratones de la cepa BALB/c de 5 semanas de edad, se agruparon en 6 lotes de 4 animales cada uno (ver **esquema 8**). La mitad de los ratones fueron inoculados por vía ig con TC y PLV con el fin de inducir una activación Th2 específica contra PLV (sensibilización). Como mencionamos anteriormente, existe una gran variabilidad en la respuesta observada entre los animales, por lo cual decidimos modificar el plan de activación Th2 específico descrito en el apartado 1.3 de esta tesis. En este caso realizamos una mayor cantidad de inoculaciones por vía ig con el fin de obtener una gran proporción de animales con niveles de IgE específica elevados. El resto de los animales se mantuvo sin recibir ningún tipo de inmunización durante el tiempo que duró la sensibilización.

Luego del realizar el desafío oral, ambos grupos, los animales sensibilizados y los que no fueron sensibilizados, se dividieron en tres lotes, para recibir cada uno de los siguientes tratamientos: 3 inoculaciones por vía sc con OMP-16 junto a PLV, u OMP- 19 junto a PLV, o PLV solamente como control de este tratamiento. Por lo tanto en este caso los tratamientos se realizaron en forma desfasada con la sensibilización.



Esquema 8:

Sensibilización: Días 0, 7, 14, 21, 28y 35: se inocularon por vía ig:

10 µg de TC + 20 mg de PLV, para todos los animales del experimento que fueron sensibilizados.

Tratamiento: Dependiendo del lote, se inocularon por vía sc

20 µg de PLV + 100 µg de OMP-16, para el grupo denominado **S/T-OMP-16** si fueron sensibilizados previamente; y **T-OMP-16** si eran ratones no sensibilizados.

20 µg de PLV + 100 µg de OMP-19, para el grupo denominado **S/T-OMP-19** si fueron sensibilizados previamente; y **T-OMP-19** si eran ratones no sensibilizados.

20 µg de PLV, para el grupo denominado **S/T-Control Ag** si fueron sensibilizados previamente; y **T-Control Ag** si eran ratones no sensibilizados.

Desafío oral: administración de 20 mg de PLV por vía ig una vez concluida la sensibilización (Día 39).

Caracterización de la respuesta inmune

2.3. a- Pruebas in vitro

• **Detección de anticuerpos séricos**

Una vez concluido el protocolo de sensibilización con TC junto a PLV, se midieron los niveles de IgE específica con el fin de verificar el aumento en los niveles de este anticuerpo previo al tratamiento con las OMP, el mismo puede apreciarse en la **figura 38**.

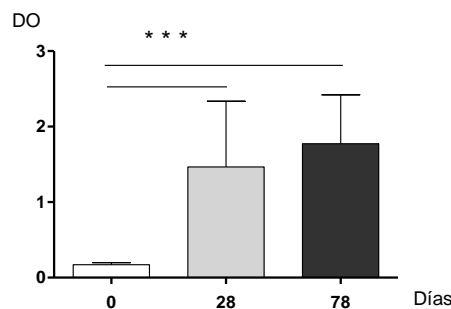


Figura 38: IgE específica para PLV medida por EAST. El gráfico muestra los valores medios de DO ± SD para días diferentes durante y luego de la sensibilización. (***) p < 0,001).

En la **figura 39** se muestran los resultados obtenidos para la detección de IgE específica para PLV, divididos en los distintos lotes dependiendo el tratamiento que

recibieron, tanto para los animales sensibilizados previamente (**figura 39 a**), como para los que no fueron sensibilizados (**figura 39 b**). En los tres grupos en los que fueron divididos los animales sensibilizados con TC junto a PLV, se observa un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,001$) en los niveles de este anticuerpo entre el día 0 y el día 78. Luego se observa que los tres grupos siguen la misma tendencia de incremento de la IgE ($p < 0,01$ entre el día 78 y el 103. Finalmente se observa un descenso en los niveles de IgE específica al día 124, una vez finalizado el tratamiento (diferencias estadísticamente significativa para los tratamientos con OMP- 19 junto a PLV y PLV solamente, como esta indicado en la **figura 39 a**). Pero si comparamos el día 78 con el día 124 (corresponde al período del tratamiento inmunomodulador) no se observan diferencias estadísticamente significativas para este isotipo. Es decir que el tratamiento con las proteínas de *B. abortus* junto a PLV, no induce una variación significativa en la respuesta con respecto a los niveles de IgE en comparación con la que se obtiene en el tratamiento control empleando sólo PLV.

En la **figura 39 b** se muestran los resultados obtenidos en los animales que no fueron sensibilizados, pero recibieron los mismos tratamientos por vía sc. Como puede verse, en todos los casos se produce un aumento ($p < 0,001$) en los niveles de IgE específica para PLV.

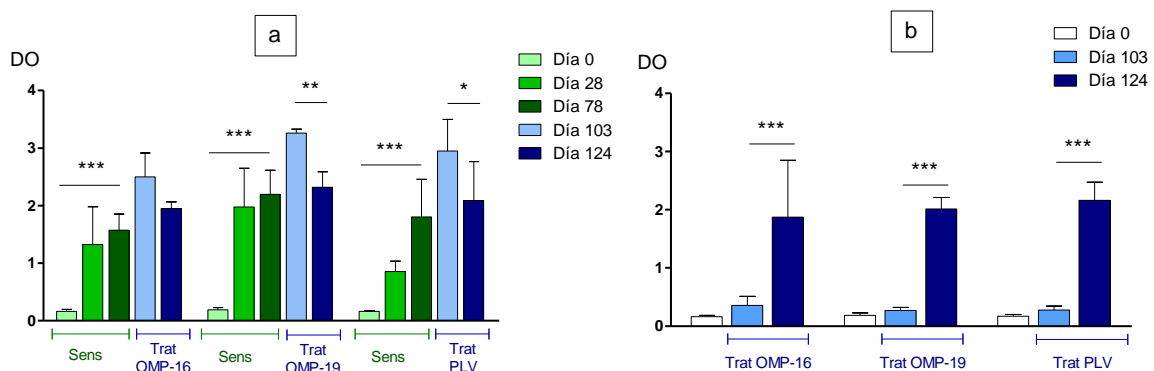


Figura 39. Valores medios de DO \pm SD para la determinación de IgE específica para PLV por EAST. En **a**) se muestran los resultados de los animales tratados con TC+PLV (Sens), y luego inoculados por vía sc con los distintos tratamientos (T). En **b**) se presentan los datos obtenidos para los ratones a los cuales sólo se les realizó el tratamiento (T). (***) $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

Al día 124 no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de IgE específica cuando comparamos todos los lotes de animales (incluyendo los

sensibilizados y tratados, como los que sólo recibieron el tratamiento). Estos resultados sugieren que la administración de PLV por vía sc induce la secreción de IgE esp.

Siguiendo el mismo esquema, en la **figura 40** se muestran los resultados obtenidos para la detección de IgG1 (**a** y **b**) e IgG2a (**c** y **d**) específicas para PLV.

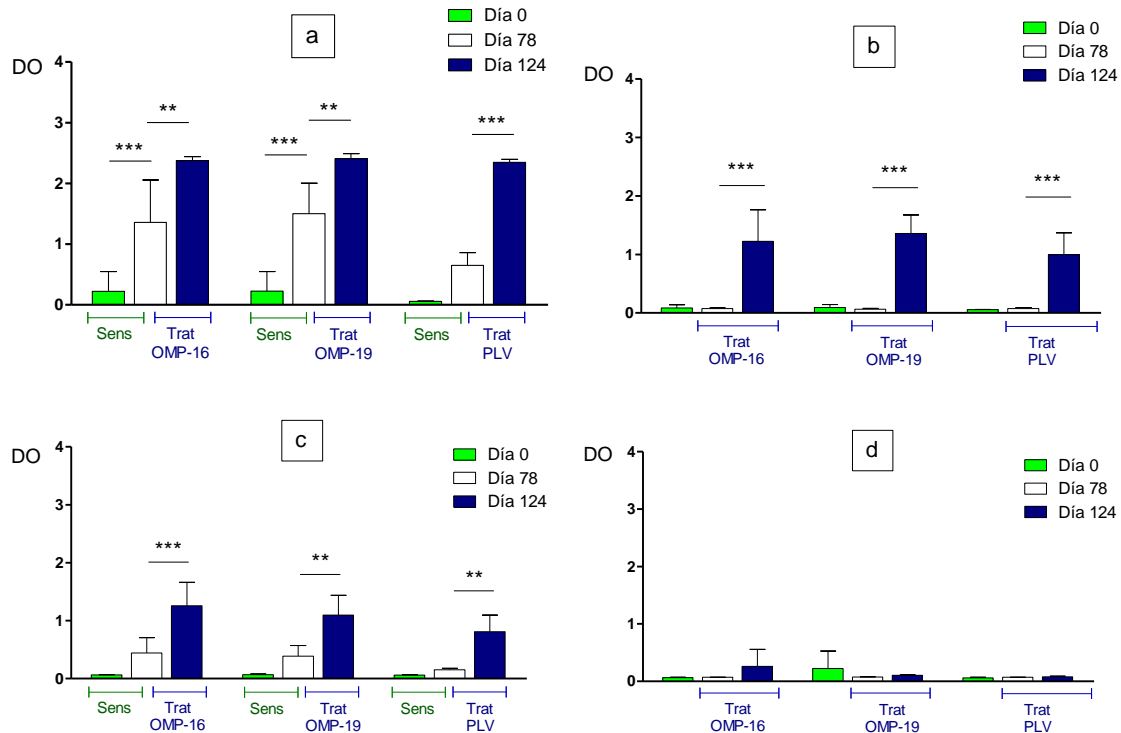


Figura 40. Valores medios de DO \pm SD, para la determinación por ELISA indirecto de IgG1 e IgG2a específicos para PLV. En **a** y **b** se muestran los resultados correspondientes a IgG1 esp. Y en **c** y **d**, para IgG2a esp. Asimismo **a** y **c** corresponden a animales tratados con TC+PLV (Sens), y luego inoculados por vía sc con los distintos tratamientos (T), y **b** y **d**, a los animales a los cuales sólo se les realizaron los tratamientos (T). (***) $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

Puede observarse que el plan de sensibilización induce un aumento estadísticamente significativo para la IgG1 específica entre el día 0 y el día 78 para todos los grupos excepto el lote de ratones que posteriormente fue tratado con PLV por vía sc. Sin embargo, al evaluar la respuesta del conjunto de todos los ratones se observa un aumento con relevancia estadística a medida que transcurre el tiempo ($p < 0,001$ entre el día 0 y el 78). Esto se debe a que los animales se agruparon de manera aleatoria, una vez que fue confirmado el aumento de la IgE específica solamente.

Como se observa en la **figura 40 a**, los tres tratamientos producen un aumento en los valores de IgG1 con relevancia estadística. Lo mismo ocurre en los animales que no habían sido sensibilizados, los tres tratamientos tienen el mismo efecto sobre los niveles de este anticuerpo (**figura 40 b**).

Con respecto a la IgG2a específica, el análisis estadístico no muestra un aumento significativo para ninguno de los tres grupos durante el periodo de sensibilización (**figura 40 b**). Si se observan aumentos posteriores a los tres tratamientos en los animales sensibilizados, pero no se visualizan cambios en los niveles de este anticuerpo en los ratones no sensibilizados y luego tratados.

El tratamiento con las proteínas de *B. abortus* junto a PLV induce (en los animales sin sensibilizar) un aumento en los niveles de IgE e IgG1, pero no de IgG2a, sin embargo estos resultados no difieren de los obtenidos cuando inoculamos por vía sc PLV solamente. Con lo cual podemos considerar que estos incrementos en los isotipos específicos son originados por la inoculación de PLV por vía sc. Sin embargo es importante destacar el hecho de que la inoculación de leche bovina por vía sc induce una activación Th2, demostrable por los niveles de anticuerpos séricos.

En los animales sensibilizados y activados a un perfil Th2 previamente, no se observan diferencias entre los niveles de IgE específica antes y una vez concluido el tratamiento (día 78 vs día 124). Si se observa un aumento en los niveles de IgG1 e IgG2a específicos para PLV. También en este caso podemos afirmar que no se observa un comportamiento diferencial entre los tratamientos que incluyen el uso de las proteínas de *B. abortus* respecto del tratamiento control con PLV, con lo cual bajo estas condiciones experimentales no se observa que estas proteínas tengan un efecto adyuvante o inmunomodulador sobre este sistema.

- **Cuantificación de las citoquinas presentes en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos**

El día 124 del plan de inmunización se sacrificaron los animales, se aislaron los bazo, y se cultivaron los esplenocitos en presencia del antígeno (PLV o β - lactoglobulina), o en medio RPMI solamente (control negativo), y en presencia de ConA (control positivo).

A partir de los sobrenadantes de estos cultivos se cuantificaron los niveles de IL-5, e IFN- γ por ELISA, los mismos pueden observarse en la **figura 41 a y b**, para los ratones sensibilizados y luego tratados; y en la **figura 41 c y d**, para los ratones que sólo recibieron el tratamiento.

No se observan diferencias significativas para las concentraciones de IL-5 o IFN- γ , ya sea cuando analizamos estas citoquinas entre los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos en los animales previamente sensibilizados o no, así como cuando comparamos todos los grupos, para cada uno de los dos estímulos.

Los valores de IL- 5 obtenidos en los animales sensibilizados que recibieron el tratamiento son del mismo orden que los obtenidos anteriormente en animales sensibilizados con TC y PLV. Lo mismo ocurre con las concentraciones de IFN- γ cuando el estímulo son las PLV.

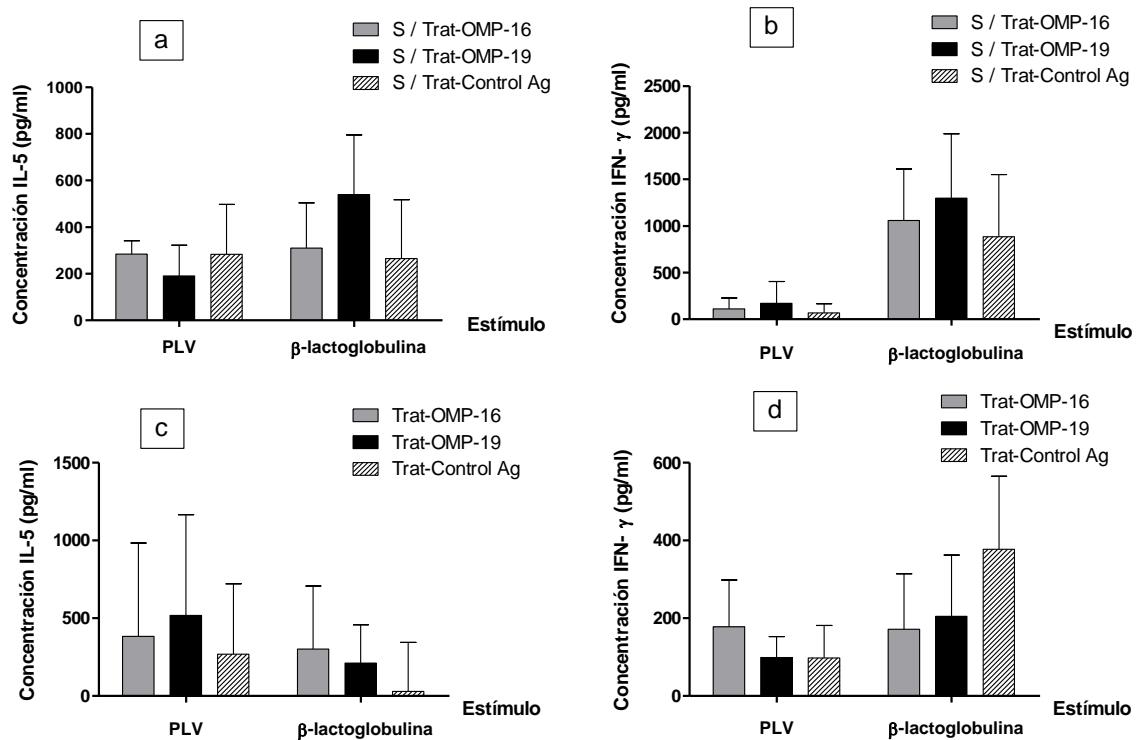


Figura 41. Concentración de citoquinas en los sobrenadantes de cultivos de esplenocitos medidas por ELISA de captura. Corresponden a ratones sensibilizados y tratados (a y b) o tratados solamente (c y d), en presencia de PLV o β -Lg, para IL-5 (a y c) e IFN- γ (b y d).

En general se puede observar, que cuando las células son estimuladas con β -lactoglobulina, se encuentran las mayores diferencias en los niveles de citoquinas entre los

animales sensibilizados y que luego recibieron alguno de los tratamientos, y los que sólo recibieron alguno de los tres tratamientos. En este caso, se observa que en los primeros, los valores de IL-5 (levemente), y los de IFN- γ son superiores, respecto a los niveles encontrados en los animales que sólo recibieron uno de los tratamientos, pero esto son solo tendencias, y carecen de significado estadístico.

Por lo tanto, ninguno de los tratamientos realizados induce un perfil de citoquinas diferente del observado con el control de Ag. Esto coincide con los niveles de anticuerpos séricos encontrados, donde no se observa que la administración de proteínas de *B. abortus* en estas condiciones induzca una inmunomodulación. Además este perfil indica que estas proteínas actuarían como adyuvantes generando linfocitos T de fenotipo Th1 y Th2.

2.3. a- Pruebas *in vivo*

• Análisis de los signos clínicos locales y sistémicos inducidos luego del desafío oral

El desafío oral se realizó una vez concluida la sensibilización de los animales con TC junto a PLV, con el fin de confirmar mediante una prueba *in vivo* la activación específica hacia un perfil Th2 en estos ratones antes de iniciar la aplicación de los tratamientos.

Los resultados del mismo pueden verse en la **figura 42**. En el grupo de animales sensibilizados se observó un aumento en el rascado de la nariz y cabeza en la mayoría de los animales, enrojecimiento alrededor de la nariz, edema en nariz y boca, pelo erizado, y baja actividad con dificultad para respirar en algunos animales. Además la mitad de los animales mostró inactividad incluso post estímulo, observándose convulsiones en algunos animales.

En el grupo de animales que no recibieron tratamiento alguno, no se observó ningún comportamiento atípico, salvo un aumento en el frotado y rascado de la nariz en algunos animales.

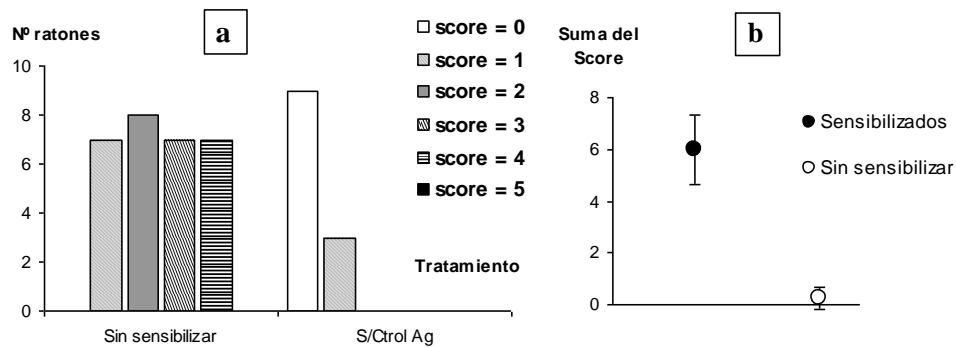


Figura 42. Signos clínicos locales y sistémicos inducidos luego del desafío oral. En **a** se grafica el número de animales que presenta cada uno de los signos en cada grupo, y en **b** se muestra el promedio y la DS de la suma de los scores obtenidos para cada ratón dentro de los grupos.

Estos resultados conciden con los niveles de IgE elevados encontrados antes de iniciar el tratamiento con las OMP de *B. abortus*. De esta manera nos aseguramos que los animales se encuentren previamente sensibilizados y con un score de signos clínicos elevado al desafío oral.

• **Prueba de Hipersensibilidad retardada (DTH)**

Los ratones fueron inoculados por vía id con PLV en la almohadilla plantar en de una de sus extremidades traseras y con solución fisiológica en la otra. A las a las 72 horas, se midieron la altura y el ancho de las patas traseras, con estos valores se calculó el perímetro de una elipse y se graficó la diferencia en los valores de estos (lo que representaría la diferencia en la inflamación) entre la pata inyectada con leche y la inyectada con solución fisiológica (control negativo), como puede verse en la **figura 43**.

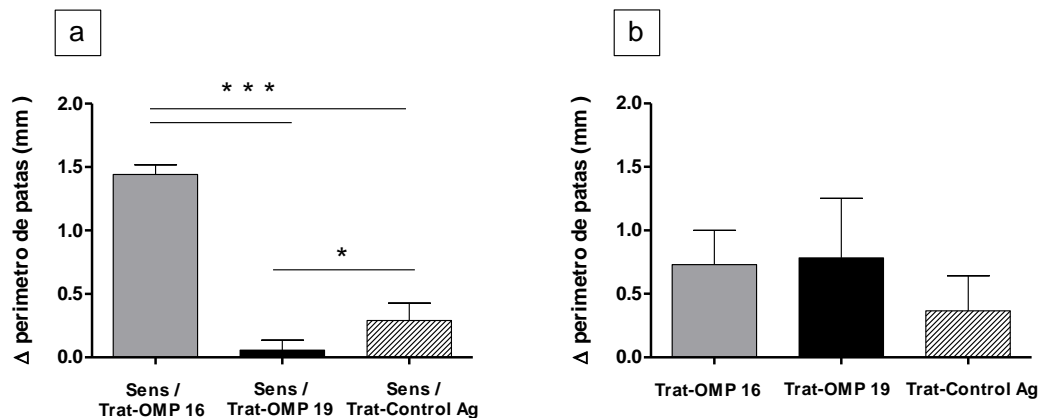


Figura 43. Resultados de la DTH medidos a las 72 hs de la inoculación. Diferencia entre los perímetros de las patas traseras (inoculada con PLV vs inoculada con solución fisiológica) calculados a partir del alto y el ancho de las mismas. En **a)** ratones sensibilizados y luego tratados y en **b)** ratones que sólo recibieron el tratamiento. Se grafican los promedios \pm la DS. (***) $p < 0,001$, * $p < 0,05$).

La prueba de hipersensibilidad retardada mostró resultados con diferencias estadísticamente significativas en los animales que primero fueron sensibilizados y después recibieron un tratamiento, como puede verse en la **figura 43 a**. Los ratones tratados con OMP-16 mostraron las mayores diferencias en el perímetro de las patas traseras, siendo estos valores estadísticamente superiores a los observados en los animales que recibieron como tratamiento OMP-19 o PLV solamente. En el grupo tratado con PLV también se obtuvieron valores estadísticamente mayores a los obtenidos en el grupo sensibilizado y luego tratado con OMP-19. Sin embargo esta mayor respuesta Th1 no se corresponde a nivel sistémico con los niveles de los distintos isotipos específicos o en los niveles de citoquinas secretadas por esplenocitos.

En los animales que solamente recibieron el tratamiento no se observaron diferencias significativas si bien la tendencia parece indicar que las respuestas más altas se obtienen cuando se realizan los tratamientos con OMP- 16 y 19.

En conclusión, no se observó una modulación clara de la respuesta Th2 previamente instaurada empleando proteínas de membrana de *B. abortus*.

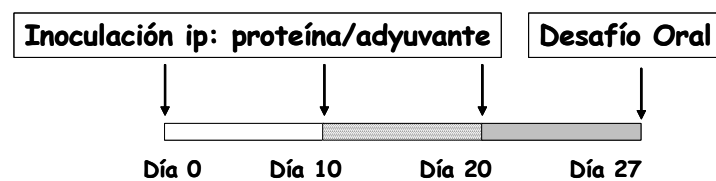
Capítulo III

3.1.- UTILIZACIÓN DEL MODELO MURINO DE ALERGIA ALIMENTARIA PARA LA EVALUACIÓN DE LA REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE ALERGENOS DE LECHE DE VACA Y SOJA

Sobre la base de resultados previos del grupo en los cuales se demostró que existe una reactividad cruzada entre caseínas bovinas y alérgenos de soja^{167,168}, decidimos aplicar el modelo murino de alergia alimentaria desarrollado para evaluar *in vivo* la alergenidad cruzada. Hemos demostrado que α -, β - y κ -caseínas presentan epitopes que son compartidos por glicininas 11S (A5A4B3) y 7S (subunidad α de la β -conglucina) a través del empleo de anticuerpos específicos de PLV (antisueros obtenidos en cabras y conejos, y anticuerpos monoclonales) en distintos tipos de inmunoensayos. Posteriormente estudiamos y confirmamos dicha reactividad cruzada inmunológica empleando sueros de pacientes alérgicos a PLV, sin indicios de estar sensibilizados a proteínas de soja en base a la información de la historia clínica. Estos sueros contienen anticuerpos IgE capaces de reconocer PLV y proteínas de soja por lo cual estos componentes contienen epitopes B y T compartidos. Hemos obtenido estas proteínas de soja en forma recombinante, y observamos que mantienen la reactividad cruzada por lo cual descartamos que la misma se deba a la presencia de hidratos de carbono conservados. Finalmente nuestro objetivo fue demostrar la reactividad cruzada en un sistema *in vivo* para lo cual decidimos emplear el modelo murino de alergia alimentaria para evidenciar la presencia de anticuerpos IgE en la superficie de los mastocitos y basófilos, que reconozcan las proteínas de reactividad cruzada y de esta manera inducir signos clínicos post-desafío con soja en animales sensibilizados a PLV. Además quisimos evaluar la eficiencia de nuestro protocolo de sensibilización por vía *ip*, cuando utilizamos proteínas de soja, y la existencia en el suero de estos animales de anticuerpos que reconozcan a PLV.

Se agruparon ratones BALB/c hembras, de 4 semanas y media de edad, en 3 lotes. La inoculación se realizó por vía *ip* utilizando como antígeno proteínas de leche de vaca o un extracto proteico obtenido a partir de porotos de soja, y como adyuvante Al(OH)₃. De esta

manera, un grupo de animales fue sensibilizado con PLV e Al(OH)₃ (lote **Sensibilización Leche**), otro grupo fue inoculado con el extracto de soja (PS) e Al(OH)₃ (lote **Sensibilización Soja**) y el tercer grupo fue inoculado exclusivamente con el adyuvante (lote **Control**) (ver **esquema 9**). Se realizó un solo desafío oral, el cual consistió en administrar por vía ig, a la mitad de los animales pertenecientes a cada uno de los lotes, PLV, y a la otra mitad PS. Las cantidades de proteínas de leche empleadas en el desafío oral son superiores a las de soja dado que las caseínas se degradan marcadamente en su paso por el tracto gastrointestinal. Las proteínas de soja presentan una mayor estabilidad térmica y a la degradación enzimática.



Esquema 9

Los días 0, 10 y 20 se inocularon por ratón:

15 µg de PLV + 0,5 mg de Al(OH)₃, para el grupo denominado **Sensibilización Leche**.

15 µg de proteínas de soja + 0.5 mg de Al(OH)₃, para el grupo denominado **Sensibilización Soja**.

0.5 mg de Al(OH)₃, para el grupo denominado **Control**.

Desafío oral: administración de 30 mg de PLV, o con 5,28 mg de proteínas de soja.

Caracterización de la respuesta inmune

1.1. a- Pruebas *in vitro*

• Detección de anticuerpos séricos

En la **figura 44** se muestran los resultados obtenidos para la detección de IgE sérica específica para PLV y de PS. En los ratones sensibilizados con PLV (grupo **Sens Leche**) se observa un aumento estadísticamente significativo en los niveles de IgE específica contra PLV, a lo largo del plan de inmunización. En cambio los niveles de este anticuerpo en el suero de los animales sensibilizados con PS (grupo **Sens Soja**) no muestran valores diferentes a los obtenidos en el grupo **Control**.

Con respecto a los niveles de IgE específica para PS, se observan diferencias estadísticamente significativas entre los animales sensibilizados (grupos **Sens Leche** y **Sens Soja**) y el grupo **Control** en los días 20, y 41. Sin embargo estas diferencias posiblemente carecen de relevancia biológica, aunque pueden expresarse como una tendencia. Entre los animales sensibilizados ya sea con PLV o con PS, los valores obtenidos no son estadísticamente diferentes entre si.

Por lo tanto en el grupo de animales sensibilizados con PLV fue posible detectar anticuerpos IgE específicos para PS, mientras que en los animales sensibilizados con PS no se detectaron anticuerpos específicos de PLV. Sin embargo, los niveles de IgE específica en el grupo **Sens Soja** fueron menores a los esperados de una extrapolación realizada a partir de resultados obtenidos cuando se utilizan PLV como antígeno para la sensibilización. Esto podría deberse en principio a que se trata de antígenos distintos y por lo tanto no se puede predecir el comportamiento a observar; o al hecho de que el alimento contiene PS, lo cual dificulta la ruptura del estado de tolerancia contra este alérgeno, haciendo que la respuesta inmune inducida sea más leve que lo esperado.

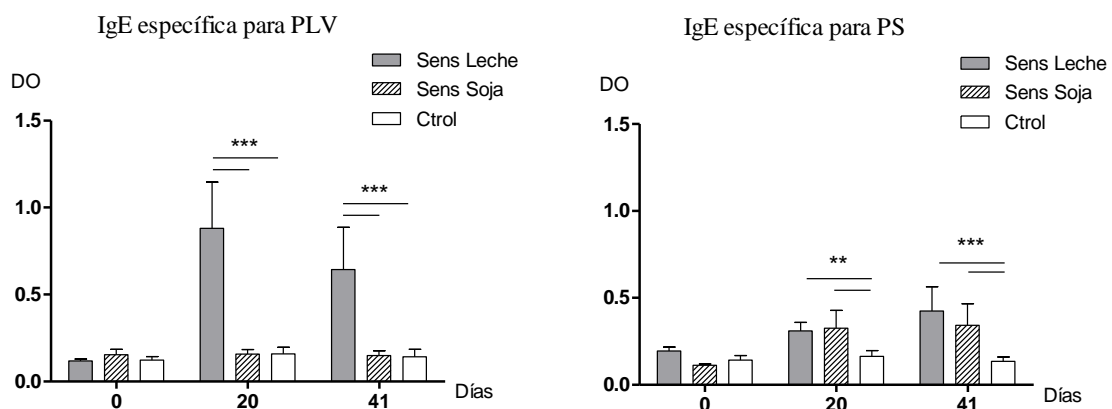


Figura 44: IgE específica para PLV y para proteínas de soja (PS) medidas por EAST. Valores promedio de $DO \pm DS$ (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$)

En la **figura 45** se muestran los resultados obtenidos para la determinación de IgG1 específica para PLV y PS. En los animales sensibilizados con PLV se observa un aumento estadísticamente significativo en los niveles de IgG1 específica para PLV a los días 16, 20 y 41 respecto a los valores obtenidos en el grupo sensibilizado con PS (grupo **Sens Soja**) y el

grupo **Control**. También se observa en este grupo niveles de este anticuerpo contra PS significativamente mayores a los del grupo **Control**.

En el grupo **Sens Soja** se observa un incremento estadísticamente significativo en los niveles de IgG1 específica para PS respecto a los valores obtenidos para el grupo **Sens Leche** y el grupo **Control**. Sin embargo no se observa en este grupo un aumento en los niveles de este anticuerpo específicos para PLV, mientras que en los animales sensibilizados con PLV sí se observa un incremento en los niveles de este isotipo específicos para PS.

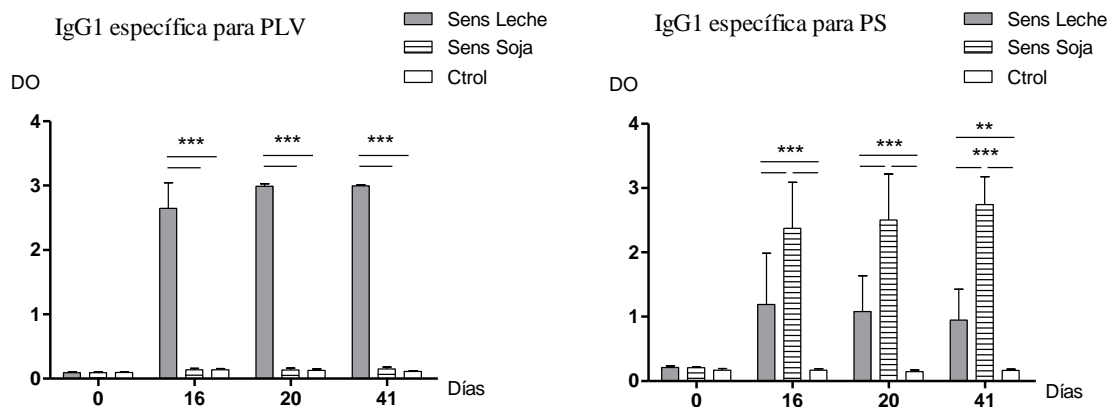


Figura 45: IgG1 específica para PLV y PS medida por ELISA indirecto. Valores promedio de DO \pm DS (***) $p < 0,001$; ** $p < 0.01$).

En la **figura 46** se muestran los resultados obtenidos para la determinación de IgG1 específica para las fracciones 7S y 11S de soja. Se observa un aumento estadísticamente significativo para los niveles de este anticuerpo específico para ambas, a los días 27 y 41 en el grupo **Sens Soja** respecto al grupo **Control**. Un comportamiento similar se observa para el grupo **Sens Leche**, siendo el aumento en los niveles de este anticuerpo más marcado para la fracción 11S. Por lo tanto pudimos evidenciar la existencia de anticuerpos de isotipo IgG1 específicos en los animales sensibilizados con PLV que presentan reactividad cruzada con las fracciones 7S y 11S de las globulinas de soja.

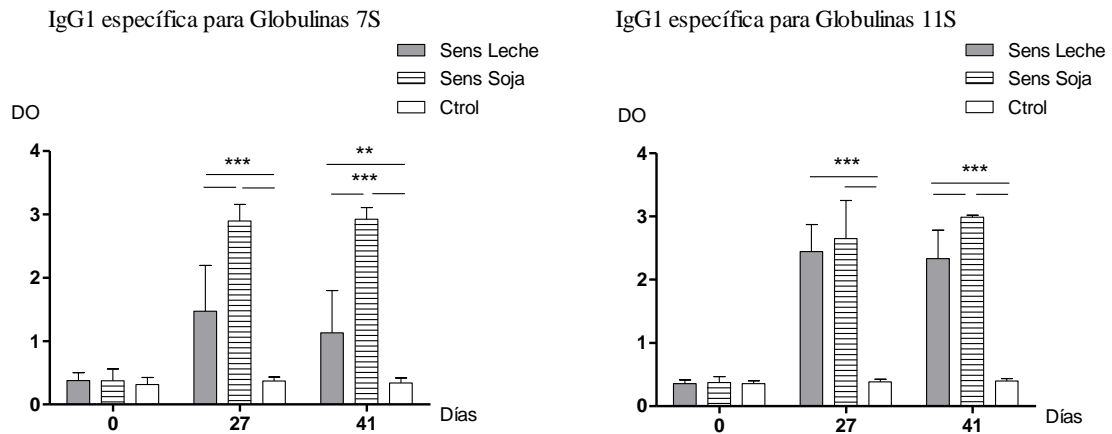


Figura 46: IgG1 específica para las globulinas 7S y 11S medida por ELISA indirecto. Valores promedio de $DO \pm DS$ (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$).

En la **figura 47** se muestran los resultados obtenidos para la determinación de IgG2a específica para PLV y PS en el suero de estos animales. Se observa un aumento estadísticamente significativo en los valores de IgG2a específicos para PLV en los ratones sensibilizados con PLV, a los días 20 y 41, respecto a los ratones del grupo **Control** y los del grupo **Sens Soja**. No se observa un aumento estadísticamente significativo en los niveles de este anticuerpo en el grupo de animales sensibilizados con PS. Con respecto a los anticuerpos específicos para PS, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos para ninguno de los tiempos estudiados. Sin embargo si analizamos el comportamiento de estos grupos a lo largo del tiempo (figura no mostrada), se producen aumentos significativos entre los niveles obtenidos el día 0 y el día 41 (p (**Sens Leche**) $< 0,01$, p (**Control**) $< 0,01$, p (**Sens Soja**) $< 0,01$).

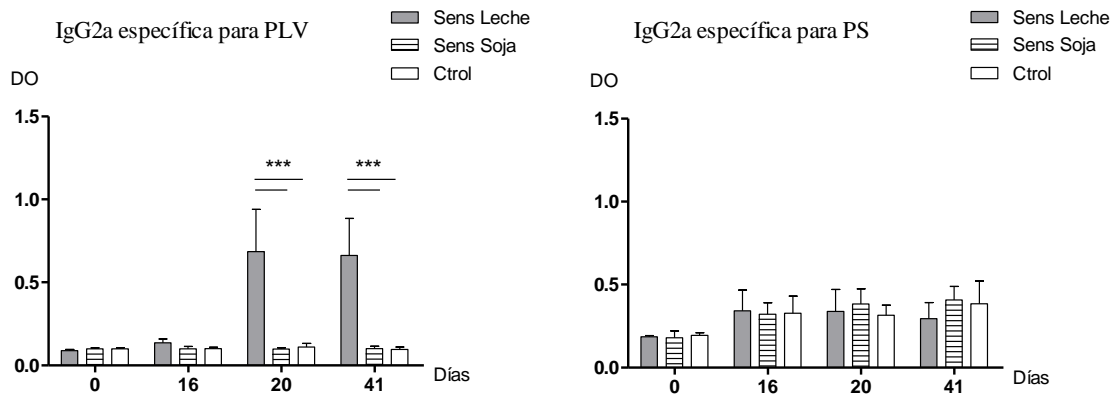


Figura 47: IgG2a específica para PLV y PS medida por ELISA indirecto. Valores promedio de DO \pm DS (***) $p < 0,001$).

En conclusión, en los animales sensibilizados con PLV, se observó la producción, como era de esperar en base a los resultados mostrados previamente en esta tesis, de anticuerpos específicos de distintos isotipos (IgE, IgG1 e IgG2a) para PLV. También se encontraron niveles estadísticamente significativos respecto a los controles de anticuerpos específicos para PS de los isotipos IgE, e IgG1.

Los ratones sensibilizados con PS mostraron una respuesta débil en cuanto a la producción de anticuerpos del isotipo IgE específicos para PS, pero si se produjo un aumento en los niveles de IgG1 específica para este alergeno. Además estos anticuerpos no reconocieron a las PLV.

Con respecto a la IgG2a específica para PS se observa una respuesta llamativa. Los tres lotes de ratones, los sensibilizados con PLV o con PS así como los animales del grupo **Control** (inoculados con el adyuvante solamente) mostraron un aumento a medida que transcurre el tiempo en los valores de este anticuerpo. Si bien este aumento es estadísticamente significativo, podría no ser relevante fisiológicamente (la mayor diferencia entre las DO promedio es de 0,22, y se observa en el lote **Sens Soja** entre el día 0 y el 41).

• Ensayo de proliferación de celular

Una vez concluido el desafío oral, se sacrificaron ratones pertenecientes a los lotes **Sens Leche** y **Control**, se extrajeron los bazos y se cultivaron los esplenocitos a fin de evaluar el índice de proliferación linfocitario antígeno-específico por incorporación de

timidina tritiada a las células desafiadas con los antígenos de interés. En la **figura 48** se muestran los resultados obtenidos en este ensayo.

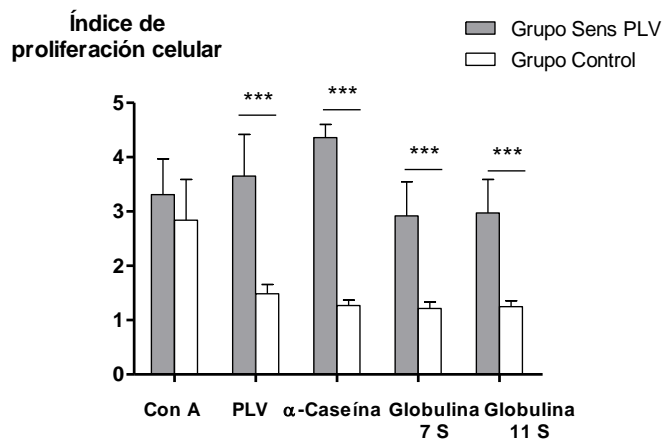


Figura 48: Índice de proliferación celular, medido por incorporación de timidina tritiada. Se grafican los valores obtenidos con cada uno de los estímulos (PLV, α -caseína, y las fracciones 7S y 11S de globulinas de soja), relativos a la incorporación de timidina tritiada en los cultivos control, tratados con medio RPMI solamente. Estos resultados corresponden a un experimento representativo.

Se evaluó el efecto del agregado de PLV, α -caseína, y de las fracciones 7 S y 11 S de proteínas de soja. Se observa proliferación de linfocitos T específicos para PLV y para ambas fracciones de PS en los animales sensibilizados con PLV.

Por lo tanto la estimulación por vía ip con $Al(OH)_3$ y PLV, induce la activación de linfocitos T que proliferan frente a antígenos presentes en la leche bovina, así como frente al extracto de proteínas de soja en los animales del grupo **Sens PLV**. Estos resultados sugieren que las proteínas de soja presentan además epítopes T compartidos con las PLV.

1.1. b- Pruebas *in vivo*

• Análisis de los signos clínicos locales y sistémicos inducidos luego del desafío oral

Los animales pertenecientes a cada uno de los lotes (**Sens Leche**, **Sens Soja** y **Control**) fueron separados al azar en dos grupos con el fin de desafiar a uno con PLV y al otro con PS. Los signos clínicos locales y sistémicos observados en estos animales se pueden ver resumidos en la **figura 49**.

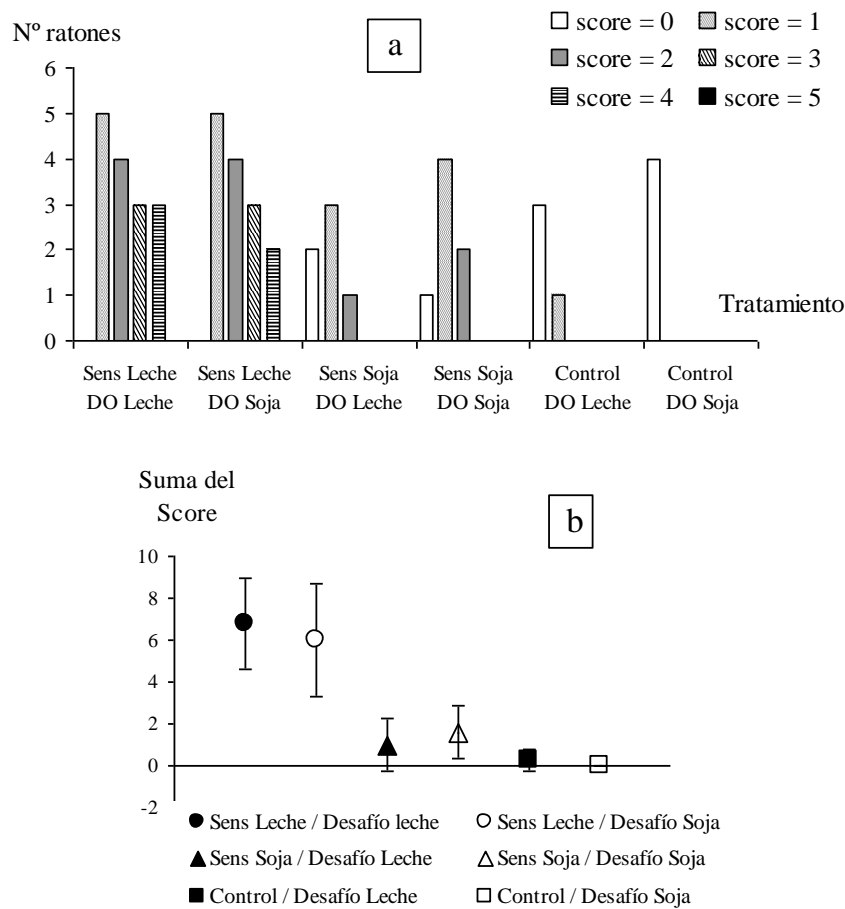


Figura 49: Signos clínicos locales y sistémicos inducidos luego del desafío oral. En **a** se grafica el número de animales que presenta cada uno de los signos en cada grupo. DO: Desafío Oral. En **b** se muestra el promedio \pm DS de la suma de los scores obtenidos para cada ratón dentro de los grupos.

En el grupo **Sens Leche**, los ratones desafiados con PLV y con PS mostraron un comportamiento similar, observándose un aumento en el rascado de nariz y cabeza en todos los animales, edema y enrojecimiento alrededor de la nariz y los ojos, disminución en la actividad, pelo erizado y dificultad para respirar en algunos animales. Los animales sensibilizados con PS mostraron signos mas leves post desafío oral, no encontrándose diferencias entre los animales desafiados con PLV o con soja. Se observó en estos animales un aumento en el rascado de nariz y cabeza, pelo erizado y una disminución en la actividad de algunos animales. En el grupo control no se observaron modificaciones en el comportamiento de los animales tras el desafío con los dos alergen. Por lo tanto, la sensibilización con PLV y el desafío oral producen signos sistémicos más marcados que los

de los animales sensibilizados con PS, y la exposición cruzada a los alérgenos es capaz de desencadenar signos clínicos.

En base a estos resultados podemos concluir que la sensibilización con PLV origina una respuesta inmune con anticuerpos específicos que muestran reactividad cruzada con PS mediada por los isotipos IgG1 principalmente y en menor medida IgE. Esto se correlaciona con los resultados obtenidos en el ensayo de proliferación celular, y la respuesta observada tras el desafío oral. En el primero observamos que los LT generados durante la sensibilización con PLV, proliferaron en presencia de PS (no observándose diferencias en la misma entre las fracciones 7S y 11S obtenidas por ultracentrifugación). Los signos clínicos observados luego del desafío de los animales con PS y con PLV fueron muy similares, pudiendo esto indicar que la IgE que reconoce a los epítopes de reactividad cruzada en la soja se encontraba unida a sus receptores específicos en la superficie de mastocitos en los tejidos periféricos.

Con respecto a los animales sensibilizados con PS se observó un aumento en los niveles de IgG1 específica y un leve aumento de IgE específica para PS, no detectándose reactividad cruzada con las PLV para ninguno de estos dos isotipos. El desafío oral ya sea con PS como con PLV mostró la aparición de signos clínicos muy leves en estos animales. Estos resultados tomados en conjunto podrían estar indicando que bajo estas condiciones de inmunización, BALB/c no es una buena cepa para inducir una respuesta Th2 contra PS, o deberían optimizarse las condiciones de sensibilización si se desea obtener un modelo de alergia alimentaria a proteínas de soja. Sin embargo, no podemos pasar por alto el hecho de que el alimento que consumen los animales contiene proteínas de soja, por lo cual no podemos descartar tampoco la inducción de tolerancia que esta ocasiona en los mismos previo al plan de inmunización, debido a la ingestión de componentes derivados de las PS a través de la leche materna, y posteriormente debido a la ingestión a través del alimento de las PS presentes en el mismo.

De esta manera podemos concluir que en los animales sensibilizados con PLV se observó una respuesta contra las PLV, la cual demostró una reactividad cruzada con PS, a través de pruebas *in vivo* y ensayos *in vitro*, de manera similar a la reactividad cruzada entre PLV y PS observada en humanos, y descrita previamente por nuestro grupo. Por lo tanto en conjunto estos resultados confirman que además de existir una reactividad cruzada inmunoquímica entre caseínas bovinas y proteínas de soja, existe una alergenidad cruzada

entre ambos sistemas filogenéticamente no relacionados. Estos resultados nos llevan a concluir que existen epitopes B (G y E) y T conservados entre caseínas y proteínas de soja.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo de tesis se pusieron a punto las condiciones para obtener un modelo murino de alergia alimentaria a proteínas de leche de vaca. Como consecuencia del desarrollo de este trabajo se generaron dos modelos que por sus diferentes cualidades resultan exitosos. Uno, obtenido a partir de la sensibilización sistémica de los animales, y el otro, obtenido mediante el uso de un adyuvante mucosal, que permite la activación de la respuesta inmune directamente en el intestino, aproximándose de esta manera más a las alergias alimentarias tal cual se observan en humanos. En una segunda etapa, aplicamos estos modelos para estudiar la reactividad cruzada *in vivo* entre dos sistemas no relacionados, como son las proteínas de la leche de vaca y las proteínas de soja; y también la eficiencia de distintos agentes inmunomoduladores como posibles estrategias terapéuticas. Teniendo en cuenta la complejidad de las enfermedades alérgicas, es prácticamente imposible contar con un único modelo que represente los diversos aspectos de la patología, por lo cual, contar con diferentes modelos de la enfermedad permite estudiar estos aspectos por partes, permitiendo que cada modelo aporte distintas “piezas” para el armado del “rompecabezas”.

En principio, y como se menciono anteriormente, los modelos animales de enfermedades alérgicas constituyen herramientas de gran relevancia para el estudio de los diferentes mecanismos moleculares y celulares tanto de la fase inductora (sensibilización alérgica), como la efectora (instauración del proceso inflamatorio), así como también para el estudio de nuevas estrategias terapéuticas, y la evaluación de la alergenidad y los riesgos de los cultivos de plantas transgénicas conteniendo nuevas proteínas⁹⁷. Debido a que los ratones no desarrollan espontáneamente alergia, el estado de tolerancia natural que presentan estos animales debe “romperse” a través del uso de adyuvantes, aunque esto constituya una limitación en el estudio de la sensibilización o fase inductora¹¹⁶. Con el fin de obtener un modelo murino de alergia alimentaria, decidimos comparar la eficiencia de distintos protocolos de inmunización en los cuales utilizamos diferentes adyuvantes (Al(OH₃), AFC, ACI y TC) para inducir una activación Th2 específica en ratones de la cepa BALB/c, con producción de anticuerpos IgE específicos, y que ponga en juego mecanismos de hipersensibilidad luego de un desafío oral con el alérgeno.

Debido a que cada cepa de ratones posee una base genética diferente, resulta obvio que cada una de estas puede mostrar una respuesta inmune única y particular cuando son

sensibilizadas con un alérgeno, siendo el tipo de alérgeno a utilizar una de las variables que afectarán la magnitud y el tipo de respuesta obtenida dentro del contexto genético determinado por la cepa¹⁹⁹. Nosotros, elegimos la cepa BALB/c para realizar nuestros experimentos, por varios motivos. Es sabido que estos ratones tienen cierta tendencia a desarrollar respuestas inmunes Th2 con producción de IgG1, utilizadas ampliamente para determinar la capacidad de sensibilización de nuevas proteínas¹⁰⁰; y que existen una gran cantidad de ratones knockout disponibles con la base genética de esta cepa, además de tratarse de la una cepa disponible en nuestro medio.

Primero utilizamos adyuvantes sistémicos (Al(OH)₃, AFC y AFI) para inducir la sensibilización de los animales contra PLV. Los adyuvantes que contienen aluminio son frecuentemente utilizados y su uso está permitido para vacunas de aplicación en veterinaria e incluso en humanos. Sin embargo no se conoce con exactitud el mecanismo mediante el cual estimula la respuesta inmune con un perfil predominantemente Th2¹²², si bien en publicaciones recientes se han dilucidado algunos de los eventos moleculares y celulares que dispara el mismo^{121,125}. El plan de inmunización por vía ip con Al(OH)₃ indujo un aumento en los niveles séricos de IgE total y específica para PLV, e IgG1 específica (muy superior al resto de las subclases de IgG analizadas), en cambio cuando utilizamos AFC o AFI como adyuvantes observamos una activación inmunológica general, la cual se manifiesta por el aumento en los niveles todos los isotipos de anticuerpos estudiados, no orientándose la respuesta inmune humoral hacia ningún perfil en especial. Por lo tanto, el uso de Al(OH)₃ generó una respuesta humoral con un perfil de activación Th2 más claro que con los otros adyuvantes utilizados, como era de esperarse.

De manera acorde con estos resultados, pudimos evidenciar la presencia de linfocitos T específicos para PLV en los animales sensibilizados sistémicamente con cualquiera de estos tres adyuvantes, a través de la medida del índice de proliferación linfocitaria en cultivos de esplenocitos. Las pruebas humorales *in vitro* mencionadas previamente así como las celulares, correlacionaron adecuadamente con las pruebas *in vivo*, ya que pudimos demostrar la aparición de signos clínicos compatibles con una alergia alimentaria después de realizar el desafío oral con el alérgeno, y la obtención de resultados positivos cuando se realizaron las pruebas cutáneas (PC y TCP).

De esta manera demostramos que es posible inducir mediante la aplicación de un plan de inmunización sistémico (utilizando $\text{Al}(\text{OH})_3$ como adyuvante) en ratones BALB/c una respuesta inmune Th2 específica y que la posterior administración oral del alérgeno induce manifestaciones clínicas, por lo que este modelo muestra semejanzas con algunos aspectos de las alergias alimentarias observada en humanos. Resultados similares utilizando este adyuvante han sido observados por otros grupos de trabajo¹⁹⁹⁻²⁰¹. Inclusive recientemente se ha visto que cuando se administra $\text{Al}(\text{OH})_3$ por vía oral junto al alérgeno se induce una respuesta Th2 antígeno específica en ratones BALB/c¹¹³. La mayoría de los modelos animales de asma se inducen por medio de una sensibilización sistémica con el alérgeno junto a $\text{Al}(\text{OH})_3$ y luego se realizan los desafíos con el alérgeno en las vías aéreas¹⁹⁹. Brant y col.¹⁰⁵, mediante un protocolo de sensibilización con este adyuvante seguido de varios desafíos por vía oral con el alérgeno, obtuvieron un modelo de diarrea alérgica (hipersensibilidad gastrointestinal asociada a eosinofilia), observando infiltrados de eosinófilos y mastocitos en el intestino delgado de estos animales.

Tomando como base trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación en los que se ha descrito y caracterizado la reactividad cruzada *in vitro* entre proteínas de leche de vaca y proteínas de soja (naturales y recombinantes)^{167,168}, decidimos aplicar este modelo de alergia alimentaria a PLV para estudiar la reactividad cruzada *in vivo* entre estos dos sistemas (punto 3.1 de Resultados y Conclusiones). Además, nos permitió estudiar la eficiencia de este plan de inmunización sistémico con un sistema antigénico diferente.

Los animales fueron sensibilizados por vía ip con el alérgeno (PLV o PS) junto a $\text{Al}(\text{OH})_3$, obteniéndose una respuesta inmune diferente con cada uno de los antígenos. En los animales sensibilizados con PLV, además de la respuesta humoral previamente descrita, pudimos observar anticuerpos de reactividad cruzada para PS de los isotipos IgE e IgG1, reconociendo este último isotipo a las fracciones 11S y 7S obtenidas por ultracentrifugación. También observamos que a partir de cultivos de esplenocitos se inducía la activación y proliferación de linfocitos T frente a proteínas de la leche de vaca, como así también frente a proteínas de soja y que el desafío por vía oral ya sea con PLV o PS producía signos clínicos de intensidad similar. Estos datos, en conjunto demuestran la existencia de una reactividad cruzada entre estos sistemas *in vivo*. Además sugieren la presencia en las PS de epitopes B y T compartidos con las PLV.

En cambio cuando se sensibilizaron los animales con PS, observamos en general una respuesta inmune Th2 moderada, con un aumento en los niveles de IgG1 específica y un leve aumento de la IgE específica para PS, no detectándose reactividad cruzada con las PLV para ninguno de estos dos isotipos. Los signos clínicos observados tras la administración oral ya sea de PS o PLV fueron muy leves. Si bien se está utilizando un antígeno diferente, lo cual implica que la respuesta puede no ser la misma que la observada con PLV, tampoco podemos descartar otro tipo de causas. Esta respuesta inmune de baja intensidad podría deberse a que las condiciones de sensibilización no son las óptimas, o al hecho de que el alimento contiene PS en su composición, las cuales podrían estar induciendo tolerancia, con lo cual las condiciones para romper este estado de tolerancia deberían ser más drásticas. Si bien se trata de un modelo inducido de manera diferente, Gizzarelli y col.¹⁰⁰, observaron que la administración de TC junto a un extracto de soja no producía en ratones BALB/c un aumento en los niveles de IgE específica para este antígeno, pero cuando los animales eran mantenidos con una dieta libre de soja por dos generaciones, esta sensibilización si inducía una respuesta inmune con un perfil Th2. Nuestro protocolo se basa en inmunizaciones sistémicas, las cuales probablemente inducen respuestas de mayor intensidad, razón por la cual nosotros si pudimos observar una respuesta, aunque sea leve. Christensen y col²⁰² mostraron que ratones de esta misma cepa que reciben una dieta que contiene PS entre sus componentes muestran niveles estadísticamente superiores de γ -globulinas específicas para soja respecto a ratones mantenidos bajo una dieta libre de soja. Cuando estos ratones son inmunizados por vía ip con AFI junto a PS, la relación de inmunoglobulinas totales específicas para soja se invierte, es decir aumentan en el grupo de animales que tenían una dieta libre de soja. Los autores concluyen que la ingestión de proteínas de soja a través de la dieta induce una respuesta de anticuerpos específicos para soja al mismo tiempo que induce un estado de tolerancia oral frente a este alérgeno.

Con el fin de aproximarnos más al cuadro observado en la alergia alimentaria en humanos, estudiamos los efectos inducidos por la sensibilización por vía intragástrica utilizando como adyuvante la Toxina Colérica. En los últimos años se han publicado trabajos en los cuales utilizando este adyuvante se han inducido respuestas alérgicas en ratones con diferentes bases genéticas, a diversos alérgenos alimentarios coadministrados

por vía ig (mani^{104,107,203}, proteínas de leche de vaca^{103,107}, camarones^{112,201}, ovoalbumina^{102,109,111,204}, y proteínas de soja^{111,205} entre otros). Nosotros observamos que en ratones de la cepa BALB/c la administración simultánea de Toxina Colérica junto a PLV indujo un aumento en los niveles sérico de IgE e IgG1 específicas, pero no de IgG2a. Además observamos un aumento en la concentración de IL-5 e IL-13, pero no de IFN- γ , en los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos provenientes de ratones sensibilizados respecto a los animales del grupo control de adyuvante, cuando eran estimulados *in vitro* con el antígeno. El desafío oral con PLV indujo en los animales sensibilizados la aparición de signos clínicos compatibles con una reacción alérgica, siendo algunos de los signos más comúnmente observados (como disnea e inactividad ante un estímulo) compatibles con síntomas que frecuentemente se presentan durante una respuesta anafiláctica⁹⁴. Esto se correlaciona con los niveles elevados de histamina plasmática hallados en este grupo de ratones 30 minutos después de realizar el desafío oral con el antígeno. Las pruebas cutáneas positivas observadas ponen de manifiesto la presencia de IgE específica funcional en el suero de estos animales. Todos estos hallazgos en conjunto indican que la sensibilización intragástrica con Toxina Colérica induce en estos animales una respuesta inmune Th2, con la consiguiente síntesis y secreción de IgE, la cual al unirse a sus receptores específicos en mastocitos tisulares media la activación de los mismos frente al antígeno específico. La activación de estas células genera el incremento en los niveles circulantes de histamina y la inducción de las distintas reacciones inflamatorias observadas que se manifiestan con signos clínicos locales y sistémicos compatibles con una reacción alérgica.

Si bien estos resultados difieren de los publicados por el grupo de Morafo y col.¹⁰⁶, quienes realizaron un estudio comparativo entre dos cepas de ratones: BALB/c y C3H/HeJ, observando diferencias en la susceptibilidad a alérgenos alimentarios entre estas, denominándolas respectivamente como baja y alta respondedora. En ese trabajo, observaron que ratones BALB/c inoculados con TC junto a PLV eran “genéticamente resistentes” a la alergia a leche de vaca. Sin embargo, como mencionamos previamente, nosotros pudimos observar una respuesta Th2 específica para PLV en ratones BALB/c mediante el uso de TC. Nuestros resultados coinciden con resultados de otros grupos, quienes utilizando protocolos de sensibilización similares con TC por vía ig en esta cepa de ratones, inducen respuestas que reproducen ciertos aspectos de las alergias alimentarias

contra OVA^{109,206}, soja^{100,111}, camarón¹¹², maní¹⁰⁷ y leche^{107,108}. Incluso se ha visto que la exposición a PLV por vía transdérmica induce una respuesta Th2 específica, demostrando de esta manera que BALB/c es por lo tanto susceptible a la leche de vaca incluso en ausencia de adyuvantes¹¹⁴.

Estas diferencias halladas respecto a una cepa podrían reflejar variaciones en la activación inmunológica que dependen de las condiciones de mantenimiento de los animales en el bioterio, la flora intestinal, el alimento, etc. Además de las discrepancias antes mencionadas respecto a la cepa de ratones BALB/c, en nuestro laboratorio no logramos inducir el modelo de alergia a PLV en ratones de la cepa C3H/HeJ.

Resumiendo, hasta aquí hemos discutido el desarrollo y la caracterización de dos modelos murinos de alergia alimentaria a proteínas de leche bovina. Uno mediante la inmunización sistémica con Al(OH)₃, y el otro obtenido por sensibilización oral utilizando TC como adyuvante mucosal. Además utilizamos el primero como herramienta biológica para estudiar la reactividad cruzada entre soja y proteínas de leche de vaca. El paso siguiente fue realizar un estudio comparativo de la respuesta inmune obtenida con los dos planes de sensibilización. Pudimos observar que la producción de anticuerpos séricos era más selectiva cuando se utilizaba el plan de sensibilización oral, ya que aumentaron los niveles de IgE e IgG1 específica para PLV, pero no de IgG2a, a diferencia del plan de sensibilización con Al(OH)₃ donde aumentaron los tres isotipos específicos analizados. Por otro lado, los resultados de las pruebas *in vivo*, ya sea la respuesta al desafío oral o la prueba cutánea, mostraron resultados muy similares. En un experimento similar el grupo de Adel-Patient¹⁰⁷, comparó la respuesta inmune producida en ratones BALB/c sometidos a dos protocolos de inmunización: uno por vía ig con TC y el otro por vía ip con Al(OH)₃; pero en vez de PLV, ellos utilizaron un extracto de maní como alérgeno. Mediante estos dos protocolos pudieron observar una respuesta Th2 específica, siendo los niveles de IgE, IgG1, e IgG2a específicos de maní más elevados en el grupo sensibilizado sistémicamente. A diferencia de nuestros resultados con PLV, ellos si observaron un aumento de los niveles de IgG2a específica para maní en el grupo sensibilizado oralmente. Además pudieron observar la secreción de citoquinas Th2 (IL-4 e IL-5) en ambos grupos en cultivos de esplenocitos, observando además la producción de IFN- γ en el grupo de animales

sensibilizados con $\text{Al}(\text{OH})_3$, lo que sugiere el desarrollo simultáneo de una leve respuesta Th1, probablemente debido a la ruta de administración.

Por último, realizamos un plan de sensibilización, que consistió en inocular simultáneamente a los animales por vía ip con $\text{Al}(\text{OH})_3$ y por vía ig con TC, buscando una respuesta inmune de mayor intensidad. Pero no obtuvimos diferencias significativas ya sea con los resultados obtenidos *in vitro* como *in vivo*, con respecto al protocolo en el cual los animales son sensibilizados por vía intraperitoneal exclusivamente.

Finalmente, utilizamos los modelos murinos de alergia alimentaria a PLV previamente establecidos, para estudiar el efecto de agentes inmunomoduladores que puedan inducir una respuesta inmune Th1 específica para el alérgeno. Se sabe que la *Brucella abortus* inactivada por calor (HKBA) produce en los ratones una respuesta T independiente de la producción de anticuerpos, con elevación de citoquinas Th1, principalmente IL-12 e $\text{IFN } \gamma$, produciendo como consecuencia de esta diferenciación Th1, anticuerpos del isotipo IgG2a, y linfocitos T citotóxicos productores de $\text{IFN } \gamma$. Teniendo estos antecedentes en cuenta, decidimos evaluar el efecto que tiene la inoculación de HKBA por vía subcutánea en ratones previamente sensibilizados por vía intragástrica con TC junto a PLV, o por vía intraperitoneal con $\text{Al}(\text{OH})_3$ junto a PLV. En los ratones que habían sido sensibilizados por vía ig y luego tratados con HKBA, pudimos observar un aumento en los niveles de todos los isotipos de anticuerpos séricos analizados (IgE, IgG1 e IgG2a específicos). En cambio en los animales sensibilizados por vía ip que luego recibieron el tratamiento con la bacteria, los niveles de IgE e IgG1 específicas no mostraron diferencias respecto de aquellos que no recibieron el tratamiento con la bacteria, pero sí observamos un aumento de la IgG2a específica. Si bien no observamos en este grupo una modulación de la respuesta Th2 previamente inducida por la sensibilización ip, la inoculación indujo una respuesta inmune humoral Th1 específica. Nuestros resultados difieren en parte de los obtenidos por el grupo de Golding²⁰⁷ quienes observaron que *B. abortus* era capaz de revertir la respuesta inmune Th2 específica obtenida en ratones previamente sensibilizados con $\text{Al}(\text{OH})_3$ junto a OVA, a través de la inducción de una respuesta Th1 específica para el antígeno. En este trabajo se observa que en respuesta a la inoculación por vía ip de *B. abortus* inactivada por calor se elevan los niveles de IgG2a

específica para OVA y disminuyen los de IgE específica, observándose además un aumento en el número de células productoras de IFN γ y una disminución concomitante en el número de células productoras de IL-4. Estos autores hallaron que la inhibición de la síntesis de la IgE específica es independiente de la producción de IL-12.

En este contexto, el grupo de la Dra. Li ha utilizado bacterias inactivadas con calor (*Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*) como adyuvantes pro-Th1, para modular la respuesta Th2 en un modelo de anafilaxia a maní en ratones C3H/HeJ. Observaron que tanto la inoculación por vía sc de *Listeria monocytogenes*¹⁴⁷ junto al antígeno, como la inoculación por vía rectal de una cepa de *Escherichia coli*¹⁹⁵ transfectada con un antígeno de maní recombinante, eran capaces de revertir la activación Th2, y de esta manera inducir una inmunoregulación de la respuesta de hipersensibilidad al maní, a través del establecimiento de un perfil de activación Th1.

También evaluamos la eficiencia de las proteínas recombinantes de membrana de *B. abortus* como inmunomoduladores de la respuesta Th2 específica inducida en los ratones, ya que estas habían demostrado generar respuestas Th1 específicas^{185,198}. Si bien ninguno de los dos protocolos empleados produjo una inmunomodulación clara del perfil de respuesta observado, algunos indicios parecen indicar sin embargo, que se observó una tendencia a la misma. Por ejemplo, la administración por vía in con la bacteria de manera simultánea a la sensibilización condujo a que en el grupo que recibió el tratamiento con OMP-19 se observara un aumento en los niveles de la IgG2a específica respecto al control negativo (animales que recibieron PLV solamente por vía in), o la menor producción de IFN- γ por los esplenocitos de los ratones que recibieron OMP-16 respecto de los cultivos del control negativo. Estos resultados indicarían que probablemente la optimización de estos protocolos puede conducir a resultados más satisfactorios. En cambio, el tratamiento por vía in con LPS permitió modular la respuesta Th2, a través de la inducción de una respuesta inmune Th1 específica, demostrable por las pruebas *in vitro* (reducción en los niveles de IgE específica y aumento en los niveles de IgG2a específica) y los estudios realizados *in vivo* (mayor DTH, y una reducción en la intensidad de los signos clínicos observados post desafío oral). No se observó una inmunomodulación cuando las proteínas de *B. abortus* se inocularon por vía sc en animales previamente sensibilizados, pero en este protocolo si pudimos observar que la inoculación de PLV por vía sc induce la

producción de anticuerpos específicos de los isotipos IgE e IgG1, pero no de IgG2a. La alta prevalencia de reacciones cutáneas en chicos con ALV podría explicarse por la sensibilización que se produce como consecuencia del empleo de cremas y aceites que contienen PLV. Defectos a nivel de la regulación en la mucosa intestinal determinan que esta sensibilización alérgica frente a sucesivas exposiciones al alérgeno por diferentes vías genere las distintas manifestaciones con que se presenta una alergia alimentaria (diarrea, broncoespasmo, asma, anafilaxia, etc.). Luego la maduración del tracto intestinal con la edad, determina que se instauren los mecanismos de tolerancia oral que influyen en las manifestaciones de la patología a nivel del tracto gastrointestinal. A pesar de que existe escasa evidencia de que la sensibilización por vía cutánea es posible, hay estudios, por ejemplo, que aíslan células T específicas para el alérgeno de lesiones en la piel de pacientes con eczema²⁰⁸. Recientemente varios grupos de investigación han observado que la exposición transdérmica a alérgenos alimentarios como los de avellanas, castañas de cajú, semillas de sésamo y leche de vaca pueden inducir en modelos animales una reacción de hipersensibilidad inmediata incluso en algunos casos con evidencias de anafilaxia sistémica de proteínas^{114,209,210}.

En conclusión, en el presente trabajo de tesis hemos aplicado en ratones de la cepa BALB/c, distintos planes de inmunización, utilizando distintos adyuvantes y rutas de inmunización, y hemos caracterizado la respuesta inmune obtenida mediante el empleo de pruebas *in vitro* e *in vivo*, obteniendo dos modelos murinos de alergia alimentaria a proteínas de leche de vaca, cada uno con de sus ventajas y sus limitaciones. Pero ambos constituyen modelos que aportan información útil y confiable para la comprensión y el estudio de las enfermedades alérgicas, la reactividad cruzada entre distintos alimentos, la evaluación de nuevas estrategias terapéuticas, y para juzgar el posible riesgo que constituyen el desarrollo de alimentos modificados genéticamente, entre otros posibles usos. Nosotros, en este trabajo de tesis validamos el uso de los mismos como herramienta biológica para confirmar la reactividad cruzada entre la leche de vaca y la soja *in vivo* (como primer paso para la búsqueda de nuevos alérgenos, y la evaluación de posibles variantes hipoalérgicas obtenidas por modificaciones genéticas de semillas de soja), y la evaluación de nuevas estrategias como posibles tratamientos para las enfermedades alérgicas. Otros integrantes del grupo de trabajo han continuado los experimentos dentro

de esta línea de investigación, principalmente en el empleo de las proteínas recombinantes de membrana de *B. abortus* y proteínas de leche de vaca y soja para modular la instauración de un proceso alérgico.

CONCLUSIONES FINALES

A partir de los resultados presentados en este trabajo de Tesis Doctoral se puede arribar a las siguientes conclusiones finales:

1.- En principio, respecto al desarrollo de un modelo murino de alergia alimentaria podemos concluir que:

- Los ratones de la cepa BALB/c inoculados sistémicamente con adyuvante de Freund completo, adyuvante de Freund incompleto o con Hidróxido de Aluminio junto a leche bovina, muestran un perfil de activación Th2 antígeno-específico, demostrable a partir de las pruebas realizadas tanto *in vitro* como *in vivo*. Esta respuesta Th2 específica es más clara cuando utilizamos Hidróxido de Aluminio, haciendo de este protocolo una estrategia valida para generar un modelo de alergia alimentaria a proteínas de leche de vaca.
- La sensibilización de los ratones BALB/c con Toxina Colérica junto a leche de vaca por vía oral, genera una activación Th2 antígeno-específica más “pura” que la obtenida con Hidróxido de Aluminio. Esto, sumado a la acción directa del adyuvante sobre el intestino, le confieren un mayor atractivo a este modelo, por su semejanza con la patología observada en humanos.

2.- Por otro lado, respecto a la validación de estos modelos, a partir de su utilización como herramientas biológicas, podemos decir que:

- El modelo de sensibilización sistémica resulta apto para el estudio *in vivo* de la reactividad cruzada entre proteínas de leche de vaca y proteínas de soja.
- El empleo de *Brucella abortus* inactivada por calor no logró inducir una inmunomodulación, ya que no consigue re-direccionar la respuesta inmune Th2especifica hacia una respuesta Th1 en ninguno de los modelos murinos de alergia alimentaria, bajo los protocolos aplicados.
- El tratamiento de los animales con las proteínas recombinantes de membrana de *Brucella abortus* OMP-16 y OMP-19, ya sea por vía intranasal como subcutánea, tampoco producen una inmunomodulación clara del perfil de respuesta observado.
- El tratamiento por vía intranasal con LPS permitió modular la respuesta Th2, a través de la inducción de una respuesta inmune Th1 específica, demostrable por las pruebas *in vitro* y los estudios realizados *in vivo*, en el modelo de sensibilización oral.

APÉNDICE

SOLUCIONES

- * **PBS:** 0.14 M NaCl; 2.7 mM KCl; 1.5 mM KH_2PO_4 ; 8.1 mM Na_2HPO_4 ; pH=7,4.
- * **Buffer citrato-fosfato pH=5:** 0,11 mM Ácido Cítrico; 0,1 M Na_2HPO_4 .
- * **Buffer sustrato para fosfatasa alcalina:** 10 % (V/V) dietanolamina, 0.1 % (P/V) MgCl_2 , 0.2 % (P/V) Azida sódica; pH=9,8
- * **Buffer de sensibilización** (ELISA para la detección de anticuerpos séricos): buffer $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, 0.1 M, pH=8
- * **Buffer de sensibilización** (ELISA para la detección de IL-5 e IFN- γ en sobrenadante de cultivo): buffer $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, 0.05 M, pH=9,4
- * **Solución de lavado:** 0.05% Tween 20 en PBS.
- * **Solución de bloqueo:** (ELISA para la detección de anticuerpos séricos): 5 % (V/V) Suero equino en solución fisiológica
- * **Solución diluyente:** (EAST, ELISA para la detección de anticuerpos séricos): 3 % (V/V) Suero equino en solución fisiológica
- * **Solución diluyente:** (ELISA para la detección de IL-5 e IFN- γ en sobrenadante de cultivo): 0,5 % BSA fracción "V" (Merck); 0,1 % Tween 20 en PBS, pH=7,2 - 7,4.
- * **Solución diluyente:** (ELISA para la detección de IL-13 en sobrenadante de cultivo): y 1 % BSA fracción "V" (Merck); en PBS, pH=7,2 - 7,4.
- * **Solución de sustrato para peroxidada:** (ELISA para la detección de anticuerpos séricos y de IL-5 e IFN- γ en el sobrenadante de cultivo): 1 mg/ml de o-fenilendiamina (SIGMA) en buffer citrato-fosfato pH=5
- * **Solución de sustrato para peroxidada:** (ELISA para la detección de IL-13 en sobrenadante de cultivo): Mezcla 1:1 del Reactivo A (H_2O_2) y Reactivo B (TMB), ambos de R&D Systems.
- * **Solución de sustrato para fosfatasa alcalina:** 1 mg/ml de p-nitrofenil fosfato (SIGMA) en buffer sustrato para fosfatasa alcalina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gell PGH, Coombs RRA, eds, 1963. *Clinical Aspects of Immunology*. 1st ed. Oxford, England: Blackwell.
2. Johansson, S.G. et al. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* **56**, 813-824 (2001).
3. Sampson HA, Muñoz-Furlong A, Campbell RL & et al Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report-Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *J Allergy Clin Immunol* 2006, 117:391–397.
4. Baeza, M.L. & Zubeldia, J.M. Immunology of anaphylaxis: lessons from murine models. *Curr Allergy Asthma Rep* **7**, 49-55 (2007).
5. Nauta, A.J. et al. Mechanisms of allergy and asthma. *Eur. J. Pharmacol* **585**, 354-360 (2008).
6. Broide, D.H. Immunomodulation of allergic disease. *Annu. Rev. Med* **60**, 279-291 (2009).
7. Taussig, L.M. et al. Tucson Children's Respiratory Study: 1980 to present. *J. Allergy Clin. Immunol* **111**, 661-675; quiz 676 (2003).
8. Wills-Karp, M., Santeliz, J. & Karp, C.L. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat. Rev. Immunol* **1**, 69-75 (2001).
9. Bousquet, J. & Burney, P. Evidence for an increase in atopic disease and possible causes. *Clin. Exp. Allergy* **23**, 484-492 (1993).
10. Cochrane, S. et al. Factors influencing the incidence and prevalence of food allergy. *Allergy* **64**, 1246-1255 (2009).
11. Perrigoue, J.G. et al. MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity. *Nat. Immunol* **10**, 697-705 (2009).
12. Bach, J.-F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N. Engl. J. Med* **347**, 911-920 (2002).
13. Sudo, N. et al. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J. Immunol* **159**, 1739-1745 (1997).
14. Wannemuehler, M.J., Kiyono, H., Babb, J.L., Michalek, S.M. & McGhee, J.R. Lipopolysaccharide (LPS) regulation of the immune response: LPS converts germfree mice to sensitivity to oral tolerance induction. *J. Immunol* **129**, 959-965 (1982).
15. Björkstén, B., Sepp, E., Julge, K., Voor, T. & Mikelsaar, M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J. Allergy Clin. Immunol* **108**, 516-520 (2001).
16. Kalliomäki, M. et al. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J. Allergy Clin. Immunol* **107**, 129-134 (2001).
17. Saarinen, U.M. & Kajosaari, M. Breastfeeding as prophylaxis against atopic disease: prospective follow-up study until 17 years old. *Lancet* **346**, 1065-1069 (1995).
18. Burks, W. Current understanding of food allergy. *Ann. N. Y. Acad. Sci* **964**, 1-12 (2002).
19. Benhamou, A.H., Schäppi Tempia, M.G., Belli, D.C. & Eigenmann, P.A. An overview of cow's milk allergy in children. *Swiss Med Wkly* **139**, 300-307 (2009).
20. Sicherer, S.H., Muñoz-Furlong, A., Murphy, R., Wood, R.A. & Sampson, H.A. Symposium: Pediatric Food Allergy. *Pediatrics* **111**, 1591-1594 (2003).
21. Fiocchi, A. et al. Diagnosis and Rationale for Action Against Cow's Milk Allergy (DRACMA): a summary report. *J. Allergy Clin. Immunol* **126**, 1119-1128.e12 (2010).
22. Plaut, M., Sawyer, R.T. & Fenton, M.J. Summary of the 2008 National Institute of Allergy and Infectious Diseases-US Food and Drug Administration Workshop on Food Allergy Clinical Trial Design. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **124**, 671-678.e1 (2009).
23. Keil, T. The challenge of assessing food allergy and its prevalence. *Clin. Exp. Allergy* **38**, 1252-1253 (2008).
24. Gotua, M., Lomidze, N., Dolidze, N. & Gotua, T. IgE-mediated food hypersensitivity disorders. *Georgian Med News* 39-44 (2008).
25. Sicherer, S.H. & Sampson, H.A. Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**, S116-S125 (2010).
26. Wang, J. & Sampson, H.A. Food allergy. *J. Clin. Invest* **121**, 827-835 (2011).
27. Ross, M.P. et al. Analysis of food-allergic and anaphylactic events in the National Electronic Injury Surveillance System. *J. Allergy Clin. Immunol* **121**, 166-171 (2008).
28. Branum, A.M. & Lukacs, S.L. Food allergy among children in the United States. *Pediatrics* **124**, 1549-1555 (2009).

29. Vieths, S. et al. The serum bank of EuroPrevall - the prevalence, cost and basis of food allergy across Europe. *Food Chem. Toxicol* **46 Suppl 10**, S12-14 (2008).
30. Sicherer, S.H. & Sampson, H.A. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Annu. Rev. Med* **60**, 261-277 (2009).
31. Lack, G. Epidemiologic risks for food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **121**, 1331-1336 (2008).
32. Asero, R. et al. Causes of food-induced anaphylaxis in Italian adults: a multi-centre study. *Int. Arch. Allergy Immunol* **150**, 271-277 (2009).
33. Roux, K.H., Teuber, S.S. & Sathe, S.K. Tree nut allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol* **131**, 234-244 (2003).
34. Wangorsch, A., Ballmer-Weber, B.K., Rösch, P., Holzhauser, T. & Vieths, S. Mutational epitope analysis and cross-reactivity of two isoforms of Api g 1, the major celery allergen. *Mol. Immunol* **44**, 2518-2527 (2007).
35. Oberhuber, C. et al. Purification and characterisation of relevant natural and recombinant apple allergens. *Mol Nutr Food Res* **52 Suppl 2**, S208-219 (2008).
36. Cianferoni, A. & Spergel, J.M. Food allergy: review, classification and diagnosis. *Allergol Int* **58**, 457-466 (2009).
37. Wilson, S., Blaschek, K. & de Mejia, E. Allergenic proteins in soybean: processing and reduction of P34 allergenicity. *Nutr. Rev* **63**, 47-58 (2005).
38. Añibarro, B., Seoane, F.J. & Múgica, M.V. Involvement of hidden allergens in food allergic reactions. *J Investig Allergol Clin Immunol* **17**, 168-172 (2007).
39. Calder, P.C. et al. Early nutrition and immunity - progress and perspectives. *Br. J. Nutr* **96**, 774-790 (2006).
40. Sicherer, S.H. & Sampson, H.A. 9. Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **117**, S470-S475 (2006).
41. Rona, R.J. et al. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *J. Allergy Clin. Immunol* **120**, 638-646 (2007).
42. Høst, A. et al. Clinical course of cow's milk protein allergy/intolerance and atopic diseases in childhood. *Pediatr Allergy Immunol* **13 Suppl 15**, 23-28 (2002).
43. Saarinen, K.M., Pelkonen, A.S., Mäkelä, M.J. & Savilahti, E. Clinical course and prognosis of cow's milk allergy are dependent on milk-specific IgE status. *J. Allergy Clin. Immunol* **116**, 869-875 (2005).
44. Wood, R.A. The natural history of food allergy. *Pediatrics* **111**, 1631-1637 (2003).
45. Sicherer, S.H. & Sampson, H.A. Peanut allergy: emerging concepts and approaches for an apparent epidemic. *J. Allergy Clin. Immunol* **120**, 491-503; quiz 504-505 (2007).
46. Fleischer, D.M., Conover-Walker, M.K., Christie, L., Burks, A.W. & Wood, R.A. The natural progression of peanut allergy: Resolution and the possibility of recurrence. *J. Allergy Clin. Immunol* **112**, 183-189 (2003).
47. Palmer, K. & Burks, W. Current developments in peanut allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **6**, 202-206 (2006).
48. Cox, H.E. Food allergy as seen by an allergist. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr* **47 Suppl 2**, S45-48 (2008).
49. Chatchatee, P., Järvinen, K.M., Bardina, L., Beyer, K. & Sampson, H.A. Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on alpha(s1)-casein: differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol* **107**, 379-383 (2001).
50. Mowat, A.M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol* **3**, 331-341 (2003).
51. Li, H. et al. Allergen-IgE complexes trigger CD23-dependent CCL20 release from human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **133**, 1905-1915 (2007).
52. Sokol, C.L., Barton, G.M., Farr, A.G. & Medzhitov, R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat. Immunol* **9**, 310-318 (2008).
53. Beyer, K. et al. Human milk-specific mucosal lymphocytes of the gastrointestinal tract display a TH2 cytokine profile. *J. Allergy Clin. Immunol* **109**, 707-713 (2002).
54. Soumelis, V. et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat. Immunol* **3**, 673-680 (2002).
55. Tanaka, J. et al. Proinflammatory Th2 cytokines induce production of thymic stromal lymphopoietin in human colonic epithelial cells. *Dig. Dis. Sci* **55**, 1896-1904 (2010).

56. Ying, S. et al. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *J. Immunol* **174**, 8183-8190 (2005).
57. Taneda, S. et al. Cryoglobulinemic glomerulonephritis in thymic stromal lymphopoietin transgenic mice. *Am. J. Pathol* **159**, 2355-2369 (2001).
58. Osborn, M.J. et al. Overexpression of murine TSLP impairs lymphopoiesis and myelopoiesis. *Blood* **103**, 843-851 (2004).
59. Zhou, B. et al. Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nat. Immunol* **6**, 1047-1053 (2005).
60. Lee, H.-C. & Ziegler, S.F. Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by NFkappaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **104**, 914-919 (2007).
61. Walley, A.J., Wiltshire, S., Ellis, C.M. & Cookson, W.O. Linkage and allelic association of chromosome 5 cytokine cluster genetic markers with atopy and asthma associated traits. *Genomics* **72**, 15-20 (2001).
62. Hunninghake, G.M. et al. TSLP polymorphisms are associated with asthma in a sex-specific fashion. *Allergy* **65**, 1566-1575 (2010).
63. He, R. et al. TSLP acts on infiltrating effector T cells to drive allergic skin inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **105**, 11875-11880 (2008).
64. Corrigan, C.J. et al. Early production of thymic stromal lymphopoietin precedes infiltration of dendritic cells expressing its receptor in allergen-induced late phase cutaneous responses in atopic subjects. *Allergy* **64**, 1014-1022 (2009).
65. Greer, F.R., Sicherer, S.H. & Burks, A.W. Effects of early nutritional interventions on the development of atopic disease in infants and children: the role of maternal dietary restriction, breastfeeding, timing of introduction of complementary foods, and hydrolyzed formulas. *Pediatrics* **121**, 183-191 (2008).
66. Jaffar, Z., Sivakuru, T. & Roberts, K. CD4+CD25+ T cells regulate airway eosinophilic inflammation by modulating the Th2 cell phenotype. *J. Immunol* **172**, 3842-3849 (2004).
67. Karlsson, M.R., Rugtveit, J. & Brandtzaeg, P. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J. Exp. Med* **199**, 1679-1688 (2004).
68. Ling, E.M. et al. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* **363**, 608-615 (2004).
69. Tversky, J.R. et al. Human blood dendritic cells from allergic subjects have impaired capacity to produce interferon-alpha via Toll-like receptor 9. *Clin. Exp. Allergy* **38**, 781-788 (2008).
70. Kavousanaki, M., Makrigiannakis, A., Boumpas, D. & Verginis, P. Novel role of plasmacytoid dendritic cells in humans: induction of interleukin-10-producing Treg cells by plasmacytoid dendritic cells in patients with rheumatoid arthritis responding to therapy. *Arthritis Rheum* **62**, 53-63 (2010).
71. Untersmayr, E. et al. Antacid medication inhibits digestion of dietary proteins and causes food allergy: a fish allergy model in BALB/c mice. *J. Allergy Clin. Immunol* **112**, 616-623 (2003).
72. Knippels, L.M.J., van Wijk, F. & Penninks, A.H. Food allergy: what do we learn from animal models? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **4**, 205-209 (2004).
73. Prasad, S. et al. Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab. Invest* **85**, 1139-1162 (2005).
74. Eckman, J., Saini, S.S. & Hamilton, R.G. Diagnostic evaluation of food-related allergic diseases. *Allergy Asthma Clin Immunol* **5**, 2 (2009).
75. Asero, R. et al. IgE-mediated food allergy diagnosis: Current status and new perspectives. *Mol Nutr Food Res* **51**, 135-147 (2007).
76. Mercer, N. et al. Duodenal intraepithelial lymphocytes of children with cow milk allergy preferentially bind the glycan-binding protein galectin-3. *Int J Immunopathol Pharmacol* **22**, 207-217 (2009).
77. Ceredo, I. et al. Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay. *J. Allergy Clin. Immunol* **122**, 589-594 (2008).
78. Matsumoto, N. et al. Development of peptide arrays for detection of IgE-binding epitopes in cow's milk allergens. *J. Biosci. Bioeng* **107**, 324-330 (2009).
79. Kalliomäki, M.A. & Isolauri, E. Probiotics and down-regulation of the allergic response. *Immunol Allergy Clin North Am* **24**, 739-752, viii (2004).
80. Nieuwenhuizen, N.E. & Lopata, A.L. Fighting food allergy: current approaches. *Ann. N. Y. Acad. Sci* **1056**, 30-45 (2005).

81. Kneepkens, C.M.F. & Meijer, Y. Clinical practice. Diagnosis and treatment of cow's milk allergy. *Eur. J. Pediatr* **168**, 891-896 (2009).
82. Osborn, D.A. & Sinn, J. Soy formula for prevention of allergy and food intolerance in infants. *Cochrane Database Syst Rev* CD003741 (2004).doi:10.1002/14651858.CD003741.pub2
83. Osborn, D.A. & Sinn, J. Formulas containing hydrolysed protein for prevention of allergy and food intolerance in infants. *Cochrane Database Syst Rev* CD003664 (2006).doi:10.1002/14651858.CD003664.pub3
84. Zeiger, R.S. et al. Soy allergy in infants and children with IgE-associated cow's milk allergy. *J. Pediatr* **134**, 614-622 (1999).
85. Zoppi, G. & Guandalini, S. The story of soy formula feeding in infants: a road paved with good intentions. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr* **28**, 541-543 (1999).
86. Klemola, T. et al. Feeding a soy formula to children with cow's milk allergy: the development of immunoglobulin E-mediated allergy to soy and peanuts. *Pediatr Allergy Immunol* **16**, 641-646 (2005).
87. Klemola, T. et al. Allergy to soy formula and to extensively hydrolyzed whey formula in infants with cow's milk allergy: a prospective, randomized study with a follow-up to the age of 2 years. *J. Pediatr* **140**, 219-224 (2002).
88. Rancé, F. Novel approaches in treating food allergy using allergens. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* **64**, 157-163; discussion 164-167, 251-257 (2009).
89. Eigenmann, P.A. Future therapeutic options in food allergy. *Allergy* **58**, 1217-1223 (2003).
90. Valenta, R. & Niederberger, V. Recombinant allergens for immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol* **119**, 826-830 (2007).
91. Tanabe, S. Epitope peptides and immunotherapy. *Curr. Protein Pept. Sci* **8**, 109-118 (2007).
92. Chang, T.W., Wu, P.C., Hsu, C.L. & Hung, A.F. Anti-IgE antibodies for the treatment of IgE-mediated allergic diseases. *Adv. Immunol* **93**, 63-119 (2007).
93. Riffelmann, F. [Anti IgE therapy (off label use) in severe peanut allergy with recurrent anaphylaxis]. *Pneumologie* **62**, 337-339 (2008).
94. Finkelman, F.D., Rothenberg, M.E., Brandt, E.B., Morris, S.C. & Strait, R.T. Molecular mechanisms of anaphylaxis: lessons from studies with murine models. *J. Allergy Clin. Immunol* **115**, 449-457; quiz 458 (2005).
95. McClain, S. & Bannon, G.A. Animal models of food allergy: opportunities and barriers. *Curr Allergy Asthma Rep* **6**, 141-144 (2006).
96. Finkelman, F.D. & Wills-Karp, M. Usefulness and optimization of mouse models of allergic airway disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **121**, 603-606 (2008).
97. Takeda, K. & Gelfand, E.W. Mouse models of allergic diseases. *Curr. Opin. Immunol* (2009).doi:10.1016/j.coi.2009.09.005
98. Dearman, R.J. & Kimber, I. Animal models of protein allergenicity: potential benefits, pitfalls and challenges. *Clin. Exp. Allergy* **39**, 458-468 (2009).
99. Strobel, S. & Mowat, A.M. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol. Today* **19**, 173-181 (1998).
100. Gizzarelli, F. et al. Evaluation of allergenicity of genetically modified soybean protein extract in a murine model of oral allergen-specific sensitization. *Clin. Exp. Allergy* **36**, 238-248 (2006).
101. Ito, K. et al. Murine model of IgE production with a predominant Th2-response by feeding protein antigen without adjuvants. *Eur. J. Immunol* **27**, 3427-3437 (1997).
102. Snider, D.P., Marshall, J.S., Perdue, M.H. & Liang, H. Production of IgE antibody and allergic sensitization of intestinal and peripheral tissues after oral immunization with protein Ag and cholera toxin. *J. Immunol* **153**, 647-657 (1994).
103. Li, X.M., Schofield, B.H., Huang, C.K., Kleiner, G.I. & Sampson, H.A. A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol* **103**, 206-214 (1999).
104. Li, X.M. et al. A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *J. Allergy Clin. Immunol* **106**, 150-158 (2000).
105. Brandt, E.B. et al. Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea. *J. Clin. Invest* **112**, 1666-1677 (2003).
106. Morafo, V. et al. Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential TH2-TH1 responses in C3H/HeJ and BALB/c mice. *J. Allergy Clin. Immunol* **111**, 1122-1128 (2003).
107. Adel-Patient, K., Bernard, H., Ah-Leung, S., Créminon, C. & Wal, J.-M. Peanut- and cow's milk-specific IgE, Th2 cells and local anaphylactic reaction are induced in Balb/c mice orally sensitized with cholera toxin. *Allergy* **60**, 658-664 (2005).

108. Proust, B. et al. A murine model of cow's milk protein-induced allergic reaction: use for safety assessment of hidden milk allergens. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* **41**, 85-94 (2009).
109. Perrier, C., Thierry, A.-C., Mercenier, A. & Corthésy, B. Allergen-specific antibody and cytokine responses, mast cell reactivity and intestinal permeability upon oral challenge of sensitized and tolerized mice. *Clin. Exp. Allergy* **40**, 153-162 (2010).
110. Anosova, N.G. et al. Cholera toxin, E. coli heat-labile toxin, and non-toxic derivatives induce dendritic cell migration into the follicle-associated epithelium of Peyer's patches. *Mucosal Immunol* **1**, 59-67 (2008).
111. Kroghsbo, S., Christensen, H.R. & Frøkiaer, H. Experimental parameters differentially affect the humoral response of the cholera-toxin-based murine model of food allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol* **131**, 256-263 (2003).
112. Leung, P.S.C. et al. Induction of shrimp tropomyosin-specific hypersensitivity in mice. *Int. Arch. Allergy Immunol* **147**, 305-314 (2008).
113. Brunner, R. et al. Aluminium per se and in the anti-acid drug sucralfate promotes sensitization via the oral route. *Allergy* **64**, 890-897 (2009).
114. Gonipeta, B., Parvataneni, S., Tempelman, R.J. & Gangur, V. An adjuvant-free mouse model to evaluate the allergenicity of milk whey protein. *J. Dairy Sci* **92**, 4738-4744 (2009).
115. Berin, M.C. & Shreffler, W.G. T(H)2 adjuvants: implications for food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol* **121**, 1311-1320; quiz 1321-1322 (2008).
116. Berin, M.C. & Mayer, L. Immunophysiology of experimental food allergy. *Mucosal Immunol* **2**, 24-32 (2009).
117. Gagliardi, M.C. et al. Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and licenses them for Th2 priming. *Eur. J. Immunol* **30**, 2394-2403 (2000).
118. Anjuère, F. et al. In vivo adjuvant-induced mobilization and maturation of gut dendritic cells after oral administration of cholera toxin. *J. Immunol* **173**, 5103-5111 (2004).
119. Blázquez, A.B. & Berin, M.C. Gastrointestinal dendritic cells promote Th2 skewing via OX40L. *J. Immunol* **180**, 4441-4450 (2008).
120. Ganeshan, K. et al. Impairing oral tolerance promotes allergy and anaphylaxis: a new murine food allergy model. *J. Allergy Clin. Immunol* **123**, 231-238.e4 (2009).
121. De Gregorio, E., Tritto, E. & Rappuoli, R. Alum adjuvanticity: unraveling a century old mystery. *Eur. J. Immunol* **38**, 2068-2071 (2008).
122. Sokolovska, A., Hem, S.L. & HogenEsch, H. Activation of dendritic cells and induction of CD4(+) T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine* **25**, 4575-4585 (2007).
123. Franchi, L. & Núñez, G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1beta secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur. J. Immunol* **38**, 2085-2089 (2008).
124. Eisenbarth, S.C., Colegio, O.R., O'Connor, W., Sutterwala, F.S. & Flavell, R.A. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* **453**, 1122-1126 (2008).
125. Kool, M. et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med* **205**, 869-882 (2008).
126. Flach, T.L. et al. Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. *Nat. Med* **17**, 479-487 (2011).
127. Lee, S.Y. et al. Oral administration of IL-12 suppresses anaphylactic reactions in a murine model of peanut hypersensitivity. *Clin. Immunol* **101**, 220-228 (2001).
128. Mamessier, E. & Magnan, A. Cytokines in atopic diseases: revisiting the Th2 dogma. *Eur J Dermatol* **16**, 103-113 (2006).
129. Leckie, M.J. et al. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* **356**, 2144-2148 (2000).
130. Dow, S.W., Schwarze, J., Heath, T.D., Potter, T.A. & Gelfand, E.W. Systemic and local interferon gamma gene delivery to the lungs for treatment of allergen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *Hum. Gene Ther* **10**, 1905-1914 (1999).
131. Li, X.M. et al. Food Allergy Herbal Formula-1 (FAHF-1) blocks peanut-induced anaphylaxis in a murine model. *J. Allergy Clin. Immunol* **108**, 639-646 (2001).
132. Srivastava, K.D. et al. The Chinese herbal medicine formula FAHF-2 completely blocks anaphylactic reactions in a murine model of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol* **115**, 171-178 (2005).
133. Fooks, L.J. & Gibson, G.R. Probiotics as modulators of the gut flora. *Br. J. Nutr* **88 Suppl 1**, S39-49 (2002).

134. Kim, H., Kwack, K., Kim, D.-Y. & Ji, G.E. Oral probiotic bacterial administration suppressed allergic responses in an ovalbumin-induced allergy mouse model. *FEMS Immunol. Med. Microbiol* **45**, 259-267 (2005).
135. Shida, K. et al. Lactobacillus casei strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model. *Clin. Exp. Allergy* **32**, 563-570 (2002).
136. Dev, S. et al. Suppression of histamine signaling by probiotic Lac-B: a possible mechanism of its anti-allergic effect. *J. Pharmacol. Sci* **107**, 159-166 (2008).
137. Peng, S., Lin, J.-Y. & Lin, M.-Y. Antiallergic effect of milk fermented with lactic acid bacteria in a murine animal model. *J. Agric. Food Chem* **55**, 5092-5096 (2007).
138. Frossard, C.P., Steidler, L. & Eigenmann, P.A. Oral administration of an IL-10-secreting Lactococcus lactis strain prevents food-induced IgE sensitization. *J. Allergy Clin. Immunol* **119**, 952-959 (2007).
139. Erb, K.J. Can helminths or helminth-derived products be used in humans to prevent or treat allergic diseases? *Trends Immunol* **30**, 75-82 (2009).
140. Fallon, P.G. & Mangan, N.E. Suppression of TH2-type allergic reactions by helminth infection. *Nat. Rev. Immunol* **7**, 220-230 (2007).
141. van den Biggelaar, A.H. et al. Decreased atopy in children infected with Schistosoma haematobium: a role for parasite-induced interleukin-10. *Lancet* **356**, 1723-1727 (2000).
142. Prioult, G. & Nagler-Anderson, C. Mucosal immunity and allergic responses: lack of regulation and/or lack of microbial stimulation? *Immunol. Rev* **206**, 204-218 (2005).
143. Mortimer, K. et al. Dose-ranging study for trials of therapeutic infection with Necator americanus in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg* **75**, 914-920 (2006).
144. Summers, R.W. et al. Trichuris suis seems to be safe and possibly effective in the treatment of inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol* **98**, 2034-2041 (2003).
145. Summers, R.W., Elliott, D.E., Urban, J.F., Jr, Thompson, R.A. & Weinstock, J.V. Trichuris suis therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* **128**, 825-832 (2005).
146. Adel-Patient, K. et al. Oral administration of recombinant Lactococcus lactis expressing bovine beta-lactoglobulin partially prevents mice from sensitization. *Clin. Exp. Allergy* **35**, 539-546 (2005).
147. Li, X.-M. et al. Engineered recombinant peanut protein and heat-killed Listeria monocytogenes coadministration protects against peanut-induced anaphylaxis in a murine model. *J. Immunol* **170**, 3289-3295 (2003).
148. Eigenmann, P.A., Asigbetse, K.E. & Frossard, C.P. Avirulent Salmonella typhimurium strains prevent food allergy in mice. *Clin. Exp. Immunol* **151**, 546-553 (2008).
149. Wu, C.-J., Chen, L.-C. & Kuo, M.-L. Attenuated Salmonella typhimurium reduces ovalbumin-induced airway inflammation and T-helper type 2 responses in mice. *Clin. Exp. Immunol* **145**, 116-122 (2006).
150. Rook, G.A.W., Hamelmann, E. & Brunet, L.R. Mycobacteria and allergies. *Immunobiology* **212**, 461-473 (2007).
151. Yang, X. et al. Mycobacterial infection inhibits established allergic inflammatory responses via alteration of cytokine production and vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Immunology* **105**, 336-343 (2002).
152. Major, T., Wohlleben, G., Reibetanz, B. & Erb, K.J. Application of heat killed Mycobacterium bovis-BCG into the lung inhibits the development of allergen-induced Th2 responses. *Vaccine* **20**, 1532-1540 (2002).
153. Shirota, H. et al. Novel roles of CpG oligodeoxynucleotides as a leader for the sampling and presentation of CpG-tagged antigen by dendritic cells. *J. Immunol* **167**, 66-74 (2001).
154. Weeratna, R.D., Brazolot Millan, C.L., McCluskie, M.J. & Davis, H.L. CpG ODN can re-direct the Th bias of established Th2 immune responses in adult and young mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol* **32**, 65-71 (2001).
155. Kattan JD, Srivastava KD, Li XM & Sampson HA Intranasal treatment with CpG oligonucleotides provides protection from anaphylaxis in a murine model of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111:S206 (2003).
156. Nguyen, M.D., Cinman, N., Yen, J. & Horner, A.A. DNA-based vaccination for the treatment of food allergy. *Allergy* **56 Suppl 67**, 127-130 (2001).
157. USDA. 2009 United States Department of Agriculture. In:<<http://www.soystats.com>>. en <<http://www.soystats.com/2009/Default-frames.htm>>

158. L'Hocine, L. & Boye, J.I. Allergenicity of soybean: new developments in identification of allergenic proteins, cross-reactivities and hypoallergenization technologies. *Crit Rev Food Sci Nutr* **47**, 127-143 (2007).
159. Thanh, V.H. & Shibasaki, K. Major proteins of soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization. *J. Agric. Food Chem* **24**, 1117-1121 (1976).
160. Howard, P.A., Lehnhardt, W.F. & Orthoefer 7S, and 11S vegetable protein fraction and isolation. US Patent, No. 4,368,151 (1983).
161. Catsimpoilas, N. & Leuthner, E. Immunochemical methods for detection and quantitation of Kunitz soybean trypsin inhibitor. *Anal. Biochem* **31**, 437-447 (1969).
162. Ruhrah J The soy bean in infant feeding: preliminary report. *Arch Pediatr* **26**, 496-501 (1909).
163. Hill LW & Stuart HC Soy Bean Food Preparation for Feeding Infants with Milk Idiosyncrasy. *JAMA*; **93**:985-987 (1929).
164. Bos, C. et al. Postprandial kinetics of dietary amino acids are the main determinant of their metabolism after soy or milk protein ingestion in humans. *J. Nutr* **133**, 1308-1315 (2003).
165. Agostoni, C. et al. Soy protein infant formulae and follow-on formulae: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr* **42**, 352-361 (2006).
166. Osborn, D.A. & Sinn, J. Soy formula for prevention of allergy and food intolerance in infants. *Cochrane Database Syst Rev* CD003741 (2006).doi:10.1002/14651858.CD003741.pub4
167. Rozenfeld, P., Docena, G.H., Añón, M.C. & Fossati, C.A. Detection and identification of a soy protein component that cross-reacts with caseins from cow's milk. *Clin. Exp. Immunol* **130**, 49-58 (2002).
168. Curciarello, R., Lareu, J.F., Fossati, C.A., Docena, G.H. & Petruccelli, S. Immunochemical characterization of Glycine max L. Merr. var Raiden, as a possible hypoallergenic substitute for cow's milk-allergic patients. *Clin. Exp. Allergy* **38**, 1559-1565 (2008).
169. Lack, G., Fox, D., Northstone, K. & Golding, J. Factors associated with the development of peanut allergy in childhood. *N. Engl. J. Med* **348**, 977-985 (2003).
170. Ballmer-Weber, B.K. & Vieths, S. Soy allergy in perspective. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **8**, 270-275 (2008).
171. Niggemann, B., Sielaff, B., Beyer, K., Binder, C. & Wahn, U. Outcome of double-blind, placebo-controlled food challenge tests in 107 children with atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy* **29**, 91-96 (1999).
172. Errahali, Y. et al. Allergen in soy oils. *Allergy* **57**, 648-649 (2002).
173. Codina, R. et al. Identification of the soybean hull allergens involved in sensitization to soybean dust in a rural population from Argentina and N-terminal sequence of a major 50 KD allergen. *Clin. Exp. Allergy* **32**, 1059-1063 (2002).
174. Mills, E.N.C. & Breiteneder, H. Food allergy and its relevance to industrial food proteins. *Biotechnol. Adv* **23**, 409-414 (2005).
175. Imamura, T., Kanagawa, Y. & Ebisawa, M. A survey of patients with self-reported severe food allergies in Japan. *Pediatr Allergy Immunol* **19**, 270-274 (2008).
176. Holzhauser, T. et al. Soybean (Glycine max) allergy in Europe: Gly m 5 (beta-conglycinin) and Gly m 6 (glycinin) are potential diagnostic markers for severe allergic reactions to soy. *J. Allergy Clin. Immunol* **123**, 452-458 (2009).
177. Sicherer, S.H., Sampson, H.A. & Burks, A.W. Peanut and soy allergy: a clinical and therapeutic dilemma. *Allergy* **55**, 515-521 (2000).
178. Duke Soybean as a possible important source of allergy. *J. Allergy* **5**, 300-302 (1934).
179. Gómez-Ollés, S. et al. Assessment of soy aeroallergen levels in different work environments. *Clin. Exp. Allergy* **37**, 1863-1872 (2007).
180. Beardslee, T.A., Zeece, M.G., Sarath, G. & Markwell, J.P. Soybean glycinin G1 acidic chain shares IgE epitopes with peanut allergen Ara h 3. *Int. Arch. Allergy Immunol* **123**, 299-307 (2000).
181. Mittag, D. et al. Soybean allergy in patients allergic to birch pollen: clinical investigation and molecular characterization of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol* **113**, 148-154 (2004).
182. Ledit R.; Arduoso, C.; Crisci, R. et al. Asociación entre exposición a polvo de soja, sensibilidad alérgica y perfil de síntomas respiratorios. *MEDICINA* **61**, 41-48 (2001).
183. Ballmer-Weber, B.K. et al. Clinical characteristics of soybean allergy in Europe: a double-blind, placebo-controlled food challenge study. *J. Allergy Clin. Immunol* **119**, 1489-1496 (2007).
184. Smaldini Paola et al. In vivo evidence of cross-reactivity between cow's milk and soybean proteins in a mouse model of food allergy. *International Archives of Allergy and Immunology* doi:333562

185. Pasquevich, K.A. et al. Immunization with recombinant *Brucella* species outer membrane protein Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD4+ and CD8+ T cells as well as systemic and oral protection against *Brucella abortus* infection. *Infect. Immun* **77**, 436-445 (2009).
186. Giambartolomei, G.H. et al. Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. *J. Immunol* **173**, 4635-4642 (2004).
187. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* **193**, 265-275 (1951).
188. Ceska, M. Radioimmunoassay of IgE using paper disks. *Meth. Enzymol* **73**, 646-656 (1981).
189. Soriani, M., Bailey, L. & Hirst, T.R. Contribution of the ADP-ribosylating and receptor-binding properties of cholera-like enterotoxins in modulating cytokine secretion by human intestinal epithelial cells. *Microbiology (Reading, Engl.)* **148**, 667-676 (2002).
190. Raz, E. et al. Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **93**, 5141-5145 (1996).
191. Zhu, F.-G., Kandimalla, E.R., Yu, D. & Agrawal, S. Oral administration of a synthetic agonist of Toll-like receptor 9 potently modulates peanut-induced allergy in mice. *J. Allergy Clin. Immunol* **120**, 631-637 (2007).
192. Swoboda, I. et al. A recombinant hypoallergenic parvalbumin mutant for immunotherapy of IgE-mediated fish allergy. *J. Immunol* **178**, 6290-6296 (2007).
193. Bannon, G.A. et al. Engineering, characterization and in vitro efficacy of the major peanut allergens for use in immunotherapy. *Int. Arch. Allergy Immunol* **124**, 70-72 (2001).
194. Helm, R.M. & Burks, A.W. Sensitization and allergic response and intervention therapy in animal models. *J AOAC Int* **87**, 1441-1447 (2004).
195. Li, X.-M. et al. Persistent protective effect of heat-killed *Escherichia coli* producing «engineered,» recombinant peanut proteins in a murine model of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol* **112**, 159-167 (2003).
196. Zwerdling, A. et al. *Brucella* lipoproteins mimic dendritic cell maturation induced by *Brucella abortus*. *Microbes Infect* **10**, 1346-1354 (2008).
197. Barrionuevo, P. et al. *Brucella abortus* inhibits major histocompatibility complex class II expression and antigen processing through interleukin-6 secretion via Toll-like receptor 2. *Infect. Immun* **76**, 250-262 (2008).
198. Pasquevich, K.A. et al. 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. *J. Immunol* **184**, 5200-5212 (2010).
199. Herz, U., Renz, H. & Wiedermann, U. Animal models of type I allergy using recombinant allergens. *Methods* **32**, 271-280 (2004).
200. Winkler, B. et al. Allergen-specific immunosuppression by mucosal treatment with recombinant Ves v 5, a major allergen of *Vespula vulgaris* venom, in a murine model of wasp venom allergy. *Immunology* **110**, 376-385 (2003).
201. Reese, G. et al. Reduced allergenic potency of VR9-1, a mutant of the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin). *J. Immunol* **175**, 8354-8364 (2005).
202. Christensen, H.R., Brix, S. & Frøkiaer, H. Immune response in mice to ingested soya protein: antibody production, oral tolerance and maternal transfer. *Br. J. Nutr* **91**, 725-732 (2004).
203. Fischer, R. et al. Oral and nasal sensitization promote distinct immune responses and lung reactivity in a mouse model of peanut allergy. *Am. J. Pathol* **167**, 1621-1630 (2005).
204. Saldanha, J.C.S. et al. A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. *Braz. J. Med. Biol. Res* **37**, 809-816 (2004).
205. Christensen, H.R., Kjaer, T.M.R. & Frøkiaer, H. Low-dose oral tolerance due to antigen in the diet suppresses differentially the cholera toxin-adjuvanted IgE, IgA and IgG response. *Int. Arch. Allergy Immunol* **132**, 248-257 (2003).
206. Lyons, A. et al. Bacterial strain-specific induction of Foxp3+ T regulatory cells is protective in murine allergy models. *Clin. Exp. Allergy* **40**, 811-819 (2010).
207. Scott, D.E., Agranovich, I., Inman, J., Gober, M. & Golding, B. Inhibition of primary and recall allergen-specific T helper cell type 2-mediated responses by a T helper cell type 1 stimulus. *J. Immunol* **159**, 107-116 (1997).

208. van Reijssen, F.C., Felius, A., Wauters, E.A., Bruijnzeel-Koomen, C.A. & Koppelman, S.J. T-cell reactivity for a peanut-derived epitope in the skin of a young infant with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol* **101**, 207-209 (1998).
209. Birmingham, N.P. et al. An adjuvant-free mouse model of tree nut allergy using hazelnut as a model tree nut. *Int. Arch. Allergy Immunol* **144**, 203-210 (2007).
210. Parvataneni, S., Gonipeta, B., Tempelman, R.J. & Gangur, V. Development of an adjuvant-free cashew nut allergy mouse model. *Int. Arch. Allergy Immunol* **149**, 299-304 (2009).