



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas  
Doctorado en Ciencias Biológicas

**TÍTULO DE TESIS**

**Efecto del glicomacropéptido, solo o combinado con *Lactobacillus rhamnosus*, sobre las alergias alimenticias en un modelo experimental.**

Tesis que presenta Diana Reyes Pavón  
para optar por el grado de  
Dr. en Ciencias Biológicas especialidad Inmunología

**Tutores:**

**Dra. Eva María Salinas Miralles**  
**Dra. Mariela Jiménez Vargas**  
**Asesor: Dr. Andrés Quintanar Stephano**

Aguascalientes, Ags., Noviembre 2020

CARTA DE VOTO APROBATORIO  
COMITÉ TUTORAL

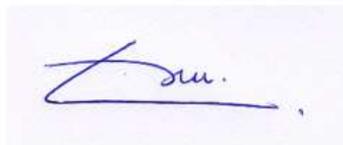
**M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ**  
**DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**

PRESENTE

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **DIANA REYES PAVÓN** con ID 96997 quien realizó la tesis titulada: **EFFECTO DEL GLICOMACROPÉPTIDO, SOLO O COMBINADO CON *Lactobacillus rhamnosus*, SOBRE LAS ALERGIAS ALIMENTICIAS EN UN MODELO EXPERIMENTAL**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"Se Lumen Proferre"**  
**Aguascalientes, Ags., a 24 de noviembre de 2020**



**Dra. Eva María Salinas Miralles**  
**Co-Tutora de tesis**



**Dra. Mariela Jiménez Vargas**  
**Co-Tutora de tesis**



**Dr. Andrés Quintanar Stephano**  
**Asesor de tesis**

c.c.p.- Interesado

c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Código: DO-SEE-FO-16

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.

Actualización: 00

Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

DICTAMEN DE LIBERACION ACADEMICA PARA INICIAR LOS TRAMITES DEL EXAMEN  
DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 2 DICIEMBRE--20

NOMBRE: DIANA REYES PAVÓN ID 96997

PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS LGAC (del posgrado): PROTEÍNAS EN LA RESPUESTA INMUNE Y LA SECRECIÓN NEURAL

TIPO DE TRABAJO: ( X ) Tesis ( ) Trabajo práctico

TITULO: Efecto del glicomacropéptido, solo o combinado con Lactobacillus rhamnosus, sobre las alergias alimenticias en un modelo experimental

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

El trabajo contribuye al conocimiento de la acción de los probióticos sobre las alergias, para poder aplicarse posteriormente en el humano

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
- SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
- SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
- SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
- SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
- SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
- SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
- NA Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
- SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
- SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
- NA Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
- SI Coincide con el título y objetivo registrado
- SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
- SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
- SI Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- SI Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
- SI El estudiante es el primer autor
- SI El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
- SI En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
- SI Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
- SI La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

Sí  SI  
No

FIRMAS

Elaboró:

\* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

DR. RODOLFO GONZÁLEZ SEGOVIA

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DRA. ALMA LILIAN FUERTES BARRERA

\* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano.

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DRA. HAYDÉE MARTÍNEZ ROVALCABA

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ

**Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado**

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: .... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.



Article

# Protective Effect of Glycomacropeptide on Food Allergy with Gastrointestinal Manifestations in a Rat Model through Down-Regulation of Type 2 Immune Response

Diana Reyes-Pavón <sup>1</sup>, Daniel Cervantes-García <sup>1,2</sup>, Luis G. Bermúdez-Humarán <sup>3</sup>,  
Laura Elena Córdova-Dávalos <sup>1</sup>, Andrés Quintanar-Stephano <sup>4</sup>, Mariela Jiménez <sup>1,\*</sup>  
and Eva Salinas <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Microbiology, Basic Science Center, Autonomous University of Aguascalientes, 20131 Aguascalientes, Mexico; nutrois@gmail.com (D.R.-P.); dcervantesga@conacyt.mx (D.C.-G.); lcdavalos@gmail.com (L.E.C.-D.)

<sup>2</sup> National Council of Science and Technology, 03940 Mexico City, Mexico

<sup>3</sup> Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, 78350 Jouy-en-Josas, France; luis.bermudez@jouy.inrae.fr

<sup>4</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Basic Science Center, Autonomous University of Aguascalientes, 20131 Aguascalientes, Mexico; aquinta@correo.uaa.mx

\* Correspondence: mayojv@hotmail.com (M.J.); emsalin@correo.uaa.mx (E.S.); Tel.: +52-(449)-910-8424 (E.S.)

Received: 20 August 2020; Accepted: 22 September 2020; Published: 25 September 2020



**Abstract:** Glycomacropeptide (GMP) is a bioactive peptide derived from milk  $\kappa$ -casein with immune-modulatory and anti-inflammatory properties. Food allergy (FA) is an adverse immune reaction with a broad spectrum of manifestations. Allergen intake induces persistent intestinal inflammation and tissue damage. In this study, the anti-allergic activity of GMP was evaluated using a rat ovalbumin (OVA)-induced FA model with gastrointestinal manifestation. Rats were orally GMP treated from 3 days prior and during FA development. The severity of food anaphylaxis and diarrheal episodes, antibody production and histamine level were measured. Histopathological changes, inflammation and predominant cytokine profile at intestine were analyzed. Oral GMP intake decreased clinical signs and diarrhea severity induced by allergen, with a significant reduction in intestinal edema and expression level of *IL-1 $\beta$*  and *TNF- $\alpha$* . Prophylaxis with GMP also diminished serum anti-OVA IgE and IgG1, and histamine levels. GMP treatment markedly decreased eosinophil infiltration, mast cell and goblet cell hyperplasia, total IgE expression in intestine, and prevented histological changes in villi, crypts and internal muscularis layer. The treatment effectively suppressed *IL-5*, *IL-13* and *GATA3* expression and skewed the intestinal cytokine profile toward type 1 and regulatory. These results suggest that GMP may protect against FA through down-regulating the type 2 inflammatory response.

**Keywords:** glycomacropeptide; food allergy model; allergic diarrhea; allergen-specific immunoglobulin; histamine; intestinal inflammation; intestinal histopathology; type 2 immune response

## 1. Introduction

Food allergy (FA) is an adverse immune reaction to food proteins that is becoming a growing clinical problem. The World Allergy Organization has declared that 2.5% of the general population suffers from some type of FA [1]. Mainly, the child population is affected, causing a strong economic

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes y el CONACYT por el apoyo brindado durante la realización de mi doctorado y mi estancia doctoral, sin los cuales, esto no hubiera sido posible.

A mis tutores la dra. Eva Salinas Miralles, una prueba viviente de que se puede ser exitoso y pleno en esta carrera de ciencias, gracias por enseñarme de disciplina, trabajo en equipo y, sobre todo, de ciencia. A la dra. Mariela Jiménez Vargas, que siempre leyó todo lo que yo escribía. Espero que algún día yo tenga su capacidad de análisis, de combinación de colores, de atención en los detalles y su perseverancia para luchar por todo lo que vale la pena. Gracias a ambas por creer en mí en los momentos difíciles. Y por último al dr. Andrés Quintanar Stephano, quien siempre tuvo un oído para mis hipótesis, una mano para las cirugías de mis animales y, sobre todo, una palabra de aliento en el camino de la ciencia. No cabe duda de que fue exactamente el tipo de directores y asesores de tesis que necesitaba.

A mi tutor honoris causa el dr. Daniel Cervantes García y la dra. Laura Córdova Dávalos, quienes fueron siempre una guía y una fuente de sabiduría en todo lo que implicó mi trabajo experimental.

Al señor Manuel, Fer, Bere, Sonia y todos los que en algún momento me prestaron un poco de ayuda para resolver las dificultades técnicas que aparecieron en el camino.

Al dr. Luis Bermúdez-Humarán, quien me aceptó en su laboratorio y me ayudó siempre a resolver las dificultades de la estancia. Gracias por ese punto de vista, por ese dato importante que no consideraba y por toda la ayuda. Además, gracias a Edgar, Natalia, Daniela, Pablo, Flore y todos los que durante la estancia escucharon mis delirios y me lo hicieron más fácil. A Marthe Vilotte y Julie Rivière, así como al personal de la plataforma y @BRIDGE y de Micalis. A Véronique Laurent y a Claire Cherbuy por todos los consejos y la ayuda. A Célia a Camille; nunca dejé de aprender de todos ustedes en el tiempo que pude estar en el INRA.

A mi madre quien hasta el último momento me ayudó, aguantó e intentó alentar. Sin duda no lo habría logrado sin tu constante apoyo. Incluso puedo agradecerte por haberme ayudado a elegir los colores de mis gráficas de barras. A mi padre por escucharme y animarme a seguir siempre adelante en todo el proceso.

Hoy agradezco inmensamente a Dios por guiarme y a mí misma por perseverar.

## DEDICATORIAS

...En algún momento dije que sería doctora, y tal vez nunca me imaginé que esas palabras tuvieran el significado que hoy adquieren...

A Edith, mi confidente eterna de sabiduría, equilibrio, quien siempre fué un oído listo para escucharme, para entender mis frustraciones con la ciencia y para alentarme a no desesperar y hacerme ver las cosas desde un mejor punto de vista.

A Mauricio, maestro continuo de ciencia, mi motivación, la persona que se atrevió a discutir conmigo mis propios resultados e intentar redimensionarlos en la luz y en la sombra. Gracias por tu apoyo constante durante estos años.

A Rodrigo y Juan Carlos que me enseñaron cada día a ver las cosas con calma e inteligencia, que soportaban mis pláticas y me alentaron en el camino. Gracias a toda mi familia, y a mis amigos de la vida, que tal vez nunca entendían de qué les hablaba pero que veían que estaba bien y era feliz. Gracias por todo.

A mis amigos del doctorado. Aunque nadie vino aquí a hacer amigos, termino este ciclo con más cosas positivas de las que pude imaginar: A Jeny, Josué, Laura, Cristian, Diego y Adriana. Muchas gracias por enseñarme y aprender conmigo. Gracias especiales a Bere que siempre me ayudó a encontrar los documentos precisos en los momentos más estresantes.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, que con su apoyo y entre bromas, risas y palabras de aliento. En especial a Armi que fue mi punto de apoyo durante la primera fase del doctorado y a Alicia que me enseñó de la mejor manera a trabajar con mi LGG.

Por último, a cualquier persona que se aventure a leer este compendio de mis años de doctorante. La ciencia es un camino interesante que se descubre poco a poco, pero se ama desde el inicio.

Sólo la inteligencia se examina a sí misma.... Jaime Balmes

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL .....	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
ACRÓNIMOS.....	8
RESUMEN .....	9
ABSTRACT .....	10
INTRODUCCIÓN .....	11
ANTECEDENTES.....	12
ALERGIAS ALIMENTICIAS .....	12
BREVE PANORAMA MUNDIAL DE LA PREVALENCIA .....	13
MECANISMOS INMUNOLÓGICOS IMPLICADOS .....	14
ENTRADA DEL ALÉRGENO Y SENSIBILIZACIÓN.....	14
HIPERSENSIBILIDAD GASTROINTESTINAL INMEDIATA.....	19
HIPERSENSIBILIDAD GASTROINTESTINAL CRÓNICA .....	21
FACTORES DE RIESGO.....	21
SIGNOS Y SÍNTOMAS CLÍNICOS .....	25
PRINCIPALES ALÉRGENOS INVOLUCRADOS EN AA HUMANA.....	26
REACTIVIDAD CRUZADA .....	28
IMPACTO ECONÓMICO DE LA AA .....	30
MODELOS ANIMALES DE AA .....	31
USO DE ADYUVANTES EN LOS MODELOS DE AA .....	32
TRATAMIENTOS ACTUALES PARA LAS AA .....	33
RESTRICCIÓN DIETARIA.....	34
INMUNOTERAPIA .....	34
MEDICAMENTOS SINTOMÁTICOS.....	36
ANTICUERPOS MONOCLONALES .....	37
PROBIÓTICOS .....	38
BENEFICIO TERAPÉUTICO DE LOS PROBIÓTICOS Y MECANISMO DE ACCIÓN .....	39
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (LGG) .....	40
PÉPTIDOS BIOACTIVOS LÁCTEOS.....	42
GLICOMACROPÉPTIDO.....	43
ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL GLICOMACROPÉPTIDO.....	45
PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS Y ANTIINFLAMATORIAS.....	47
INMUNOMODULACIÓN EN ALERGIAS.....	48
JUSTIFICACIÓN.....	49
HIPÓTESIS.....	49
OBJETIVOS.....	49
METODOLOGÍA .....	50
MICROORGANISMO Y ALMACENAMIENTO .....	50
CONDICIONES DE CULTIVO Y DETERMINACIÓN DE BIOMASA DE LGG .....	50
REGISTRO DE pH DE MEDIOS CON LGG .....	50
TITULACIÓN DE ACIDEZ DE MEDIOS CON LGG.....	51
ANIMALES .....	51
CARACTERIZACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL DE AA.....	51
TRATAMIENTO Y GRUPOS EXPERIMENTALES.....	53
MEDICIÓN DEL PESO CORPORAL.....	53
OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SUERO .....	54
DETERMINACIÓN DE IgG1 ANTI-OVA.....	54
ANAFILAXIA CUTÁNEA PASIVA.....	54
ENSAYO DE ANAFILAXIA ALIMENTICIA .....	55
MEDICIÓN DE TEMPERATURA RECTAL .....	55
MEDICIÓN DE PRESIÓN ARTERIAL .....	55
DETERMINACIÓN DE EXTRAVASACIÓN INTESTINAL MEDIANTE AZUL DE EVANS.....	55
CUANTIFICACIÓN DE PLACAS DE PEYER.....	56
CUANTIFICACIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE PROTEASA II DE MASTOCITOS.....	56

CUANTIFICACIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE HISTAMINA .....	56
PURIFICACIÓN DE RNA Y RT-PCR EN TIEMPO REAL CUANTITATIVA (qRT-PCR) .....	56
ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DE LA MUCOSA INTESTINAL.....	58
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	59
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>60</b>
ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO IN VITRO DEL LGG CON DIFERENTES DOSIS DE GMP .....	60
DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE AA EN RATA WISTAR .....	63
ANÁLISIS DEL INCREMENTO DE PESO CORPORAL EN DIFERENTES MODELOS DE AA .....	63
ANÁLISIS DE LOS TÍTULOS DE IgE ANTI-OVA EN SUERO EN LOS MODELOS DE AA .....	64
ANÁLISIS DE LOS SIGNOS CLÍNICOS DE ANAFILAXIA ALIMENTICIA EN LOS MODELOS DE AA ....	65
CAMBIOS EN LA PERMEABILIDAD VASCULAR DE LOS MODELOS DE AA.....	68
DETERMINACIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE PROTEASA II DE MASTOCITOS .....	69
DETERMINACIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE HISTAMINA .....	70
EFFECTO DEL GMP, SOLO O COMBINADO CON LGG, EN AA .....	71
ANÁLISIS DEL INCREMENTO DE PESO CORPORAL ASOCIADO A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS EN ANIMALES CON AA Y TRATADOS CON GMP Y/O LGG .....	71
ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE IgE E IgG1 ANTI-OVA EN SUERO DE ANIMALES CON AA Y TRATADOS CON GMP Y/O LGG .....	72
ANÁLISIS DE LOS SIGNOS CLÍNICOS DE ANAFILAXIA ALIMENTICIA EN ANIMALES CON AA Y TRATADOS CON GMP Y/O LGG .....	73
ANÁLISIS DE VARIACIONES EN LA PERMEABILIDAD VASCULAR EN ANIMALES CON AA Y TRATADOS CON GMP Y/O LGG .....	76
ANÁLISIS DE LAS DIFERENCIAS EN EL TEJIDO LINFÁTICO INTESTINAL EN ANIMALES CON AA Y TRATADOS CON GMP Y/O LGG .....	77
DETERMINACIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE HISTAMINA DE ANIMALES CON AA Y TRATADOS CON GMP Y/O LGG .....	78
DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN RELATIVA DE GENES ASOCIADOS CON LA REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD TIPO I EN TEJIDO INTESTINAL DE ANIMALES CON AA Y TRATADOS CON GMP Y/O LGG .....	78
MODIFICACIONES HISTOPATOLÓGICAS EN ANIMALES CON AA Y TRATADOS CON GMP Y/O LGG .....	83
DISCUSIÓN .....	87
CONCLUSIONES .....	96
REFERENCIAS .....	97
ANEXOS .....	118

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA AA EN PAÍSES LATINOAMERICANOS.....	13
TABLA 2. NOMENCLATURA DE ALÉRGENOS MÁS COMUNES Y SUS CARACTERÍSTICAS EN ALERGIA ALIMENTICIA. ....	27
TABLA 3. NOMENCLATURA DE ALÉRGENOS MÁS COMUNES EN LOS 8 ALIMENTOS MÁS ALERGÉNICOS DESCRITOS....	27
TABLA 4. FAMILIAS DE PROTEÍNAS CON ALÉRGENOS ALIMENTICIOS DE REACCIÓN CRUZADA. ....	29
TABLA 5. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS.....	57



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1. INDUCCIÓN DE LA TOLERANCIA INTESTINAL A ANTÍGENOS ALIMENTICIOS. CD: CÉLULA DENDRÍTICA, NLM: NÓDULO LINFÁTICO MESENTÉRICO, TREG: LINFOCITOS T REGULADORES, AR: ÁCIDO RETINOICO. CHINTHRAJAH ET AL., 2016.</b> .....	15
<b>FIGURA 2. A) INDUCCIÓN DE LA TOLERANCIA INMUNOLÓGICA CUTÁNEA A LOS ANTÍGENOS ALIMENTICIOS; B, RUPTURA DE LA TOLERANCIA Y SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA. TSLP: LINFOPOYETINA ESTROMAL TÍMICA; IGE: INMUNOGLOBULINA E; TH2, TH9: LINFOCITOS T COOPERADORES DE PERFIL 2, 9; TFH: LINFOCITOS T COOPERADORES FOLICULARES. MODIFICADA DE CHINTHRAJAH ET AL., 2016; BERIN ET AL., 2015.</b> .....	16
<b>FIGURA 3. MECANISMOS MEDIANTE LOS CUALES UNA PERSONA ES SENSIBILIZADA A UN ALÉRGENO. IGE SÉRICA ESPECÍFICA (IGE), CÉLULA DENDRÍTICA (CD), RECEPTOR ESPECÍFICO DE LINFOCITO T (TCR), ICOS Y EL LIGANDO DE CD40 (SE MUESTRAN COMO MOLÉCULAS COESTIMULADORAS), EL SITIO DE UNIÓN A ANTICUERPOS ESPECÍFICOS (FCERI) PUEDE BAJO CIERTAS CIRCUNSTANCIAS SER SITIO DE UNIÓN DE IG PARA OTROS ALÉRGENOS O INCLUSO DE IG PARA NO ALÉRGENOS. NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE, 2017</b> .....	18
<b>FIGURA 4. MECANISMOS INMUNOLÓGICOS EN EXPOSICIONES SUBSECUENTES A UN ALÉRGENO. IGE SÉRICA ESPECÍFICA (IGE), CÉLULA DENDRÍTICA (CD), PROSTAGLANDINA D<sub>2</sub> (PGD), CISTENIL-LEUCOTRIENOS (CYS-LTs), LEUCOTRIENO B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), FACTOR ACTIVADOR DE PLAQUETAS (PAF), FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF), INTERLEUCINA 8 (IL-8), PROTEÍNA QUIMIOTÁCTICA DE MONOCITOS-1 (MCP-1) Y FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF), REACCIONES DE FASE TARDÍA (RFT). NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE, 2017</b> .....	19
<b>FIGURA 5. PERMEABILIDAD INTESTINAL EN LA ALERGI A ALIMENTICIA Y PAPEL DE CD23. CL<sup>-</sup>: IONES CLORO, IGE: INMUNOGLOBULINA E, MHC: COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD, IL: INTERLEUCINA, TCR: RECEPTOR DEL LINFOCITO T. BURTON-OETTGEN, 2011.</b> .....	21
<b>FIGURA 6. EFECTOS DE LA MICROBIOTA QUE CONTRIBUYEN A LA TOLERANCIA O SENSIBILIZACIÓN ORAL. AGCC: ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA, REG3B: PÉPTIDO ANTIMICROBIANO, RPG: RECEPTOR ACOPLADO A PROTEÍNA G. CHINTHRAJAH ET AL., 2016.</b> .....	23
<b>FIGURA 7. LA MARCHA ATÓPICA. EDAD AL DIAGNÓSTICO DE CONDICIONES ALÉRGICAS COMUNES. HILL-SPERGEL, 2017.</b> .....	24
<b>FIGURA 8. FACTORES DE RIESGO DE LA ALERGI A ALIMENTICIA DEL INICIO DE LA VIDA A LA SENECTUD. NUMEROSOS FACTORES PUEDEN DAR LUGAR A LAS AA EN EL INICIO DE LA VIDA (AZUL) Y OTROS MÁS TARDE (NEGRO), COMO RESULTADO DE CAMBIOS EN LA BARRERA INTESTINAL, INMUNOSENESCENCIA, Y OTROS FACTORES RELACIONADOS CON EL ENVEJECIMIENTO. FE: HIERRO, ZN: ZINC, VIT. C: VITAMINA C. MODIFICADO Y TRADUCIDO DE DE MARTINIS ET AL., 2019</b> .....	25
<b>FIGURA 9. DIFERENTES PATRONES DE REACTIVIDAD CLÍNICA SE OBSERVAN LUEGO DEL RETO CON EL ALIMENTO. NIVEL DE EXPOSICIÓN AL ALÉRGENO (NIVEL BAJO: BARRAS SÓLIDAS Y NIVEL ALTO: LÍNEAS DISCONTINUAS). TURNER-WAINSTEIN, 2017.</b> .....	26
<b>FIGURA 10. MECANISMOS DE INMUNOTERAPIA ORAL. LA DISMINUCIÓN DE LA ACTIVACIÓN INMUNE SE LOGRA MEDIANTE LA DESENSIBILIZACIÓN DE MASTOCITOS Y BASÓFILOS, ASÍ COMO DELECCIÓN DE LINFOCITOS TH2 EFECTORES. CD, CÉLULA DENDRÍTICA; T REG, CÉLULA T REGULADORA. Wood, 2015.</b> .....	35
<b>FIGURA 11. ESTRUCTURAS REPORTADAS PARA LOS RESIDUOS GLICOSÍDICOS UNIDOS AL GMP. ESTRUCTURA DE LAS 5 CADENAS (A-E) DE HIDRATOS DE CARBONO PRESENTES EN EL GMP. FARRELL ET AL., 2004, IMAGEN ORIGINAL DE SAITO- ITOH, 1992.</b> .....	43
<b>FIGURA 12. ESTRUCTURA PRIMARIA DEL CASEINOMACROPÉPTIDO BOVINO (CMP) SOBRE LAS VARIANTES A Y B DE LA κ-CASEÍNA BOVINA. THOMÄ-WORRINGER ET AL., 2006.</b> .....	44
<b>FIGURA 13. ESQUEMA DE LOS PROTOCOLOS DE LOS MODELOS DE CARACTERIZACIÓN DE AA Y TOMA DE MUESTRAS. (IM) MODELO DE AA CON SENSIBILIZACIÓN INTRAMUSCULAR: INMUNIZACIÓN INTRAMUSCULAR CON 1 MG DE OVOALBÚMINA (OVA) COMO ALÉRGENO PREPARADA EN HIDRÓXIDO DE ALUMINIO VÍA INTRAMUSCULAR Y B. PERTUSSIS VÍA SUBCUTÁNEA, REFUERZO: MEDIANTE LA INYECCIÓN DE OVA PREPARADA EN HIDRÓXIDO DE ALUMINIO VÍA INTRAMUSCULAR; A: AYUNO, RF: RETO FINAL CON 200 MG OVA VÍA ORAL (V.O.); (O) MODELO DE</b>	

AA CON SENSIBILIZACIÓN ORAL: INMUNIZACIÓN ORAL CON OVA PREPARADA EN BICARBONATO DE SODIO V.O.;

PC: PESO CORPORAL, A: AYUNO, RF: RETO FINAL CON 750 MG OVA/G PC V.O. .... 52

**FIGURA 14. ESQUEMA DEL PROTOCOLO DE AA EN LOS GRUPOS EXPERIMENTALES, ADMINISTRACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS Y TOMA DE MUESTRA.** PRETX: PRETRATAMIENTO, PC: PESO CORPORAL, A: AYUNO. .... 53

**FIGURA 15. CAMBIOS TEMPORALES EN LA BIOMASA DE LGG EN CONDICIONES AEROBIAS EN AUSENCIA O PRESENCIA DE GMP.** A) REPRESENTACIÓN GRÁFICA B) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS, MOSTRANDO AQUELLOS QUE PRESENTAN CAMBIOS SIGNIFICATIVOS. N= 9, 3 ENSAYOS POR TRIPLICADO; \*P < 0.01, \*\*P < 0.001, \*\*\*P < 0.0001 vs 0% GMP EN UN MISMO TIEMPO, \*P < 0.05, \*\*P < 0.0001 vs 0.1% GMP EN UN MISMO TIEMPO. ANOVA DE DOS VÍAS, POST-HOC HOLM-SIDAK'S. .... 60

**FIGURA 16. CAMBIOS TEMPORALES EN LA BIOMASA DE LGG EN CONDICIONES ANAEROBIAS EN AUSENCIA O PRESENCIA DE GMP.** A) REPRESENTACIÓN GRÁFICA B) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS, MOSTRANDO AQUELLOS QUE PRESENTAN CAMBIOS SIGNIFICATIVOS. N= 9, 3 ENSAYOS POR TRIPLICADO; \*P < 0.01, \*\*P < 0.001, \*\*\*P < 0.0001 vs 0% GMP EN UN MISMO TIEMPO, \*P < 0.001, \*\*P < 0.0001 vs 0.1% GMP EN UN MISMO TIEMPO. ANOVA DE DOS VÍAS, POST-HOC HOLM-SIDAK'S. .... 61

**FIGURA 17. CAMBIOS TEMPORALES EN EL PH DE LOS MEDIOS DE LGG EN CONDICIONES AEROBIAS EN AUSENCIA O PRESENCIA DE GMP.** REPRESENTACIÓN GRÁFICA. N= 9, 3 ENSAYOS POR TRIPLICADO; NS. ANOVA DE DOS VÍAS, POST-HOC HOLM-SIDAK'S. .... 62

**FIGURA 18. CAMBIOS TEMPORALES EN EL PH DE LOS MEDIOS DE LGG EN CONDICIONES AEROBIAS EN AUSENCIA O PRESENCIA DE GMP.** REPRESENTACIÓN GRÁFICA. N= 9, 3 ENSAYOS POR TRIPLICADO; \*P < 0.0001 vs 0% GMP EN UN MISMO TIEMPO, \*P < 0.0001, vs 0.5% GMP EN UN MISMO TIEMPO. ANOVA DE DOS VÍAS, POST-HOC HOLM-SIDAK'S. .... 62

**FIGURA 19. PORCENTAJE DE ACIDEZ EXPRESADO COMO ÁCIDO LÁCTICO DE LOS MEDIOS DE LGG EN CONDICIONES ANAEROBIAS EN AUSENCIA O PRESENCIA DE GMP.** A) REPRESENTACIÓN GRÁFICA B) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS, MOSTRANDO AQUELLOS QUE PRESENTAN CAMBIOS SIGNIFICATIVOS. N= 9, 3 ENSAYOS POR TRIPLICADO; \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001 vs 0% GMP EN UN MISMO TIEMPO, \*P < 0.05, \*P < 0.01, \*P < 0.001, \*P < 0.0001, 0.5% vs GMP EN UN MISMO TIEMPO. ANOVA DE DOS VÍAS, POST-HOC HOLM-SIDAK'S. .... 63

**FIGURA 20. INCREMENTO DE PESO CORPORAL A LOS 40 DÍAS DE INICIADO EL MODELO DE INDUCCIÓN DE AA EN LOS DIFERENTES GRUPOS ANALIZADOS.** N= 13. A) MODELO IM Y SU CORRESPONDIENTE SH-IM. NS, ANOVA DE UNA VÍA, POST-HOC DE BONFERRONI; B) MODELO O Y SU CORRESPONDIENTE SH-O. NS, T DE STUDENT. .... 64

**FIGURA 21. INVERSA DE TÍTULOS DE IgE ALÉRGICO ESPECÍFICA EN SUEROS DE ANIMALES DE LOS DIFERENTES GRUPOS ANALIZADOS.** N= 6. A) MODELO IM Y SU CORRESPONDIENTE SH-IM. \*P < 0.05, \*\*P < 0.001 vs SH-IM EN UN MISMO TIEMPO, +P < 0.01 vs AA-IM EN UN MISMO TIEMPO, ANOVA DE DOS VÍAS, POST-HOC DE HOLM-SIDAK; B) MODELO O Y SU CORRESPONDIENTE SH-O. NS, MANN-WHITNEY. .... 65

**FIGURA 22. EVALUACIÓN DEL PUNTAJE EN LA REACCIÓN DE ANAFILAXIA ALIMENTICIA EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE LOS MODELOS.** N= 8. A) MODELO IM Y SU CORRESPONDIENTE SH-IM. \*P < 0.01, \*\*P < 0.001 vs SH-IM EN UN MISMO TIEMPO, +P < 0.05, ++P < 0.01 vs AA-IM EN UN MISMO TIEMPO, PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS, POST-HOC DE DUNN; B) MODELO O Y SU CORRESPONDIENTE SH-O. NS, PRUEBA DE MANN-WHITNEY. .... 66

**FIGURA 23. TEMPERATURA RECTAL DE LOS ANIMALES ANTES Y DESPUÉS DEL RETO FINAL, EN LOS DIFERENTES GRUPOS ANALIZADOS.** N= 6. A) MODELO IM Y SU CORRESPONDIENTE SH-IM. \*P < 0.05 vs SH-IM EN UN MISMO TIEMPO, +P < 0.05 vs AA-IM EN UN MISMO TIEMPO, ANOVA DE DOS VÍAS, POST-HOC DE BONFERRONI Y DUNNET; B) MODELO O Y SU CORRESPONDIENTE SH-O. \*P < 0.05 vs SH-O EN UN MISMO TIEMPO, T DE STUDENT. .... 67

**FIGURA 24. DETERMINACIÓN DE PRESIÓN ARTERIAL MEDIA ANTES Y DESPUÉS DEL RETO FINAL, EN LOS DIFERENTES GRUPOS ANALIZADOS.** N SH-IM= 3, N AS= 4, N AA-IM= 2. A) MODELO IM Y SU CORRESPONDIENTE SH-IM. NS, KRUSKAL-WALLIS POST-HOC DUNN'S. N SH-O= 3, N AA-O= 2. B) MODELO O Y SU CORRESPONDIENTE SH-O. NS, MANN-WHITNEY. .... 68

**FIGURA 25. EXTRAVASACIÓN DE AZUL DE EVANS POR SEGMENTO INTESTINAL EN LOS DIFERENTES GRUPOS ANALIZADOS.** N= 4. A) MODELO IM Y SU CORRESPONDIENTE SH-IM. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs SH-IM, ANOVA DE UNA VÍA, POST-HOC DE BONFERRONI; B) MODELO O Y SU CORRESPONDIENTE SH-O. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs SH-O, T DE STUDENT. .... 69

- FIGURA 26. NIVELES SÉRICOS DE PROTEASA II DE MASTOCITOS EN LOS DIFERENTES GRUPOS ANALIZADOS 30 MIN LUEGO DEL RETO FINAL CON EL ALÉRGENO.** N= 3. A) MODELO IM Y SU CORRESPONDIENTE SH-IM. NS, ANOVA DE UNA VÍA, POST-HOC DE BONFERRONI; B) MODELO O Y SU CORRESPONDIENTE SH-O. NS, T DE STUDENT. .... 69
- FIGURA 27. NIVELES SÉRICOS DE PROTEASA II DE MASTOCITOS EN LOS DIFERENTES GRUPOS ANALIZADOS 120 MIN LUEGO DEL RETO FINAL CON EL ALÉRGENO.** N= 3. A) MODELO IM Y SU CORRESPONDIENTE SH-IM. NS, ANOVA DE UNA VÍA, POST-HOC DE BONFERRONI; B) MODELO O Y SU CORRESPONDIENTE SH-O. NS, T DE STUDENT. .... 70
- FIGURA 28. NIVELES SÉRICOS DE HISTAMINA EN LOS DIFERENTES GRUPOS ANALIZADOS EN EL DÍA 27, 30 MIN LUEGO DEL RETO CON EL ALÉRGENO.** N= 3. A) MODELO IM Y SU CORRESPONDIENTE SH-IM. \*P < 0.05 \*\*P < 0.01 VS GRUPO SH-IM, ANOVA DE UNA VÍA, POST-HOC DE BONFERRONI; B) MODELO O Y SU CORRESPONDIENTE SH-O. NS, T DE STUDENT..... 70
- FIGURA 29. NIVELES SÉRICOS DE HISTAMINA EN LOS DIFERENTES GRUPOS DEL MODELO IM Y SU CORRESPONDIENTE SH-IM. DÍA 40; 30 MIN LUEGO DEL RETO CON EL ALÉRGENO.** N= 3, \*P < 0.05 VS GRUPO SH-IM. ANOVA DE 1 VÍA, POST-HOC DE BONFERRONI. .... 71
- FIGURA 30. INCREMENTO DE PESO EN ANIMALES ALÉRGICOS, CON O SIN TRATAMIENTO (AA, GMP, GMP + LGG) Y SU CORRESPONDIENTE SHAM.** N= 10. NS, ANOVA DE UNA VÍA, POST-HOC DE BONFERRONI. .... 71
- FIGURA 31. PRESENCIA O AUSENCIA DE IgE EN GRUPOS DE ALERGINA, CON O SIN TRATAMIENTO (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) Y SU CORRESPONDIENTE SHAM, A LO LARGO DEL TIEMPO. N= 9.** A) REPRESENTACIÓN GRÁFICA; B) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.0001 VS SHAM EN UN MISMO TIEMPO, +P < 0.01, ++P < 0.0001 VS AA EN UN MISMO TIEMPO. ANOVA DE DOS VÍAS, POST-HOC DE HOLM-SIDAK. .... 72
- FIGURA 32. PRESENCIA O AUSENCIA DE IgG1 EN GRUPOS DE ALERGINA, CON O SIN TRATAMIENTO (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) Y SU CORRESPONDIENTE SHAM, A LO LARGO DEL TIEMPO.** N= 10. A) REPRESENTACIÓN GRÁFICA; B) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.0001 VS SHAM EN UN MISMO TIEMPO, +P < 0.05, ++P < 0.01, +++P < 0.0001 VS AA EN UN MISMO TIEMPO, ^P < 0.05 VS LGG EN UN MISMO TIEMPO, ^P < 0.0001 VS GMP EN UN MISMO TIEMPO. ANOVA DE DOS VÍAS, POST-HOC DE HOLM-SIDAK..... 73
- FIGURA 33. EVALUACIÓN DEL PUNTAJE EN LA REACCIÓN DE ANAFILAXIA ALIMENTICIA EN GRUPOS DE ALERGINA, CON O SIN TRATAMIENTO (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) Y SU CORRESPONDIENTE SHAM, A LO LARGO DEL TIEMPO ANTES Y DESPUÉS DEL RETO CON OVA.** N= 11, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 VS SHAM EN EL MISMO TIEMPO, +P < 0.05, ++P < 0.01, +++P < 0.001 VS AA EN EL MISMO TIEMPO, ^P < 0. VS GMP EN EL MISMO TIEMPO. PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS, POST-HOC DE DUNN. .... 74
- FIGURA 34. PUNTAJE DE LA REACCIÓN DIARREICA TRAS ANAFILAXIA ALIMENTICIA EN GRUPOS DE ALERGINA, CON O SIN TRATAMIENTO (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) Y SU CORRESPONDIENTE SHAM, A LO LARGO DEL TIEMPO ANTES Y DESPUÉS DEL RETO CON OVA.** N= 11, \*P < 0.05, \*P < 0.01 VS SHAM EN EL MISMO TIEMPO, ^P < 0.05 VS GMP EN EL MISMO TIEMPO. PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS, POST-HOC DE DUNN..... 75
- FIGURA 35. EXTRAVASACIÓN INTESTINAL DE AZUL DE EVANS EN GRUPOS DE ALERGINA, CON O SIN TRATAMIENTO (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) Y SU CORRESPONDIENTE SHAM. N= 5.** A) POR SEGMENTO INTESTINAL; B) INTEGRACIÓN DE LOS TRES SEGMENTOS EVALUADOS. \*P < 0.01, \*\*P < 0.001 VS SHAM, +P < 0.05, ++P < 0.01, +++P < 0.001, ++++P < 0.0001 VS AA, ANOVA DE UNA VÍA, POST-HOC DE BONFERRONI. .... 76
- FIGURA 36. A) NÚMERO Y B) ÁREA TOTAL DE PLACAS DE PEYER EN GRUPOS DE ALERGINA, CON O SIN TRATAMIENTO (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) Y SU CORRESPONDIENTE SHAM.** AA N= 10, GMP, N= 9 GMP + LGG N= 10, LGG N= 9. \*P < 0.01 \*\*P < 0.0001 VS SHAM, +P < 0.001 VS AA, ^P < 0.001 VS LGG. ANOVA DE UNA VÍA, POST-HOC DE BONFERRONI. .... 77
- FIGURA 37. NIVELES DE HISTAMINA EN GRUPOS DE ALERGINA, CON O SIN TRATAMIENTO (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) Y SU CORRESPONDIENTE SHAM.** N= 9; \*P < 0.01 VS SH, +P < 0.01, ++P < 0.0001 VS AA, ANOVA DE UNA VÍA, POST-HOC DE BONFERRONI..... 78
- FIGURA 38. EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA DE INMUNOGLOBULINAS ASOCIADAS CON LA REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD TIPO I EN EL INTESTINO DE ANIMALES ALÉRGICOS CON O SIN TRATAMIENTO (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) Y SU CORRESPONDIENTE SHAM.** N= 4. A) IgE; B) IgA. N= 4, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*P < 0.0001 VS SHAM, +P < 0.01, ++P < 0.001 VS AA, ^P < 0.01 VS LGG. ANOVA DE 1 VÍA, POST-HOC DE BONFERRONI..... 78

**FIGURA 39. EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA DE GENES ASOCIADOS CON LA REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD TIPO I EN EL INTESTINO DE ANIMALES ALÉRGICOS CON O SIN TRATAMIENTO (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) Y SU CORRESPONDIENTE SHAM. N= 4. A) MCPTII, B) TNF-A, C) IL-1B, D) CXCL-1 Y E) MUC2. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001 vs SHAM, +P < 0.05, ++P < 0.01, +++P < 0.001 vs AA. ANOVA DE UNA VÍA, POST-HOC DE BONFERRONI. .... 80**

**FIGURA 40. EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA DE FACTORES DE CRECIMIENTO Y CITOCINAS ASOCIADAS CON LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS INMUNES A PERFILES INFLAMATORIOS O REGULADORES EN EL INTESTINO DE ANIMALES ALÉRGICOS CON O SIN TRATAMIENTO (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) Y SU CORRESPONDIENTE SHAM. N= 4. A) GATA3, B) IL-13, C) IL-5, D) T-BET , E) IFN- $\gamma$ , F) ROR $\gamma$ T , G) IL-17, H) IL-22, I) FoxP3, J) IL-10 Y K) TGF-B. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001 vs SHAM, +P < 0.05, ++P < 0.01, +++P < 0.001 vs AA,  $\gamma$ P < 0.05,  $\gamma\gamma$  P < 0.01 vs LGG. ANOVA DE UNA VÍA, POST-HOC DE BONFERRONI..... 81**

**FIGURA 41. RELACIÓN RELATIVA DE mRNA ENTRE FACTORES REGULADORES DE TRANSCRIPCIÓN EN EL INTESTINO DE ANIMALES ALÉRGICOS CON O SIN TRATAMIENTO (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) Y SU CORRESPONDIENTE SHAM. N= 4. A) GATA3/T-BET, B) GATA3/ROR $\gamma$ T Y C) GATA3/FoxP3. \*P < 0.01, \*\*P < 0.001 vs SHAM, +P < 0.05, ++P < 0.01, +++P < 0.001 vs AA, ANOVA DE UNA VÍA, POST-HOC DE BONFERRONI..... 83**

**FIGURA 42. ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y DEL INFILTRADO DE EOSINÓFILOS EN EL INTESTINO DE ANIMALES ALÉRGICOS CON O SIN TRATAMIENTO (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) Y SU CORRESPONDIENTE SHAM MEDIANTE LA TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA (HES). N= 4. A) IMÁGENES DE LA TINCIÓN, SE MARCAN CON FLECHAS LOS EOSINÓFILOS (HES); B) ALTURA DE VELLOSIDADES; C) PROFUNDIDAD DE CRIPTAS; D) ESPESOR DE LA CAPA CIRCULAR MUSCULAR; E) NÚMERO DE EOSINÓFILOS/CAMPO (5000MM<sup>2</sup>) \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 \*\*\*\*P < 0.0001 vs SHAM, +P < 0.001, ++P < 0.0001 vs AA,  $\wedge$  P < 0.05,  $\wedge\wedge$  P < 0.01,  $\wedge\wedge\wedge$  P < 0.0001 vs GMP. ANOVA DE UNA VÍA, POST-HOC DE BONFERRONI. .... 84**

**FIGURA 43. ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y DEL INFILTRADO DE EOSINÓFILOS EN EL INTESTINO DE ANIMALES ALÉRGICOS CON O SIN TRATAMIENTO (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) Y SU CORRESPONDIENTE SHAM MEDIANTE LA TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA (HES). N= 4. A) IMÁGENES DE LA TINCIÓN, SE MARCAN CON FLECHAS LAS CÉLULAS CALICIFORMES; B) NÚMERO DE CÉLULAS CALICIFORMES/CAMPO (1MM<sup>2</sup>). \*P < 0.001 vs SHAM, +P < 0.05, ++P < 0.001, +++P < 0.0001 vs AA,  $\wedge$  P < 0.01vs GMP. ANOVA DE UNA VÍA, POST-HOC DE BONFERRONI. .... 86**

## ACRÓNIMOS

AA: alergia alimenticia  
 ALA:  $\alpha$ -lactoalbúmina  
 AGCC: ácidos grasos de cadena corta  
 BLG:  $\beta$ -lactoglobulina  
 BSA: albúmina sérica bovina  
 CAC: codex alimentarius  
 CysLT: cisteinil-leucotrieno  
 DNA: ácido desoxirribonucleico  
 DO: densidad óptica  
 EFSA: Autoridad Europea de Seguridad en materia Alimentaria  
 ELISA: ensayos de inmunoabsorción ligados a enzima  
 FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura  
 Fc $\epsilon$ R1: receptor de alta afinidad para IgE  
 GI: gastrointestinal  
 GMP: glicomacropéptido  
 Ig: inmoglobulina  
 IL: interleucina  
 ILSI: Instituto Internacional de Ciencias de la Vida  
 i.m.: intramuscular  
 IT: inmunoterapia  
 IUIS: Unión Internacional de Sociedades de Inmunología  
 LGG: *Lactobacillus rhamnosus* LGG  
 LYS: lisozima  
 LPS: lipopolisacárido  
 MCP-1: proteína quimiotáctica  
 NLM: nódulo linfático mesentérico  
 OVA: ovoalbúmina  
 OVM: ovomucoide  
 OVT: ovotransferrina  
 PAF: factor activador plaquetario  
 PATC: Comité Técnico de Alergenicidad de Proteínas  
 PBS: tampón fosfato salino  
 PCA: anafilaxia cutánea pasiva  
 PGD: prostaglandina  
 rpm: revoluciones por minuto  
 TCR: receptor del linfocito T  
 TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante beta  
 TIM: moléculas con dominios tipo mucina y tipo Ig de linfocitos T  
 TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa  
 TSLP: linfopoyetina estromal tímica  
 SIM: sistema inmune de mucosas  
 SEM: error estándar de la media  
 ssf: solución salina fisiológica  
 VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial  
 v.o.: vía oral  
 WAO: Organización Mundial de la Alergia  
 WHO: Organización Mundial de la Salud

## RESUMEN

La AA es una patología idiosincrática y compleja con una aparición creciente en la población actual, gracias a diversos factores. Cursa con pérdida de tolerancia a antígenos alimenticios, mediada por IgE, cuyos signos clínicos se desencadenan luego de la liberación de mediadores vasoactivos. Algunas terapias actuales examinan el impacto de sustancias no farmacológicas como los péptidos bioactivos o los probióticos. El GMP proveniente de la kappa-caseína láctea, junto con el LGG, un probiótico, tienen efecto inmunorregulador en numerosas patologías GI. En este trabajo se comprobó además que el péptido tiene efecto prebiótico *in vitro* en el crecimiento del LGG a la concentración de 0.5%. Posteriormente, mediante la caracterización de AA en rata Wistar se concluyó la necesidad de sensibilizar a los animales sistémicamente en conjunto con el uso de adyuvantes y después se evaluó el impacto profiláctico oral del péptido y el probiótico, tanto en los signos, variables séricas e inflamatorias de la patología. El GMP logró disminuir la respuesta de anticuerpos, las manifestaciones GI, la inflamación y las alteraciones histopatológicas intestinales gracias al cambio del perfil celular clásico del fenómeno alérgico hacia uno regulador. Con el LGG se apreció este efecto, pero, aun cuando éste modula la síntesis de IgE y la inflamación intestinal, el efecto en las manifestaciones GI de este grupo de animales no fué concluyente. Al utilizar ambos tratamientos de forma simultánea, no se observó mejoría al comparar contra los efectos inducidos únicamente por el GMP, por lo que se sugiere continuar con el estudio de este probiótico en las AA para aclarar sus mecanismos de acción. Por todo lo anterior, se considera que el estudio completo de los beneficios terapéuticos de estos agentes en AA logrará contribuir en gran medida a la comprensión de la patología.

## ABSTRACT

Food allergy (FA) is an idiosyncratic disease, complex and with a growing occurrence in the current population, due to different factors. It causes the loss of tolerance to food antigens, and it is mediated by IgE, with signs that are triggered by the release of vasoactive mediators. Some actual therapies explore the impact of non-pharmacological substances like the bioactive peptides or the probiotics. The GMP from the dairy kappa-casein, along with the LGG, a probiotic, have an immune-regulatory effect over several gastrointestinal pathologies. In this work, it was shown that the peptide has a prebiotic *in vitro* effect on the LGG growth at 0.5%. Afterwards, through the characterization of the FA in Wistar rat, it was concluded the need of the systemic sensitization along with the adjuvant administration, and later, the profilactic effect of both, the peptide and the probiotic was evaluated, in the signs, serum and inflammatory variables of the pathology. The glycomacropeptide diminished the antibody response, the gastro-intestinal manifestations, the inflammation, and the intestinal histopathological alterations due to the change of the classical cellular allergic profile to a regulatory one. With LGG, this effect was assessed, but even if it could modulate the IgE synthesis and the intestinal inflammation, the effect over the clinical signs was not conclusive. When using both substances simultaneously, no improvement over the GMP alone induced effects was observed, which therefore suggests that it is necessary to continue with the study of the probiotic over the FA, to clarify its mechanisms of action. Due to all the above, it is believed that the complete study of the therapeutical effects of these agents over FA will contribute greatly to the better understanding of the pathology.

## 1. Introducción

En medicina, el término alergia apareció por primera vez en 1906, cuando el pediatra Clemens von Pirquet observó que la respuesta a algunos antígenos dio lugar, más que a la protección del huésped, a un daño en el mismo. Fue hasta 1963 que Gell y Coombs trabajaron en un esquema de clasificación para distinguir entre los diversos tipos de alergia o hipersensibilidad (I-IV), descrito en su libro “Clinical aspects of immunology<sup>1</sup>” (Igea, 2013).

La hipersensibilidad se divide en “alergia mediada por Inmunoglobulina (Ig) E” y “reacciones no mediadas por IgE”, donde se incluye a las reacciones mediadas por anticuerpos IgG y la activación del complemento (tipos II y III) o por células T (tipo IV). Las reacciones de hipersensibilidad tipo I (o alergias) son iniciadas por la interacción de un anticuerpo IgE y un antígeno multivalente. En individuos normales, la concentración sérica de IgE es la más baja de cualquiera de las clases de Ig, y en individuos sanos sólo existen anticuerpos IgE en respuesta a infecciones parasitarias. Algunas personas, sin embargo, están predispuestas a generar anticuerpos IgE contra antígenos ambientales comunes; muchos de estos antígenos entran al huésped, a concentraciones muy bajas, por medio de tejidos mucosos y tienden a predisponer al individuo a generar respuestas Th2, lo que precede la secreción de IgE por linfocitos B. Las alergias a los alimentos, cuya incidencia está aumentando, son un tipo común de atopía. En niños, éstas explican más respuestas anafilácticas que cualquier otro tipo de alergia (Owen, 2014).

La atopía es definida por la Organización Mundial de la Alergia (WAO, por sus siglas en inglés) y la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI, por sus siglas en inglés) como una tendencia personal o familiar, usualmente en la infancia o adolescencia, a ser sensibilizado y producir anticuerpos IgE en respuesta a exposición ordinaria a alérgenos, usualmente proteínas. Como consecuencia, estas personas pueden desarrollar síntomas típicos de alergia focalizada como asma, rinoconjuntivitis, eczema o alergia gastrointestinal (GI), aunque no todos los casos están mediados por la presencia de IgE (Johansson et al., 2001).

La sensibilización atópica o la producción de anticuerpos puede documentarse en pruebas *in vitro* e *in vivo*, frecuentemente a través de pruebas de punción cutánea (*skin prick*) (Fiocchi et al., 2012). La alergia mediada por IgE puede ser dividida en “alergia atópica”, inducida por anticuerpos IgE alérgeno-específicos luego de la exposición a cantidades mínimas (picogramos-nanogramos) de moléculas antigénicas; y en “alergia no atópica”, mediada por IgE y caracterizada por la producción de esta Ig luego de la exposición a grandes cantidades de alérgeno (microgramos-miligramos), que frecuentemente atraviesan la barrera cutánea, casi siempre luego de exposiciones repetidas al alérgeno (Owen, 2014). Este trabajo se centra en la primera.

Es importante destacar que un individuo no nace alérgico, sino que tiene una predisposición genética, y junto con la interacción con el medio ambiente se manifiesta la reacción alérgica (Smaldini *et al.*, 2016). Esta forma de expresión, hablando específicamente de la alergia alimenticia (AA), determina que se trate de una enfermedad multifactorial; así como, idiosincrática y

---

<sup>1</sup> En su libro, Gell y Coombs utilizan la definición “reacciones alérgicas que producen daño tisular” para este tipo de reacciones. La clasificación divide a las reacciones en los tipos I-IV, basándose en los mecanismos inmunológicos desencadenantes (Gell & Coombs, 1963).

pleomórfica, debido a que puede variar desde síntomas crónicos GI hasta anafilaxia severa (Aldemir *et al.*, 2008).

## 2. Antecedentes

### 2.1. Alergias alimenticias

Las alergias alimenticias (AA) también llamadas alimentarias, han sido descritas desde hace muchos años, y siguen siendo un tema controversial debido a la variada sintomatología que provocan, así como a los patrones inmunológicos y etiopatogénicos que se observan durante su establecimiento y evolución. En la actualidad se afirma que la epigenética, la alimentación de la madre durante el embarazo, los factores nutricionales, la nutrigenómica y el ambiente de los primeros años de vida determinarán la función del sistema inmune a largo plazo; por tanto, incidirán en la aparición y el tipo de AA (Rossel-Araya, 2011).

Una idea interesante de “*alergia alimentaris*” (término latino para AA) se utilizó en 1981, definiéndola como una respuesta inmune a alérgenos o componentes alimenticios y sus aditivos, mediada frecuentemente por reacciones humorales antígeno-anticuerpo (Fries, 1981).

La mayor parte de los elementos de esta definición han permanecido en la que aún se propone por la WAO (Johansson *et al.*, 2001), sabiendo actualmente que, cuando se demuestra la participación de mecanismos inmunológicos, se utiliza el término de AA y si hay participación de IgE se denomina AA mediada por IgE. El resto de las reacciones antes denominadas intolerancias a alimentos pueden denominarse hipersensibilidad alimenticia no alérgica (Bruijnzeel-Koomen *et al.*, 1995; Ortolani *et al.*, 1999).

Actualmente, también se le define como síndrome de polen-alimento la patología que se da en aquellos pacientes con síntomas secundarios a sensibilización primaria a pólenes con reactividad cruzada con componentes alimentarios (un mecanismo de AA tipo 2, que se tratará más adelante) (Ma *et al.*, 2003) y al síndrome de alergia oral como la patología con síntomas exclusivamente orofaríngeos relacionados con la ingesta de cualquier alimento (consecuencia de AA tipo 1 o 2) (Azamar-Jácome *et al.*, 2017).

Dentro de la clasificación de las reacciones adversas a los alimentos existen también otras reacciones adversas no mediadas por IgE, pero, de carácter inmunológico. Entre estas últimas se encuentran la colitis y enterocolitis inducida por alimentos, la enfermedad celiaca, la dermatitis herpetiforme y la alérgica, y otras pulmonares, como la hemosiderosis inducida por leche de vaca. Adicionalmente, existen otras reacciones no inmunológicas no tóxicas conocidas como intolerancias con participación de fenómenos enzimáticos o metabólicos, ejemplos concretos son la intolerancia a la lactosa o las malabsorciones de carbohidratos.

En otro gran grupo se incluyen las reacciones a alimentos con etiología que no ha sido claramente determinada como inmunológica; entre ellas, la anafilaxia inducida por ejercicio dependiente de alimentos, las reacciones adversas a aditivos y la esofagogastroenteropatía eosinofílica. Por otro lado, existen reacciones adversas clasificadas como tóxicas, como las bacteremias y las mediadas por componentes farmacológicos en alimentos, y otro grupo de reacciones no claramente relacionadas a la ingesta de alimentos, como el síndrome de colon irritable y la enfermedad

inflamatoria intestinal crónica. Por las manifestaciones que cada una presenta, es importante realizar un diagnóstico diferencial completo antes de iniciar el tratamiento para AA (CENETEC, 2011).

En la siguiente tabla se presenta un panorama de las características generales de la AA en países latinoamericanos, a partir de artículos con análisis epidemiológicos originales obtenidos mediante una búsqueda sistemática (Sánchez-Sánchez, 2013). La tabla (1) recopila aspectos importantes de la epidemiología de la alergia alimenticia de 484 artículos, útiles para el abordaje inicial de la patología.

**Tabla 1. Características generales de la AA en países latinoamericanos.**

	PAÍS					
	México	Costa Rica	Colombia	Venezuela	Brasil	Chile
<b>Artículos Revisados</b>	9	2	3	1	4	1
<b>Población de estudio</b>	Pacientes alérgicos y controles	Pacientes alérgicos y controles	Población general	Pacientes con dermatitis atópica	Pacientes alérgicos y controles	Pacientes con varios tipos de alergia
<b>Frecuencia de sensibilización al alimento</b>	30-70% casos 20% controles	0-70% casos 2-40% controles	15-23%	80% casos 20% controles	40-80% casos 20-40% controles	15%
<b>Alimentos principales en la respuesta IgE</b>	Pescado, leche de vaca, frutas, chile, tomate	Pescado, vegetales, cacahuete y cereales	Fruta, vegetales y pescado	Leche de vaca	Pescado, huevo, leche de vaca, trigo	Depende de la edad: leche, huevo, carne, soya, naranja
<b>Alimentos principales en la respuesta celular</b>	Huevo (43%), leche (42%), soya (35%), trigo (28%)	N/D	N/D	N/D	Leche (34%), huevo (37%), soya (28%), trigo (28%)	N/D
<b>Dieta de provocación y eliminación</b>	1 artículo: excluir más del 85% de las reacciones	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
<b>Sistemas afectados</b>	Vías aéreas	Vías aéreas	Piel, tracto GI	Piel y vías aéreas	Piel y vías aéreas	N/D

N/D: No hay datos, GI: Gastrointestinal. **Sánchez & Sánchez, 2013.**

### 2.1.1. Breve panorama mundial de la prevalencia de las alergias alimenticias

Como se menciona en diversas revisiones sobre epidemiología de la AA, las cifras reportadas suelen ser más altas que las confirmadas por reto oral con el alérgeno; además, de que existen numerosos factores que modifican la prevalencia de esta patología (Nwaru *et al.*, 2014; Sicherer *et al.*, 2017; Sicherer-Sampson, 2018). La WAO definió en general que el 2.5% de la población sufre de esta patología (Fiochi, 2017), y se sabe según información de este mismo organismo que la AA

afecta entre el 6 y 8% de los niños menores de 4 años y entre el 1 y 3% de la población adulta (San Mauro-Martín *et al.*, 2014). Se sabe también que esta patología ha incrementado en ciudades occidentalizadas gracias a la industrialización y otros cambios (Osborne, 2011; Prescott, 2011). La alergia a los alimentos ha tenido un incremento en países industrializados en los últimos años, estimándose una prevalencia general de 3 a 35%, siendo más frecuentes la alergia a proteínas de leche, huevo, cacahuete y mariscos. Se sabe que esta prevalencia varía en función de la edad y la población de que se trate (CENETEC, 2011). Con el acelerado ritmo de crecimiento poblacional en los últimos 60 años, se estima que para el año 2050, la prevalencia a nivel mundial de las AA afectará a 4 mil millones de personas (San Mauro-Martín *et al.*, 2014).

En un proyecto colaborativo entre la WAO y la Red Mundial de Universidades, donde se incluyen 93 países miembros, se reportan grandes variaciones comparativas en la prevalencia de la AA según datos disponibles hasta ese momento, así como en las metodologías para la determinación de ésta, pero se mencionan las menores prevalencias para Tailandia e Islandia, así como las más altas para Canadá, Finlandia y Australia (Prescott *et al.*, 2013).

En México existe poca información epidemiológica sobre AA; pero, se ha analizado a través del estudio Mexipreval; un estudio observacional, transversal y descriptivo, en la República Mexicana mediante un muestreo por conveniencia. Este reporta que el 70% de los pacientes con sospecha de AA corresponde a pacientes pediátricos, manifestándose como síndrome de alergia oral (SAO) en 37.2% (Medina-Hernández *et al.*, 2015). Así mismo, se estima que el SAO afecta al 5.3% de la población pediátrica en nuestro país, mientras que la prevalencia pediátrica en E.U.A. es del 5% y en la población adulta del 8% (Azamar-Jácome *et al.*, 2017). En un estudio realizado en el Hospital Universitario de Monterrey (Nuevo León), se encontró a la AA como una comorbilidad de los pacientes que acudían a consulta de alergia, con una frecuencia de 2.6% (Medina-Hernández *et al.*, 2015).

Las desigualdades en la estadística de la patología podrían reflejar diferencias en la conciencia o percepción de la enfermedad, acceso al sistema de salud, influencias socioeconómicas o verdaderas diferencias en prevalencia entre individuos (Soller *et al.*, 2015).

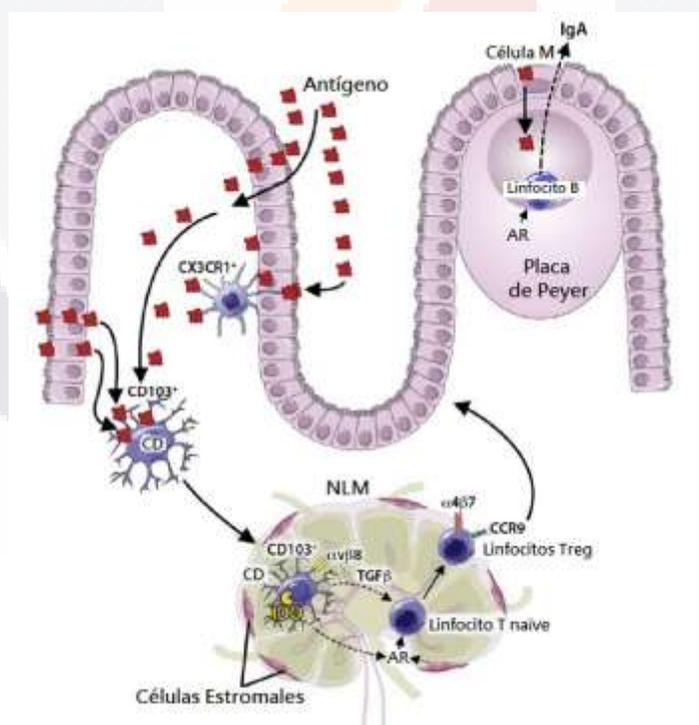
### **2.1.2. Mecanismos inmunológicos implicados**

En los últimos años, la investigación básica relacionada con la patología alérgica a alimentos se ha enfocado al entendimiento de los mecanismos de sensibilización y de la enfermedad alérgica. A continuación, se muestran los mecanismos celulares y moleculares que tienen lugar durante las diferentes fases de la AA. Se expondrán primero las principales vías de entrada de los alérgenos alimentarios que desencadena la etapa de la sensibilización, luego la fase de hipersensibilidad GI inmediata y finalmente la fase crónica de la hipersensibilidad GI.

#### **2.1.2.1. Entrada del alérgeno y sensibilización**

El intestino puede tolerar la presencia de una gran cantidad de antígenos que atraviesan la barrera GI y que llegan a la circulación general sin producir sintomatología. Esta inducción de tolerancia depende mayoritariamente de la frecuencia de exposición antigénica. Existen diferentes vías mediante las cuales los antígenos alimenticios atraviesan la barrera del epitelio mucoso: por difusión

paracelular, por transcitosis en las células epiteliales intestinales, endocitosis o transcitosis por las células M, o mediante el muestreo del lumen intestinal que realizan las células mieloides  $CD11c^+ CX_3CR1^+$  de la lámina propia. No se conoce el mecanismo exacto, pero se postula que el antígeno es captado por las proyecciones transluminales de células  $CX_3CR1^+$ , mismas que llegan al lumen intestinal sin modificar las uniones estrechas y la integridad de la barrera intestinal. Estas células no migran a los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM), pero, se propone que pudiesen pasar el antígeno a las células dendríticas  $CD103^+$ . Tal como se observa en la figura 1, una vez que las células dendríticas  $CD103^+$  en la lámina propia capturan al antígeno, migran a los NLM donde los presentan a linfocitos T naïve. Bajo situaciones de homeostasis, se produce la inducción de células T reguladoras  $\alpha 4\beta 7^+ CCR9^+$  de alojamiento intestinal y células plasmáticas productoras de IgA, a través de la producción, por parte de las células dendríticas  $CD103^+$ , de ácido retinoico (derivado de la vitamina A), factor de crecimiento transformante (TGF)- $\beta$ , indolamina 2, 3-dioxigenasa (enzima que participa en el catabolismo del triptófano) y a la sobreexpresión por estas células de  $\alpha\nu\beta 8$  para activar TGF- $\beta$  latente (Berin-Mayer, 2013; Chinthrajah *et al.*, 2016). Por lo general, se produce una hiporrespuesta o tolerancia inmune, debida a anergia clonal. Así mismo, factores dietarios como la vitamina A y factores microbianos como *Clostridium spp.* y el polisacárido A de *Bacteroides fragilis* promueven la generación de células T reguladoras; a su vez, éstas suprimen activamente la sensibilización a alimentos y se diseminan a otros sitios del organismo (Berin-Mayer, 2013). Además, en individuos tolerantes, la mayor parte de los anticuerpos frente a alimentos son de clase IgG (Tang-Martino, 2013; Gocki-Bartuzi, 2016).



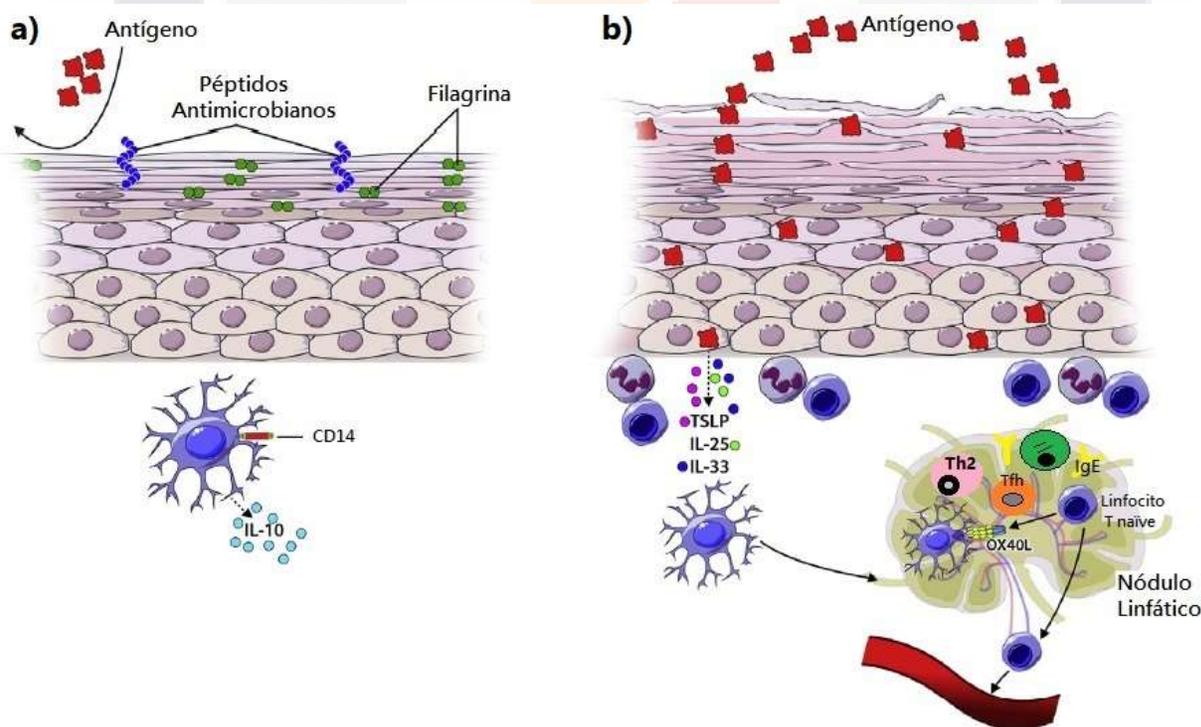
**Figura 1. Inducción de la tolerancia Intestinal a antígenos alimenticios.** CD: Célula Dendrítica, NLM: Nódulo linfático mesentérico, Treg: Linfocitos T reguladores, AR: Ácido Retinoico. Chinthrajah *et al.*, 2016.

Adicionalmente, se sabe que el sitio de presentación del antígeno posee un rol importante en la determinación del tipo de respuesta de regulación. La proliferación de células de regulación específicas en tejido linfático GI (como placas de Peyer y NLM), así como la secreción de cantidades

variables de sustancias como la interleucina (IL)-10 son críticas para las respuestas tolerogénicas (Berin-Mayer, 2013). La fragilidad en la inducción de tolerancia da lugar a los fenómenos relacionados a la alergia que se tratarán a continuación.

La sensibilización a alérgenos alimenticios puede llevarse a cabo por numerosas vías, como ya se sabe en la actualidad. Una de las maneras más investigadas de sensibilización para alérgenos alimenticios y también inhalados y con más consecuencias durante los primeros años de vida de los niños, es la sensibilización en útero, la cual, puede llevarse a cabo por transferencia transplacentaria. Mediciones de IgE alérgeno-específica mediante tecnología de microarreglos en fuentes como el cordón umbilical, o sangre materna o fetal soportan esta idea (Kamemura *et al.*, 2012).

Entre las manifestaciones más comunes de AA se encuentran la urticaria o el eczema, por lo que se ha explorado el vínculo entre los sistemas cutáneo y GI en el caso de la AA. En 2015, Martin y colaboradores realizaron un estudio de cohorte en 4453 niños; con ello, demostraron una probabilidad 5 veces mayor de desarrollar una reacción de AA mediada por IgE en los niños con eczema en relación con los que no lo presentaban. Tal como se observa en la figura 2a, cuando la función de barrera del estrato córneo está conservada (homeostasis) elementos como péptidos antimicrobianos o IL-10 liberada por células dendríticas CD14<sup>+</sup>, así como el mantenimiento óptimo de los niveles de filagrina, una proteína estructural de la capa granular (McGrath, 2008), promueven el mantenimiento de la tolerancia a alérgenos (Chinthrajah *et al.*, 2016).

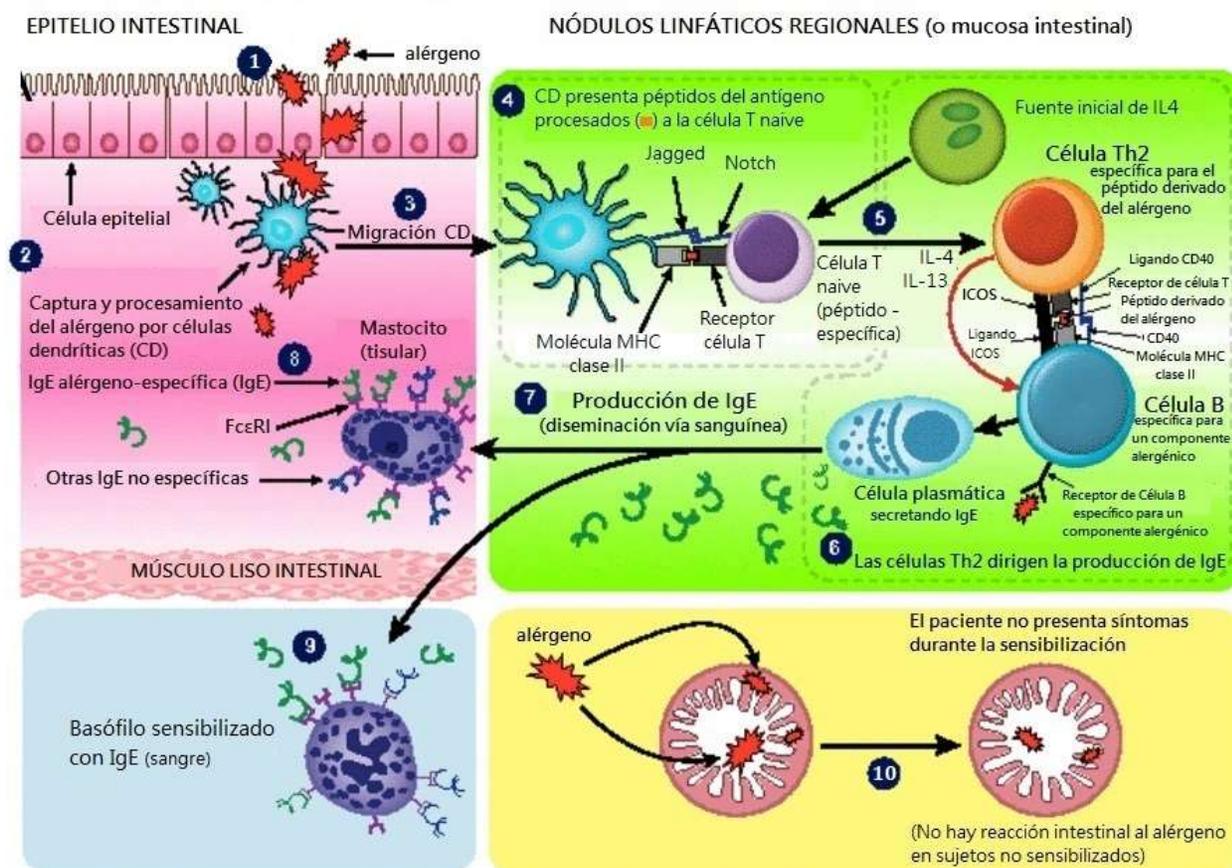


**Figura 2. a) Inducción de la tolerancia inmunológica cutánea a los antígenos alimenticios; b, Ruptura de la tolerancia y sensibilización cutánea.** TSLP: Linfopoyetina Estromal Tímica; IgE: Inmunoglobulina E; Th2, Th9: Linfocitos T cooperadores de perfil 2, 9; Tfh: Linfocitos T cooperadores foliculares. **Modificada de Chinthrajah et al., 2016; Berin et al., 2015.**

Sin embargo, los queratinocitos son capaces de producir linfopoyetina estromal tímica (TSLP), IL-33 y/o IL-25 en respuesta al daño por microorganismos, por la activación por antígenos alimenticios,

así como por señales inflamatorias. Todavía no se define cómo los antígenos alimenticios podrían participar, pero la presencia de puentes disulfuro, la glicosilación, la resistencia a la proteólisis enzimática o degradación térmica, o simplemente la presencia de actividad biológica, se consideran factores importantes. TSLP, IL-33 y/o IL-25 activan a las células linfoides innatas (ILC), mastocitos, basófilos y células dendríticas a producir más citocinas que de manera coordinada activan una respuesta de predominancia tipo 2. Este microambiente puede sobreregular la expresión de OX40L en células presentadoras de antígeno, promoviendo la diferenciación de células T cooperadoras (Th) al perfil Th2 (figura 2b), linfocitos que podrían pasar a circulación sistémica. Otros factores, como, defectos genéticos o adquiridos (ej. mutaciones en el gen de la filagrina) o sitios con patología alérgica previa como la dermatitis atópica, traen como resultado la pérdida de la función de barrera en el estrato córneo incrementando la sensibilización al alérgeno. Además, se sabe que existen factores ligados a la microbiota cutánea. Por ejemplo, la enterotoxina B estafilocócica, es capaz de inducir inflamación y contribuir a la proliferación de linfocitos T foliculares mediante la liberación de IL-33 de células dendríticas, ejerciendo así, un efecto que facilita la instauración del perfil Th2 (Tordesillas *et al.*, 2014). Se ha propuesto también la importancia de receptores activados por proteasas (PAR) para capacitar a las células a iniciar eventos polarizantes hacia perfiles celulares específicos; así como, al posible inicio de reacciones inflamatorias (Sébert *et al.*, 2019). Finalmente, las células Th2 y Th foliculares diferenciadas bajo este microambiente tipo 2 incrementan el cambio de isotipo a IgE en los linfocitos B (Berin *et al.*, 2015; Chinthrajah *et al.*, 2016; National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2017). Por lo tanto, si existen en el ambiente, los alérgenos alimenticios pueden entrar al organismo a través de la epidermis y desencadenar la sensibilización (Chinthrajah *et al.*, 2016)

Los alérgenos presentes en la comida, como cualquier antígeno alimenticio, pueden cruzar el epitelio del intestino delgado como se mencionó anteriormente: a través de difusión paracelular, por transcitosis en las células epiteliales intestinales, endocitosis o transcitosis por las células M, o mediante el muestreo del lumen intestinal que realizan las células mieloides CD11c<sup>+</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> de la lámina propia (Berin-Mayer, 2013; Chinthrajah *et al.*, 2016; National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2017). En el epitelio intestinal, la fase de sensibilización inicia con la entrada del alérgeno (figura 3, 1); así como, la secreción de IL-25, IL-33 y TSLP como consecuencia de daño o inflamación epitelial, activada en algunos casos por características endógenas del alérgeno alimenticio. La TSLP, particularmente, promueve la diferenciación de las células dendríticas hacia un fenotipo promotor de células Th2. Tal como se observa en la figura 3, una vez que el alérgeno es capturado y procesado por una célula dendrítica localizada en la mucosa intestinal (2) que migra a un nódulo linfático regional (3) (u otro sitio en la mucosa intestinal), ésta presenta el péptido derivado del alérgeno (4) (físicamente asociado a una molécula del MHC clase II en la membrana) a una célula T naïve (término francés inmunológicamente aceptado para denominar al linfocito virgen) (5) con un receptor específico (TCR). Ambas células están también unidas por moléculas coestimuladoras (jagged en la membrana de la célula dendrítica y notch en la de la célula T) lo que potencia la interacción (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2017). La secreción de IL-25 por las células epiteliales podría también contribuir a la expansión de ILC tipo 2 (no mostradas en la figura 3), quienes secretan IL-5 e IL-13, para continuar con la activación de la respuesta Th2 (Yu *et al.*, 2016).



**Figura 3. Mecanismos mediante los cuales una persona es sensibilizada a un alérgeno.** IgE sérica específica (IgE), célula dendrítica (CD), receptor específico de linfocito T (TCR), ICOS y el ligando de CD40 (se muestran como moléculas coestimuladoras), el sitio de unión a anticuerpos específicos (FcεRI) puede bajo ciertas circunstancias ser sitio de unión de Ig para otros alérgenos o incluso de Ig para no alérgenos. **National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2017**

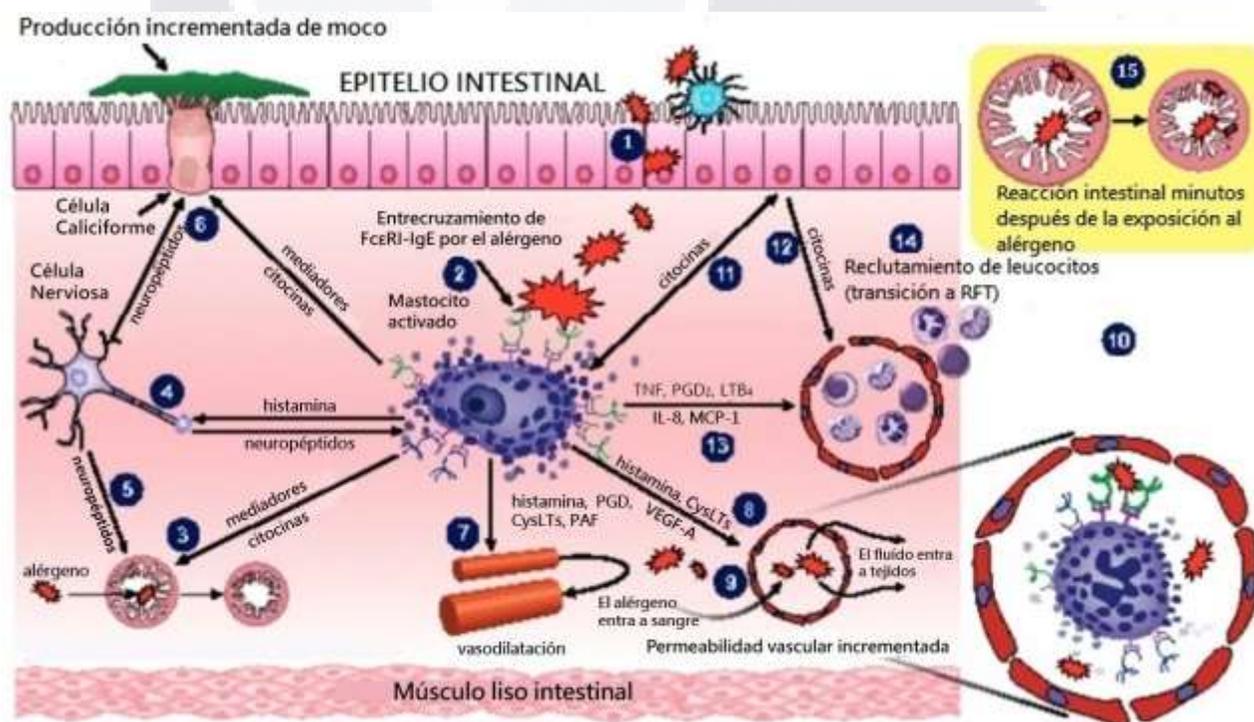
Los linfocitos Th2 mediante factores de transcripción como STAT-5 y Gata-3 (Jackson *et al.*, 2009), son la fuente más importante de IL-4 e IL-13. Estos, a través de señales por contacto intercelular (CD40/CD40L), inducen el cambio de isotipo en los linfocitos B (6) hacia la cadena pesada  $\epsilon$ , además de la diferenciación a células plasmáticas y células B de memoria. Además, las células plasmáticas incrementan la producción de IL-4 e IL-13 (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2017). La producción de IgE (7) por el linfocito B está muy regulada y, aun en individuos con niveles elevados, éstos permanecen por varios órdenes menores que otros anticuerpos como la IgG (Caraballo-Zakzuk, 2012). La concentración basal de IgE suele estar en  $\sim 150$  ng/mL mientras que la de IgG puede ser de 10 mg/mL (Gould, 2003).

Estas IgEs se fijan sobre los receptores de alta afinidad (FcεRI) de la superficie de mastocitos localizados en tracto GI (o de la piel, vías aéreas altas y bajas y otros sitios anatómicos no mostrados en la imagen) y de basófilos (9) localizados en esa zona o en sangre circulante en menor número, quedando así sensibilizados. La presencia de las moléculas de IgE específicas en la superficie de mastocitos y basófilos no activa o activa solo ligeramente a las células, pero las prepara para activarse luego de la exposición repetida al alérgeno reconocido por la IgE. Debido a la ausencia

de IgE específica la exposición inicial al alérgeno no ocasiona una reacción inmediata (10) (Yu *et al.*, 2016; National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2017).

### 2.1.2.2. Hipersensibilidad gastrointestinal inmediata

En exposiciones subsecuentes al alérgeno (figura 4, 1), al entrar en contacto con los mastocitos sensibilizados se produce un entrecruzamiento del complejo FcεRI-IgE (2) en la superficie de la célula, lo que propicia el aumento de la concentración de calcio intracelular que desencadena de una manera rápida la liberación del contenido de sus gránulos, constituido por diversos mediadores, y la síntesis *de novo* de mediadores derivados del ácido araquidónico y también de manera más lenta la secreción de citocinas y factores de crecimiento (Burton-Oettgen, 2011).



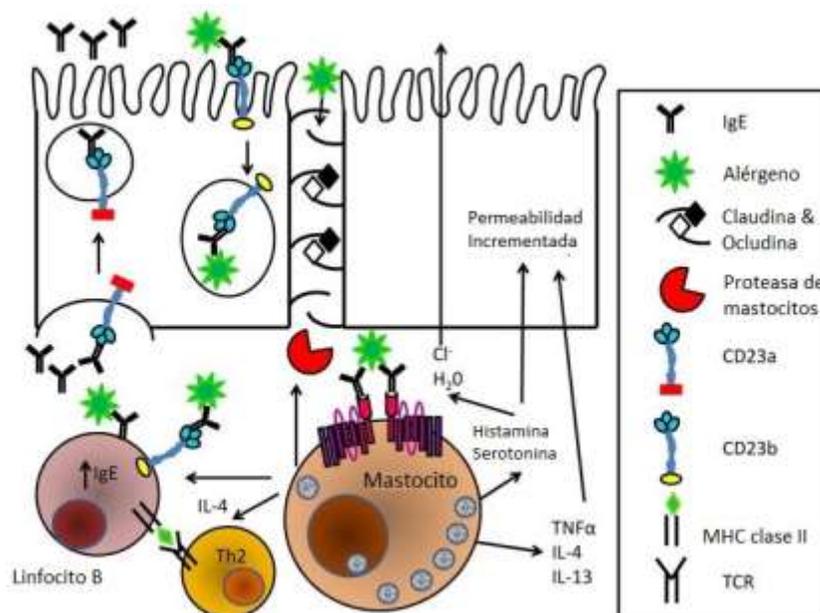
**Figura 4. Mecanismos inmunológicos en exposiciones subsecuentes a un alérgeno.** IgE sérica específica (IgE), célula dendrítica (CD), prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD), cistenil-leucotrienos (cys-LTs), leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), factor activador de plaquetas (PAF), factor de necrosis tumoral (TNF), interleucina 8 (IL-8), proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) y factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), reacciones de fase tardía (RFT). **National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2017**

Los mastocitos son células centinelas y efectoras clave en las AA y ya se ha demostrado su expansión, crecimiento y supervivencia en la mucosa GI gracias a los efectos de la IL-4, lo que a su vez incrementa la sensibilidad a anafilaxia mediada por IgE (Burton *et al.*, 2012). Además, estas células son capaces de pasar por numerosos ciclos de degranulación, seguidos por producción *de novo* de mediadores vasoactivos dependiendo del estímulo al que se enfrenten (Kunder, 2009), lo que en la AA contribuye al entendimiento de la intensidad y el alcance de sus respuestas a alérgenos.

Los mediadores mastocitarios liberados incluyen sustancias importantes como histamina y una gran variedad de otros químicos [como prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), cistenil-leucotrienos (cys-LTs), leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), factor activador de plaquetas (PAF)] y citocinas [como factor de necrosis tumoral (TNF), IL-8, proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) y factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)] con diversos efectos en células y tejidos locales, y que, al ser liberados en grandes cantidades pueden entrar en sangre y ocasionar signos y síntomas intestinales inmediatos (15) o en otros sitios como piel, vías aéreas y sistema cardiovascular (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2017).

Los efectos de los mediadores y citocinas liberados comprenden cambios en peristalsis intestinal (3), estimulación de nervios locales para liberación de neuropéptidos (4) que pueden incrementar la producción de moco por las células caliciformes (6) así como el peristaltismo intestinal (5), vasodilatación (7) y aumento en la permeabilidad vascular (8) lo que permite al alérgeno entrar al torrente sanguíneo (9). Ahí, puede unirse a las IgE en la superficie de basófilos (10), causando agregación de sus receptores específicos, activando a estas células a liberar más mediadores y citocinas cuyo efecto se antepone al de los mastocitos tisulares. Los productos de la activación mastocitaria también pueden inducir a células estructurales locales, como células epiteliales, a liberar productos que puedan influir a su vez en funciones del propio mastocito como el incremento en la secreción de mediadores (11, 12). Además, los mediadores anteriores pueden favorecer el desarrollo de la inflamación en vasos sanguíneos locales con acciones como el reclutamiento de leucocitos de circulación sistémica (13, 14). Éstos pueden mantener la inflamación local durante las reacciones de hipersensibilidad “de fase tardía” (RFT) que se asocian con manifestaciones que pueden persistir o recurrir incluso por varias horas, luego de la exposición inicial al alérgeno (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2017). Las células activadas (eosinófilos, neutrófilos y células mononucleares) liberan otros mediadores y sustancias citotóxicas, volviendo a este proceso más complejo en cuanto a tratamientos y a su resolución.

Una de las manifestaciones más interesantes de la AA es el incremento en la permeabilidad intestinal, descrito hace tiempo con el término en inglés “leaky gut” o “intestino con fuga” (Broom, 2010; Kucharski, 2017) debido a los mecanismos que lo causan, y que se observan en la figura 5. Una vez que se lleva a cabo la degranulación del mastocito, las proteasas secretadas por éste pueden hidrolizar las proteínas de uniones adherentes como ocludina o claudina lo que facilita el paso de alérgenos a la mucosa. Dos mediadores importantes, la serotonina y la histamina mediante la secreción de iones cloro, promueven la salida de agua al lumen intestinal, lo que da lugar a signos como la diarrea. Del mismo modo, la secreción de citocinas incrementa la permeabilidad intestinal (Burton *et al.*, 2011). En la misma figura se aprecia como la expresión del receptor de baja afinidad para la IgE, CD23, por las células del epitelio intestinal favorecen la captura del antígeno alimenticio a través de la IgE producida localmente por los linfocitos B de la mucosa intestinal y su transporte mediante transcitosis a la mucosa, donde exacerba el proceso alérgico. Este mismo receptor CD23 es expresado por los linfocitos B y facilita la captura del alérgeno por la propia célula B.



**Figura 5. Permeabilidad intestinal en la alergia alimenticia y papel de CD23.** Cl<sup>-</sup>: iones cloro, IgE: Inmunoglobulina E, MHC: Complejo principal de histocompatibilidad, IL: interleucina, TCR: receptor del linfocito T. **Burton-Oettgen, 2011.**

### 2.1.2.3. Hipersensibilidad gastrointestinal crónica

Cuando el estímulo antigénico es persistente (como puede ser durante la exposición continua a alérgenos de alimentos) la respuesta se transforma en una respuesta inflamatoria crónica, donde predomina la infiltración eosinofílica, el daño y la reparación mediante fibrosis (Salinas, 2012). Además, esta fase suele caracterizarse por la presencia de gran número de células innatas y adaptativas, cambios en la matriz extracelular y alteraciones en el número y función de las células en los tejidos afectados, así como citocinas y compuestos altamente tóxicos liberados por éstas. En conjunto, todos estos elementos continúan el efecto tisular nocivo en tracto GI en el caso de la AA (Galli *et al.*, 2008; Reyes-Pavón *et al.*, 2020), volviéndose las manifestaciones clínicas mucho más difíciles de revertir en este estadio de la patología (DeMartinis, 2020).

Además de las poblaciones anteriormente mencionadas de células T, se ha hecho evidente la participación de linfocitos Th9, que secretan IL-9 (Valdahon *et al.*, 2008) y cuyos efectos en modelos murinos han sido asociados al mantenimiento de la sintomatología y el daño tisular en el proceso alérgico (Chen *et al.*, 2015).

### 2.1.3. Factores de riesgo

En todos los casos de alergia y atopia, se sabe que la asociación entre genes predisponentes, la ausencia de genes protectores y la exposición ambiental al alérgeno son factores de riesgo importantes para el desarrollo de dichas patologías.

Los estudios en gemelos monocigóticos y dicigóticos han provisto aproximaciones importantes sobre el componente genético de numerosas patologías (Hrubec-Robinette, 1984). Se han encontrado datos que sugieren una fuerte influencia genética en 77 pares de gemelos (monocigóticos y dicigóticos) con casos de alergia al cacahuate con heredabilidad del 82% y el 87%,

respectivamente, utilizando un modelo que considera también componentes ambientales (Sicherer *et al.*, 2000). Además, se tienen reportes sobre mutaciones genéticas por pérdida de función en la filagrina de la barrera epitelial, asociadas con alergia al cacahuete (Brown *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2012). Ésto, se ha asociado con sensibilización a este alimento más que con reacciones clínicas al mismo; pero, se sugiere que las AA deben ser resultado de una barrera insuficiente a los alérgenos, como se menciona en el apartado de entrada del alérgeno y sensibilización (Berin-Sampson, 2013).

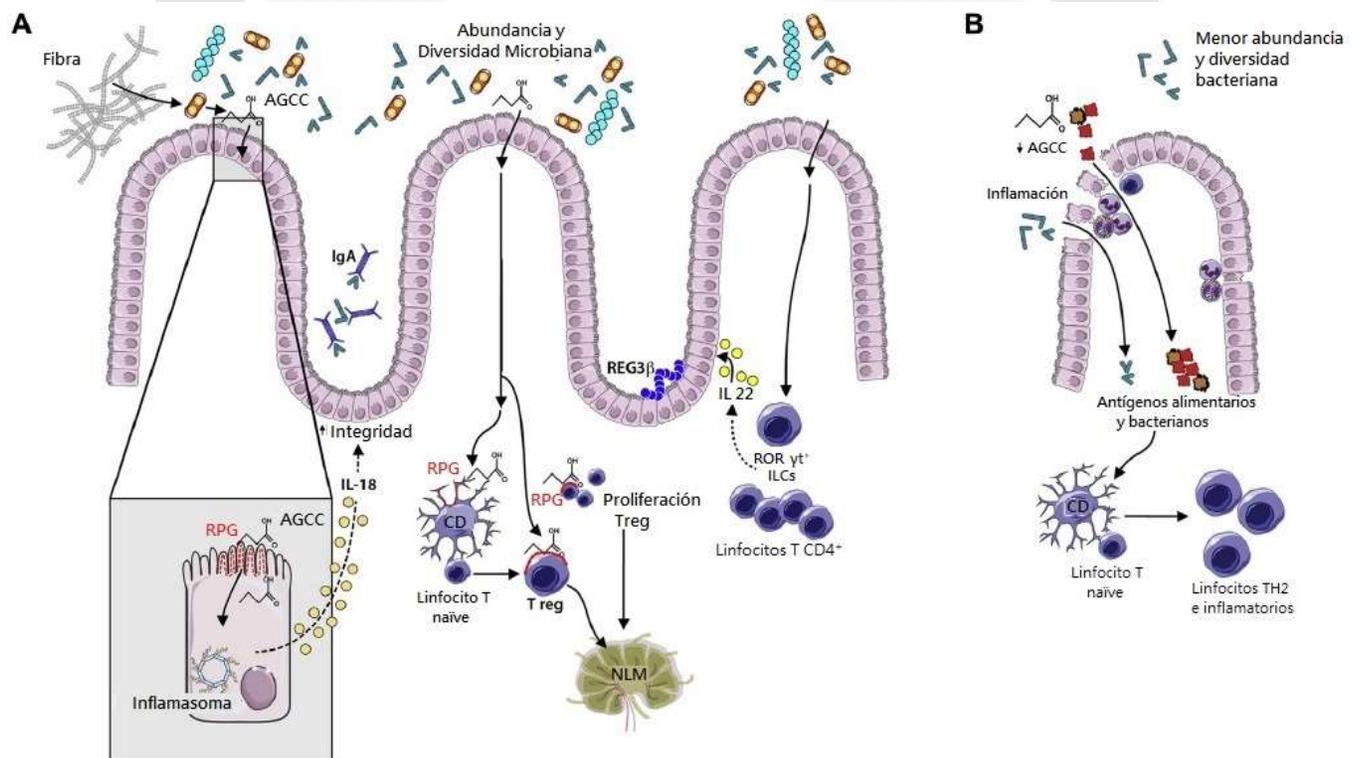
Aun cuando se analizan los componentes genéticos que deben existir en los individuos alérgicos, el fenotipo de la patología está influenciado por factores ambientales (Sicherer *et al.*, 2000). Numerosos factores ambientales inciden en el desarrollo de la alergia a alimentos, incluyendo la vía de nacimiento, el uso de antibióticos e inmunizaciones, así como la exposición a mascotas y animales en general (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2017). Estudios de las diferencias en alimentación por lactancia materna y la alimentación con fórmula maternizada y su efecto en la diversidad de la microbiota infantil, así como, las interrelaciones que se crean con el sistema inmune del huésped dejan claro el impacto de factores que antes no se consideraban útiles para el abordaje de esta entidad alérgica (Praveen *et al.*, 2015).

En el caso de las AA, por numerosas razones, la lactancia materna es recomendada los primeros meses de vida; sin embargo, aún no se esclarecen los mecanismos que la convierten en un factor protector. Diversos estudios de cohorte han demostrado la relación entre el uso de fórmulas con leche de vaca o proteína de soya con una mayor incidencia de dermatitis atópica o enfermedades respiratorias en la infancia temprana. Basado en los datos disponibles, el “Grupo Experto” de la Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica y el “Comité nutricional” de la Academia Americana de Pediatría recomiendan lactancia materna exclusiva preferentemente durante 6 meses (mínimo 4) para todos los niños, tengan o no historial de atopía, con el fin de prevenir enfermedades alérgicas. Además, aquí se recomienda utilizar una fórmula hidrolizada para niños con alto riesgo de alergia durante los primeros meses de vida, reincorporándose luego este periodo a las recomendaciones normales para la edad (Muraro *et al.*, 2004).

Aunque aún se discute si la introducción retardada de los alimentos sólidos protege contra AA, suele recomendarse iniciarla después del periodo estipulado para lactancia materna, y en el caso de los niños con alto riesgo de desarrollar la patología se propone retardar la introducción de productos lácteos, huevo, cacahuete, nueces y pescado de 12 a 36 meses dependiendo del alérgeno. Actualmente, pese al trabajo existente para postular recomendaciones eficaces para la población vulnerable a AA, aún existen limitaciones en la información sobre la prevención primaria de la patología, aunque los criterios han comenzado a cambiar de la evitación del alérgeno a la exposición al mismo para iniciar el desarrollo de tolerancia desde fases iniciales (Hamelmann *et al.*, 2007).

Otro de los factores de riesgo que aún no termina de dilucidarse es la ausencia de una microbiota intestinal de calidad y cantidad suficientes en el organismo de que se trate. El estudio del comensalismo bacteriano con el ser humano ha servido de base para el análisis de las interrelaciones entre los microorganismos y el humano en diferentes patologías. En alergias, este análisis inicia desde la postulación de la hipótesis de la higiene, descrita desde 1989, que relacionó la exposición microbiana tardía con una incidencia aumentada de fiebre del heno. Dicha hipótesis resultó novedosa en su época pues contrastó los postulados anteriores sobre la prevalencia de ambientes asépticos para el desarrollo de la inmunidad (Okada *et al.*, 2010). Se ha visto que la desviación en perfiles Th1/Th2 contribuye a la producción de IgE y a las respuestas alérgicas,

sugiriéndose que en los países desarrollados la falta de contacto microbiano en la niñez que normalmente favorecería respuestas Th1 parciales, redirige la respuesta inmune hacia un fenotipo Th2 y por tanto predispone a desórdenes alérgicos (Okada *et al.*, 2010). Además, como menciona en apartados anteriores, el intestino es uno de los sitios donde existe mayor exposición a microorganismos patogénicos desde las primeras etapas de vida y la disfunción de la microbiota, o su composición, así como modificaciones en los patrones de colonización intestinal se han documentado en numerosas patologías (Molloy *et al.*, 2013) entre las cuales también se encuentra la AA (Prince *et al.*, 2015). En esta patología, el análisis de la microbiota intestinal *per se* ha sido abordado por varios motivos. El primero, es que se sabe que existen modificaciones en la microbiota que se han esclarecido mediante el uso de modelos murinos; así, se tienen reportes de que la expresión de IL-33 se encuentra incrementada en células epiteliales de animales libres de gérmenes, mientras que las células T reguladoras ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> se encuentran reducidas en estos animales (Ohnmancht *et al.*, 2015); por otro lado, se ha observado la presencia de disbiosis en pacientes con AA. Fazlollahi y colaboradores (2018) analizaron mediante un estudio multicéntrico una cohorte de 141 niños con AA encontrando incrementos en las familias de *Lachnospiraceae*, *Streptococcaceae*, y *Leuconostocaceae* al comparar con sus controles.



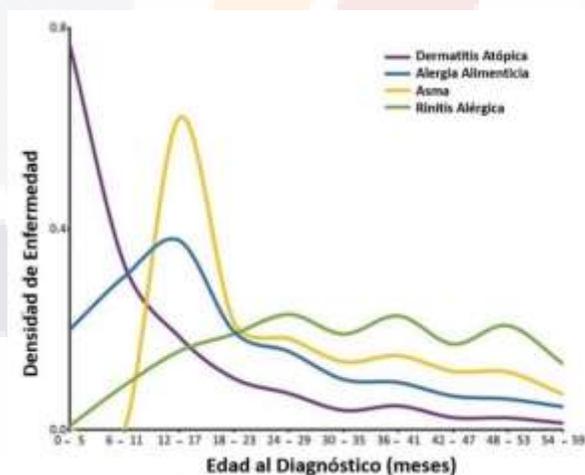
**Figura 6. Efectos de la microbiota que contribuyen a la tolerancia o sensibilización oral.** AGCC: ácidos grasos de cadena corta, REG3β: péptido antimicrobiano, RPG: receptor acoplado a proteína G. **Chinthrajah *et al.*, 2016.**

De igual forma, la actividad conjunta del sistema inmune de mucosas (SIM), con la microbiota intestinal de calidad permite el predominio en el organismo de un ambiente tolerogénico. Como se ilustra en la figura 6, la diversidad y la abundancia microbiana promueven este estado. La fermentación de fibras dependiente de microorganismos produce ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que se unen a receptores acoplados a proteínas G en células del epitelio intestinal para activar la producción de IL-18 por el inflamasoma, lo que, aunado a la secreción de péptidos antimicrobianos (como REG3β), fortalece la barrera epitelial.

Las células dendríticas contribuyen al cambio de linfocitos T naïve hacia un perfil regulador (FoxP3<sup>+</sup>) y a su proliferación; lo que, junto con la acetilación de la histona H3 del promotor de FoxP3<sup>+</sup> por los AGCC puede contribuir a la diferenciación, inducción o preservación de dichos linfocitos. La IL-22 proveniente de ILCs RORγt<sup>+</sup> y linfocitos T CD4<sup>+</sup> es un factor esencial para la integridad epitelial y la síntesis de péptidos antimicrobianos o moco. Mientras las condiciones del ambiente permanezcan tolerogénicas, tanto las células dendríticas colónicas como los linfocitos migran a NLM y se mantienen en el fenotipo regulador luego de la interacción con otras células intestinales, o algunas otras que transportan citocinas, metabolitos u otras sustancias de diferentes sitios corporales (Cao *et al.*, 2014, Chinthrajah *et al.*, 2016; Sampson, 2018).

En el escenario opuesto, cuando ocurren algunos cambios en la abundancia o diversidad bacteriana se disminuyen los factores mencionados anteriormente (AGCC e interleucinas) lo que incide en la integridad epitelial, favoreciendo el paso de antígenos, microorganismos o alérgenos alimenticios. Además, la activación de células dendríticas en respuesta a estímulos inflamatorios promueve el desarrollo de respuestas Th2 (Chinthrajah *et al.*, 2016) y la sensibilización alérgica.

Por último, uno de los factores de riesgo más comentados en la patología alérgica, es la historia natural de la enfermedad, la cual puede también contribuir al desencadenamiento de las AA. El conjunto de patologías atópicas tiende a ocurrir en una progresión denominada “marcha atópica” (figura 7) en la cual puede existir una manifestación inicial de alergia en la niñez temprana, muchas veces dermatitis atópica, seguida por el desarrollo progresivo de alergia a alimentos, rinitis alérgica o asma (Yu *et al.*, 2016). Como puede observarse, la AA presenta un pico máximo de presentación de la enfermedad durante la niñez y la juventud, luego del cual tiende a disminuir y/o a cambiar a otras modalidades de la patología alérgica (Hill-Spergel, 2017).



**Figura 7. La marcha atópica. Edad al diagnóstico de condiciones alérgicas comunes. Hill-Spergel, 2017.**

Como se muestra en la figura 8, numerosos factores interaccionan para dar lugar al fenómeno de AA desde el inicio de la vida hasta la senectud. Ciertos eventos se conocen por ser factores de riesgo para promover la aparición de esta patología multifactorial, los cuales al inicio de la vida suelen ser factores genéticos, étnicos, historial familiar, exposición a alérgenos dietarios (Lack *et al.*, 2012), y con el paso de los años existen otros factores que también pueden ocasionar la patología entre los cuales se destaca a la disfunción de la barrera mucosa intestinal, inflamación, los cambios en microbiota intestinal y otros como la inmunosenescencia ( De Martinis *et al.*, 2019).

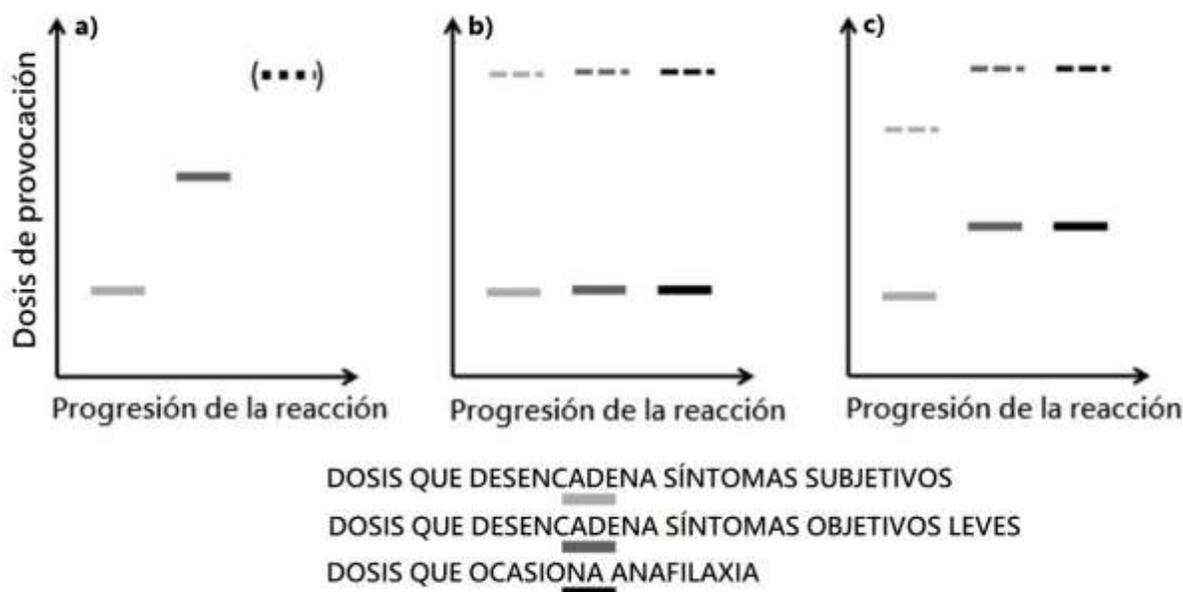


**Figura 8. Factores de riesgo de la alergia alimenticia del inicio de la vida a la senectud.** Numerosos factores pueden dar lugar a las AA en el inicio de la vida (azul) y otros más tarde (negro), como resultado de cambios en la barrera intestinal, inmunosenescencia, y otros factores relacionados con el envejecimiento. Fe: hierro, Zn: Zinc, Vit. C: Vitamina C. Modificado y traducido de De Martinis *et al.*, 2019

#### 2.1.4. Signos y síntomas clínicos

Como se mencionó en el apartado de hipersensibilidad GI inmediata, las AA conducen a la liberación de mediadores de los mastocitos ubicados en mucosa y submucosa intestinal; lo cual, tras su llegada al torrente sanguíneo induce un aumento en el peristaltismo y la secreción de líquidos por células de recubrimiento intestinal ocasionando manifestaciones a este nivel, pero con capacidad de llegar a cuadros de sintomatología más compleja como la anafilaxia sistémica. Esta última, está causada por una reducción del tono vascular y fuga de plasma, lo que, ocasiona una reducción en la presión arterial o choque anafiláctico, a menudo mortal. Los efectos cardiovasculares suelen acompañarse de constricción de vías respiratorias superiores e inferiores, edema laríngeo, hipermotilidad intestinal, producción de moco intestinal y respiratorio y lesiones urticariales en la piel (Arhens *et al.*, 2012; Berin-Sampson, 2013; Yu *et al.*, 2016).

Como se observa en la figura 9, si bien existen dosis desencadenantes de síntomas diferentes para cada persona, algunos individuos manifiestan síntomas subjetivos iniciales; los cuales, pueden volverse objetivos luego de dosis subsecuentes, manifestándose así la anafilaxia tras la continua exposición al alérgeno (a). En otros pacientes se observa anafilaxia como primer síntoma, sin síntomas subjetivos anteriores (b) o con éstos (c). La anafilaxia en cualquier caso puede ocurrir en cualquier nivel de exposición al alérgeno (Turner-Wainstein, 2017).



**Figura 9. Diferentes patrones de reactividad clínica se observan luego del reto con el alimento.** Nivel de exposición al alérgeno (nivel bajo: barras sólidas y nivel alto: líneas discontinuas). Turner-Wainstein, 2017.

En resumen, la presentación clínica de las AA involucra un amplio espectro de síntomas, desde cutáneos (urticaria, angioedema, eczema atópico/dermatitis), GI (vómitos, cólico, dolor abdominal, diarrea, constipación), respiratorios (rinorrea, estornudos, sibilancias, tos, disnea), hasta circulatorios (colapso cardiovascular). Los síntomas asociados al fenómeno alérgico pueden ayudar al discernimiento entre un mecanismo mediado o no por IgE, y a identificar el tipo de alérgeno involucrado (Yu *et al.*, 2016).

### 2.1.5. Principales alérgenos involucrados en AA humana

Cualquier antígeno capaz de provocar hipersensibilidad mediada por mecanismos inmunológicos se define como alérgeno. La tabla 2 menciona las características más relevantes de los alérgenos comunes implicados en la patología de la AA. La mayor parte de los alérgenos que generan reacciones con anticuerpos IgE e IgG son proteínas, muchas veces con cadenas laterales de carbohidratos, aunque, no es la única posibilidad (Mari *et al.*, 1999; Johansson *et al.*, 2001). Los alérgenos pueden entrar en contacto con el organismo mediante exposición inhalada, ingerida o cutánea y suelen agruparse en familias proteicas de acuerdo con sus características estructurales (Radauer *et al.*, 2008).

En 2007, Jenkins y colaboradores demostraron a través de métodos de secuenciación de perfiles de alérgenos y análisis *in silico* las relaciones estructurales y evolucionarias entre éstos. Mientras que, las proteínas que tenían 54% de homología humana en su secuencia eran todas alergénicas, aquellas con homología de secuencias mayor al 63% eran raramente alergénicas. Esto es importante al analizar los alérgenos que con más frecuencia ocasionan AA. Si bien, cualquier alimento puede ser potencialmente alergénico, se han identificado 8 como los responsables de producir el 90% de las reacciones alérgicas en niños y adultos. Estos alimentos constituyen el denominado grupo de los “Grandes 8”: la leche y sus derivados, el huevo y sus derivados, los

cacahuates y sus derivados, el trigo y sus derivados, las nueces, la soya, los pescados y los mariscos (Smaldini *et al.*, 2016) (Tabla 2); de los cuales, se han identificado sus principales componentes alergénicos cuya nomenclatura oficial se indica en la tabla 3. Igualmente se sabe desde 1996 que más de 160 alimentos han sido documentados como causantes de alergia con menor frecuencia (Hefle *et al.*, 1996).

**Tabla 2. Nomenclatura de alérgenos más comunes y sus características en alergia alimenticia.**

Denominación	Características particulares en alergia alimenticia	Principales alérgenos
“Los Grandes Ocho”	Antígenos altamente alergénicos para el 90% de la población estadounidense	Leche, huevo, pescado, marisco, nueces, cacahuete, trigo, soya.
“Trofoalérgeno”	Cualquier antígeno de ingreso por vía gastrointestinal	Leche, huevo, pescado, marisco, nueces, cacahuete, trigo, soya, manzana, aguacate, platano, cocoa, papa, fresa, entre otros.
Alérgenos “sensibles a la digestión”	Antígenos que suelen degradarse en cavidad oral, no resisten la digestión ni la proteólisis. Originan el síndrome de alergia oral	Papa (Solt t 1), Apio (Api g 1), Piña (Ana c 1), Cacahuete (Ara h 5), Cereza (Pru av 4), entre otros.
“Aeroalérgenos”	Antígenos de ingreso por vía aérea (inhalación). Tras sensibilizar al individuo pueden ocasionar reacciones cruzadas con diversos alérgenos alimentarios	Polen de abedul, ambrosía, artemisa, ciprés, cedro, maíz, girasol. Látex.
“Panalérgenos”	Familia de proteínas relacionadas, ampliamente distribuidas en la naturaleza y que comparten estructura tridimensional o regiones con secuencias altamente conservadas. Responsables de muchas reacciones cruzadas entre pólenes y alérgenos alimentarios	Prolifinas como las del polen de abedul (Bet v 1 y Bet v 2); proteínas de transferencia de lípidos no específicas como las de ambrosia (Amb 6), Kiwi (Act 10) y látex (Hev b 12).

Adaptado de Reyes-Pavón *et al.*, 2020.

**Tabla 3. Nomenclatura de alérgenos más comunes en los 8 alimentos más alergénicos descritos.**

Alimento (o derivados)	Alérgenos más comunes (Nomenclatura oficial)
Leche	Bos d 4, Bos d 5, Bos d 6, Bos d 7, Bos d 8
Huevo	Gal d 1, Gal d 2, Gal d 3, Gal d 4, Gal d 5
Cacahuete	Ara h 1, Ara h 2, Ara h 6
Trigo	Tri a 19
Frutos secos	Ber e 1(nuez de brasil), Jug r 1, Jug r 2 (Nuez), Cor a 14 (avellana)
Soya	Gly m 5, Gly m 6
Pescados	Sal s 1 (salmón), Gad c 1 (bacalao)
Mariscos	Pen a 1 (camarón), Cha f 1 (cangrejo), Hom a 6 (langosta)

Bock *et al.*, 2001; Palosuo *et al.*, 2001; Jiménez-Saiz *et al.*, 2011; Ahrens *et al.*, 2012; Van Gramberg *et al.*, 2013; Lorentz *et al.*, 2015.

La base de datos de la nomenclatura de alérgenos es el listado oficial aprobado por la organización mundial de la salud y la unión internacional de sociedades de inmunología (WHO/IUIS por sus siglas en inglés) que contiene los nombres oficiales de los alérgenos aceptados como tal. Se asignan en base al nombre taxonómico y la fuente del organismo en latín, consistiendo en el género (3-4 letras) y la especie (1-2 letras) así como números que se refieren a la familia de proteínas. Así mismo,

existe una base de datos del alergoma, que desde 2002 contiene registros de moléculas, fuentes alergénicas para su uso en biología molecular, genética y epidemiología, con información actualizada continuamente a partir de publicaciones que contribuyen al entendimiento de las alergias (Lorenz *et al.*, 2015).

El caso particular de 3 de los alérgenos más descritos se menciona a continuación. La alergia a la proteína de leche de vaca es una de las más prevalentes en niños y lactantes, pudiendo dividirse en 2 tipos: la alergia a la caseína total (nomenclatura del alérgeno Bos d 8), que implica el 80% del contenido proteico total, y la alergia a las proteínas del suero, que implican el 20% restante. La fracción de caseína puede ser subdividida en 4 proteínas principales ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ -caseína), en tanto que el suero contiene  $\beta$ -lactoglobulina (BLG o Bos d 5),  $\alpha$ -lactoalbúmina (ALA o Bos d 4), inmunoglobulinas (Bos d 7), albúmina sérica bovina (BSA o Bos d 6) y pequeñas cantidades de lactoferrina. Aunque cada proteína tiene potencial alergénico, la caseína, BLG y ALA son consideradas las más alergénicas (Ahrens *et al.*, 2012).

La alergia a proteína de huevo de gallina es considerada la segunda más común en la infancia, con los alérgenos dominantes en la clara del huevo. La yema tiene ciertas propiedades alergénicas, pero mucho menores que las de las 4 principales proteínas en la clara: ovomucoide (OVM o Gal d 1), ovoalbúmina (OVA o Gal d 2), ovotransferrina (OVT o Gal d 3), y lisozima (LYS o Gal d 4). Aun cuando OVA es la proteína más abundante en la clara de huevo (54% de la proteína total), OVM (Gal d 1) ha sido reportada como el alérgeno inmunodominante (Mine-Yang, 2009; Jiménez-Saiz *et al.*, 2011).

Los cacahuates son una especie de la familia de leguminosas no perteneciente a la de las oleaginosas y, por tanto, diferente a las nueces en general, aunque también son consideradas alérgenos importantes y causantes de reacciones anafilácticas. A diferencia de las alergias a leche de vaca o huevo, la alergia a cacahuates raramente se supera. El uso extendido de los alimentos con proteínas alergénicas ha generado incrementos en su investigación en los últimos años, siendo 11 las proteínas caracterizadas (Ara h 1-11) y teniendo la mayor alergenicidad Ara h 1 y Ara h 2 (Bock *et al.*, 2001; Van Gramberg *et al.*, 2013).

### 2.1.6. Reactividad cruzada

Los alimentos como factor desencadenante de reacciones alérgicas han ganado importancia en la actualidad. Más del 60% de las AA en niños, adolescentes y adultos están ligadas con una alergia a un inhalante. En contraste con las alergias clásicas donde la sensibilización ocurre en el tracto GI dirigida mayoritariamente contra alérgenos alimenticios, la sensibilización en alergias de reacción cruzada relacionadas a polen o a otros alérgenos se considera que ocurre contra aeroalérgenos (Werfel *et al.*, 2015).

Los anticuerpos generados contra un alérgeno específico pueden ser capaces de unirse a otros alérgenos de la misma familia, aun cuando el sujeto no haya sido sensibilizado a ese segundo alérgeno. Esto se conoce como reactividad cruzada e incrementa el número de fuentes alimenticias contra las cuales se puede iniciar una reacción alérgica (Lorentz *et al.*, 2015).

El látex es otra fuente de alérgenos que ocasiona alergias relacionadas con alimentos a través del síndrome de alergia látex-fruta (Tabla 4). Así mismo, la inhalación de polen también es conocida

por ocasionar sensibilización a algunos determinantes de carbohidratos que se encuentran en glicoproteínas de plantas (Lorentz *et al.*, 2015).

La mayoría de los alérgenos alimenticios de plantas pertenecen a pocas familias y superfamilias de proteínas. Algunas de éstas son la superfamilia de cupinas, la familia de prolaminas, la de inhibidores de  $\alpha$ -amilasa y tripsina; así como, proteínas relacionadas con patogénesis como respuesta a infecciones por hongos, bacterias o virus (Breiteneder-Radauer, 2004). Es importante recalcar que existe mucha menor variedad en los alérgenos alimenticios animales. Las características de los alérgenos en plantas podrían indicar que al menos para algunos de éstos, su alergenicidad depende de sus funciones bioquímicas por lo que, en un futuro, podría analizarse la alergia a todo un grupo de alérgenos con funciones bioquímicas idénticas para fines de estudio y comprensión de las consecuencias. Como ha sido mencionado, secuencias homólogas de DNA (ácido desoxirribonucleico, por sus siglas en inglés) codifican los alérgenos de reacción cruzada; como se observa en la tabla 4, alérgenos de familias proteicas diferentes pueden originar reacciones cruzadas con inhalantes, sustancias como el látex, o con otros alimentos, incrementando las formas de presentación del fenómeno alérgico (Breiteneder-Ebner, 2000; Sicherer, 2001).

**Tabla 4. Familias de proteínas con alérgenos alimenticios de reacción cruzada.**

Familia de proteínas	Reactividad cruzada posible entre	Fuentes con alérgenos potenciales de reacción cruzada*
Familia Bet v 1 = proteínas PR-10 similares en patogenicidad	Alimento-alimento	Alérgenos en manzana, cereza, chabacano, pera, durazno, frambuesa, fresa, kiwi, zanahoria, apio, tomate, avellana, cacahuete, soya, semilla de mostaza.
	Inhalante-alimento (Polen: alergia relativa a proteína de alimentos, especialmente a abedul)	Alérgenos inhalados de polen de abedul, aliso, carpe, roble, avellano, castaño.
Profilinas	Alimento-alimento	Alérgenos en manzana, cereza, durazno, pera, fresa, naranja, piña, kiwi, banana, melón, litchi, zanahoria, apio, tomate, pimienta, mostaza, cacahuete, soya, avellana, almendra, trigo, cebada, arroz, etc.
	Inhalante-alimento (Polen: alergia relativa a proteína de alimentos, especialmente a abedul, ambrosía, artemisa)	Alérgenos inhalados en polen de abedul, ambrosía, artemisa, <i>Cynodon dactylon</i> , <i>Parietaria officinalis</i> , <i>Phleum pratense</i> , <i>Mercurialis annua</i> , <i>Chenopodium album</i> , <i>Kali tragus</i> , <i>Amaranthus retroflexus</i> , olivo, palmeras de dáttil, avellano, girasol, azafrán arroz, maíz, etc.
	Látex <sup>1</sup> -alimento ("Síndrome de látex-fruta")	Látex.
Proteínas de transferencia de lípidos	Alimento-alimento	Alérgenos alimenticios en durazno, chabacano, cereza, pera, manzana, fresa, ciruela, uva, mora, frambuesa, naranja, limón, mandarina, kiwi, plátano, apio, tomate, espárrago, lechuga, coliflor, frijol, mostaza, avellana, nuez, almendra, semilla de girasol, cacahuete, maíz, trigo, castaña, etc.
	Inhalante-alimento (Polen: alergia relativa a proteína de alimentos)	Alérgenos inhalados en pólen de ambrosía, artemisa, parietaria, olivo y sicomoro.
	Látex <sup>1</sup> -alimento ("Síndrome de látex-fruta")	Látex.
	Alimento-Alimento	Alérgenos en pera, zanahoria.

Proteínas similares a Bet v 6	Inhalante-alimento (Polen: alergia relativa a proteína de alimentos, especialmente con abedul)	Alérgeno inhalado en polen de abedul.
Proteínas similares a traumatinas = PR5	Alimento-alimento	Alérgenos alimenticios en pimiento, manzana, cereza, durazno, kiwi, plátano.
	Inhalante-alimento (Polen: alergia relativa a proteína de alimentos)	Alérgenos inhalados en ciprés o cedro.

\* Los alimentos mencionados contienen alérgenos pertenecientes a la familia especificada en la primera fila. Una reacción cruzada entre alérgenos de la misma familia es potencialmente posible pero no inevitable. Las fuentes alimenticias contienen alimentos que han sido oficialmente añadidos a la lista oficial de alérgenos IUIS (International Union of Immunological Societies).

<sup>1</sup> El látex puede ser tanto un alérgeno inhalante como de contacto. **Lorentz et al., 2015**

### 2.1.7. Impacto económico de la AA

A pesar de la gran variedad de alternativas terapéuticas con que se cuenta en la actualidad (descritas más adelante), el impacto económico de la AA es importante sobre todo en etapas vulnerables de la vida como la niñez. En México, no existen datos actualizados del impacto económico que tienen las AA en las familias de pacientes menores de edad, adultos, ni en el sistema de salud. Sin embargo, a través de una encuesta diseñada por médicos, investigadores de servicios de salud y economistas del área en niños de E.U.A. se determinó que el costo total anual de servicios médicos es de \$4.3 billones de dólares (\$724 por niño), siendo las hospitalizaciones las mayores causantes del costo médico directo (\$1.9 billones) seguido por las visitas a alergólogos y otros especialistas (Gupta *et al.*, 2013). Otros factores que implican un incremento en los gastos incluyen las ausencias laborales del cuidador del menor, así como modificaciones dietarias específicas. El costo total de las AA se estima en \$24.8 billones anuales (\$4,184 por niño). Se utilizaron estudios transversales para analizar los datos recolectados por los cuidadores de niños alérgicos en este mismo país, y también se observó que los niños de menor estrato socioeconómico regresan 2.5 más veces a urgencias gastando más en hospitalización que los niños de mayor ingreso (Bilaver *et al.*, 2016). Así mismo, visitan menos a los médicos especialistas y gastan menos en medidas profilácticas, por lo que su riesgo de ingestiones accidentales y anafilaxia es mayor, lo que resalta la necesidad de mejorar la igualdad en el manejo de alergia de todos los niños.

En cuanto a la población europea, hasta 2007 se sabía que el impacto en calidad de vida y economía causado por esta patología era importante, sin embargo, no se contaba con los instrumentos para cuantificarlo a pesar de su relevancia para la mejora de políticas de salud pública (Mills *et al.*, 2007). En 2013, un estudio de casos y controles, con enfoque económico, para evaluar costos de proveedores de servicios médicos a pacientes adultos y niños con AA concluyó que los adultos, además de incrementar el número de visitas hospitalarias y de días de hospitalización, obtuvieron una media de costos de servicios de salud de \$927 dólares mayor que los controles sin AA, y los niños \$1334 dólares mayor al realizar la misma comparación (Fox *et al.*, 2013). El promedio anual del costo de cuidados de salud para los pacientes alérgicos fue de \$1778 dólares, existiendo un gradiente de costos dependiendo de la severidad de la patología (Fox *et al.*, 2013).

La carga del paciente con esta patología implica el control de la enfermedad, así como los costos de la atención durante las recaídas o exacerbaciones de ésta y de la fase remitente, lo que constituye un problema de salud pública creciente. Aunado a esto, se encuentra el riesgo de la introducción de nuevos alérgenos alimentarios o modificaciones transgénicas a los alimentos. Por

ello, ha cobrado un interés particular en la investigación moderna el encontrar herramientas que ayuden a conocer el grado de seguridad alimentaria en humanos y animales; así como, la investigación en los modelos experimentales de la enfermedad para entender mejor los mecanismos subyacentes, y el análisis de terapias que logren una disminución del impacto económico y social de la patología.

### 2.1.8. Modelos animales de AA

La necesidad de desarrollar nuevos métodos para probar el potencial alergénico de diferentes sustancias ha sido recalcada por diferentes documentos como, las guías de la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) y de la WHO sugieren desarrollar modelos *in vivo* para tal fin. El Codex Alimentarius (CAC) y la Autoridad Europea de Seguridad en materia Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés) también han expresado su interés por desarrollar un modelo *in vivo* como parte de la evaluación de seguridad de los alimentos. Trabajos recientes del Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI, por sus siglas en inglés) y del Comité Técnico de Alergenicidad de Proteínas (PATC, por sus siglas en inglés) en Norteamérica, a su vez, subrayan la importancia del establecimiento de modelos animales de AA (Aldemir *et al.*, 2008).

El desarrollo de modelos murinos de alergia contribuye al estudio de los mecanismos causantes; así como, de los tratamientos específicos. Desde hace varios años, el campo de la investigación de las AA ha trabajado con modelos experimentales de cerdo, perro, ratón y rata. Los roedores son los preferidos para el estudio de la fase efectora de las alergias. Sin embargo, al no existir la alergia en estas especies, debe inducirse de forma artificial mediante el empleo de adyuvantes pro-Th2 [hidróxido de aluminio, toxina colérica, enterotoxina B de *Staphylococcus*, etc.] (Finkelman *et al.*, 2005). Desde 1999 se tienen datos de que la producción de niveles de IgE luego de la sensibilización a OVA ha mostrado mejores resultados en la cepa Brown Norway, luego de probar otras como Wistar, Hooded Lister, y Piebald Virol Glaxo (Knippels *et al.*, 1999). Sin embargo, en un modelo de sensibilización con áscaris dinitrofenilado, y uso de *Bordetella pertussis* como adyuvante en ratas Sprague-Dawley, Donryu y Wistar se aprecia que estas últimas fueron de utilidad al mostrar altos niveles de IgE hacia el décimo día, variable importante para los modelos de alergia (Hirano *et al.*, 2001). Así mismo, Sun y colaboradores (2013) refieren diferentes respuestas inmunes en un modelo enteral de sensibilización a OVA entre ratas Brown Norway y Wistar, con incrementos en niveles de histamina, IgE, IgG, modificaciones en la presión arterial y variables histopatológicas concordantes con la AA, lo que, garantizó el éxito de la provocación de la alergia en estas cepas. Numerosos modelos en ratón también se han reportado útiles en la comprensión de los mecanismos involucrados en la AA (Li *et al.*, 2000; Benedé-Berín, 2018).

Actualmente, muchos modelos inducen el proceso inflamatorio en la mucosa intestinal mediante el empleo de toxina colérica. Otros en cambio, inducen una sensibilización sistémica, como es el caso de la administración intraperitoneal del alérgeno junto al hidróxido de aluminio y la posterior re-sensibilización por vía gástrica. Finalmente, en otros modelos, aunque pocos y sólo en determinadas cepas de ratones, se induce la sensibilización alérgica administrando únicamente el alérgeno sin adyuvante, por vías intragástrica e intraperitoneal (Van Halteren *et al.*, 1997; Gizzarelli

*et al.*, 2006). La elección del tipo de modelo, la cepa, o el tratamiento adecuado depende de numerosos factores importantes para analizar las variables de estudio del ensayo en cuestión.

### 2.1.9. Uso de adyuvantes en los modelos de AA

Tal como se ha descrito, el sistema inmune de ratones y humanos neonatales tiene una tendencia natural hacia el perfil Th2; la cual, suele disminuir gradualmente durante los primeros dos años de vida (Barrios *et al.*, 1996; Prescott *et al.*, 1998). Lo anterior, fundamenta la idea de que la provocación de alergia en modelos experimentales obtiene mejores resultados al iniciar a temprana edad; sin embargo, para garantizar el éxito de la provocación alérgica en animales que no suelen padecerla (como los roedores), se utilizan sustancias conocidas como “adyuvantes”. Éstos rompen la tolerancia oral cuando se administran con antígenos alimenticios para desarrollar modelos animales de AA. Aunque su mecanismo de acción aún es desconocido, existen evidencias que demuestran su papel estimulador sobre las células presentadoras de antígeno y sobre las células del epitelio intestinal, que al ser activadas pueden producir citocinas como la TSLP que, a su vez, favorece la respuesta Th2 (Urrego-Álvarez *et al.*, 2009).

Estudios *in vitro*, utilizando la toxina colérica, demuestran que esta sustancia promueve la maduración y el aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras en células dendríticas (Ganeshan *et al.*, 2009). En este trabajo se aborda la existencia de una interacción entre moléculas con dominios tipo mucina y tipo Ig de linfocitos T (TIM)-1 (presente en los linfocitos T) y moléculas TIM-4 (expresadas en las células presentadoras de antígeno), lo cual tiene un papel importante en la polarización hacia el perfil Th2 (Yang *et al.*, 2007). Las proteínas TIM son glicoproteínas de superficie tipo 1 y están compuestas por un dominio tipo Ig, un dominio tipo mucina extracelulares, un dominio transmembrana y una cola intracelular citoplásmica; bajo condiciones homeostáticas, todas las proteínas de esta familia están confinadas a conjuntos de células de linaje mieloide o linfoide y a células renales epiteliales (Baghdadi-Jinushi, 2014).

La enterotoxina B de *Staphylococcus*, principal responsable de la contaminación alimenticia en algunas regiones del mundo como países norteamericanos, es otro adyuvante importante en modelos animales, mostrando ser un potente regulador de la expresión de TIM-4 en las células dendríticas (Ganeshan *et al.*, 2009).

Otro adyuvante importante, aunque menos tratado para el tema de la AA es la *B. pertussis*. Desde 1996, se sabe que las vacunas acelulares de esta bacteria, administradas subcutáneamente a ratones conducen a respuestas selectivas Th2 con niveles altos de IL-4 y niveles moderados de IL-5, en células esplénicas *ex vivo* 6 semanas luego de la inmunización (Barnard, 1996). Por su parte, la vacuna celular ha mostrado desencadenar respuestas murinas de producción de IgE actuando como adyuvante en modelos experimentales (Lindsay *et al.*, 2004). Dong y colaboradores (2003) postularon que este tipo de vacuna lograba potenciar la sensibilización alérgica en mucosa. Esto cuando se administra de manera simultánea al alérgeno en un modelo en rata Brown Norway de asma alérgica. Así mismo, en otro modelo de sensibilización alérgica asmática a OVA en ratas Sprague-Dawley, se relaciona a la hiperresponsividad, debido al incremento en los niveles de fosfodiesterasa 4D, observándose también variables típicas de la patología, como inflamación eosinofílica y producción de moco (Wang *et al.*, 2014). De la misma manera, en un modelo experimental de sensibilización intestinal a OVA en ratas Sprague Dawley se demostró que, al utilizar a la toxina de *B. pertussis* como adyuvante, la sensibilización incrementó junto con los títulos

de IgE y la respuesta epitelial secretora de iones. Probablemente por incrementos en la permeabilidad intestinal a antígenos lumbinales desarrollándose una respuesta de hasta 8 meses de duración (Kosecka *et al.*, 1999).

Por último, el hidróxido de aluminio es un adyuvante ampliamente estudiado por su utilización en numerosas vacunas y la cantidad de mecanismos de acción que posee. En una revisión sobre el tema, He y colaboradores clasifican estos mecanismos en efecto de depósito, efecto profagocítico, diferenciación de células dendríticas e incremento de captura del antígeno por células presentadoras; así como, aceleramiento de reacciones inflamatorias locales, además de efectos específicos en sistema inmune adaptativo, innato y del complemento (He *et al.*, 2015). Se sabe por ejemplo que el hidróxido de aluminio contribuye a la inducción de citocinas como la IL-1 $\beta$  mediante el inflammasoma NLRP3 analizado en un modelo de ratones deficientes de macrófagos estimulados con lipopolisacárido (LPS) (Franchi-Nuñez, 2008). En este mismo estudio se observó que en ratones que poseen el inflammasoma, el hidróxido de aluminio logra la generación de IgGs contra el antígeno albúmina sérica humana, en un mecanismo dependiente de células T. Además, otros estudios en ratones C57BL/6 han demostrado que el hidróxido de aluminio promueve no solamente la activación de la caspasa-1, sino también la secreción de IL-1 $\beta$  a través de la acción de dicho inflammasoma (Eisenbarth *et al.*, 2008). Igualmente, Harte y colaboradores (2017) logran observar que el hidróxido de aluminio genera secreción de IL-1 $\beta$  en células polimorfonucleares de sangre periférica bovinas, en ausencia de la estimulación con LPS, lo cual hasta ahora se ha observado únicamente en este tipo de animales. Igualmente, se identificó que estas células expresan caspasa-1 activa, y que la secreción de IL-1 $\beta$  se reduce cuando se inhibe a la caspasa-8, lo que las posiciona como integrantes activos durante este proceso. Se propone además, que en este modelo de estudio, el ingreso celular del hidróxido de aluminio induce degradación lisosomal para la liberación de catepsinas, las cuales se relacionan a la activación del inflammasoma (Zhang, 2018; Chevriaux, 2020) lo que media la oligomerización de la proteína asociada a apoptosis y la activación de las caspasas (Harte, 2017). Pese a lo anterior, cada antígeno tiene características únicas y las interacciones entre éstos y el adyuvante dependen de numerosos factores como la dosis, el tipo de antígeno o la formulación de la dosis, así como la especie en que se analice.

#### **2.1.10. Tratamientos actuales para las AA**

Una de las particularidades de la AA es la posibilidad de su regresión espontánea, que suele ser mayor mientras más temprana haya sido su aparición. La tolerancia puede tardar en generarse de 1 a 5 años, aunque de forma menos común, algunos tipos de alergia alimenticia pueden ser persistentes. La alergia frente a muchos alérgenos de alimentos tiende a la regresión, aunque para algunos como el pescado, los frutos secos o las leguminosas éste fenómeno no suele lograrse. La razón de que un alimento que se ha identificado como causante de una reacción alérgica vuelve a ser tolerado tras una dieta de exclusión, es un fenómeno en el que aún no se comprende la totalidad de los mecanismos subyacentes. Se sabe que la edad y su relación con la maduración del SIM en tracto digestivo tienen un papel importante. Además, en algunos pacientes, se ha observado un incremento gradual de anticuerpos IgG específicos contra el alérgeno, así como una disminución en los IgE específicos que desencadenan el fenómeno de hipersensibilidad (Álvarez-Castello *et al.*, 2004).

No obstante, durante el periodo de existencia de la AA o en casos de alergias persistentes, es indispensable para el paciente el uso de tratamientos dirigidos a evitar o disminuir la sintomatología alérgica, buscando modificar la respuesta inmune alérgica para promover la inducción de tolerancia. Algunas terapéuticas novedosas para el control de las alergias se fundamentan en mecanismos de modificación del alérgeno (encapsulamiento o manosiación), modificación de la ruta de entrada del antígeno y del tipo de respuesta celular en el organismo alérgico (vacunas de *Escherichia coli*) o la administración del antígeno con un ligando microbiano específico (*Listeria monocytogenes*) para forzar un tipo de respuesta específico (Berin-Mayer, 2013). A continuación, se enumeran los principales tratamientos para las AA.

#### 2.1.10.1. Restricción dietaria

El único tratamiento efectivo que se conoce hasta ahora para tratar las AA consiste en la restricción dietaria para la eliminación del estímulo inmunológico. En muchas situaciones es complicado asegurar su efectividad, por lo que casi la mitad de los pacientes con AA sufren reacciones accidentales cada 3-5 años por el contacto con productos nutricios, así como otros con diferente función, en cuya composición se encuentra el componente alergénico. Esto puede ser originado por contaminación del alimento con alérgenos (utensilios en restaurantes, durante la manufactura o procesamiento, entre otros factores), desconocimiento de la presencia de un alérgeno en la composición del alimento (caseinatos indicando proteínas de la leche, ovomucoide para proteínas de huevo, emulsificantes para proteínas de soja, etc.), errores u omisiones en el etiquetado, así como etiquetado impreciso (emulsificante, espesante, saborizante, entre otros ) así como por reactividad cruzada con otros alérgenos que pueden hacer que el sistema inmune reconozca a dos diferentes sustancias como si fueran iguales. Muchas de estas reacciones accidentales suelen ser graves y de no tratarse adecuadamente (autoaplicación de adrenalina mediante EpiPen) ponen en riesgo la vida de los pacientes (Sicherer-Leung, 2012).

#### 2.1.10.2. Inmunoterapia

Hacia 1911, se redactó el primer trabajo sobre inmunoterapia (IT)<sup>2</sup> en el que se administró extractos de pólenes en cantidades crecientes con la consiguiente desaparición de las manifestaciones de la rinitis alérgica (Noon, 1911). De este modo se lograron gradualmente importantes avances en el control de alergias por picaduras de insectos y pólenes. La caracterización y comprensión de mecanismos inmunológicos en el SIM ha permitido el avance en materia de inmunoterapia, así como el desarrollo de protocolos más eficaces en las reacciones alérgicas más incapacitantes, y también lograr la disminución de las reacciones adversas originadas por esta terapéutica (Finegold *et al.*, 2010; Smaldini *et al.*, 2016).

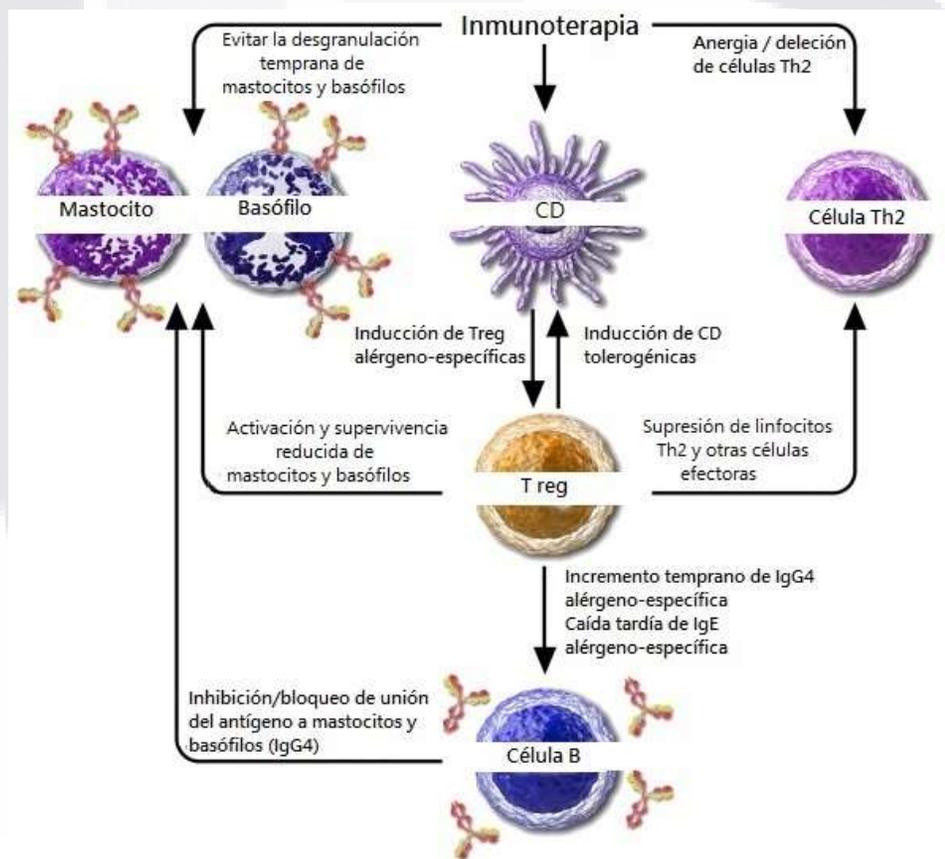
La IT desensibilizante consiste en la administración gradual de cantidades crecientes del alérgeno dañino hasta dosis que permiten tolerar la exposición natural a éste. Estos procedimientos que se efectúan sobre el SIM inducen algunos de los mecanismos que median la tolerancia inmunológica inducida a nivel intestinal, pero, que tiene efectos sistémicos en el organismo. De esta manera, la IT donde el alérgeno se administra oralmente (IT oral) logra la adquisición de mecanismos tolerogénicos intestinales; mientras que, la IT nasal puede implicar cambios en estos mecanismos

---

<sup>2</sup> "Prophylactic inoculation against hay fever" apareció en The Lancet, y Leonard Noon fue reconocido por su comprensión de que, en esta terapéutica, la sensibilidad al alérgeno se reduce sólo con la dosis y la frecuencia correctas, ocasionando, de lo contrario, la exacerbación del problema (Noon, 1911).

inicialmente a nivel bronquial, pero globalmente estos se suman igualmente a los mecanismos tolerogénicos del SIM intestinal. Dado que, no se conocen completamente los mecanismos detrás de estos tratamientos, en los últimos años, se ha generado un marcado interés internacional en su estudio, principalmente en asma y AA (Smaldini *et al.*, 2016).

La figura 10 ilustra mecanismos planteados como cruciales para el funcionamiento de la IT oral en la actualidad: disminución en la reactividad basofílica inducida por el alérgeno y disminución de la producción de IL-4. Una de las principales estrategias de la IT oral ha sido el cambio celular en mastocitos y basófilos, los cuales a través del estímulo constante con dosis controladas, se vuelven hiporresponsivos al alérgeno. En la fase de consolidación del tratamiento, dosis más grandes del alérgeno inducen grandes cantidades de IgG alérgeno-específica, que pueden neutralizarlo e impedir que las IgEs logren el entrecruzamiento de su receptor específico, previniendo degranulación (Kulis *et al.*, 2018).



**Figura 10. Mecanismos de Inmunoterapia Oral.** La disminución de la activación inmune se logra mediante la desensibilización de mastocitos y basófilos, así como delección de linfocitos Th2 efectoras. CD, célula dendrítica; T reg, célula T reguladora. Wood, 2015.

Otros fenómenos que se han propuesto como causantes del efecto benéfico de la IT oral incluyen la inducción de células dendríticas tolerogénicas, y la expansión de las células T reguladoras y cambios epigenéticos en éstas, así como, expansión de linfocitos B de memoria antígeno-específicos (Wood, 2015; Hussey-Freeland *et al.*, 2016). Como lo señala Wood (2015) en una revisión sobre inmunoterapia, se ha reportado como limitante específica de este tipo de IT la

aparición de un fenómeno denominado “hiporresponsividad sostenida” que implica la desensibilización eventual de los pacientes, sin tolerancia a largo plazo.

A pesar de los avances logrados en el entendimiento y desarrollo de esta terapéutica, las reacciones adversas que derivan de su utilización siguen siendo un obstáculo mayor, apareciendo en al menos 10% de los pacientes de ensayos clínicos. Por lo que, no existe aún un protocolo estandarizado y aprobado para aplicarse en pacientes con alergia mediada por IgE. El desarrollo más reciente ha sido la IT sublingual, que permitió reducir las reacciones tóxicas por la menor dosis de alérgeno que se emplea en la administración sublingual, en comparación con el tratamiento oral; así como la combinación de la IT con Omalizumab, un anticuerpo monoclonal del que se hablará más adelante (Hussey-Freeland *et al.*, 2016; Smaldini *et al.*, 2016).

### 2.1.10.3. Medicamentos sintomáticos

Las recomendaciones para anafilaxia por AA se basan ampliamente en la utilización de antihistamínicos H2 (ranitidina, 1-2 mg/kg por dosis) en conjunto con antihistamínicos H1 (1-2 mg/kg (máximo 50 mg) por vía intravenosa o intramuscular (Tang, 2003; Oyoshi *et al.*, 2014). Dicha combinación ha resultado de utilidad en reacciones alérgicas agudas en estudios aleatorizados, doble ciego, con placebo. Pese a ello, los mecanismos de la supresión del receptor H2 en la anafilaxia sistémica aún no han sido demostrados. Se sabe hasta ahora, que los ratones con deficiencia de estos receptores de histamina modifican la respuesta anafiláctica IgE dependiente, produciendo un efecto protector (Oyoshi *et al.*, 2014).

Los tratamientos farmacológicos sintomáticos incluyen también los corticoides y antileucotrienos, que tampoco corrigen el defecto inmunológico, ni aseguran una remisión a largo plazo; sólo revierten el proceso inflamatorio, actuando a distintos niveles. En el caso de los corticoides, en general, se conocen dos vías de actuación con respecto a las alergias. La primera, la vía genómica, se caracteriza por su lentitud y efectividad a dosis bajas, dado que necesita la unión del corticoide a su receptor en la célula y la posterior puesta en marcha de todo el mecanismo de la transcripción genética. En esta primera vía no se aprecian cambios significativos hasta aproximadamente 30 minutos después de la administración del corticoide (Zubeldia *et al.*, 2012; Boardman *et al.*, 2014).

No obstante, también se han descrito efectos de los corticoides al cabo de segundos o pocos minutos de su administración, lo que, se explicaría por la existencia de mecanismos de acción diferentes (no genómicos), con diferentes grados de especificidad, para cuya explicación existen varias teorías. En esta segunda vía, la vía no genómica, los mecanismos de acción a nivel celular se traducen en una serie de efectos sobre la respuesta del sistema inmunitario, inhibiendo el efecto de mediadores proinflamatorios y estimulando el de los de tipo antiinflamatorio. Esto, a su vez, se refleja en los cambios que tienen lugar en las diferentes poblaciones de células que intervienen en la respuesta inmunológica y en los procesos inflamatorios (células dendríticas, linfocitos T, macrófagos, granulocitos, mastocitos); todo lo que se dirige, a proteger al organismo de los daños que se originarían por una respuesta inmune exagerada. Algunos de los corticoides más utilizados en las manifestaciones alérgicas incluyen a la betametasona, acetato de cortisona,

dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona y triamcinolona (Zubeldia *et al.*, 2012).

Por su parte, los leucotrienos que tienen efectos y contribuciones en la respuesta inflamatoria (contracción de músculo liso, degranulación, agregación y quimiotaxis de neutrófilos, aumento de permeabilidad vascular y remodelado de músculo liso, especialmente en vía aérea (Leff, 2001)) pueden ser bloqueados por fármacos que inhiben la 5-lipooxigenasa o que antagonizan al receptor de cistenil-leucotrieno 1 (CysLT1). La activación de estos receptores es crucial en la regulación del tono de músculo liso de vía aérea e induce mitogénesis en este tipo de músculo, así como, el incremento del calcio citosólico. Los antileucotrienos se clasifican en dos grupos, inhibidores de 5-lipooxigenasa (como Zileuton) y antagonistas del receptor CysLT1 (como Zafirlukast, Montelukast, Pobilukast y Pranlukast) (Vázquez-García *et al.*, 2005).

Por otro lado, cuando el paciente entra en estado de anafilaxia, el tratamiento de elección es la epinefrina. En solución acuosa, con dosis máxima de 0.5 mg, suele utilizarse 0.01 mg/kg intramuscular cada 5-15 min, según se necesite para controlar los síntomas y mantener la presión sanguínea (Sampson *et al.*, 2006). Algunos estudios en niños han dejado claro que si la epinefrina se administra intramuscularmente con autoinyector, la absorción del fármaco se vuelve más rápida y los niveles plasmáticos de éste mejoran al comparar con la administración subcutánea (Simons *et al.*, 1998). Igualmente, se sabe que en adultos sin anafilaxia, los máximos incrementos plasmáticos en las concentraciones de epinefrina así como los más veloces, fueron los observados tras la inyección intramuscular, teniendo resultados similares al utilizar inyección precargada (EpiPen) o con ampola (Simons *et al.*, 2001).

#### **2.1.10.4. Anticuerpos monoclonales**

El tratamiento con anticuerpos monoclonales humanizados anti-IgE logra una disminución en los niveles de IgE libre así como la regulación de los receptores de alta afinidad para la IgE, lo que provoca la inhibición de la síntesis de IgE específica.

El Omalizumab es el anticuerpo anti-IgE humanizado indicado para el tratamiento del asma alérgica. Su impacto en AA aún no está totalmente descrito pero los beneficios clínicos se logran con solo pocas dosis del medicamento, como ya fue demostrado en estudios piloto en niños con alergia a proteínas de leche de vaca (Nadeau *et al.*, 2011); además, se sabe que junto con la inmunoterapia desensibilizante logra una rápida desensibilización en los pacientes (MacGinnitie, 2017). Así, se ha demostrado que con esta terapéutica se han podido administrar dosis mayores del alérgeno durante la inmunoterapia, de manera más rápida que a los pacientes sin tratamiento; en pacientes con alergia a la proteína de leche de vaca pueden administrarse dosis mayores de leche sin presentar sintomatología alérgica aparente (Muraro *et al.*, 2014). Esta combinación terapéutica incrementa el grado de seguridad de la IT, aumentando las posibilidades del éxito terapéutico, mediante una reducción de células de tipo 2 productoras de IL-4 e incremento en células T reguladoras (Nadeau, *et al.*, 2011; Manohar-Nadeau, 2014; Abdel-Gadir, 2018).

## 2.2. Probióticos

Inicialmente, la definición de los probióticos propuesta en 1965, se refería a sustancias secretadas por los microorganismos que estimulan el crecimiento de otros (en oposición a los “antibióticos”). Actualmente, el término probiótico hace referencia a un preparado o a un producto que contiene cepas de microorganismos viables en cantidad suficiente como para alterar la microbiota en algún compartimento del huésped (por implantación o colonización) y que produce efectos beneficiosos en dicho huésped. La WHO propone una definición más simple, refiriéndose a microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidad adecuada confieren un efecto beneficioso sobre la salud del huésped (Oliveira-González, 2007).

Los probióticos, concebidos originalmente para el tratamiento de enfermedades GI, se han evaluado como agentes profilácticos y terapéuticos en diversas patologías alérgicas. El número limitado y la calidad de los estudios clínicos y su reproducibilidad, así como las conclusiones de numerosos metaanálisis que se abstienen de recomendar probióticos como agentes terapéuticos, hace difícil justificar una postura en cuanto a los mismos. Para ello, sería necesario especificar sus indicaciones, tipo de paciente al que beneficien, efectos específicos de las cepas, dosis, mecanismos de acción, inicio óptimo y duración del tratamiento, seguimiento, fiabilidad y disponibilidad. La utilización de los probióticos como terapia se fundamenta en la hipótesis de la higiene; sin embargo, es necesario continuar la investigación básica sobre los mecanismos inmunomoduladores necesarios para que el paciente muestre tolerancia y no presente efectos secundarios a la administración del probiótico (por diferencias o incompatibilidades con su propia microbiota), para así precisar las cepas específicas que funcionen en respuestas alérgicas ya establecidas (Fiocchi *et al.*, 2012).

Específicamente en la prevención de la alergia se han realizado estudios en humanos utilizando directamente probióticos en preparación oral o con fórmula láctea, a través de leche materna (indirectamente administrado a las madres durante la lactancia), por vía transplacentaria durante el embarazo o en combinación de los anteriores (Cuello-García *et al.*, 2015). La existencia de la vía transplacentaria de transmisión bacteriana, que fundamenta una de las maneras más novedosas para el transporte de probióticos, fue demostrada por Jiménez y colaboradores (2005) después de que su grupo de investigación encontró conteos bajos de bacterias ácido-lácticas en placenta, líquido amniótico, vasos del cordón umbilical y meconio de recién nacidos antes de la lactancia materna incluyendo a los nacidos por cesárea (Martín *et al.*, 2004). Esto, refutaba la hipótesis de esterilidad del recién nacido, hasta ese momento vigente. Para comprobar que existía transmisión de bacterias se recolectaron muestras de sangre de cordón umbilical de neonatos y se identificaron aislados mediante crecimiento en medios selectivos y otras pruebas. Además, se comprobó en ratones gestantes inoculados con *Enterococcus faecium* la transmisión de la bacteria en líquido amniótico; mientras que, no pudo detectarse en los ratones no inoculados (Jiménez *et al.*, 2005).

A pesar de las limitaciones de diversos ensayos en que se utilizan probióticos, numerosos estudios, que incluyen las recomendaciones de la WAO y sus guías de práctica clínica para la prevención de alergias, han mostrado que no existen efectos adversos durante su empleo, por lo que han sido catalogados como seguros. En las enfermedades alérgicas, el uso de probióticos se sugiere como una acción atractiva para su prevención y tratamiento por la disminución de algunas de sus manifestaciones (Cuello-García *et al.*, 2015).

### 2.2.1. Beneficio terapéutico de los probióticos y mecanismo de acción

Desde 1997, se han reportado los beneficios del uso de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) en niños con eczema atópico e historial familiar de AA. Un primer estudio evaluó un grupo de niños con alergia a leche de vaca que presentaban eczema tóxico e historial familiar de AA, a quienes se administró una fórmula extensamente hidrolizada con o sin LGG (Majamaa-Isolauri, 1997). Posterior a un mes de tratamiento, los pacientes se reexaminaron y retaron oralmente con leche de vaca, disminuyendo con el tratamiento la puntuación que obtenían en una escala que mide la intensidad del eczema atópico, a diferencia de los no tratados. Dicha puntuación mejoró también en el grupo de niños alimentados con leche materna siendo sus madres tratadas con LGG por 1 mes. En estudios subsecuentes, el mismo grupo de trabajo demostró al analizar 27 infantes con eczema atópico y alimentados con seno materno, que al utilizar fórmula hidrolizada con o sin administración conjunta de LGG y *Bifidobacterium lactis* Bb-12 existió mejoría significativa en el eczema de los niños con suplementación probiótica (Isolauri *et al.*, 2000).

En otro estudio clínico doble ciego realizado en pacientes pediátricos del hospital universitario central de alergia en Helsinki, trabajando en pacientes con sospecha de alergia a proteína de leche de vaca y eczema atópico o dermatitis se analizaron los efectos de la suplementación con LGG o una mezcla de 4 cepas probióticas por 4 semanas, notando mediante análisis de muestras fecales como los grupos con probióticos tenían mayor cantidad de IgA, sin evidenciarse cambios en TNF- $\alpha$ . Los pacientes tratados con LGG tuvieron menores cantidades de antitripsina-  $\alpha$ 1, relacionándose con la disminución de la inflamación de membrana mucosa (Viljanen, 2005).

Existen numerosos mecanismos mediante los cuales los probióticos demuestran efectos benéficos en el huésped, pudiéndose clasificar como de naturaleza microbiológica, epitelial o inmunológica.

Los probióticos son capaces de modular la composición de la microbiota intestinal. Se ha demostrado, en estudios de suplementación con LGG o *L. casei* en niños alérgicos, la reducción del número de bacterias patógenas como clostridia y el mantenimiento o potenciamiento de los niveles de bifidobacteria (Lahtinen *et al.*, 2009), lo que se debe casi siempre a cambios en el ambiente intestinal, como la disminución del pH y la competencia por nutrientes, resultando en condiciones restrictivas para el crecimiento de las bacterias patógenas (Todorov *et al.*, 2011). Además, los probióticos pueden competir con otros microorganismos por su unión a numerosos receptores específicos en células epiteliales, evitando la invasión y posterior infección patogénica (Setia *et al.*, 2009), o pueden inhibir el crecimiento del patógeno mediante la producción de bacteriocinas (Heng *et al.*, 2011). Muchos probióticos modifican el equilibrio entre perfiles celulares tipo 1/2 previniendo el desarrollo de ciertas enfermedades inflamatorias como las alergias (Pochard, 2002; Niers, 2005).

Estudios recientes sugieren que la microbiota comensal representa un modulador importante de la homeostasis intestinal, de modo que, la desregulación de la interacción simbiótica entre microbiota y mucosa resulta en patologías con repercusiones clínicas importantes. Estudios con ratones criados en condiciones libres de gérmenes muestran que tienen sistemas inmunes subdesarrollados. En contraste, los ratones libres de patógenos son capaces de reconstituir su flora bacteriana con bifidobacterias (Sudo *et al.*, 1997). Además, los probióticos pueden influenciar la generación de citocinas pro y antiinflamatorias intestinales; se ha visto un descenso de TNF- $\alpha$  y cambios en los niveles de TGF- $\beta$  y otros mediadores inflamatorios, probablemente gracias al mejoramiento de la integridad de barrera intestinal mediante respuestas que involucran IgA (Marschan, 2008). En un estudio de un modelo experimental de colitis ulcerativa en el que se

utilizaron dos cepas de *B. bifidum* (cepas BbiY, BbrY) se observa una potente producción de IL-10 en cultivos de células mononucleares de sangre periférica, así como disminución en la secreción de IL-8 en células HT-29 estimuladas con TNF- $\alpha$  (Imaoka *et al.*, 2008). En otros estudios con modelos murinos, se evaluaron hasta 8 cepas de *Lactobacillus* para observar la producción de citocinas e inmunoglobulinas en respuesta a antígenos administrados vía parenteral, observando cambios en la producción de citocinas proinflamatorias tras la administración parenteral del antígeno. *L. reuteri* indujo citocinas Th1 y proinflamatorias, mientras que *L. casei* indujo secreción de IL-10 e IL-4 (Massen *et al.*, 2000). Mohamadzadeh y colaboradores exploraron como diferentes lactobacilos (*L. gasseri*, *L. johnsonii* y *L. reuteri*) pueden activar a células dendríticas mieloides humanas y contribuir a su polarización hacia diferentes perfiles inmunológicos, mediante la secreción primordial de IFN- $\gamma$ , e IL-12 (Mohamadzadeh *et al.*, 2005).

Otra hipótesis conocida es que la protección de probióticos en alergia está basada en la estimulación de los receptores tipo Toll. Se estudió el sobrenadante de cultivos celulares de *B. breve* c50, notando que tienen capacidad de contribuir en la proliferación y producción de citocinas como IL-10 en células dendríticas humanas a través de TLR2, lo que puede considerarse una capacidad regulatoria y de limitación de otros perfiles celulares (Hoarau, 2006).

De igual forma, la producción de células T reguladoras se relaciona también al uso de probióticos. La administración de bifidobacterias y lactobacilos se ha relacionado con la inducción de células T reguladoras y la posterior supresión de la producción de IgE, aunque dado que la colonización de los probióticos es transitoria, la actividad regulatoria no suele ser permanente (Özdemir, 2010). Estudios con *L. reuteri* y *L. casei*, describen un probable mecanismo de regulación por parte de los probióticos, ya que la activación de células dendríticas mediante DC-SIGN (receptor de lectinas tipo C) con estos lactobacilos desencadena el desarrollo de células T reguladoras productoras de altos niveles de IL-10, lo que se ha propuesto como un mecanismo efectivo para mejorar la fisiopatología de enfermedades en las que existe inflamación, entre ellas la dermatitis atópica (Smits *et al.*, 2005).

### **2.2.2. *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)**

En 1983, el *L. rhamnosus* ATCC 53103 se aisló de muestras fecales humanas por Sherwood Gorbach y Barry Goldwin<sup>3</sup>. El bacilo fue identificado inicialmente como una cepa probiótica por su resistencia a ácidos y bilis, sus buenas características de crecimiento y su gran capacidad adhesiva a las células del epitelio intestinal. Sus efectos benéficos han sido estudiados ampliamente en humanos y otros organismos y ya existen productos que lo incluyen con fines comerciales (Segers-Lebeer, 2014). Este lactobacilo, es una bacteria gran positiva formadora de colonias, anaerobia facultativa, mesófila (15-4°C) y no formadora de esporas. Es estable en ácidos y bilis y es facultativamente heterofermentativa, capaz de fermentar xilosa, trehalosa, sorbitol, salicilina, ribosa, ramnosa, melezitosa, manosa, manitol, glucosa, fructosa y celobiosa. Requiere ácido fólico, riboflavina, niacina, ácido pantoténico y calcio para su crecimiento, tiene gran poder adhesivo a células y además, es conocido como buen productor de ácidos grasos de cadena corta (Silva, 1987; Curry-Crow, 2004; Doron, 2005,).

<sup>3</sup> Sherwood Gorbach y Barry Goldin aislan en 1983 el LGG a partir de muestras fecales de un adulto humano saludable y lo archivan para patentar el 17 de abril de 1985. Junto con Chang, uno de sus colegas, publican los resultados de un estudio para el tratamiento de la colitis por *Clostridium difficile* con LGG. Luego de enviar la información a la American Type Culture Collection (ATCC) (número de acceso 53103); la cepa se identifica como miembro de las especies de *L. rhamnosus* (Papizadeh *et al.*, 2016).

Uno de los mecanismos que pueden explicar el efecto benéfico de este lactobacilo es la presencia de un cúmulo de genes spaCBA involucrados en la biosíntesis del pili spa CBA. Éste pili es una protrusión larga y delgada de la superficie celular que cumple diferentes funciones, particularmente, juega un rol esencial en la adhesión a las capas mucosas a las células epiteliales Caco-2 y en la formación de biopelículas (Leber *et al.*, 2012). Desde 2002, se tienen datos sobre las relaciones entre LGG y las células epiteliales intestinales, que son el primer punto de contacto en el huésped. Se ha demostrado que *L. rhamnosus* promueve la supervivencia de estas células mediante la activación de Akt/proteína cinasa B antiapoptótica y la inhibición de MAP cinasa p38 pro-apoptótica, idéntico a lo observado con algunos otros probióticos (Yan-Polk, 2002).

El potencial inmunomodulador del LGG ha recibido especial atención en el campo de las alergias. En modelos experimentales, se sabe que una dosis de  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias (UFC)/por ratón al día, una semana antes de la sensibilización, previene el desarrollo de la marcha alérgica con la supresión de citocinas como la IL-17, IL-4 y TSLP mediante mecanismos de las células T reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> en nódulos linfáticos mesentéricos (Kim *et al.*, 2014). En otro estudio, utilizando esa misma dosis del lactobacilo ( $1 \times 10^9$  UFC/por ratón) al día, una semana antes de la sensibilización, se observó que el bacilo también suprime parámetros alérgicos en un modelo de asma experimental, incluyendo hiperreactividad e inflamación de vías aéreas, e IgE totales, incrementando significativamente la población de células T reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> (Jang *et al.*, 2012). Por otro lado, Kim y colaboradores (2012) observaron que la administración de células dendríticas tratadas con LGG ( $1 \times 10^7$  UFC) suprimen el fenotipo asmático, incluyendo hiperreactividad bronquial, celularidad total de vías aéreas y conteos de células inflamatorias (eosinófilos), inflamación pulmonar e Igs séricas en un modelo de asma experimental en ratón, lo que demuestra la inmunomodulación que ejerce sobre células del sistema inmune innato.

Aunque existen pocos datos sobre el uso de LGG en AA en humanos, desde 2001 se realizaron estudios que mostraron que la combinación de tratamiento  $10^{10}$  UFC diarias en cápsulas o en agua en dosis prenatales maternas (2-4 semanas) y postnatales pediátricas (6 meses) en familias con historial atópico, disminuyeron los síntomas alérgicos como el eczema (Kalliomaki *et al.*, 2007). Además, en un estudio reciente en pacientes de 1-12 meses con alergia a proteína de leche de vaca y administrados con LGG, se observaron cambios importantes en las poblaciones microbianas intestinales respecto a los controles sanos. Las familias de bacterias características en el intestino de niños sanos (*Enterobacteriaceae* y *Bifidobacteriaceae*) fueron significativamente menos abundantes en el grupo de niños con alergia a proteína de leche de vaca, siendo las más abundantes *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*, lo que representó la emergencia del género *Firmicutes* (Clostridiales particularmente). Los géneros *Blautia*, *Roseburia* y *Corprococcus* también incrementaron significativamente luego del tratamiento con una fórmula de proteína de caseína de leche de vaca extensamente hidrolizada y LGG; sólo un género, *Oscillospira*, fue significativamente diferente entre los niños que se volvieron tolerantes y los que permanecieron alérgicos. La mayoría de los niños tolerantes mostraron incrementos en los niveles de butirato fecal (Berni *et al.*, 2016), éste ha sido ampliamente descrito como la fuente energética preferencial de colonocitos y es considerado un sensor de salud intestinal (Miquel *et al.*, 2013). Además, en otros estudios se ha observado también la producción del butirato por otras especies, regulando igualmente la función celular y la de la barrera intestinal, así como la captura antigénica en la circulación sistémica (Stefka *et al.*, 2014).

### 2.3. Péptidos bioactivos lácteos

La leche contiene hormonas y factores de crecimiento que modulan algunas funciones GI y hemodinámicas, además de otras moléculas que protegen frente al desarrollo de algunas enfermedades y modulan la población de microorganismos intestinales. Así, la leche se caracteriza por su importante acción antibacteriana frente a patógenos intestinales coliformes y su acción prebiótica al estimular el crecimiento de microflora benéfica en el intestino. La bioactividad de la leche se atribuye a las proteínas y péptidos secretados por las glándulas mamarias; aunque la actividad biológica está latente, ausente o incompleta en la proteína nativa. Las estructuras de las secuencias biológicamente activas suelen obtenerse por digestión enzimática *in vitro* o *in vivo*. Estos péptidos liberados pueden actuar como compuestos reguladores con actividad tipo hormonal, cuya actividad biológica está relacionada con la composición y secuencia de los aminoácidos presentes, considerándose péptidos bioactivos aquellos que contienen de 3 a 20 residuos de aminoácidos por molécula y que poseen propiedades multifuncionales, con actividades biológicas específicas (Torres-Yanez *et al.*, 2013).

A partir de la aparición de los métodos de procesamiento de la leche, como la microfiltración y ultrafiltración, los concentrados proteicos con contenido entre 35-85% de aislados de proteína de suero de quesería se han vuelto importantes para la mejora funcional y nutricional de los alimentos. Las proteínas de suero de quesería son en su mayoría BLG (48%-58%), ALA (13%-19%), caseinomacropéptido o glicomacropéptido (GMP, 12%-20%), BSA, inmunoglobulinas de cadena ligera y pesada y varias proteínas de suero de otros tipos (Bonaille-Tomasula, 2001).

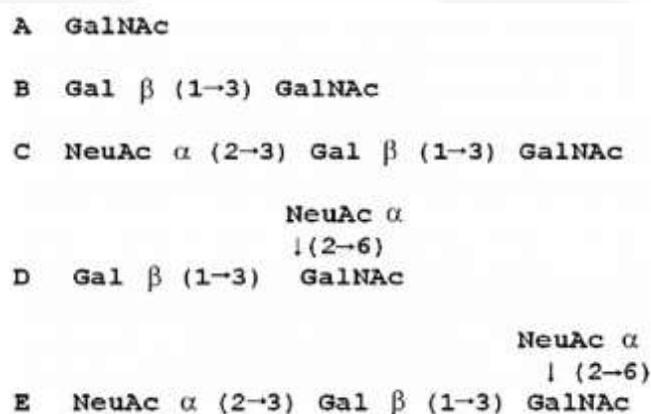
Aunque la potencia de los péptidos derivados de la leche es menor a la de los fármacos, los primeros podrían tener un efecto fisiológico importante sin los efectos secundarios de una terapéutica convencional. No obstante, es necesario que los péptidos bioactivos sean liberados durante la digestión y que alcancen el sitio donde ejercen su acción en el tracto intestinal o después de su reabsorción en los órganos periféricos. Entre los distintos péptidos con actividad biológica descritos hasta ahora existen péptidos con actividad opioide, con acción antihipertensiva, inmunomoduladores, antitrombóticos, transportadores de calcio y antimicrobianos (Pihlanto-Leppälä, 2001).

Se han reportado péptidos que presentan más de una función biológica. Por ejemplo, la fracción Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp de las caseínas  $\alpha$ S1 presenta un efecto inmunomodulador e inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), al controlar la producción de angiotensina II y de bradicinina las cuales regulan, entre otros factores, la presión arterial y la homeostasis hidroelectrolítica (Cravioto, 2001). Otros ejemplos, son la fracción 206-208 de las caseínas  $\alpha$ S2 con una función antimicrobiana, actividad antioxidante y potente antihipertensivo; la secuencia Ala-Gly-Thr-Trp-Tyr, correspondiente al fragmento 15-20 de las BLG, con una función inhibidora de ECA y antioxidante; en  $\beta$ -lactorfina por su actividad opioide e inhibidora de ECA o  $\beta$ -casomorfina 7 con una actividad opioide intestinal y reguladora de proliferación linfocítica (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2014).

### 2.3.1. Glicomacropéptido

Uno de los péptidos con más importancia por el conjunto de propiedades benéficas que se han encontrado es el GMP. Se sabe que, durante el procesamiento de la leche para la elaboración del queso, la renina también conocida como quimosina, hidroliza la fracción  $\kappa$ -caseína en el enlace entre fenilalanina 105 y metionina 106, generando una fracción para- $\kappa$ -caseína con residuos del 1 al 105 y otra denominada GMP de residuos 106-109 (que permanece soluble en la proteína de suero de leche).

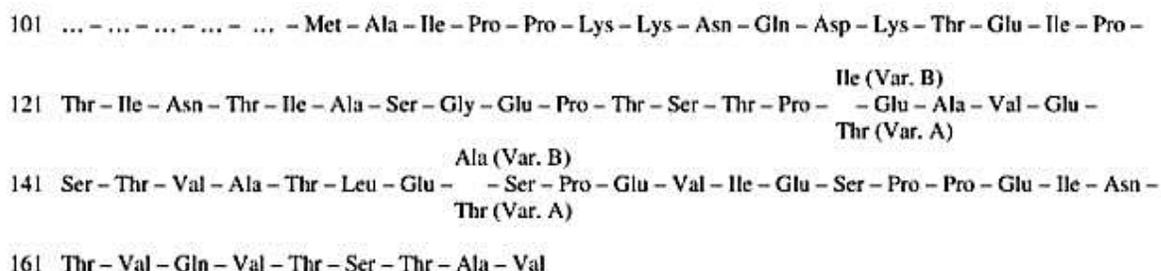
Dicha sustancia es un péptido C-terminal hidrofílico de caseína formado por 64 aminoácidos. En el péptido han sido identificadas hasta 5 cadenas de hidratos de carbono tipo mucinas unidas a residuos de treonina en 6 diferentes posiciones (121-131-133-136-142-165, de la secuencia del GMP en la caseína). Como se ilustra en la figura 12, cada cadena está compuesta por diferentes proporciones de N-acetilneuraminil (NeuAc), galactosil (Gal) y N-acetilgalactosamina (GalNAc) (Saito-Itoh, 1992; Thomä-Worringer *et al.*, 2006).



**Figura 11. Estructuras reportadas para los residuos glicosídicos unidos al GMP.** Estructura de las 5 cadenas (A-E) de hidratos de carbono presentes en el GMP. Farrell *et al.*, 2004, imagen original de Saito- Itoh, 1992.

Aunque prevalecen en la estructura cadenas de aminoácidos ramificados, es importante remarcar la ausencia de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) (Rojas & Torres, 2013, Requena y cols., 2008). Las características estructurales del GMP, lo hacen un péptido ácido, altamente polar (punto isoeléctrico debajo de 4) y estable al calor (Sawin *et al.*, 2015).

Hasta el momento se conocen once variantes genéticas de  $\kappa$ -caseína; sin embargo, se sabe que en la leche de vaca hay dos que generan las dos variantes del GMP bovino, variantes A y B representadas en la figura 12. En la posición 136 se encuentra una treonina en su variante A y una isoleucina en la B, así como un ácido aspártico en la posición 148 en la variante A y una alanina en la B (Farrel *et al.*, 2014) además presenta modificaciones postraduccionales, como fosforilaciones en los residuos de serina así como las glicosilaciones antes mencionadas en los residuos de treonina vía uniones de grupos OH (Sawin *et al.*, 2015).



**Figura 12. Estructura primaria del caseinomacropéptido bovino (CMP) sobre las variantes A y B de la  $\kappa$ -caseína bovina. Thomä-Worringer *et al.*, 2006.**

El uso de cromatografía líquida ha permitido observar pesos moleculares entre 6755 y 6787 Da en el GMP dependiendo de la variante génica de la fracción  $\kappa$ -caseína de que se derive (en promedio 7500 Da). Las técnicas de aislamiento del péptido para la comprensión de sus propiedades biológicas y funcionales han sido numerosas en las últimas décadas, destacando la precipitación por ácido tricloroacético y por alcohol etílico, la ultrafiltración y las técnicas cromatográficas como las de gel, las de afinidad, las de interacción hidrofóbica y las de intercambio iónico. La combinación de diferentes técnicas ha potenciado su aislamiento. Las técnicas suelen categorizarse en tres grupos principales: de precipitación selectiva (mediante calor, alcohol, ácido acético o tricloroacético), de filtración de membrana (microfiltración, diálisis, ósmosis inversa, electrodiálisis) y de adsorción selectiva (intercambio iónico) (Neelima *et al.*, 2013).

La incapacidad del GMP de generar reacciones inmunológicas luego de su administración ya ha sido evaluada. En 2006, se realizó un estudio utilizando diferentes productos de GMP para inmunizar ratones, y observar si el tamaño del péptido sería un factor determinante en su inmunogenicidad. Los resultados demuestran que independientemente de la ruta de inmunización, el GMP *per se* no induce la producción de anticuerpos específicos, comportamiento que es común a las sustancias de peso molecular menor a 5 kDa (Mikkelsen *et al.*, 2006). Lo anterior ha permitido que el péptido sea propuesto como alternativa terapéutica en numerosos escenarios de los que se hablará más adelante.

Así mismo, la seguridad del péptido en animales y humanos también ha sido revisada. Tal como mencionan Kelleher y colaboradores (2003), la suplementación con GMP no afecta el estado nutricional de monos *Rhesus* en crecimiento. En éstos, el hematocrito y cobre sanguíneos mejoraron (al comparar con el grupo sin la adición del péptido) y la absorción de zinc se incrementó. Además, el perfil de aminoácidos plasmáticos se mantiene similar al de los monos con lactancia materna. A su vez, el uso del péptido ha sido evaluado en humanos, luego de su administración a lactantes a término (36-42 semanas de gestación) sin encontrarse evidencia de efectos en la absorción del hierro en comparación con los que tenían lactancia materna (Szymlec-Gay *et al.*, 2011). Además, en un estudio piloto en 24 pacientes con colitis ulcerativa distal se evaluó el efecto del GMP en la evolución de la patología, notándose efectos antiinflamatorios y similares a los del tratamiento convencional en cuanto a la disminución de los puntajes clínicos y endoscópicos de la colitis y demostrando la seguridad de la administración oral del péptido (Hvas *et al.*, 2016).

En cuanto a sus propiedades nutricionales, al ser un péptido rico en aminoácidos ramificados y bajo en metionina, se ha utilizado en dietas de pacientes hepatópatas (Abd El-Salam *et al.*, 1996). Además, contrario a lo reportado por los pacientes en relación con la poca palatabilidad de otras preparaciones de aminoácidos sintéticos, el GMP muestra un efecto positivo en condiciones

organolépticas. Otros estudios muestran la habilidad del GMP suplementado en la fenilcetonuria. A nivel experimental, para 2008, Ney y colaboradores realizan un primer acercamiento al análisis del efecto del péptido en ratones con fenilcetonuria evaluando que, al utilizarlo, el soporte del crecimiento se mantiene y además se obtiene una disminución de fenilalanina plasmática y cerebral, comparado con una dieta de aminoácidos (Ney *et al.*, 2008). En 2012, Solverson y colaboradores postulan de nuevo que la suplementación dietaria con GMP en ratones fenilcetonúricos logra una disminución de fenilalanina sérica, manteniendo el crecimiento de los animales, pero a la vez disminuyendo parámetros inflamatorios propios de la patología como niveles de IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , y GM-CSF (Solverson, 2012). Posteriormente, se han realizado estudios cruzados aleatorizados con pacientes fenilcetonúricos donde se ha demostrado que las dietas adicionadas con el péptido vuelven la dieta más aceptable entre los pacientes, mejora los síntomas GI, mantiene el control de las cifras de fenilalanina sanguíneas y disminuye el hambre por lo que podría garantizar un mejor apego al tratamiento nutricional (Ney *et al.*, 2016). Otro estudio clínico (Zaki *et al.*, 2016) prospectivo en una unidad de genética en Egipto también demuestra que la adición del 50% de GMP a la proteína en productos alimenticios también disminuye el estrés causado por la limitación de alimentos en estos pacientes, así como los costos del tratamiento nutricional. En humanos, un metaanálisis reciente subraya la importancia de la investigación en torno al uso de este péptido en los pacientes fenilcetonúricos ya que ni el número de estudios que se han realizado hasta el momento ni los tamaños de muestra son tan grandes como para finalizar el entendimiento de los efectos a la salud específicos y la formulación de recomendaciones en torno a dicho tratamiento (Pena, 2018).

### 2.3.1.1. Actividades biológicas del glicomacropéptido

El GMP presenta actividad biológica tanto en su forma intacta como hidrolizada (Thomä-Worringer *et al.*, 2006). En modelos murinos de animales obesos, la suplementación de una dieta rica en grasas con GMP induce una reducción del colesterol total plasmático, de las lipoproteínas de baja densidad y del colesterol y triglicéridos hepáticos. La suplementación de la dieta con GMP, también ha demostrado efectos reductores en el depósito de tejido adiposo, así como disminuyendo la actividad de la sintasa de ácidos grasos y en deshidrogenasa glicerol-3-fosfato, lo que implica una disminución en la síntesis de ácidos grasos. Así mismo, su uso profiláctico previene la esteatosis hepática en ratas obesas, disminuye intermediarios metabólicos de peroxidación lipídica (como el malondialdehído) e incrementa la actividad mitocondrial de las enzimas superóxido dismutasa hepática y glutatión peroxidasa, disminuyendo la secreción de leptina y citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6). Así, se sugiere que su administración podría contrarrestar los efectos de la obesidad inducida por dietas altas en calorías (Shi-Ping *et al.*, 2012).

Otra de las bioactividades del péptido es la remineralizante, lo cual ha constituido un efecto importante en el campo de la salud dental. Hacia 1994, se probó la capacidad del GMP para unirse a *Streptococcus sanguis* OMZ 9 y *Streptococcus sobrinus* OMZ 176, e impedir su unión a perlas de hidroxiapatita cubiertas, sin modificar la capacidad de otras especies como *A. viscosus* Ny 1 en un modelo experimental tópico anticariogénico (Neeser *et al.*, 1994). Posteriormente se constató que también lograba una reducción en la adhesión de *S. sobrinus* y *S. naitans*, modificando así la capacidad patogénica de la placa dental y protegiendo contra las caries (Schüpbach *et al.*, 1996). A la fecha, existen numerosos estudios que evalúan su capacidad para revertir la desmineralización

dental, unos con efectos más claros que otros, dependiendo de factores como la dosis y la formulación de las sustancias utilizadas (Zhang, 1998; Zhang, 2001; Elgamily *et al.*, 2019).

Así, el GMP se ha descrito también como un agente antibacteriano poderoso, teniéndose como referencia el efecto específico en poblaciones bacterianas de sistemas distintos a la cavidad oral como el intestino. En 2006, Brück y colaboradores observaron como el péptido logró inhibir la unión a una cepa *E. coli* enteropatógena y *Salmonella typhimurium* a células CaCo-2 gracias a la unión bacteriana preferente a su estructura rica en ácido siálico (Brück *et al.*, 2006). En otros modelos con una *E. coli* enterotoxigénica K88 y tratamiento con distintas concentraciones del péptido, se volvió a encontrar un efecto que limita la adherencia a la mucosa intestinal de cerdos a una concentración de 2.5 mg/mL, además previniendo el sobrecrecimiento bacteriano intestinal del animal (Hermes, 2013). En otro estudio se evaluó el efecto del GMP sobre esta misma cepa bacteriana, mostrando como logra impedir los efectos secundarios de la infección por el patógeno como cambios morfofuncionales intestinales y afectación al crecimiento de los animales (Rong, 2015).

Otras bacterias como *Desulfovibrio* también se han detectado disminuídas en modelos murinos de fenilcetonuria, donde se ha logrado evaluar una disminución importante de esta bacteria tras 8 semanas de una dieta isoenergética que contenía al péptido, gracias a probables cambios en el microambiente que implican cambios en los sustratos energéticos del microorganismo como cambios en la síntesis de mucinas (Sawin, 2015). Sin embargo, esta modulación del crecimiento bacteriano no se queda en el aspecto de la limitación de bacterias que tienen connotaciones negativas a la salud del huésped, sino que el péptido ha sido también descrito como un agente prebiótico. Este término se refiere a los ingredientes de los alimentos no digeribles que producen efectos beneficiosos sobre el huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de un tipo o de un número limitado de bacterias en el colon (Oliveira & González, 2007). Hacia 1954, trabajando con variantes de *L. bifidus*, se encontraron evidencias sobre la presencia de ácido siálico en la leche. En el trabajo de aquel momento se lograron identificar factores bífidos que favorecen el crecimiento de *L. bifidus* en leche humana y de vaca que no eran destruidos ni alterados, incluso bajo la acción de temperaturas elevadas. Sin embargo, fue hasta 1965 que un grupo de investigación francés estableció la existencia de ácido siálico unido en la fracción kappa de la caseína (Neelima *et al.*, 2013), involucrando al GMP en esta actividad. La capacidad prebiótica del GMP ha sido estudiada posteriormente por diferentes autores y en diferentes condiciones.

En modelos *in vitro*, algunos hidrolizados de GMP, en condiciones anaeróbicas, son capaces de incrementar significativamente la biomasa y producción de ácidos de *B. animalis* subsp. *lactis* (Quian *et al.*, 2014); así como incrementar el crecimiento de *B. longum* ssp. *infantis* (O'Riordan *et al.*, 2018). En las mismas condiciones anaeróbicas, se tienen resultados sobre la capacidad prebiótica del GMP puro, asialidado y altamente glicosilado, donde la densidad óptica de los cultivos incrementa 1.8 y 1.5 veces para *B. thermophilum* RBL67 y *L. rhamnosus* RW-9595-M respectivamente, al comparar con el medio sin suplementación, además de que la glicosilación o sialidación del péptido no alteran su capacidad prebiótica (Robitaille, 2013). El efecto prebiótico del GMP en *B. longum* ssp. *infantis* con la suplementación de 2 mg/mL en medios de cultivo indujo un incremento de alrededor de 20% medido como densidad óptica. Además, mediante el análisis con herramientas moleculares se postula que el péptido podría modular vías metabólicas de hidratos de carbono bacterianas mediante la inducción y represión de glicógenos que podrían incidir en vías de crecimiento y división celular bacteriana.

Lo anterior sienta las bases del análisis del potencial prebiótico en bacterias de colonización alóctona, así como de especies de la microbiota residente en diferentes condiciones de crecimiento *in vitro*, lo que debería probarse en *modelos in vivo* para determinar si dicho efecto contribuye a la modificación de las bacterias intestinales del hospedero y/o a la salud de éste.

### **2.3.1.1.1. Propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias**

Las propiedades del GMP que contribuyen al mantenimiento de los parámetros inmunológicos referidos como normales o a la tendencia a la homeostasis de éstos, han sido evaluadas en diversas ocasiones. A continuación, se presentan los hallazgos más relevantes.

Para 1998 se reportó que la suplementación dietaria con GMP suprime los niveles séricos de anticuerpos IgG específicos a OVA administrada vía oral y  $\beta$ -lactoglobulina inyectada vía parenteral en ratones (Monnai *et al.*). En 2004, Li & Mine observaron el potencial inmunomodulador del péptido en la línea celular U937 incrementando significativamente su proliferación. Así como, la actividad fagocítica en más del 50%. El efecto fue dependiente de la concentración del péptido, y del tratamiento de éste con enzimas homólogas a las existentes en tracto GI durante la ingesta de este, observándose incremento significativo de los efectos proliferativos luego de la adición de pepsina y de la combinación pepsina-tripsina. Además, el efecto evaluado en el estudio fué dependiente de la porción utilizada, ya que las que contenían mayor contenido de ácido siálico mostraban mayor actividad y conservaban un amplio porcentaje del efecto proliferativo incluso tras el tratamiento con sialidasas. Se sabe que el GMP intacto en monocitos humanos estimula la secreción de TNF, IL-1 $\beta$  e IL-8 en forma dependiente de la concentración medido en células THP-1 y esta actividad está mediada a través de la activación de las vías de MAP quinasas y NF- $\kappa$ B (Requena *et al.*, 2009). En 2010, Requena y colaboradores evaluaron el efecto del GMP sobre esplenocitos en cultivo para intentar explicar su actividad antiinflamatoria en determinadas patologías, observando como este péptido obstaculiza la activación de células Th1, mientras favorece la activación de células T reguladoras. En este trabajo se describe un incremento en la expresión de FoxP3 e IL-10 en los esplenocitos incubados con GMP, así como la inhibición de la expresión de IFN- $\gamma$  (Requena *et al.*, 2010).

El efecto antiinflamatorio ha sido igualmente evaluado en diversos modelos de patología GI experimentalmente inducida por diversos mecanismos. Por ejemplo, estudios en modelos experimentales de ileítis inducida por ácido trinitrobenzenosulfónico, muestran que el GMP administrado oralmente reduce las lesiones inflamatorias intestinales en las ratas; además, se observa menor extensión de zonas necróticas y puntuación en escala de daño, menor actividad mieloperoxidasa, fosfatasa alcalina, óxido nítrico sintasa inducible y una reducción en la síntesis de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-17, sin afectar la producción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 de las células de ganglios linfáticos mesentéricos aisladas de los animales con la patología. La expresión de FoxP3 se incrementó con la ileítis, y no hubo reducción con el tratamiento con GMP (Requena *et al.*, 2008).

Daddaoua y colaboradores (2005) analizan el efecto del pretratamiento con GMP en un modelo de colitis en rata Wistar por inducción con ácido trinitrobenzenosulfónico, observando como disminuye la anorexia y el daño colónico, así como factores oxidativos e inflamatorios, tal como la fosfatasa alcalina y la IL-1 $\beta$  medidas por RT-PCR (Daddaoua *et al.*, 2005). En un modelo de colitis ulcerativa inducida por oxalazona en ratón se demuestra que el GMP disminuye los niveles de mRNA de FasLy p65 en tejido colónico, lo que sugiere que éste tiene efectos anti-apoptóticos mediados a través de

una señal disminuída en la vía de Fas/FasL (Chen, 2014). Además, los animales experimentan mejoría en parámetros morfológicos característicos de daño en colon.

### 2.3.1.1.1. Inmunomodulación en alergias

En los últimos años se ha explorado el potencial terapéutico del GMP en algunas facetas de la patología alérgica en modelos experimentales. En 2012, Jiménez y colaboradores demostraron que el pretratamiento oral con GMP reduce significativamente el desarrollo de la sensibilización alérgica experimental, disminuyendo los niveles de IgE específicas en suero, inhibiendo la respuesta proliferativa de esplenocitos a OVA y disminuyendo la producción de IL-13 estimulada por OVA en cultivos celulares de bazo de animales sensibilizados. El tratamiento con GMP influyó en las manifestaciones clínicas inmediatas de la hipersensibilidad cutánea, reduciendo la intensidad de la respuesta inflamatoria local, y disminuyendo los signos de la anafilaxia severa, demostrando la función inmunomoduladora del GMP en la respuesta inmune alérgica (Jiménez *et al.*, 2012).

Además, se ha mostrado que el GMP atenúa la inflamación de vías aéreas y la remodelación asociada a fenómenos asmáticos, reduciendo la infiltración de eosinófilos, la hiperplasia de células caliciformes y los depósitos de colágeno pulmonares en modelos de asma en ratas. Este efecto se acompaña de la disminución en la expresión de IL-5 e IL-13 y del aumento en la expresión de IL-10 en tejido pulmonar (Roldán *et al.*, 2016). Además, está demostrado que la administración del péptido, antes y durante la sensibilización, induce un incremento en las cantidades de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Bacteroides* intestinales en los animales sensibilizados, así como en la producción de TGF- $\beta$  por esplenocitos en respuesta al alérgeno. El impacto en la función de mastocitos se evidenció mediante la inhibición de su activación y de la liberación de histamina en respuesta a alérgenos, sin alterar la cantidad de estas células en los tejidos analizados (Jiménez *et al.*, 2016).

El tratamiento con GMP contribuye en el mantenimiento de la barrera cutánea sobrerregulando la expresión de filagrina y péptidos antimicrobianos y ha mostrado modificaciones en la colonización de *S. aureus* en modelos de dermatitis atópica en rata. Otro de los hallazgos importantes es una regulación de la microbiota intestinal en este modelo, incrementando bifidobacterias, lo que puede modificar la respuesta sistémica de la patología (Jiménez *et al.*, 2020). En el mismo sentido, se sabe que tiene un efecto terapéutico importante al administrarse oralmente antes de la inducción de la dermatitis atópica, suprimiendo la inflamación, el prurito, el reclutamiento de eosinófilos y la hiperplasia de mastocitos en piel (Muñoz *et al.*, 2017). La administración del GMP también incide en la respuesta inflamatoria alérgica cutánea disminuyendo la cantidad de IL-4, IL-5, IL-13, pero incrementando la de IL-10 en lesiones tipo dermatitis atópica. Es importante mencionar que, incluso después de la inducción de la patología, la mayoría de los efectos inmunomoduladores del péptido se mantienen (con excepción del efecto anti-prurinérgico).

### 3. Justificación

Siendo las AA entidades que se presentan frecuentemente en la población mundial (sobre todo en las etapas iniciales de la vida) con desarrollo inespecífico y multifactorial, cuadros clínicos de sintomatología variada que afectan numerosos órganos y sistemas y que resultan de difícil diagnóstico por sus semejanzas con otras patologías de diversos orígenes, es crucial desarrollar protocolos de investigación que analicen el establecimiento de los patrones alérgicos, así como su tratamiento y prevención, para evitar disfunciones orgánicas específicas que incidan en la etapa de desarrollo en que se presente.

Además, partiendo del punto de que los tratamientos actuales son caros e inaccesibles para una gran parte de la población afectada y considerando, a su vez, que los fenómenos de industrialización promueven el incremento anual del número de personas enfermas, es relevante el surgimiento de nuevos estudios integrativos de investigación básica, en los que se plantee la utilización de agentes naturales de fácil acceso y aplicación al organismo, que permitan mejorar la sintomatología y el patrón básico de la enfermedad.

Se propone el uso del GMP por su potencial prebiótico e inmunomodulador en el tratamiento de la hipersensibilidad tipo 1 a través de la regulación de perfiles inflamatorios. Además, se propone la alternativa del uso del tratamiento sinérgico con GMP y LGG, por el impacto positivo del microorganismo en las manifestaciones clínicas alérgicas y en el balance entre los perfiles inmunológicos inflamatorios y reguladores en modelos experimentales de patología GI y alérgica.

### 4. Hipótesis

El GMP administrado vía oral, solo o combinado con *L. rhamnosus*, regula negativamente la respuesta inmune y los signos clínicos asociados a las AA.

### 5. Objetivos

#### 5.1. Objetivo General

Estudiar el efecto del GMP administrado vía oral, solo o combinado con *L. rhamnosus*, sobre la respuesta inmune y los signos clínicos asociados a las AA.

#### 5.2. Objetivos Particulares

**5.2.1.** Analizar el crecimiento *in vitro* del *L. rhamnosus* con diferentes dosis de GMP.

**5.2.2.** Desarrollar y caracterizar un modelo de AA en rata Wistar.

**5.2.3.** Analizar niveles de anticuerpos asociados a la respuesta alérgica en animales con AA y tratados con GMP y/o *L. rhamnosus*.

**5.2.4.** Cuantificar marcadores plasmáticos de activación de mastocitos por alérgenos en animales con AA y administrados con GMP y/o *L. rhamnosus*.

**5.2.5.** Evaluar, en animales con AA y que reciben oralmente GMP y/o *L. rhamnosus*, signos clínicos asociados con la patología tras el reto con el alérgeno.

**5.2.6.** Estudiar las variaciones en la permeabilidad vascular en animales con AA tratados con GMP y/o *L. rhamnosus*.

**5.2.7.** Evaluar los perfiles de citocinas y las poblaciones linfocitarias predominantes en tejido intestinal de animales con AA y que recibieron tratamiento con GMP y/o *L. rhamnosus*.

**5.2.8.** Realizar un estudio histopatológico de la mucosa intestinal en animales con AA tratados con GMP y/o *L. rhamnosus*.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1. Microorganismo y almacenamiento**

LGG ATCC 53103 se cultivó durante 24 h a 37 °C en medio Man Rogosa Sharpe previamente esterilizado (MRS, Difco, Becton Dickinson, E.U.A) en agitación orbital suave y pasado este tiempo se prepararon alícuotas de 1.335 mL (1 mL LGG, y 335 µL de glicerol al 60%) y se almacenaron a -80 °C.

### **6.2. Condiciones de cultivo y determinación de biomasa de LGG**

Se descongeló un vial de LGG en un matraz con 20 mL de medio estéril MRS y se mantuvo 24 h a 37 °C en agitación orbital suave para el crecimiento y desarrollo de la bacteria. Pasado este tiempo se inoculó una alícuota del medio de crecimiento ajustada a una densidad óptica (DO) de 0.3, obtenida a una longitud de onda de 600 nm ( $DO_{600}$ ) en el espectrofotómetro SmartSpec™Plus (Bio-Rad, E.U.A.).

Para la determinación de biomasa en condiciones aerobias, se utilizó medio MRS en ausencia o presencia de 0.1, 0.3 o 0.5% de GMP (LACPRODAN® CGMP-10, donado por Arla Foods Ingredients, Dinamarca) y se mantuvieron los medios a 37 °C. Éstos se esterilizaron previo a la inoculación del LGG. Finalmente, se determinó la biomasa mediante  $DO_{600}$  a las 0 h y cada hora hasta las 8 h, así como a las 12, 24, 36 y 48 h.

Para la determinación de biomasa en condiciones anaerobias se realizó el procedimiento descrito para condiciones aerobias con las siguientes modificaciones: se utilizaron frascos con tapa hermética, luego de preparar los medios de siembra se desplazó el oxígeno de los frascos mediante la adición de gas nitrógeno (Infra, México), para después cerrarse con tapa hermética manteniendo las condiciones de anaerobiosis y esterilidad. La inoculación y toma de muestras se realizó mediante inyección con jeringa, en condiciones de esterilidad.

### **6.3. Registro de pH de medios con LGG**

El registro de pH se determinó en paralelo a la medición de la biomasa de los cultivos antes mencionados, con la ayuda de un potenciómetro Orion 3-Star (ThermoScientific, E.U.A.) en condiciones de esterilidad y agitación constante.

#### 6.4. Titulación de acidez de medios con LGG

La titulación de los medios se realizó con base al porcentaje de acidez expresado en porcentaje de ácido láctico, para las muestras obtenidas en condiciones de anaerobiosis por ser un indicador más sensible de los cambios en los niveles de acidez. Se determinó a partir de muestras de 3 mL obtenidas de cada medio, las cuales fueron centrifugadas a 1646 x g, 4 °C, 5 min en centrífuga refrigerada HERMLE Z383k (HERMLE, Alemania). Posterior a esto se procedió a titular 1 mL del sobrenadante mediante la adición de NaOH 1 N por goteo, cuantificando los mililitros utilizados por cada muestra. Así mismo, como indicador de la titulación se utilizaron 0.05 mL de fenoftaleína al 0.03% por muestra. El punto final de las titulaciones se determinó al viraje del color de las muestras a un rosa pálido, posterior a lo cual se procedió a calcular la acidez en base a la cantidad de ácido láctico por muestra mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ acidez} = (\text{mL NaOH gastados} \times 0.1 \text{ M} \times \text{mEq ácido láctico} / 1 \text{ mL}) \times 100\%$$

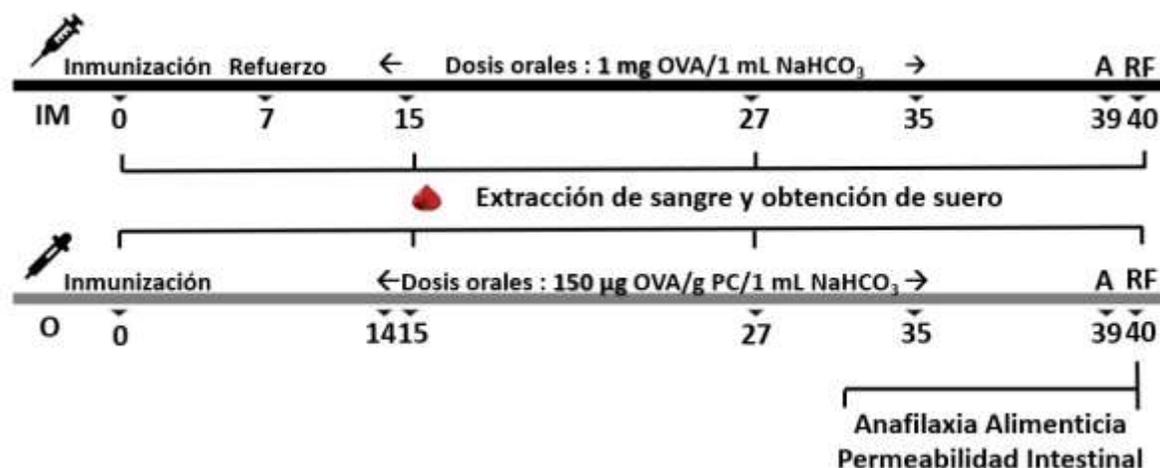
#### 6.5. Animales

Los animales utilizados en este proyecto se obtuvieron del bioterio de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, y se trataron con estricto apego a las normas éticas aprobadas por la Normatividad Institucional de los Estándares y Manejo de Cuidado Animal (Normal Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999) (fecha de aprobación: 02/04/2018), así como el Instituto Nacional de guías en salud para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Durante la ejecución de cada uno de los protocolos, los animales se mantuvieron en jaulas de metal (5 animales / jaula) a temperatura controlada (22-24 °C) y ciclos de luz-oscuridad de 12 h; así como con una dieta libre de proteína de huevo desde su destete (Nutricubos, Purina) y agua *ad libitum*. Las ratas parentales también fueron alimentadas con una dieta libre de proteína de huevo.

#### 6.6. Caracterización del modelo experimental de AA

Se trabajó con ratas Wistar macho recién destetadas (8 semanas de edad, 100-120 g). Inicialmente, se les administró un tratamiento desparasitante con Drontal puppy (Bayer, Mexico) vía oral (v.o.) una dosis de 1mg/kg de peso corporal seguido de un antibiótico v.o. Enroxil 10% / 3 días (Senosiain, México). Se dejaron descansar por 7 días y se iniciaron los protocolos de sensibilización utilizando OVA (Sigma Aldrich, E.U.A.) como alérgeno. Para ello, las ratas se clasificaron en cinco grupos, cómo se indica a continuación (figura 13):

- **SH-IM:** animales SHAM del modelo de AA por sensibilización intramuscular (i.m.).
- **AS:** animales con sensibilización i.m. (sin re-sensibilizaciones orales) (modelo de sensibilización alérgica sistémica).
- **AA-IM:** animales con AA por sensibilización i.m. y re-sensibilizaciones orales.
- **SH-O:** animales SHAM del modelo de AA por sensibilización v.o.
- **AA-O:** animales del modelo de AA por sensibilización y re-sensibilizaciones v.o.



**Figura 13. Esquema de los protocolos de los modelos de caracterización de AA y toma de muestras.** (IM) Modelo de AA con sensibilización intramuscular: Inmunización intramuscular con 1 mg de ovoalbúmina (OVA) como alérgeno preparada en hidróxido de aluminio vía intramuscular y *B. pertussis* vía subcutánea, Refuerzo: mediante la inyección de OVA preparada en hidróxido de aluminio vía intramuscular; A: Ayuno, RF: Reto final con 200 mg OVA vía oral (v.o.); (O) Modelo de AA con sensibilización oral: Inmunización oral con OVA preparada en bicarbonato de sodio v.o.; PC: Peso corporal, A: Ayuno, RF: Reto final con 750 µg OVA/g PC v.o.

#### Modelo de AA con sensibilización intramuscular (IM):

El día 0, los animales AA-IM recibieron 1 mg de OVA (i.m.) como alérgeno, junto con 7.8 mg de hidróxido de aluminio (Imject Alum, Thermo Scientific, USA) en 1 mL de solución salina fisiológica (ssf) al 0.9% y 500 µL de la vacuna DPT celular por vía subcutánea (s.c.) (Dipertix, Biofarma, Indonesia; con 30 UI de toxoide diftérico, 60 UI de toxoide tetánico y 4 UI de *B. pertussis*) para favorecer una respuesta de anticuerpos IgE (Jiménez *et al.*, 2012). El día 7 se dio un refuerzo, sin la aplicación de la vacuna DPT. Posteriormente, del día 15 al 35, en un periodo de 5 días seguido de 3 días de descanso se administró 1 mg de OVA en 1 mL de bicarbonato de sodio 0.2 M (v.o.) utilizando una sonda gastro-esofágica.

Los animales del grupo AS se sensibilizaron con el alérgeno por vía IM en los días 0 y 7 (siguiendo el protocolo anteriormente descrito), mientras que los del grupo SH-IM recibieron solo los adyuvantes, sin la administración del alérgeno. A ambos grupos del día 15 al 35, en periodos de 5 días y descanso de 3 días, se les administró 1 mL de bicarbonato de sodio 0.2 M (v.o.) con ayuda de una sonda gastro-esofágica.

En el día 40 y tras 24 h de ayuno todos los animales recibieron como reto final 200 mg de OVA en 2 mL de bicarbonato 0.2 M (adaptado de Jiménez *et al.*, 2012 y Abril-Gil *et al.*, 2015).

#### Modelo de AA oral con sensibilización oral (O):

El día 0 se administró a los animales del grupo AA-O mediante cánula gastro-esofágica una dosis de 150 µg de OVA por gramo de peso corporal de la rata en 1 mL de bicarbonato 0.2 M como vehículo. A partir del día 15 y hasta el día 35 las ratas se re-sensibilizaron con la misma dosis del alérgeno, en periodos de 5 días (y descanso de 3 días) (modificado de Sun *et al.*, 2013). El grupo SH-O solo recibió el vehículo en los mismos periodos de tiempo. Tras un ayuno de 24 h, los animales

de los grupos SH-O y AA-O recibieron en el día 40 y como reto final 750  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal de OVA en 2 mL de bicarbonato de sodio 0.2 M.

## 6.7. Tratamiento y grupos experimentales

Las ratas se clasificaron en cinco grupos ( $n=9$ ), como se indica a continuación: SHAM, AA (animales alérgicos con el modelo de AA con sensibilización i.m. descrito en la estandarización de los modelos), GMP (animales con AA y tratados con GMP), GMP + LGG (animales con AA y tratados con GMP y LGG) y LGG (animales con AA y tratados con LGG).

A partir del día -3 y hasta el día 40, los animales del grupo GMP, recibieron diariamente, v.o., por sonda gastro-esofágica 500 mg de GMP por kg de peso corporal disuelto en agua estéril. Los animales del grupo LGG, recibieron la dosis antes descrita de GMP junto con  $1 \times 10^9$  células de LGG/1 mL de agua estéril del día -3 al día 40 de protocolo. El grupo LGG recibió  $1 \times 10^9$  células de LGG/1 mL de agua estéril durante el mismo tiempo que los grupos anteriores. Los animales SHAM y AA, se dosificaron del día -3 al día 40 de protocolo con 1 mL de agua estéril (figura 14).

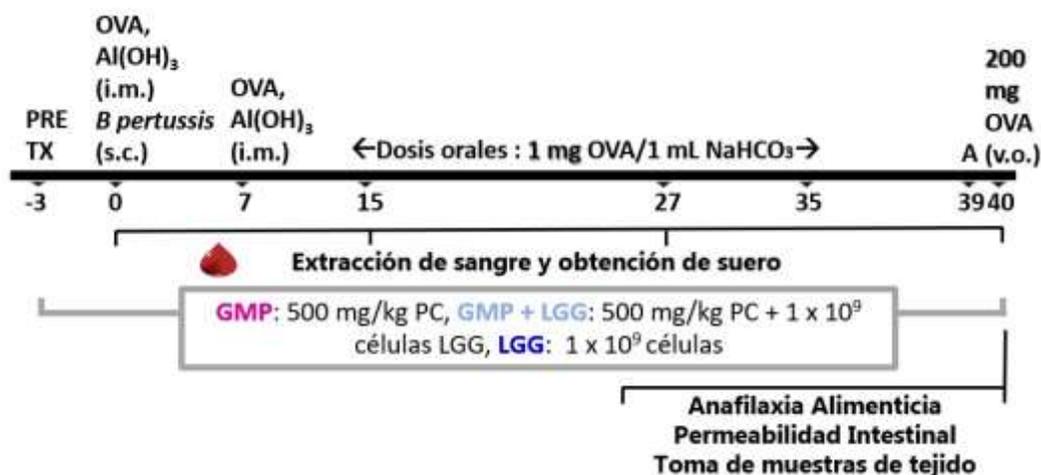


Figura 14. Esquema del protocolo de AA en los grupos experimentales, administración de los tratamientos y toma de muestra. PRETX: Pretratamiento, PC: Peso Corporal, A: Ayuno.

La dosis para el GMP se estableció de acuerdo con lo reportado para otros estudios terapéuticos en rata (Roldan *et al.*, 2016; Muñoz *et al.*, 2017; Daddaoua *et al.*, 2005; Requena *et al.*, 2008; López-Posadas *et al.*, 2010), al igual que la dosis del LGG (Yu, 2010, Jang, 2012, Kim, 2013, Kim, 2014). Para propagar al microorganismo para su dosificación, una de las alícuotas almacenadas como se indicó anteriormente, se suspendió en un matraz con 25 mL de medio estéril MRS y se mantuvo 24 h a 37 °C a 80 rpm en incubador Benchtop 2220S (Labnet, USA) para potenciar el crecimiento de la bacteria. Para su mantenimiento, se sembraron 100  $\mu\text{L}$  del medio de crecimiento de la bacteria en 25 mL de medio estéril MRS en las condiciones antes mencionadas cada 24 h.

## 6.8. Medición del peso corporal

La valoración del peso corporal de las ratas se realizó en una balanza analítica EK 1200G (AND, Reino Unido), con una precisión de  $\pm 0.1$  g. El procedimiento se llevó a cabo los días 0 y 40 para la

estandarización de los modelos de alergia y -3 y 40 para los grupos de tratamiento de la alergia a las 8 a.m. en ambas ocasiones. Para esto se colocó a los animales en un frasco ligero sobre la balanza y se registró el valor del peso en gramos que se mantuvo durante más de 3 s. La evaluación fue repetida dos a tres veces hasta garantizar la misma cifra para disminuir errores debidos al movimiento de los animales. Los datos se representaron como incremento de peso (g) = peso día 40 (g) – peso día 0 (g).

### **6.9. Obtención de muestras de suero**

En los días 0, 15, 27 y 40, treinta min después de la administración del alérgeno o en su defecto del vehículo se obtuvieron máximo 1000 µL de sangre de la vena caudal de las ratas, previamente anestesiadas con éter. La sangre se dejó coagular a 37 °C y se centrifugó a 735 x g por 15 min. Finalmente, el suero se alicuotó en volúmenes de 100, 70 y 15 µL y se congelaron a -80 °C hasta su uso.

### **6.10. Determinación de IgG1 anti-OVA**

Se realizaron ensayos de inmunoabsorción ligados a enzima (ELISA) indirecto semicuantitativo para analizar los niveles de IgG1 anti-OVA (Sun *et al.*, 2013; Macedo-Mendoza, 2015). A continuación, se describe el procedimiento general utilizado. Para comenzar, se cubrieron los pocillos de una microplaca (Thermo Scientific, USA) con 10 µg/mL de OVA en buffer de carbonatos 50 mM y se incubó toda la noche bajo agitación a 4 °C. Luego de lavar la placa con una solución de tampón fosfato salino (PBS) al 0.05% de Tween-20 (PBST) se bloqueó con buffer de carbonatos 50 mM adicionado con 1% BSA durante 30 min a temperatura ambiente y posterior al lavado, la placa se incubó 1 h con los sueros de las ratas a analizar diluidos 1:50 en PBST-BSA. Tras el lavado de la placa, cada uno de los siguientes reactivos fue secuencialmente añadido, incubado y removido mediante 3 lavados manuales con PBST: anticuerpo monoclonal de ratón anti IgG1 de rata biotinilado incubado 2 h a 37 °C (diluido 1:2000; ABCAM, Cambridge, United Kingdom), estreptavidina-peroxidasa de rábano 1 h de incubación cubierto de la luz a 37°C (1:60000; ABCAM, Cambridge, United Kingdom) y ortofenilendiamina (OPD) cubierto de la luz a temperatura ambiente (tableta de 20 mg disuelta según indicaciones del fabricante ; Sigma, E.U.A.). Tras 20 min se paró la reacción con ácido sulfúrico 4 N, y la DO se midió a 490 nm en un espectrofotómetro de placa (iMark, Bio-Rad, E.U.A.). El nivel de IgG anti-OVA se determinó en relación con el índice positivo (Índice Positivo o IP: [media de DO + 2 desviaciones estándar de 10 muestras séricas de animales controles, sin sensibilizar]). Para ello el valor de absorbancia de cada muestra se dividió entre el valor del IP.

### **6.11. Anafilaxia Cutánea Pasiva**

Los títulos de IgE sérica anti-OVA se analizaron por anafilaxia cutánea pasiva (PCA, por sus siglas en inglés) (Jiménez *et al.*, 2012). Para esto, se rasuró el dorso de ratas Wistar macho de entre 300-400 g de peso corporal. A las 24 h se anestesiaron con éter y se les inyectó en el dorso vía intradérmica 50 µL de diluciones crecientes (1:2 a 1:128) de los sueros a analizar. Pasadas 24 h, se inyectó 50 µL de una solución de histamina (Sigma-Aldrich, Suiza) a una concentración de 0.04

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en ssf (control positivo) y 50  $\mu\text{L}$  de ssf (control de la reacción generada solo por la inyección). Inmediatamente por vía intravenosa (yugular) se inyectó el alérgeno en una solución de azul de Evans (2 mg de OVA + 34 mg de Azul de Evans/kg del animal al 3 % en ssf).

Luego de 30 min se sacrificó a las ratas por sobredosis de éter para la obtención de la piel del dorso y se midió el diámetro interno de cada una de las reacciones producidas por los sueros, histamina y ssf. El título de anticuerpos IgE anti-OVA en cada suero se expresó como la mayor dilución que causó una lesión mayor a 5 mm de diámetro (Dai *et al.*, 2004).

### **6.12. Ensayo de anafilaxia alimenticia**

La anafilaxia alimenticia se evaluó mediante el registro de los signos clínicos tras administración del reto final. A las 0 h y cada diez min durante la primera hora tras el reto, y a las 1.5, 2 y 24 h se midieron signos clínicos de anafilaxia alimenticia con base en la escala propuesta por Li y colaboradores (2000); donde: 0, no presenta manifestaciones; 1, el animal se rasca o frota alrededor de su nariz o cabeza; 2, el animal presenta edema en ojos o boca, piloerección, diarrea, menor actividad o taquipnea; 3, el animal presenta sibilancias, dificultad para respirar, cianosis en boca o cola; 4, el animal no presenta actividad pero presenta temblor o convulsión y 5, muerte del animal. Además, luego de evidenciarse que la diarrea era un indicador importante en nuestro modelo de alergia, para los animales de los grupos de tratamiento se incluyó la utilización de una escala que analiza los cambios en la apariencia de las evacuaciones: 0, sin cambios; 1, evacuación blanda pero formada; 2, blanda, no formada; 3, un episodio de diarrea líquida; 4, al menos 2 episodios de diarrea líquida (Dunker *et al.*, 2012).

### **6.13. Medición de temperatura rectal**

El registro de la temperatura corporal se hizo vía rectal con un termómetro digital CT-513W (Citizen, Japón) a las 0 h y cada diez min durante la primera hora tras el reto, y a las 1.5, 2 y 24 h.

### **6.14. Medición de presión arterial**

La medición de la presión arterial se llevó a cabo el día 40 del protocolo de provocación de alergia mediante la canulación de la arteria femoral izquierda en las ratas utilizando el sistema de registro Biopac AcqKnowledge 4 (MP150, BIOPAC Systems, Inc., E.U.A.).

Los animales se anestesiaron por vía intraperitoneal utilizando una mezcla de Ketamina-Xilacina (95 mg-5 mg/ kg de peso corporal), se rasuró la región inferior abdominal y se realizó una incisión diagonal de 3 cm en la línea inguinal, para localizar y disecar la arteria femoral izquierda. Se insertó un catéter en la arteria (22G x 850 mm), el cual se conectó al sistema de registro BiopacAcqKnowledge 4. Se registró la presión basal durante 1 min y durante los 60 min posteriores a la administración del reto con el alérgeno.

### **6.15. Determinación de extravasación intestinal mediante azul de Evans**

Para cuantificar la extravasación intestinal durante la estandarización del modelo de AA en los animales y evaluar la permeabilidad vascular, luego de 30 min del reto final con el alérgeno, se inyectó de forma sistémica (vía yugular) una solución de azul de Evans en ssf (20 mg/kg de peso corporal al 1.5 %), y pasados 30 min se sacrificó al animal por sobredosis de éter (Saldanha *et al.*, 2004). Se abrió el abdomen y se obtuvieron segmentos de 5 cm del duodeno, yeyuno proximal e

íleon de la rata, de la siguiente manera: se cortaban los 10 cm de intestino posteriores al píloro, los 5 primeros para el segmento de duodeno y los 5 siguientes para el segmento de yeyuno proximal; para el segmento de íleon se descartaban los 3 cm anteriores a la válvula ileocecal y se obtenían los siguientes 5 cm (Rao *et al.*, 1986; Saavedra *et al.*, 2005). Se lavaron con 1 mL de PBS (NaCl 137 mM; KCl 3 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.7 mM, pH7.4) para eliminar las heces fecales, y se continuó con 4 lavados con acetilcisteína (6 mM; 1 mL cada uno). Se sumergió cada muestra en 1 mL de NaOH (1 N) 37 °C durante 24 h, y al día siguiente se añadió a cada tubo 9 mL de la mezcla H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.6 N: acetona (5:13). Los tubos se agitaron vigorosamente unos segundos y centrifugaron a 110 x g por 15 min en centrífuga clínica (SOL-BAT, J-12, México). Se leyó la absorbancia de 1 mL del sobrenadante de cada muestra a 620 nm en espectrofotómetro SmartSpec Plus y este valor se interpoló en una curva patrón de azul de Evans (0.1-5 µg/mL, preparada en la mezcla NaOH, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, acetona).

Posteriormente y con la finalidad de cuantificar más exactamente la misma variable en los grupos de AA con o sin tratamiento (en los que las diferencias pueden ser más discretas) se inyectó de forma sistémica (vía yugular) una solución de azul de Evans en ssf (20 mg/kg de peso corporal al 1.5 %), luego de 5 min se administró el reto final con el alérgeno vía cánula gastro-esofágica y pasados 30 min se sacrificó al animal por sobredosis de éter (Muto *et al.*, 2014). Se abrió el abdomen y se obtuvieron segmentos de 5 cm del duodeno, yeyuno proximal e íleon de la rata, éstos se lavaron con 1 mL de PBS para eliminar las heces fecales, y se continuó con 4 lavados con acetilcisteína. Los segmentos se pesaron y sumergieron en 1 mL de formamida por 24 h a 50°C. Cada tubo se centrifugó a 100 x g durante 10 min (centrífuga eppendorf 5415 C, E.U.A.) y se leyó el sobrenadante en espectrofotómetro SmartSpec Plus a 620 nm y el valor se interpoló en una curva patrón de azul de Evans (0.1-30 µg/mL, preparada en formamida).

#### **6.16. Cuantificación de placas de Peyer**

En los mismos animales en que se realizaron los ensayos de extravasación intestinal anteriormente descritos y antes de fraccionar el intestino para su posterior procesamiento, se cuantificaron las placas de Peyer. Además de la cuantificación, se realizaron mediciones de ancho y largo de cada placa para el posterior cálculo del área por placa ( $A = \text{Radio mayor} \times \text{Radio menor} \times \pi$ ) y del área total de placas de Peyer por animal (Cervantes-García *et al.*, 2020).

#### **6.17. Cuantificación de niveles séricos de proteasa II de mastocitos**

La cuantificación de los niveles séricos de proteasa II de mastocitos (rMCP-II) se llevó a cabo mediante el empleo de un kit comercial (OKEH02490, Aviva Systems Biology, E.U.A.) basado en un ensayo ELISA tipo sándwich con 100 µL de suero por muestra siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **6.18. Cuantificación de niveles séricos de histamina**

La cuantificación de los niveles séricos de histamina se llevó a cabo mediante el empleo de un kit comercial (MBS732202, MyBiosource, E.U.A.) basado en un ensayo ELISA competitivo de fase sólida, con 100 µL de suero por muestra siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **6.19. Purificación de RNA y RT-PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR)**

Las muestras de intestino se obtuvieron 24 h posteriores al reto oral de los animales con el alérgeno en el día 40. El RNA total se aisló de un segmento de 1 cm de intestino delgado, 3 cm después de

la mitad exacta (yeyuno distal) utilizando un kit de extracción GeneJET RNA purification kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, E.U.A.). Una vez purificado el RNA se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) con la relación A260/280, utilizando muestras con valores mayores a 1.8 para la síntesis de ADN complementario con el kit Maxima First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific) en un termociclador (Applied Biosystems 2720, Foster City, CA, USA).

El ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real se estableció con Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific E.U.A.) en un sistema de PCR en tiempo real StepOne (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos utilizados para la cuantificación de la expresión del mRNA se enlistan en la tabla 5. Para la PCR en tiempo real se usaron 2  $\mu$ L del cDNA como template para la detección de  $\beta$ -actina, GATA3, T-bet (o Tbx21), ROR $\gamma$ t, FoxP3, Mcpt-II, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , interleucinas (IL)-1 $\beta$ , -5, -13, -17, -22, IgA, IgE, CXCL-1 (el equivalente a IL-8 en la rata) y MUC2. La cuantificación relativa se determinó con el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , normalizando con  $\beta$ -actina como gen "housekeeping" (Schmittgen & Livak, 2008).

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados.

Nombre	Secuencia	Número de Acceso
Fw-GATA3	AGAAGGCAGGGAGTGTGTGA	NM_133293.1
Rv-GATA3	TTAGCGTTCCTCCTCCAGAG	
Fw-FoxP3	CGGGAGAGTTTCTCAAGCAC	NM_001108250.1
Rv-FoxP3	CACAGGTGGAGCTTTTGTCA	
Fw-T-bet	TCCAAGTTCAACCAGCACCA	NM_001107043.1
Rv-T-bet	ATAAGCGGTTCCCTGGCATA	
Fw-ROR $\gamma$ t	GCAGCAACGGGAACAAGTAG	XM_006232926.3
Rv-ROR $\gamma$ t	GGGCTATACTCAAGGTGGCA	
Fw-IgA(Fc)	CGGAACTATGAATGTGACCT	AJ510151.1
Rv-IgA(Fc)	GACTAAGGAGGGTTTTGGAC	
Fw-IgE(Fc)	CGTCTGTCGGTTCTGATCTT	X00923.1
Rv-IgE(Fc)	GTCGCAGGATGAATGGAGTA	
Fw-McptII	ATTATCGGTGGTGTGGAGTC	NM_172044.1
Rv-McptII	GTGTGGATTCTCGCTTTCTC	
Fw-IFN- $\gamma$	GCCTAGAAAGTCTGAAGAAC	NM_138880.2
Rv-IFN- $\gamma$	GAGATAATCTGGCTCTCAAG	
Fw-TNF- $\alpha$	GCCTCAGCCTCTTCTCAT	NM_012675.3
Rv-TNF- $\alpha$	CGCTTGGTGGTTTGCTACGA	
Fw-IL-1 $\beta$	AAATCTCACAGCAGCATCTC	NM_031512.2
Rv-IL-1 $\beta$	ACTAGCAGGTCGTCATCATC	
Fw-IL-5	CAGTGGTGAAGAGACCTTG	NM_021834.1
Rv-IL-5	GTATGTCTAGCCCCGAAAG	
Fw-IL-13	ATCGAGGAGCTGAGCAACAT	NM_053828.1
Rv-IL-13	ATCCGAGGCCTTTTGGTTAC	
Fw-IL-17	CGTGAAGGTCAACCTGAAAG	NM_001106897.1
Rv-IL-17	TCTATCAGGGTCCTCATTGC	
Fw-IL-22	CTCTGCCCATCAACTCCCAA	NM_001191988.1
Rv-IL-22	TTGGCTTTGACTCCTCGGAA	
Fw-CXCL1	ATGGCGTCTGTCTGGTGAAC	NM_030845.1
Rv-CXCL1	ACGACCATCGATGAAACGCA	
Fw-MUC2	AGTGGTTGGTGAATGACCCG	XM_017590472.1
Rv-MUC2	CTGGGGATCCGGGTGGTATT	
Fw- $\beta$ -Actina	GTCGTACCACTGGCATTGTG	NM_031144.3
Rv- $\beta$ -Actina	GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA	

Fc, fragmento cristalizante

## 6.20. Estudio histopatológico de la mucosa intestinal

Del intestino delgado de los animales diseccionado a las 24 h del reto final con el alérgeno, se cortó un segmento de 3 cm a partir de la mitad exacta y hacia el yeyuno (yeyuno distal). Luego de fijar las muestras en formalina neutra 10% durante 5 días (10 ml por cada muestra de 1 cm<sup>2</sup>), se procedió a realizar un lavado con PBS para rehidratar los tejidos para posteriormente enjuagar con agua de grifo. Posterior a esto se manipularon las muestras por separado para deshidratarlas de nuevo y posteriormente poder incluirse en la matriz de parafina con el procesador de tejidos Leica TP1020 (Leica, Alemania).

Para esto, se pasaron por un baño de formol 10% (2h), uno de etanol 80%(1h), uno de etanol 96% (1 h) y 2 baños de etanol absoluto (1 h c/u). Se continuó con un baño en alcohol absoluto-xilol (1h) 2 de xilol (1 h c/u) para terminar con la inmersión en parafina (60 °C: 2h). Por último, se realizó la inclusión en parafina y la creación de los bloques de tejido embebidos listos para su posterior corte y procesamiento en laminillas.

Para este procedimiento, se realizaron cortes del bloque de 10 µm de grosor con microtomo semi-automático 2245/LEICA (LEICA, Alemania) y una vez llegado al inicio de tejido se realizaron cortes de 5 µm y se montaron en laminillas de vidrio adhesivas (Klinipath, Holanda). Antes de proceder a la tinción, las laminillas de desparafinizaron en xileno (2 baños, 3 min c/u), rehidratando con etanol al 100% (2 baños, 2 min c/u), agua de grifo (1 baño: 10 s), agua destilada (1 baño: 1 min) y luego se siguió el protocolo de tinción específico descrito a continuación. Para la tinción de hematoxilina-eosina-safranina (HES) se tiñeron con hematoxilina (Diapath, Martinengo, Italia), posteriormente se lavaron con agua destilada (1 baño: 25 s), agua de grifo (15 s) para reforzar la primera tinción con agente azulante (Diapath, Italia) para cambiar la coloración parda o marrón a un tono azulado y poder finalizar la tinción con eosina mejorando el contraste entre las estructuras. luego de lo cual se realizó un lavado en agua de grifo (11 s) y otro en agua destilada (2 min). Se procedió a teñir con eosina (RAL diagnostic, Francia) por 30 s y se deshidrataron las laminillas utilizando un baño de: etanol 95% (15 s), etanol 100% (30 s) y se repitió el baño de esta última solución por 45 s más. Por último, se realizó una tinción de contraste con safranina (RAL diagnostic, Francia) por 2 min para evidenciar el tejido conjuntivo y hacer un mejor análisis morfológico, y luego se realizaron lavados en etanol 100% (2 baños: 30 s c/u). Para finalizar, se realizó la clarificación con xileno con 2 baños, uno de 30 s y uno de 1 min. Las laminillas se montaron con la ayuda de HistoRAL (RAL diagnostic, Francia) y posteriormente se colocó el cubre-objetos utilizando el equipo LEICA CV5030 (LEICA, Alemania).

Para la tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS) las laminillas se sumergieron en ácido periódico (Diapath, Martinengo, Italia) durante 5 minutos, para luego lavar en agua de grifo (20 s) y en agua destilada (2 min). Se procedió a teñir con el reactivo de Schiff (Diapath, Martinengo, Italia) durante 15 min y se repitieron los lavados mencionados anteriormente por 5 min para posteriormente teñir en hematoxilina de Mayer (Diapath, Martinengo, Italia) durante 1 min y lavar en agua de grifo durante 5 min. Por último, se procedió a sumergir en etanol 100% (2 baños: 30 s c/u). Para finalizar, se realizó la clarificación con xileno (2 baños, uno de 30 s y uno de 1 min) y se procedió a montar las laminillas. Ambas tinciones se realizaron en el autómata de tinciones MYREVA SS30 (Microm, Microtech, Francia) y luego de dejar secar las laminillas en refrigeración a 4 °C durante 48 h, se escanearon en el Panoramic SCAN II (plataforma @BRIDGE, INRAE, Francia).

El análisis morfométrico se realizó con la aplicación Case Viewer 3D Histech versión 2.3 del mismo escáner. La tinción de HES se utilizó para el análisis morfométrico inicial y la identificación de

eosinófilos y la de PAS para la identificación de células caliciformes. Para evaluar la altura de las vellosidades intestinales se eligieron 10 vellosidades por corte (por triplicado), midiéndose a partir de la cripta hasta el ápice de la vellosidad con el objetivo 20x. Con el mismo objetivo, se realizó la medición de la profundidad de 10 criptas, y el espesor de la muscular circular en 10 sitios aleatorios de toda la circunferencia.

Para la cuantificación de eosinófilos por campo se marcaron 20 campos de  $5000 \mu\text{m}^2$  en imagen enfocada con el objetivo anteriormente mencionado (20x) por triplicado en distintos sitios cercanos a la base de las vellosidades (60 campos/animal). El análisis se llevó a cabo por grupo de tratamiento. Además, se analizaron diferentes segmentos seleccionados aleatoriamente en cada muestra como áreas de interés para contar las células caliciformes (medidas por campo de  $1 \text{ mm}^2$  en imagen desenfocada en 3 cortes diferentes por animal). Para todos los análisis, se utilizaron técnicas de enmascaramiento y conteo en ciego con el fin de evitar el sesgo y obtener resultados más relevantes.

### **6.21. Análisis estadístico**

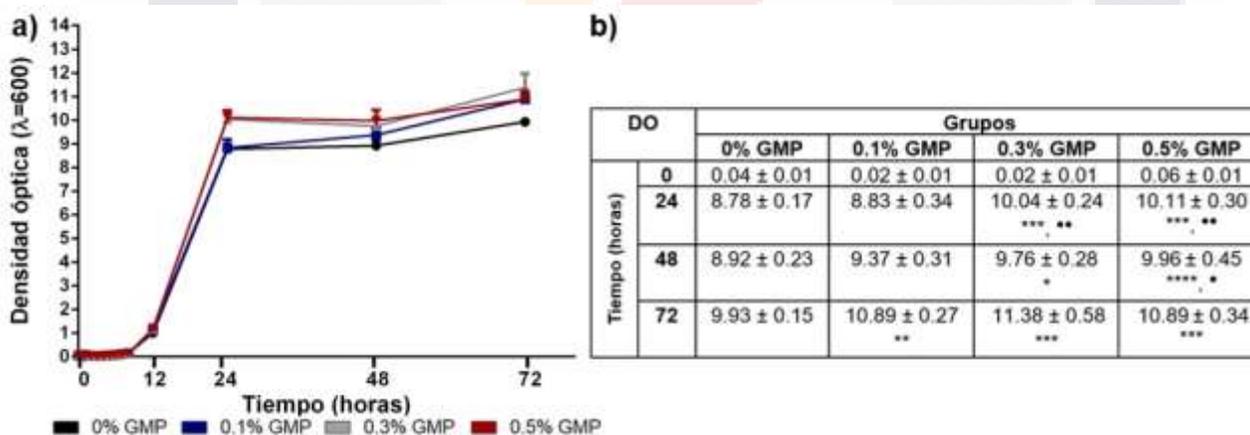
Para los datos que mostraron una distribución normal, se presentaron como la media de los valores  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) y el análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ANOVA de una vía y análisis *post-hoc* multicomparativo de Bonferroni para la comparación de varios grupos entre sí y ANOVA de dos vías y análisis *post-hoc* de Holm-Sidak multicomparativo para los análisis de biomasa, pH, acidez del LGG, así como para la temperatura (en la caracterización del modelo) y los valores de IgE e IgG1-anti-OVA (tanto en la caracterización como en el tratamiento se utilizó el modelo mixto de ANOVA). Para evaluar las diferencias entre los grupos en el puntaje de signos de anafilaxia alimenticia, en el puntaje de diarrea y en los datos de registro de presión arterial se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis con *post-hoc* de Dunn y los valores de presentaron de manera individual y con la mediana de cada grupo. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p < 0.05$ . Se especifica en cada figura la prueba estadística, el análisis *post-hoc* utilizado y el nivel de significancia.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Análisis del crecimiento *in vitro* del LGG con diferentes dosis de GMP

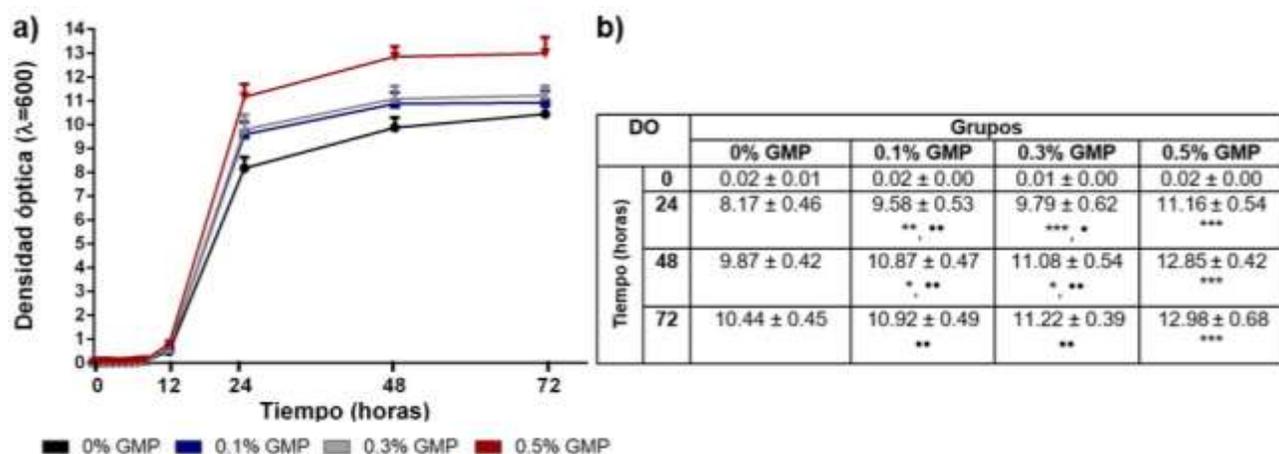
Para analizar el crecimiento bacteriano *in vitro* en presencia o no de GMP, se cuantificó la biomasa de LGG en el medio, registrando la  $DO_{600}$  ante la presencia de 0, 0.1, 0.3 y 0.5 % de GMP bajo condiciones de aerobiosis y anaerobiosis. Así mismo, se analizó el metabolismo indirecto del LGG mediante determinación del pH del medio en el que se creció el lactobacilo. Además, por existir cambios significativos en éste en condiciones anaerobias, se realizó únicamente en estas condiciones de experimentación un segundo análisis del metabolismo indirecto mediante la titulación del medio, técnica de mayor sensibilidad. Para ésta, se determinó el porcentaje de acidez del medio en función de los gramos de ácido láctico de las muestras.

En condiciones aerobias, el cultivo de LGG (figura 15) sin GMP incrementó su biomasa a partir de las 8 h de inoculación, siendo más evidente a las 12 h, seguido de un aumento significativo en la  $DO_{600}$  a partir de las 24 h y que se mantuvo constante a las 48 h y 72 h. La biomasa bacteriana con 0.3 y 0.5% de GMP incrementó a las 24 h 1.1 veces ( $p < 0.0001$ ) en comparación con la condición sin GMP y con la condición 0.1% GMP ( $p < 0.0001$ ). A las 48 h, la condición 0.3% GMP ( $p < 0.01$ ) tuvo 1.1 veces más biomasa que la que no tenía adición del péptido al igual que la condición 0.5% GMP ( $p < 0.0001$ ), aunque este último además tuvo 10% mayor biomasa que la condición 0.1 GMP. Por último, a las 72 h los microorganismos sometidos a los tres diferentes tratamientos tuvieron un incremento del 10% de la biomasa al comparar con las bacterias en condiciones basales (0.1% GMP y 0.3% GMP:  $p < 0.001$ , 0.5% GMP:  $p < 0.0001$ ). En la figura 15 se muestran las cifras exactas, así como los incrementos en el tiempo por concentración del péptido.



**Figura 15. Cambios temporales en la biomasa de LGG en condiciones aerobias en ausencia o presencia de GMP.** a) Representación gráfica b) Análisis estadístico de los datos, mostrando aquellos que presentan cambios significativos.  $n = 9$ , 3 ensayos por triplicado; \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  vs 0% GMP en un mismo tiempo, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.0001$  vs 0.1% GMP en un mismo tiempo. ANOVA de dos vías, *post-hoc* Holm-Sidak's.

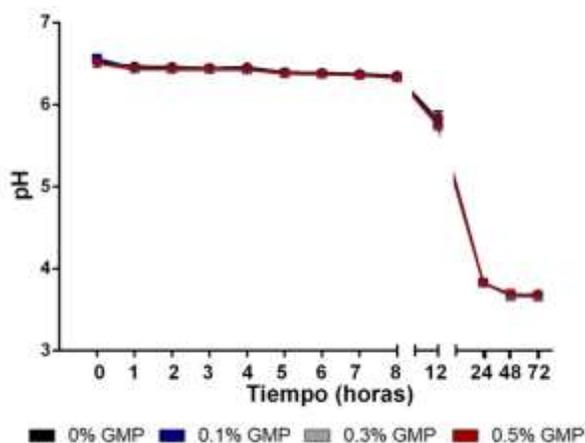
Por otro lado, bajo condiciones anaerobias y mediante el registro de la  $DO_{600}$  (figura 16) se observaron aumentos en la biomasa bacteriana en todos los tratamientos con GMP a lo largo del tiempo. En las bacterias sin GMP se detectaron cambios de las 8 a las 72 h comparando con el inicio del ensayo (0h).



**Figura 16. Cambios temporales en la biomasa de LGG en condiciones anaerobias en ausencia o presencia de GMP.** a) Representación gráfica b) Análisis estadístico de los datos, mostrando aquellos que presentan cambios significativos.  $n=9$ , 3 ensayos por triplicado; \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  vs 0% GMP en un mismo tiempo, \* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.0001$  vs 0.1% GMP en un mismo tiempo. ANOVA de dos vías, *post-hoc* Holm-Sidak's.

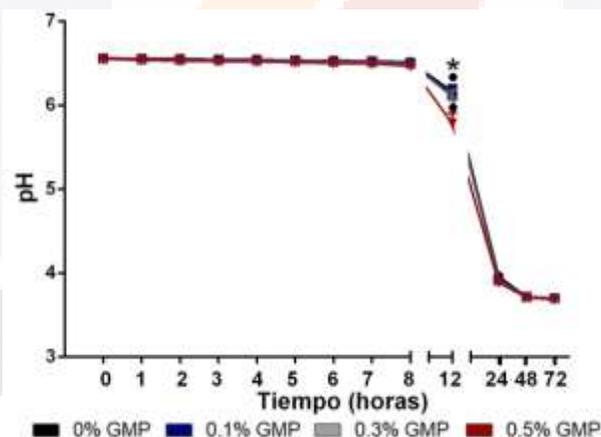
Como se aprecia en la figura 16, la exposición con 0.1% y 0.3% de GMP incrementó la generación de biomasa 1.2 veces a partir de las 24 h ( $p < 0.001$  y  $p < 0.0001$ , respectivamente), y la condición de 0.5% de GMP la incrementó 1.4 veces ( $p < 0.0001$ ) en comparación con los microorganismos sin GMP. En este tiempo, la concentración más alta utilizada de GMP también tuvo biomasa de LGG 1.1 veces ( $p < 0.001$ ) mayor que la de 0.1% GMP y 1.2 veces mayor ( $p < 0.001$ ) que la de 0.3% GMP. A las 48 h el incremento en la biomasa fue de 1.1 veces para las condiciones 0.1% y 0.3% ( $p < 0.01$ ) al comparar contra el cultivo bacteriano sin GMP, mientras que la de 0.5% GMP aumentó esta variable 1.3 veces ( $p < 0.0001$ ). De nuevo, el incremento entre esta condición y las de 0.1% y 0.3% GMP fué 1.2 veces mayor ( $p < 0.0001$ ). Por último, para las 72 h la única condición que logró el incremento de la biomasa bacteriana 1.2 veces al comparar contra el grupo sin GMP fué la de 0.5% GMP ( $p < 0.0001$ ), teniendo incrementos de 1.2 veces y 1.1 veces ( $p < 0.0001$ ) respectivamente, al comparar contra las condiciones 0.1% y 0.3% GMP.

El aumento en la cantidad de bacterias se asocia con la disminución en el pH del medio (Shah, 2000) hasta un mínimo de 3 donde se sabe que el crecimiento de esta bacteria se inhibe (Goldin, 1993). El registro del pH en condiciones aerobias (figura 17) evidenció la misma tendencia que para los datos de  $DO_{600}$  (aerobios), pero a la inversa. Como se aprecia, los valores de pH fueron constantes hasta las 8 h ( $6.35 \pm 0.01$ ), con una ligera disminución a las 12 h ( $5.82 \pm 0.10$ ), seguido de un descenso a las 24 h ( $3.84 \pm 0.01$ ), pH que se mantuvo a las 48 h ( $3.67 \pm 0.02$ ) y 72 h ( $3.69 \pm 0.03$ ) de evaluación. El pH en el medio de las bacterias expuestas a GMP en las diferentes concentraciones no sufrió modificaciones significativas.



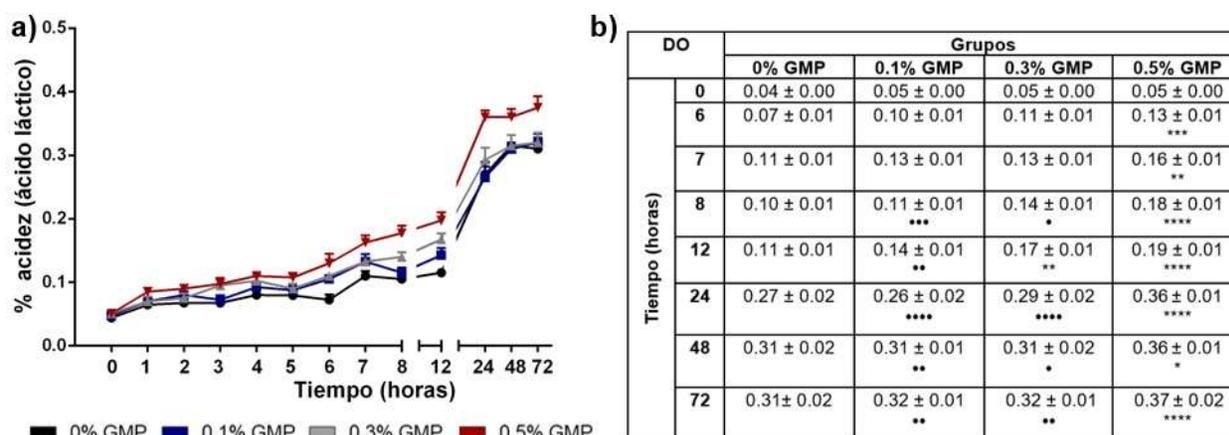
**Figura 17. Cambios temporales en el pH de los medios de LGG en condiciones aerobias en ausencia o presencia de GMP.** Representación gráfica.  $n=9$ , 3 ensayos por triplicado; NS. ANOVA de dos vías, *post-hoc* Holm-Sidak's.

Bajo condiciones anaerobias (figura 18) el pH del medio bacteriano fue constante las primeras 8 h ( $6.51 \pm 0.02$ ), con una ligera disminución a las 12 h ( $6.16 \pm 0.08$ ), la cual se acentuó a las 24 h ( $3.96 \pm 0.01$ ), y prácticamente se mantuvo constante a las 48 h ( $3.72 \pm 0.01$ ) y 72 h ( $3.70 \pm 0.01$ ). A las 12 h existió una disminución de 6.18 % en el pH de los medios adicionados con 0.5% GMP ( $5.78 \pm 0.13$  vs  $6.16 \pm 0.08$ ;  $p < 0.0001$ ) al comparar contra el grupo sin GMP. Además, en este momento existió también una disminución de 5.65% al comparar la concentración de 0.5% del péptido con la de 0.1% ( $6.13 \pm 0.09$ ;  $p < 0.0001$ ) y una de 5.32% al comparar contra la de 0.3% ( $6.11 \pm 0.08$ ;  $p < 0.0001$ ). A partir de ese tiempo las diferencias entre las condiciones desaparecieron.



**Figura 18. Cambios temporales en el pH de los medios de LGG en condiciones aerobias en ausencia o presencia de GMP.** Representación gráfica.  $n=9$ , 3 ensayos por triplicado; \* $p < 0.0001$  vs 0% GMP en un mismo tiempo, \* $p < 0.0001$ , vs 0.5% GMP en un mismo tiempo. ANOVA de dos vías, *post-hoc* Holm-Sidak's.

Por existir cambios significativos en el pH del medio de crecimiento de LGG en condiciones anaerobias, se decidió para esta condición un segundo análisis del metabolismo indirecto de la bacteria, evaluando el porcentaje de ácidos titulables del medio expresado como porcentaje de ácido láctico. Como se observa en la figura 19, se apreció una tendencia creciente continua de estos valores, inversa a los datos del pH y similar al análisis de la  $DO_{600}$ . Durante las primeras 6 h el porcentaje de acidez de los medios sin el péptido tuvo un valor promedio de fue aproximadamente de 0.068, a partir de ese momento tuvo incrementos continuos hasta las 48 h.



**Figura 19. Porcentaje de acidez expresado como ácido láctico de los medios de LGG en condiciones anaerobias en ausencia o presencia de GMP. a)** Representación gráfica **b)** Análisis estadístico de los datos, mostrando aquellos que presentan cambios significativos.  $n=9$ , 3 ensayos por triplicado; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs 0% GMP en un mismo tiempo, \* $p < 0.05$ , \* $p < 0.01$ , \* $p < 0.001$ , \* $p < 0.0001$ , 0.5% vs GMP en un mismo tiempo. ANOVA de dos vías, *post-hoc* Holm-Sidak's.

Las únicas condiciones que modificaron la acidez del medio fueron las de 0.3 y 0.5% de GMP. A las 6 h existió un incremento de 1.8 veces entre 0.5% GMP y el medio sin GMP ( $p < 0.001$ ), misma que a las 12 h fué de 1.7 veces ( $p < 0.0001$ ) y para las 24 h tuvo una de 1.3 veces ( $p < 0.0001$ ), presentando una diferencia de 1.1 veces a las 48 h ( $p < 0.05$ ) para terminar a las 72 h con una diferencia de 1.2 veces ( $p < 0.0001$ ) con la condición sin GMP. Al comparar con el medio sin GMP, la adición de 0.3% del péptido, presentó un incremento a las 12 h siendo éste de 1.5 veces ( $p < 0.01$ ) y desapareciendo las diferencias en el resto de los tiempos evaluados.

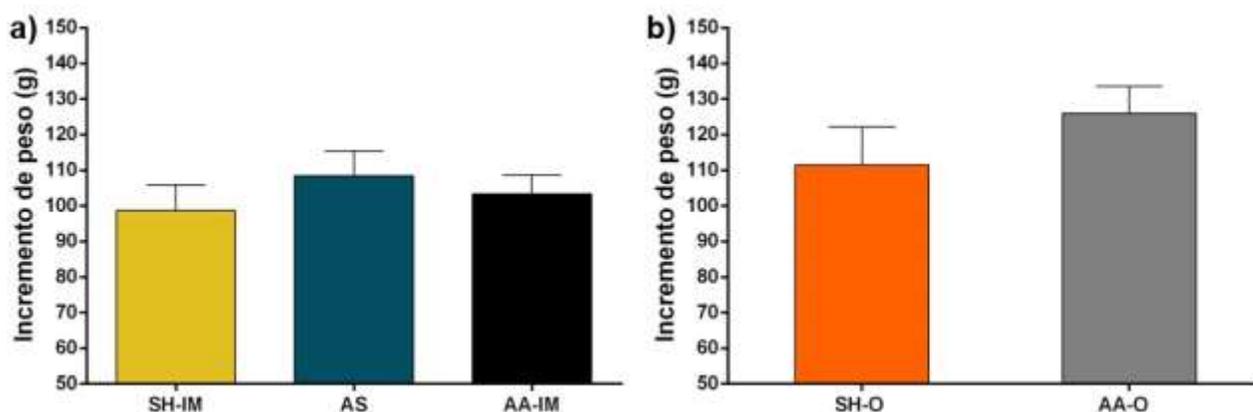
Se evaluaron igualmente las diferencias entre las condiciones adicionadas con GMP, teniendo la condición de 0.5% incrementos importantes a las 8, 24 y 72 h al comparar contra 0.1% y 0.3% de GMP. A las 8h, los medios con 0.5% de GMP tuvieron 1.5 veces mayor acidez que los adicionados con 0.1% ( $p < 0.001$ ) y 1.3 veces mayor que los adicionados con 0.3% ( $p < 0.05$ ). Para las 24 h, tuvieron 1.4 veces mayor acidez que los de 0.1% ( $p < 0.0001$ ) y 1.2 veces mayor que los de 0.3% ( $p < 0.0001$ ) y para las 72 h 1.2 veces ( $p < 0.01$ ) mayor acidez que ambas condiciones.

Conjuntamente, los resultados de la cuantificación de biomasa y de titulación de porcentaje de acidez, muestran un efecto prebiótico *in vitro* del GMP sobre LGG en condiciones anaerobias.

### 7.3. Desarrollo y caracterización del modelo de AA en rata Wistar.

#### 7.3.1. Análisis del incremento de peso corporal en diferentes modelos de AA

Para valorar el estado general de los animales de cada grupo y detectar variaciones a nivel del consumo de alimento o del metabolismo básico de nutrimentos, así como cambios en el peso generado por la ingesta de la OVA, se cuantificó el incremento de peso corporal en los animales del día 0 al día 40 de la inducción del modelo de AA. Como se muestra en la figura 20a, el consumo de OVA en el grupo AA-IM ( $103.40 \pm 5.27$  g) no generó un incremento de peso en los animales distinto al de los grupos AS ( $108.40 \pm 7.01$  g) y SH-IM,  $98.65 \pm 7.25$  g. Así mismo, no existieron diferencias significativas entre los incrementos de peso corporal de los animales del grupo AA-O ( $125.9 \pm 7.66$  g) en comparación con su grupo control SH-O ( $111.5 \pm 10.65$  g) (figura 20b).



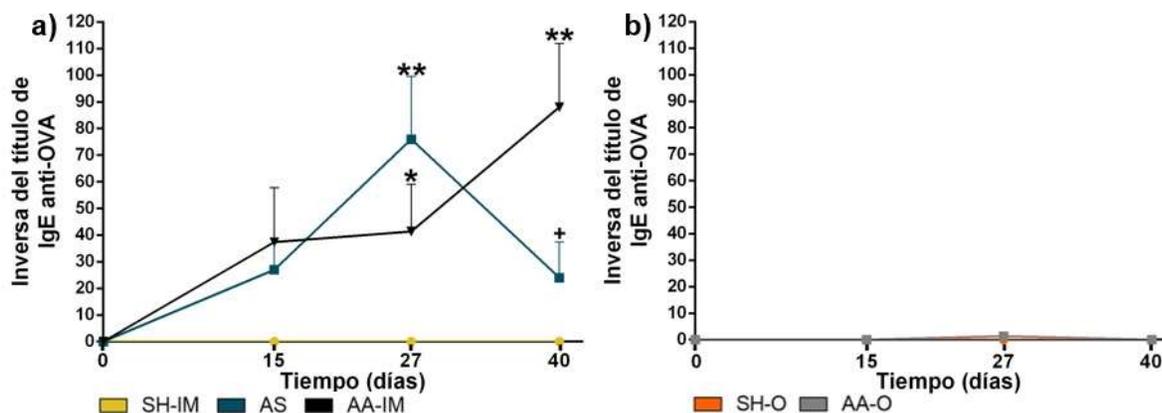
**Figura 20. Incremento de peso corporal a los 40 días de iniciado el modelo de inducción de AA en los diferentes grupos analizados.** n= 13. a) Modelo IM y su correspondiente SH-IM. NS, ANOVA de una vía, *post-hoc* de Bonferroni; b) Modelo O y su correspondiente SH-O. NS, t de student.

### 7.3.2. Análisis de los títulos de IgE anti-OVA en suero en los modelos de AA

Los niveles de IgE alérgeno-específica en las muestras de suero de los diferentes grupos experimentales se tituló mediante PCA, en sueros obtenidos los días 0, 15, 27 y 40 de los protocolos.

Como se observa en la figura 21a, b, los resultados de la prueba PCA mostraron que ningún animal de los grupos SH a lo largo del tiempo, ni los animales de los diferentes modelos en el día 0 mostraron IgEs anti-OVA en suero. En los animales AA-IM (figura 21a) se observó un incremento en los títulos de IgE anti-OVA en suero en el día 15 ( $37.33 \pm 20.39$ ). El título se incrementó ligeramente para el día 27 ( $41.33 \pm 17.82$ ) y alcanzó su pico máximo el día 40 ( $88.00 \pm 24.00$ ) siendo 41.3 y 88.0 veces mayor que en el grupo SH-IM en los días 27 ( $p < 0.05$ ) y 40 ( $p < 0.001$ ). Por su parte, los animales del grupo de sensibilización sistémica (AS) también tuvieron un incremento en los niveles de IgE para el día 15, dicho incremento continuó el día 27, donde alcanzó su pico máximo ( $76.00 \pm 23.52$ ); mismo que descendió en un 31.57% el día 40 ( $24.00 \pm 13.46$ ). Al comparar con el grupo SH-IM, los valores de IgE alérgeno específica fueron 76 veces mayores en el día 27 ( $p < 0.001$ ), además al día 40, el valor de la inmunoglobulina en el grupo AA-IM fue 3.6 veces mayor que en el AS ( $p < 0.01$ ).

Por otro lado, no se observó un incremento significativo en los títulos séricos de IgE anti-OVA en los animales sensibilizados vía oral (AA-O) en los días 15, 27 y 40 con respecto al día 0 ni con respecto al de los animales del grupo SH-O en los mismos tiempos (figura 21b).



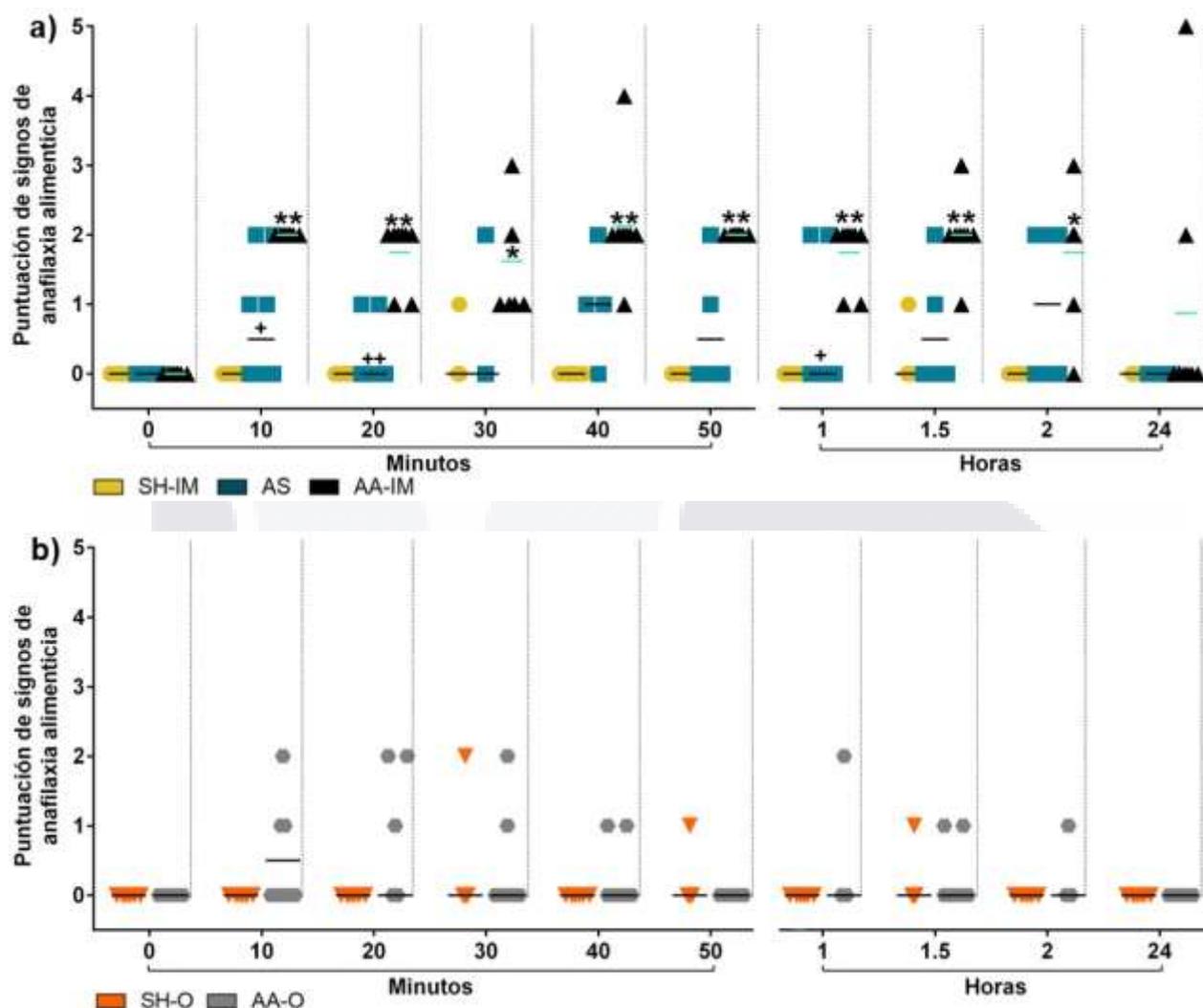
**Figura 21. Inversa de títulos de IgE alérgeno específica en sueros de animales de los diferentes grupos analizados.** n= 6. a) Modelo IM y su correspondiente SH-IM. \*p < 0.05, \*\*p < 0.001 vs SH-IM en un mismo tiempo, +p < 0.01 vs AA-IM en un mismo tiempo, ANOVA de dos vías, *post-hoc* de Holm-Sidak; b) Modelo O y su correspondiente SH-O. NS, Mann-Whitney.

### 7.3.3. Análisis de los signos clínicos de anafilaxia alimenticia en los modelos de AA

Para valorar la aparición de anafilaxia en los animales tras la dosis final con el alérgeno (OVA), se valoraron los signos clínicos de AA (figura 22) asignándole una puntuación a los signos con base a la escala de Li y colaboradores (2000), como se indica en la metodología. A la par se cuantificaron la temperatura rectal a las 0 h y cada diez minutos durante la primera hora tras el reto, y a las 1.5, 2 y 24 h. Así mismo, la presión arterial de los animales se valoró antes de la administración del alérgeno y cada diez minutos durante la primera hora tras el reto.

Es importante mencionar que algunos animales del grupo AA-IM presentaron signos clínicos tangibles que mostraron una reacción a la ingesta de la OVA a partir de las primeras dosis orales con el alérgeno, aun cuando esto no se cuantificó como una variable del estudio si no hasta el reto final. En esta fase, los animales SHAM no presentaron signos tras las dosis orales del vehículo (bicarbonato de sodio 0.2 M).

Los animales SH-IM no desarrollaron signos de reacción anafiláctica alimenticia luego del reto final con el alérgeno. Un animal del grupo mostró conducta de rascado a los 30 min y otro a las 1.5 h, en eventos aislados y de menor frecuencia y duración que los de los animales AA; sin embargo, el grupo no superó el valor promedio de 0.5 en ninguno de los tiempos evaluados (figura 22a).



**Figura 22. Evaluación del puntaje en la reacción de anafilaxia alimenticia en los diferentes grupos de los modelos.** n= 8. a) Modelo IM y su correspondiente SH-IM. \*p < 0.01, \*\*p < 0.001 vs SH-IM en un mismo tiempo, +p < 0.05, ++p < 0.01 vs AA-IM en un mismo tiempo, prueba de Kruskal-Wallis, *post-hoc* de Dunn; b) Modelo O y su correspondiente SH-O. NS, prueba de Mann-Whitney.

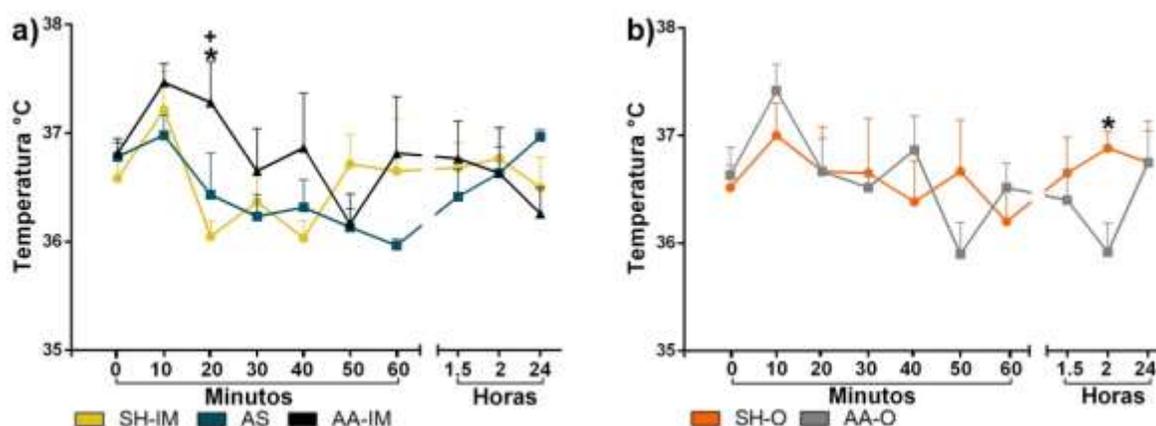
Por otro lado, en la figura 22a también se puede observar que los animales del grupo AA-IM presentaron una reacción de anafilaxia alimenticia intensa, alcanzando una puntuación de signos mayor a 2 tras el reto final v.o. con OVA. Así, al comparar con su grupo SH-IM, los animales incrementaron el puntaje asignado en la escala de anafilaxia alimenticia en todos los tiempos evaluados, siendo los mayores incrementos los de los 10 min ( $2.00 \pm 0$  vs 0 puntos;  $p < 0.001$ ), a los 40 min ( $2.12 \pm 0.29$  vs 0 vs 0 puntos;  $p < 0.001$ ) y 1.5 h ( $2 \pm 0.18$  vs  $0.12 \pm 0.12$  puntos,  $p < 0.001$ ). Los signos más comunes que mostraron los animales fueron diarrea, piloerección y conducta de rascado constante y repetitiva.

En contraste, los animales del grupo AS no desarrollaron una reacción anafiláctica significativa tras la ingesta del alérgeno. En algunos de los tiempos analizados los animales mostraron signos de conducta de rascado y piloerección, con valores promedio de puntaje en la escala menor a 1, sin diferencias significativas al comparar contra el grupo SH-IM en todos los tiempos. Es importante destacar que a las 24 h tras el reto alérgico los animales no presentaron ningún signo de anafilaxia, regresando al valor inicial en la escala de 0. Al hacer comparaciones entre los dos grupos sensibilizados (AA-IM y AS), se obtuvo a los 10 min un incremento en el puntaje de los animales del

grupo AA-IM respecto al AS ( $2.00 \pm 0$  vs  $0.75 \pm 0.31$  puntos;  $p < 0.01$ ). Este incremento se volvió a observar a los 20 min, siendo de  $1.75 \pm 0.16$  vs  $0.25 \pm 0.16$  puntos, ( $p < 0.001$ ) y de  $1.75 \pm 0.16$  vs  $0.5 \pm 0.33$  puntos ( $p < 0.01$ ) a la hora. En los tiempos posteriores, las diferencias entre estos grupos disminuyeron.

El grupo AA-O (figura 22b), no reflejó diferencias significativas en ninguno de los tiempos al comparar con las puntuaciones del grupo SH-O, siendo los valores de ambos grupos en la puntuación de signos de anafilaxia alimenticia muy cercanos al 0.

Al evaluar la temperatura rectal de las ratas tras el reto final con el alérgeno (figura 23) se observó que los animales presentaron un rango de temperatura de 35.09 a 37.4 °C durante el ensayo. Así mismo, los animales del grupo AA-IM registraron las temperaturas más altas desde el inicio y durante los 20 min posteriores al reto, observándose un incremento de 1° al comparar el grupo SH-IM en este momento ( $37.28 \pm 0.37$  vs  $36.05 \pm 0.14$ ;  $p < 0.05$ ) teniendo la misma diferencia significativa al analizar contra el grupo AS ( $36.43 \pm 0.38$ ;  $p < 0.05$ ) (figura 23a). El único cambio significativo en la temperatura rectal fue en los animales del grupo AA-IM respecto a su control a los 20 min tras el reto oral con OVA, siendo la temperatura 1 grado más alta en el primero ( $37.28 \pm 0.37$  °C vs  $36.05 \pm 0.14$ °C;  $p < 0.05$ ).

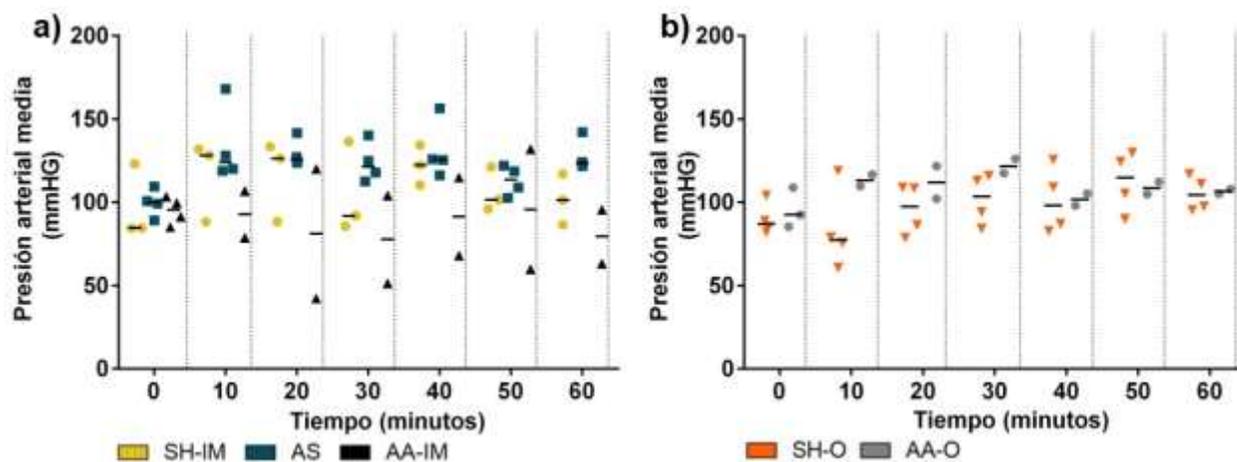


**Figura 23. Temperatura rectal de los animales antes y después del reto final, en los diferentes grupos analizados.** n= 6. a) Modelo IM y su correspondiente SH-IM. \* $p < 0.05$  vs SH-IM en un mismo tiempo, + $p < 0.05$  vs AA-IM en un mismo tiempo, ANOVA de dos vías, *post-hoc* de Bonferroni y Dunnet; b) Modelo O y su correspondiente SH-O. \* $p < 0.05$  vs SH-O en un mismo tiempo, t de student.

En cuanto al modelo de sensibilización oral (figura 23b) se observaron diferencias significativas con el grupo SH-O únicamente a las 2 h del reto final con el alérgeno, constatándose una disminución en la temperatura del grupo AA-O del 2.4 % ( $35.90 \pm 0.27$  °C vs  $36.88 \pm 0.15$  °C;  $p < 0.05$ ). El rango de temperatura para los animales de estos grupos también fluctuó entre 35.9 y 37.4 °C sin existir diferencias entre los distintos tiempos y la hora inicial.

Como puede observarse en la figura 24a, la presión media de los animales del modelo de sensibilización intramuscular antes del reto fue semejante (SH-IM,  $97.34 \pm 12.84$  mmHg; AA-IM,  $107.70 \pm 7.50$  mmHg; AS,  $99.57 \pm 4.14$  mmHg). Tras el reto alérgico la presión arterial media, en los animales SH-IM, AS y AA-IM, permaneció constante a lo largo del protocolo, teniendo valores promedio de 111.98 mmHg, 129.71 mmHg y 86.35 mmHg, respectivamente, posterior al reto con el alérgeno. El grupo AA-IM fue el único que presentó una tendencia a la disminución al comparar contra su grupo SHAM. En el caso de los animales del modelo de sensibilización oral (figura 24b),

la presión antes del reto fue de  $90.11 \pm 4.87$  mmHg para los animales SH-O y  $94.45 \pm 5.05$  mmHg para los animales AA-O. Los valores promedio luego de la administración del reto oral fueron de 99.93 mmHg y de 114.61 mmHg, respectivamente, sin cambios significativos entre ellos a ninguno de los tiempos evaluados.



**Figura 24. Determinación de presión arterial media antes y después del reto final, en los diferentes grupos analizados.** n SH-IM= 3, n AS= 4, n AA-IM= 2. a) Modelo IM y su correspondiente SH-IM. NS, Kruskal-Wallis *post-hoc* Dunn's. n SH-O= 3, n AA-O= 2. b) Modelo O y su correspondiente SH-O. NS, Mann-Whitney.

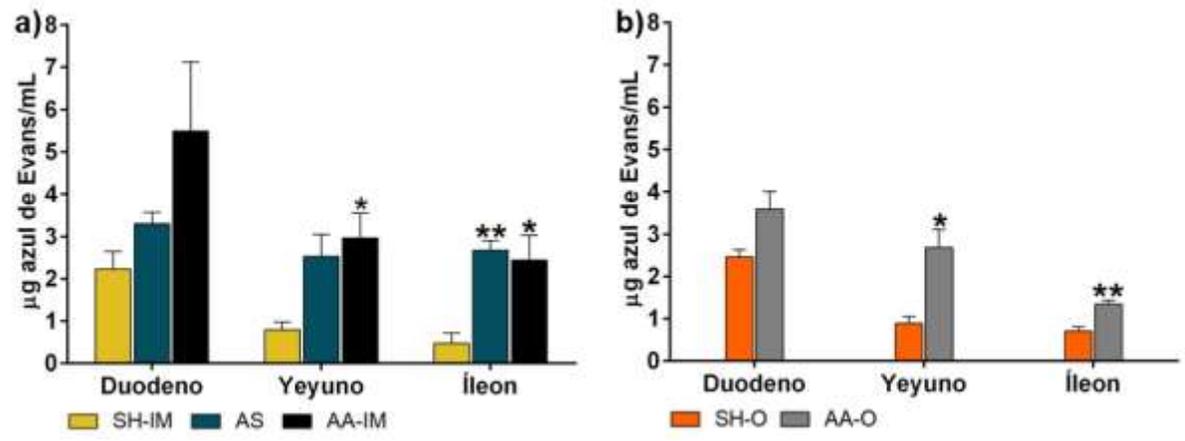
#### 7.3.4. Cambios en la permeabilidad vascular de los modelos de AA

La existencia de reacción inflamatoria en el tracto GI de animales alérgicos a los 30 min de la administración oral de la OVA, se comprobó realizando ensayos de análisis de permeabilidad vascular en distintos segmentos del intestino de las ratas de todos los grupos experimentales.

Como se muestra en la figura 25, la extravasación que indujo la OVA en los animales SHAM fue más intensa en el duodeno que en el yeyuno e íleon, y los valores de concentración de colorante extravasado fue semejante entre ambos grupos (SH-IM y SH-O).

En la figura 25a se representa la cantidad de colorante que extravasan los animales AA-IM, AS y SH-IM en tres diferentes segmentos del intestino delgado en respuesta al alérgeno. La permeabilidad vascular en los animales del grupo AA-IM y AS fue de mayor magnitud a nivel del duodeno (más que en yeyuno e íleon); sin embargo, no fue significativamente mayor que la del grupo SHAM en este mismo segmento intestinal. Además, se observaron incrementos en la extravasación del colorante en las porciones de yeyuno e íleon en los animales de los grupos AA-IM y AS, siendo estos incrementos significativos con respecto al grupo SH-IM solamente en el grupo AA-IM en ambos segmentos intestinales. Así, este incremento fue de 3.7 veces en el grupo AA-IM respecto al grupo SH-IM en la porción de yeyuno ( $2.96 \pm 0.59$   $\mu\text{g/mL}$  vs  $0.79 \pm 0.18$   $\mu\text{g/mL}$ ;  $p < 0.05$ ) mientras que, en la porción del íleon, se observó un incremento de 5.2 veces entre estos mismos grupos ( $2.44 \pm 0.58$   $\mu\text{g/mL}$  vs  $0.47 \pm 0.23$   $\mu\text{g/mL}$ ;  $p < 0.05$ ).

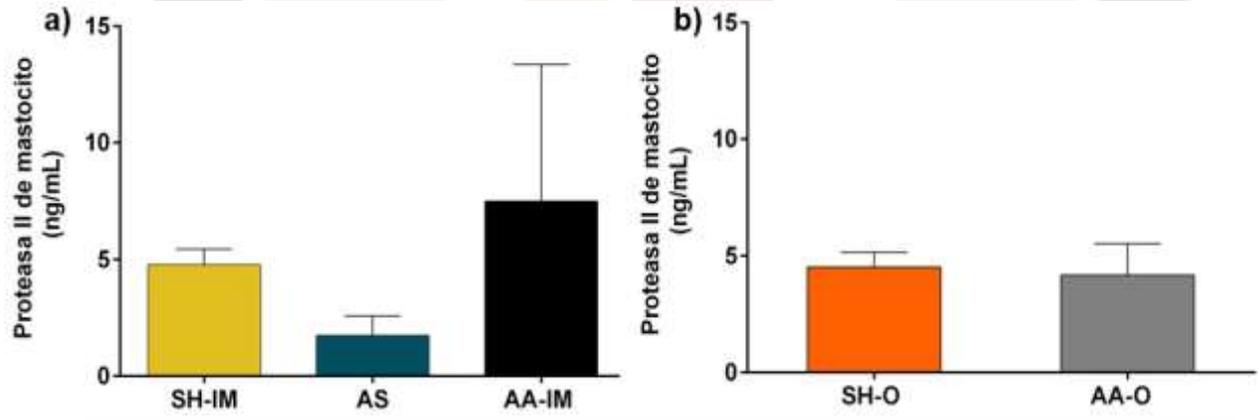
Así mismo, se observaron incrementos en la extravasación intestinal del grupo AA-O (figura 25b) de 3 veces ( $2.67 \pm 0.43$   $\mu\text{g/mL}$  vs  $0.88 \pm 0.16$   $\mu\text{g/mL}$ ;  $p < 0.05$ ) en la porción del yeyuno y cerca del doble en la porción de íleon ( $1.34 \pm 0.09$   $\mu\text{g/mL}$  vs  $0.71 \pm 0.09$   $\mu\text{g/mL}$ ;  $p < 0.01$ ) al compararse con los respectivos segmentos intestinales del grupo SH-O.



**Figura 25. Extravasación de azul de Evans por segmento intestinal en los diferentes grupos analizados.** n= 4. a) Modelo IM y su correspondiente SH-IM. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs SH-IM, ANOVA de una vía, *post-hoc* de Bonferroni; b) Modelo O y su correspondiente SH-O. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs SH-O, t de student.

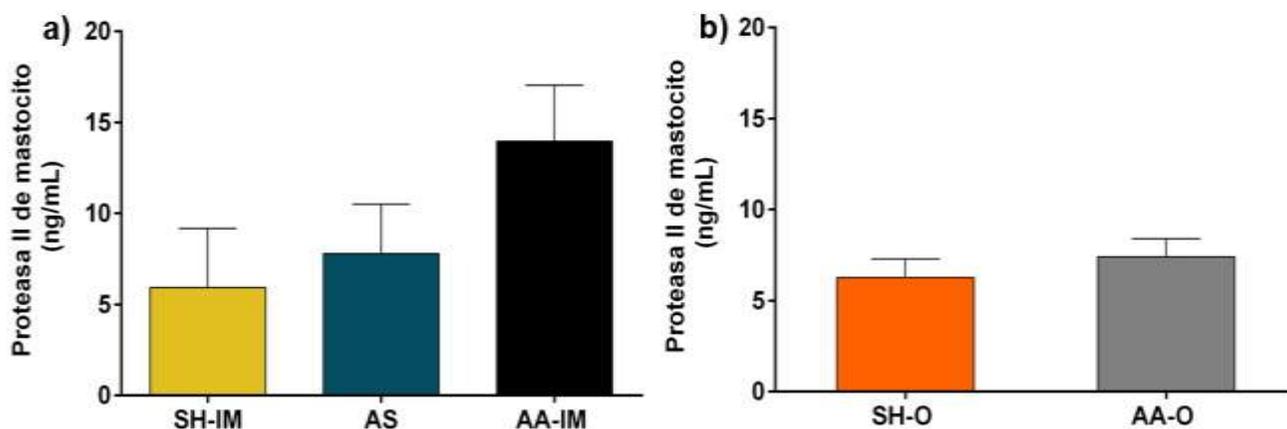
### 7.3.5. Determinación de niveles séricos de proteasa II de mastocitos

La determinación de los niveles séricos de rMCP-II se realizó a los 30 y 120 min posteriores a la administración del reto final (figuras 26 y 27). Como pudo observarse, a los 30 min (figura 26a) el grupo AA-IM presentó los niveles más altos de esta variable, aun cuando no fueron significativos al compararlos con su grupo control (SH-IM) ( $7.49 \pm 5.86$  ng/mL vs  $4.77 \pm 0.66$  ng/mL; NS). En el caso del grupo AA-O en este mismo tiempo (figura 26b), tampoco se observaron cambios respecto al grupo SH-O ( $4.16 \pm 1.34$  ng/mL vs  $4.52 \pm 0.63$  ng/mL; NS).



**Figura 26. Niveles séricos de proteasa II de mastocitos en los diferentes grupos analizados 30 min luego del reto final con el alérgeno.** n= 3. a) Modelo IM y su correspondiente SH-IM. NS, ANOVA de una vía, *post-hoc* de Bonferroni; b) Modelo O y su correspondiente SH-O. NS, t de student.

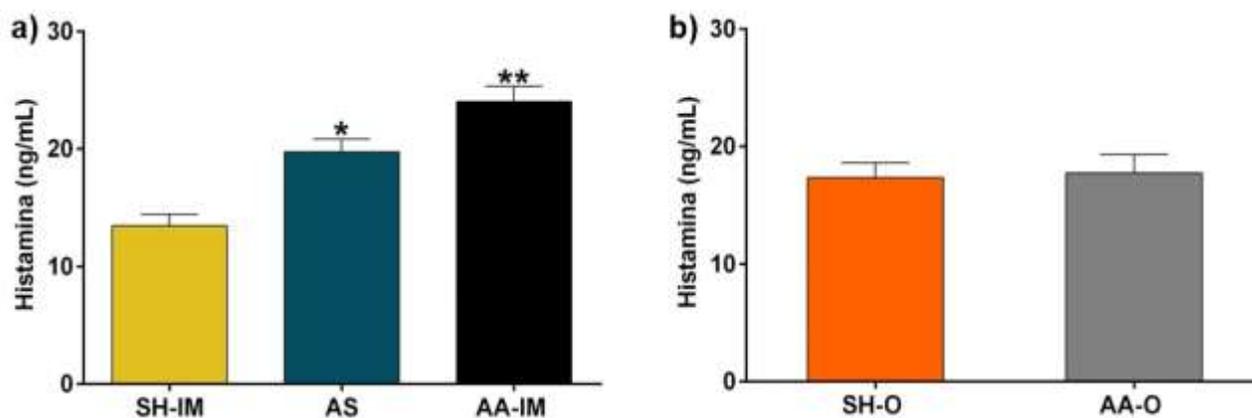
De la misma manera, a los 120 min de la administración del reto final, pudo notarse una tendencia del grupo AA-IM a presentar mayores valores en las concentraciones de rMCP-II que el grupo SH-IM; sin embargo, estadísticamente no fue demostrable ( $13.95 \pm 3.08$  ng/mL vs  $5.92 \pm 3.23$  ng/mL; NS) (figura 27a). En el modelo de sensibilización oral (figura 27b) no hubo cambios significativos entre el grupo AA-O y su control (SH-O) ( $7.39 \pm 0.99$  ng/mL vs  $6.27 \pm 1.01$  ng/mL; NS).



**Figura 27. Niveles séricos de proteasa II de mastocitos en los diferentes grupos analizados 120 min luego del reto final con el alérgeno.**  $n = 3$ . a) Modelo IM y su correspondiente SH-IM. NS, ANOVA de una vía, *post-hoc* de Bonferroni; b) Modelo O y su correspondiente SH-O. NS, t de student.

### 7.3.6. Determinación de niveles séricos de histamina

La determinación de los niveles séricos de histamina se realizó primeramente en el día 27 del protocolo de provocación de alergia, a los 30 minutos del refuerzo oral (figura 28). Como se muestra en la figura 28a, los niveles séricos de histamina se incrementaron tanto en los animales del grupo AA-IM como en los sensibilizados, observándose que el grupo AA-IM presentó los niveles más altos, 1.8 veces más histamina sérica que la de su grupo control: SH-IM ( $24.02 \pm 1.32$  ng/mL vs  $13.46 \pm 0.98$  ng/mL;  $p < 0.01$ ). Por su parte, el grupo AS presentó 1.5 veces más histamina en suero que el grupo control ( $19.73 \pm 1.10$  ng/mL;  $p < 0.05$ ). En el caso del modelo de sensibilización oral (figura 30 b), los animales de los grupos AA-O y SH-O tuvieron valores semejantes de histamina en suero ( $17.75 \pm 1.54$  ng/mL vs  $17.36 \pm 1.25$  ng/mL; NS).



**Figura 28. Niveles séricos de histamina en los diferentes grupos analizados en el día 27, 30 min luego del reto con el alérgeno.**  $n = 3$ . a) Modelo IM y su correspondiente SH-IM. \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  vs grupo SH-IM, ANOVA de una vía, *post-hoc* de Bonferroni; b) Modelo O y su correspondiente SH-O. NS, t de student.

Debido que, solo los animales del modelo de sensibilización intramuscular mostraran cambios significativos en los niveles de histamina en relación con el grupo SHAM, se volvieron a analizar los niveles séricos de esta amina vasoactiva; pero ahora, en el día 40 (Figura 29). Dicho análisis mostró nuevamente un incremento significativo de 1.8 veces de los niveles séricos de histamina en el grupo AA-IM ( $18.68 \pm 2.4$  ng/mL;  $p < 0.05$ ) con respecto a los animales del grupo SH-IM ( $10.14 \pm 0.82$

ng/mL); fenómeno que se pierde en el grupo AS alcanzando apenas una concentración de  $12.13 \pm 0.16$  ng/mL.

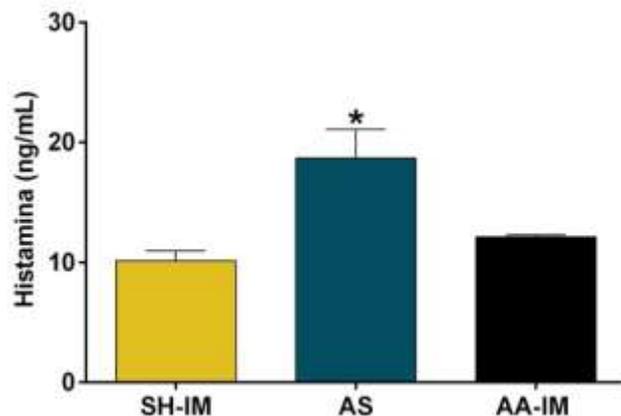


Figura 29. Niveles séricos de histamina en los diferentes grupos del modelo IM y su correspondiente SH-IM. Día 40; 30 min luego del reto con el alérgeno. n= 3, \*p < 0.05 vs grupo SH-IM. ANOVA de 1 vía, *post-hoc* de Bonferroni.

#### 7.4. Efecto del GMP, solo o combinado con LGG, en AA.

##### 7.4.1. Análisis del incremento de peso corporal asociado a los diferentes tratamientos en animales con AA y tratados con GMP y/o LGG.

Como se mencionó en la caracterización de los modelos de alergia, el registro del peso corporal y su análisis durante los diferentes días de tratamiento fue un indicativo del comportamiento alimenticio de los animales, así como del estado nutricional de los mismos durante las diferentes fases del modelo de provocación de alergia y/o su tratamiento. La cuantificación de éste se realizó del día -3 (inicio de los tratamientos) al día 40 (último día del modelo). Como se muestra en la figura 30, ni la inducción de la alergia ni los tratamientos reflejaron cambios significativos en la ganancia de peso corporal de los animales al comparar con el grupo control.

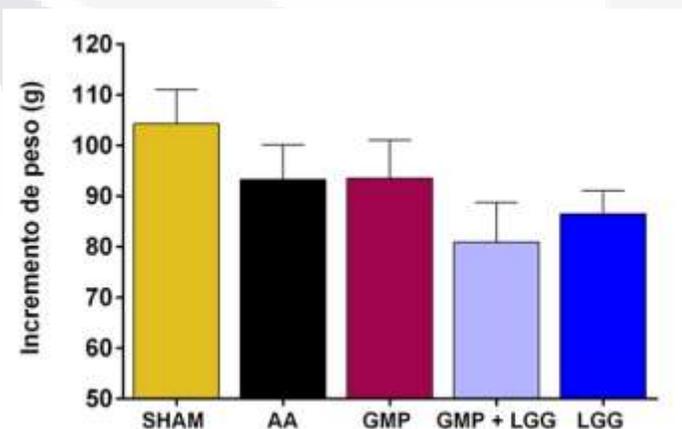
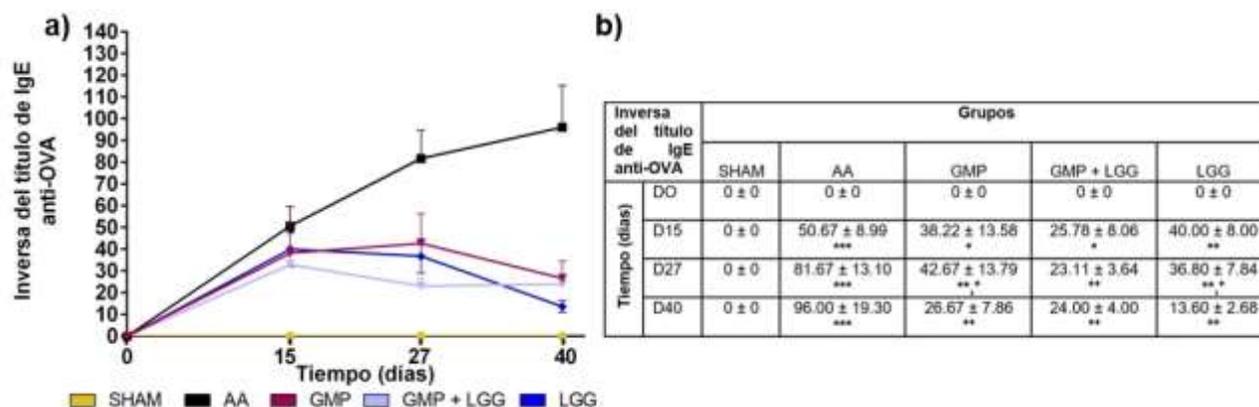


Figura 30. Incremento de peso en animales alérgicos, con o sin tratamiento (AA, GMP, GMP + LGG) y su correspondiente SHAM. n= 10. NS, ANOVA de una vía, *post-hoc* de Bonferroni.

### 7.4.2. Análisis de los niveles de IgE e IgG1 anti-OVA en suero de animales con AA y tratados con GMP y/o LGG

Para analizar el efecto de los tratamientos sobre la síntesis de anticuerpos alérgeno-específicos se analizaron los títulos de IgE (figura 31) por PCA y los niveles de IgG1 (figura 32) mediante la determinación del IP por ELISA (Macedo-Mendoza, 2015). Para ello se analizaron muestras de suero de los días 0, 15, 27 y 40 de todos los grupos de animales.



**Figura 31. Presencia o ausencia de IgE en grupos de alergia, con o sin tratamiento (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) y su correspondiente SHAM, a lo largo del tiempo. n = 9. a) Representación gráfica; b) Análisis estadístico de los datos. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.0001 vs SHAM en un mismo tiempo, +p < 0.01, ++p < 0.0001 vs AA en un mismo tiempo. ANOVA de dos vías, *post-hoc* de Holm-Sidak.**

Como puede observarse en la figura 31, todos los sueros de los animales de los diferentes grupos en el día 0, previo a la inmunización, carecen de IgE específica a OVA al igual que los sueros colectados de los animales del grupo SHAM durante todo del protocolo. Por otro lado, al día 15, el grupo AA aumentó significativamente con respecto al grupo SHAM el título de IgE anti-OVA a  $50.67 \pm 8.99$  ( $p < 0.0001$ ), incremento que continuó el día 27 ( $81.67 \pm 13.10$ ;  $p < 0.0001$ ), alcanzando su pico máximo el día 40 de la evaluación ( $96.00 \pm 19.30$ ;  $p < 0.0001$ ).

Por su parte, los animales del grupo tratado con GMP mostraron niveles del anticuerpo 24.57% menores al grupo AA el día 15 ( $38.22 \pm 13.58$ ) sin ser una diferencia significativa. El día 27 alcanzaron su pico máximo ( $42.67 \pm 13.79$ ) con valores 47.75% menores que el grupo AA ( $p < 0.05$ ); mientras que el día 40, el título descendió 72.22% ( $26.67 \pm 7.86$ ;  $p < 0.001$ ) al comparar con los sueros del grupo AA. En este día, no hubo diferencia significativa entre los títulos de IgE anti-OVA de los sueros de los animales tratados con GMP y los animales SHAM.

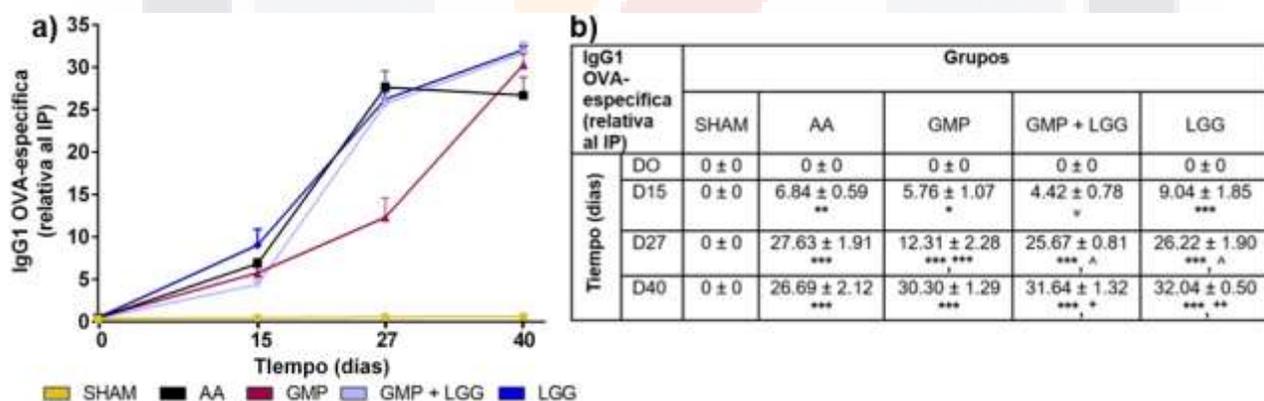
En cuanto al grupo alérgico con tratamiento con GMP + LGG, el día 15 presentó un título de IgE anti-OVA de  $27.80 \pm 8.06$ , sin alcanzar diferencias significativas con respecto al grupo AA. Sin embargo, el título descendió a  $23.11 \pm 3.63$  el día 27 y a  $24.00 \pm 4.00$  el día 40; es decir 71.7% ( $p < 0.0001$ ) y 75% ( $p < 0.0001$ ) menos que los sueros de los animales del grupo AA sin tratamiento, respectivamente. Además, en el día 27 y día 40, los niveles de IgE anti-OVA de los animales tratados con GMP + LGG no fueron significativamente diferentes respecto a los de los animales del grupo SHAM.

El grupo alérgico con tratamiento con LGG al día 15 presentó un título de esta inmunoglobulina de  $40.00 \pm 8.00$ , sin tener diferencias significativas al comparar con el grupo AA. En el día 27, tuvo una disminución del 54.94% ( $36.8 \pm 7.88$ ;  $p < 0.01$ ) y en el día 40 una de 85.83% ( $13.60 \pm 2.68$ ;  $p <$

0.0001) al comparar con el grupo AA. Al igual que ocurrió al administrar GMP a los animales, en el día 40 no se presentaron diferencias significativas entre los títulos de IgE anti-OVA de los animales tratados con LGG y los animales SHAM. Finalmente, no se evidenciaron diferencias entre los grupos con tratamiento a lo largo del tiempo.

Cuando analizamos mediante ELISA los valores relativos de IgG1 anti-OVA en las mismas muestras (figura 32), los sueros de los animales de los 5 grupos experimentales vuelven a ser negativos en el día 0. Para el día 15, el nivel de IgG1 en las muestras del grupo AA es 14.5 veces mayor que en los animales SHAM ( $p < 0.01$ ), y los grupos con tratamiento no muestran diferencias con el grupo alérgico. El día 27 este nivel incrementa aún más en los animales AA, llegando a ser 48.5 veces mayor al del grupo SHAM ( $p < 0.0001$ ). Mientras que los otros tratamientos no muestran cambios con los animales del AA, el grupo tratado con GMP presenta un valor 55.44% menor de IgG1 ( $p < 0.0001$ ). Por último, al día 40, el grupo AA vuelve a ser 42.36 veces mayor que el SHAM ( $p < 0.0001$ ) y el grupo con tratamiento GMP no presenta diferencias contra el AA. Sin embargo, el grupo GMP + LGG y el grupo LGG presentan un nivel 15.64 ( $p < 0.05$ ) y 16.69% ( $p < 0.01$ ) mayor de IgG1 anti-OVA que el grupo sin tratamiento.

Cuando comparamos el efecto de los tratamientos entre sí, llamó la atención que en el día 15 el grupo LGG tuvo niveles de IgG1 anti-OVA del doble de los del grupo GMP + LGG ( $p < 0.05$ ). Además, en el día 27, los animales tratados con GMP presentaron niveles 52.04 y 53.05 menores que el de los tratados con GMP+LGG y con LGG, respectivamente ( $p < 0.0001$ ); mientras que, en el día 40, no existen diferencias entre los diferentes grupos de tratamiento.

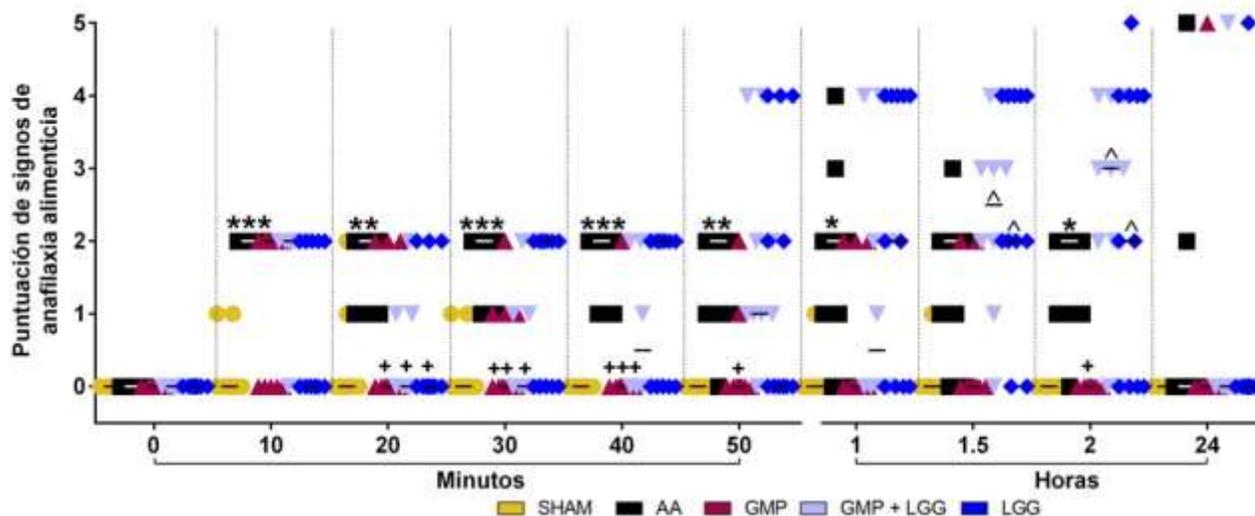


**Figura 32. Presencia o ausencia de IgG1 en grupos de alergia, con o sin tratamiento (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) y su correspondiente SHAM, a lo largo del tiempo.**  $n = 10$ . a) Representación gráfica; b) Análisis estadístico de los datos. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$  vs SHAM en un mismo tiempo, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$  vs AA en un mismo tiempo,  $^v p < 0.05$  vs LGG en un mismo tiempo,  $^Δ p < 0.0001$  vs GMP en un mismo tiempo. ANOVA de dos vías, post-hoc de Holm-Sidak.

#### 7.4.3. Análisis de los signos clínicos de anafilaxia alimenticia en animales con AA y tratados con GMP y/o LGG.

Para valorar la aparición de anafilaxia alimenticia en los animales con o sin tratamiento, se analizaron los signos clínicos en los animales luego de la administración del reto final con el alérgeno, con base en la escala de anafilaxia alimenticia mencionada en metodología (Li, 2000).

Los signos clínicos de los animales SHAM reprodujeron el mismo patrón observado durante la caracterización del modelo; sólo algunos de los animales presentaron signos vagos y esporádicos, no distintivos de AA y menores a 0.5 en todos los tiempos evaluados (figura 33).



**Figura 33. Evaluación del puntaje en la reacción de anafilaxia alimenticia en grupos de alergia, con o sin tratamiento (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) y su correspondiente SHAM, a lo largo del tiempo antes y después del reto con OVA.** n= 11, \*p <0.05, \*\*p <0.01, \*\*\*p <0.001 vs SHAM en el mismo tiempo, \*p <0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs AA en el mismo tiempo, ^p < 0. vs GMP en el mismo tiempo. Prueba de Kruskal-Wallis, *post-hoc* de Dunn.

Cabe destacar que la mortalidad en todos los grupos de AA con o sin tratamiento fue de 1 rata (16-20% dependiendo del número de animales del grupo), excepto en el grupo LGG donde una rata murió antes de terminar la evaluación y otra antes de las 24 hs del ensayo (18%) en el grupo SHAM en el que ningún animal murió.

Desde los diez minutos posteriores a la administración del alérgeno, el grupo AA presentó una puntuación superior a la del grupo SHAM ( $2.00 \pm 0$  puntos vs  $0.18 \pm 0.12$  puntos;  $p < 0.001$ ) en la escala de anafilaxia alimenticia, reproduciendo los síntomas clásicos esperados como conductas de rascado frecuentes, piloerección, edema palpebral y eventos diarreicos. Los valores se mantuvieron estables y con diferencias significativas importantes hasta los 50 min ( $p < 0.01$  vs SHAM), luego de lo cual, los signos del grupo alérgico disminuyeron, llegando a ser aun así 1.5 veces mayores que los del grupo SHAM a las 2 h del ensayo ( $1.50 \pm 0.22$  puntos vs 0 puntos;  $p < 0.05$ ).

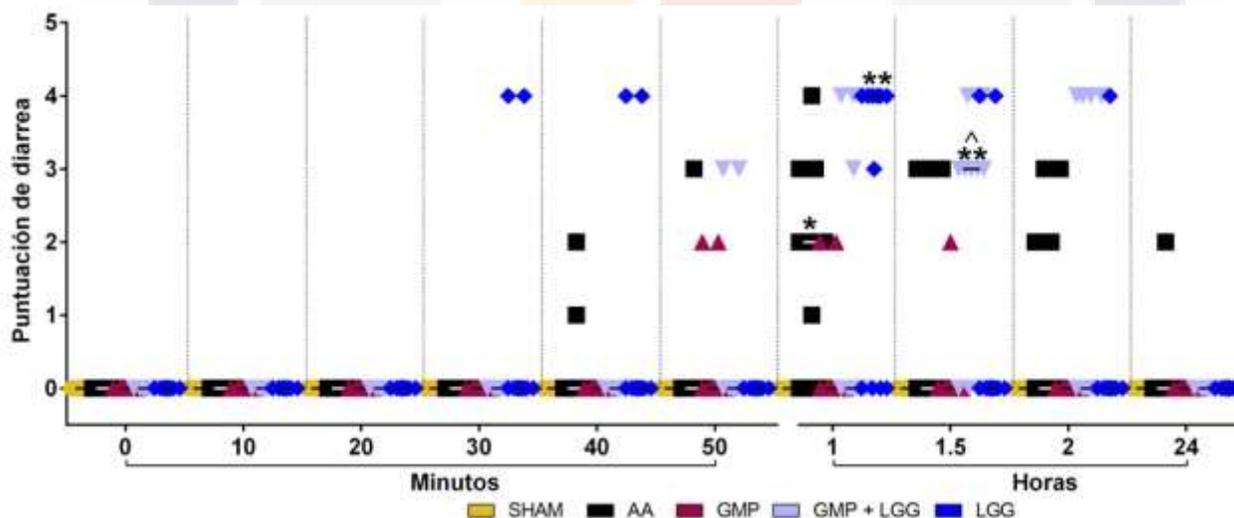
El grupo alérgico tratado con GMP presentó valores 67.54% menores al grupo AA, a los 20 min iniciales ( $0.54 \pm 0.28$  puntos vs  $1.70 \pm 0.15$  puntos;  $p < 0.05$ ). A partir de aquí, manifestó signos como conductas intermitentes de rascado, piloerección sólo en algunos animales y eventos de diarrea esporádicos. A los 40 min la diferencia en signos fue 55% menor que el grupo AA ( $0.18 \pm 0.18$  puntos vs  $1.80 \pm 0.13$  puntos;  $p < 0.001$ ) y después de la hora, la tendencia del grupo fue hacia la remisión de las manifestaciones alérgicas por lo que a las 2 h los animales no presentaron signo alguno de alergia.

Por su parte el grupo alérgico tratado con GMP + LGG presentó signos discretos de anafilaxia (como piloerección y conducta de rascado en algunos animales) a los 10 min tras el reto, siendo 70 ( $0.40 \pm 0.22$  puntos vs  $1.70 \pm 0.15$  puntos) y 66% ( $0.6 \pm 0.27$  puntos vs  $1.8 \pm 0.13$  puntos) menor al grupo AA a los 20 y 30 min, respectivamente ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, a partir de los 40 min estas

diferencias entre los animales alérgicos con y sin tratamiento con GMP + LGG desaparecieron y para la hora y media se registró la presencia de signos graves de malestar abdominal, diarrea profusa y afectación al estado general, lo cual no fue estadísticamente significativo al comparar con el grupo sin tratamiento, pero si contra el grupo tratado únicamente con GMP. Así, los animales del grupo GMP + LGG mostraron puntuación de signos de  $2.40 \pm 0.40$  y  $2.50 \pm 0.47$ , en comparación con los  $0.36 \pm 0.24$  y 0 del grupo GMP, a la hora y media y dos horas tras el reto con OVA ( $p < 0.01$ ).

Por último, el grupo alérgico tratado con LGG presentó signos de anafilaxia (como piloerección y conducta de rascado en algunos animales) a partir de los 10 min tras el reto, momento en el cual dichos signos fueron 55% menores que en el caso del grupo AA ( $0.90 \pm 0.32$  puntos vs  $2.00 \pm 0$  puntos;  $p < 0.05$ ). Luego de esto se pierde la significancia, pero se aprecia un pico máximo de signos similares a los descritos para el grupo GMP + LGG hacia la hora y media. Los animales alérgicos tratados con LGG presentaron una puntuación media de  $2.54 \pm 0.47$  puntos a la hora y media y  $2.27 \pm 0.60$  a las 2 h, siendo este valor significativamente mayor al comparar contra el grupo tratado solo con GMP ( $p < 0.01$ ).

Ya que la diarrea fue uno de los signos más importantes durante el proceso de anafilaxia alimenticia en este trabajo, se procedió a analizar las variaciones en la consistencia de las heces en los diferentes grupos de animales. Como se muestra en la figura 34, ninguno de los animales SHAM tuvo alteraciones en la solidez de las heces en el caso de los pocos animales que evacuaron luego del reto con el alérgeno.



**Figura 34. Puntaje de la reacción diarreaica tras anafilaxia alimenticia en grupos de alergia, con o sin tratamiento (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) y su correspondiente SHAM, a lo largo del tiempo antes y después del reto con OVA.**  $n = 11$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs SHAM en el mismo tiempo, ^ $p < 0.05$  vs GMP en el mismo tiempo. Prueba de Kruskal-Wallis, *post-hoc* de Dunn.

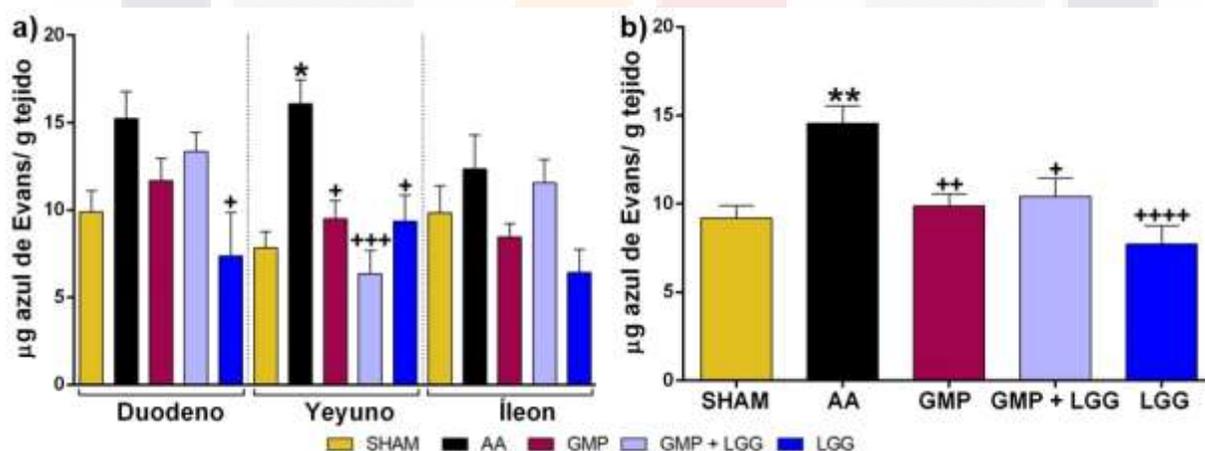
En los animales AA, la diarrea inició a partir de los 30 min del reto, teniendo una puntuación máxima de  $1.73 \pm 0.41$  tras la primera hora luego de haber administrado el alérgeno ( $p < 0.05$  vs SHAM). En este tiempo, 9% de los animales tuvieron evacuaciones sólidas, 36.36% evacuaciones semi-líquidas, 18.18% un episodio diarreico y 9% más de dos episodios de diarrea líquida. El tratamiento de los animales con GMP fue el único que generó una tendencia a la disminución de la severidad y

la frecuencia de la diarrea, teniendo en este tiempo una media de puntuación de  $0.36 \pm 0.24$  (NS); sin embargo, solo 18.18% de animales presentó cambios en la consistencia de las evacuaciones que se volvieron blandas sin llegar a ser líquidas.

Por otro lado, se observó que al adicionar el LGG junto con el GMP, el pico máximo de las manifestaciones diarreas se presentó hasta la hora y media luego de la administración del reto final ( $2.09 \pm 0.51$ ), siendo de inicio más lento y teniendo el 63.63% de los animales con presencia de al menos un episodio diarreico. En este tiempo, los animales con este tratamiento conjunto alcanzan puntuaciones en la escala 11.61% mayores que al utilizar solamente GMP ( $0.18 \pm 0.18$ ;  $p < 0.05$ ). En el caso del tratamiento único con LGG, se apreció un patrón de inicio adelantado de las manifestaciones diarreas a los 30 y 40 min posteriores a la administración del reto ( $18.18\%$  de los animales manifiestan más de 1 episodio diarreico; NS al comparar vs AA), luego de lo cual el pico máximo de puntuación sobrevino a la hora siendo la media de  $2.45 \pm 0.59$ ; NS vs AA, y posteriormente descendió hasta llegar a la normalidad a las 24 h de evaluación.

#### 7.4.5. Análisis de variaciones en la permeabilidad vascular en animales con AA tratados con GMP y/o LGG

Para comprobar la existencia de cambios inmediatos de tipo inflamatorio a nivel intestinal con los diferentes tratamientos en los animales con AA, se evaluó la permeabilidad vascular mediante la cuantificación de azul de Evans extravasado en intestino (figura 35). Aquí se ilustra el fenómeno por segmento intestinal (figura 35a) y por intestino completo (35b).



**Figura 35. Extravasación intestinal de azul de Evans en grupos de alergia, con o sin tratamiento (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) y su correspondiente SHAM. n= 5. a) Por segmento intestinal; b) Integración de los tres segmentos evaluados. \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$  vs SHAM, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs AA, ANOVA de una vía, *post-hoc* de Bonferroni.**

La extravasación inducida por el alérgeno en los diferentes grupos de animales fue mayor en yeyuno y duodeno que en íleon (figura 35a). En yeyuno, los animales alérgicos extravasaron 2 veces más colorante que los animales SHAM ( $16.08 \pm 1.37$  vs  $7.84 \pm 0.93$ ;  $p < 0.01$ ). En este mismo segmento se aprecia que el grupo GMP extravasó 40.98% menos azul de Evans que el grupo sin tratamiento ( $9.49 \pm 1.05$ ;  $p < 0.05$ ). Sin embargo, al administrar el alérgeno con la combinación de GMP + LGG, la extravasación de colorante fue 60.5% menor ( $6.35 \pm 1.31$ ;  $p < 0.001$ ) y por último al administrar únicamente el LGG la cantidad de azul de Evans extravasado disminuyó un 41.79% ( $9.36 \pm 1.47$ ;  $p < 0.05$ ). No hubo diferencias significativas entre la permeabilidad vascular generada por el alérgeno en los animales con AA y tratados, en comparación con los animales SHAM. En los otros

segmentos intestinales, solamente se apreció una tendencia del grupo alérgico a tener una mayor extravasación del colorante que los animales SHAM.

Al analizar conjuntamente todos los segmentos intestinales (figura 35b) se apreció que el grupo AA tuvo una extravasación de colorante 1.58 veces mayor al grupo SHAM ( $14.55 \pm 0.97$  vs  $9.19 \pm 0.71$ ;  $p < 0.001$ ). Al tratar a los animales alérgicos solo con GMP, la permeabilidad vascular intestinal generada por el contacto GI con el alérgeno disminuyó 32.16% ( $9.88 \pm 0.66$ ;  $p < 0.01$ ), con el tratamiento de GMP + LGG disminuyó 28.44% ( $10.41 \pm 1.04$ ;  $p < 0.05$ ), y al administrar LGG ésta disminuyó 47.01% ( $7.71 \pm 1.04$ ;  $p < 0.0001$ ), comparando con el grupo alérgico.

#### 7.4.6. Análisis de las diferencias en el tejido linfático intestinal en animales con AA tratados con GMP y/o LGG

Para analizar los cambios macroscópicos en el tejido intestinal de los animales de los diferentes grupos de estudio, se evaluaron el número y área de las placas de Peyer (figura 36) como un indicativo del estado general del tejido linfático intestinal.

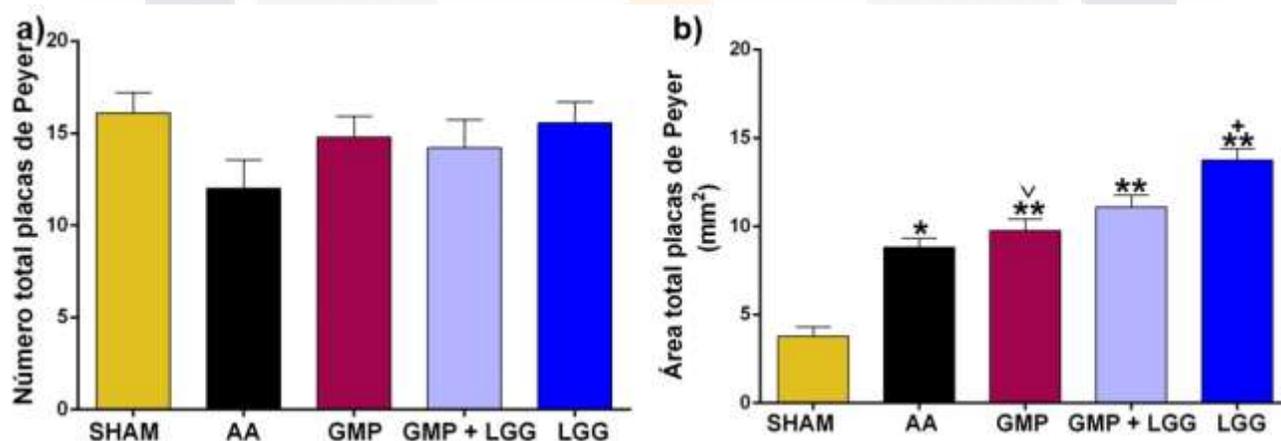


Figura 36. a) Número y b) área total de placas de Peyer en grupos de alergia, con o sin tratamiento (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) y su correspondiente SHAM. AA n= 10, GMP, n= 9 GMP + LGG n= 10, LGG n= 9. \* $p < 0.01$  \*\* $p < 0.0001$  vs SHAM, \* $p < 0.001$  vs AA, \* $p < 0.001$  vs LGG. ANOVA de una vía, *post-hoc* de Bonferroni.

En la figura 36a puede observarse únicamente una tendencia por parte del grupo alérgico a tener menor cantidad de placas de Peyer a lo largo del tejido del intestino delgado. Los grupos de tratamiento muestran también una tendencia a presentar un número semejante al del grupo SHAM.

Sin embargo, como se muestra en la figura 36b, el área de las placas de Peyer en los animales alérgicos fue 2.3 veces mayor que en los animales SHAM ( $8.81 \pm 0.50$  mm<sup>2</sup> vs  $3.77 \pm 0.53$  mm<sup>2</sup>;  $p < 0.01$ ). El grupo con tratamiento con GMP, así como el de tratamiento con GMP + LGG, no mostraron diferencias significativas al comparar con el grupo AA. Sin embargo, el grupo tratado únicamente con LGG presentó un área total de placas de Peyer 1.6 veces mayor que el grupo AA ( $13.75 \pm 0.63$  mm<sup>2</sup> vs  $8.81 \pm 0.50$  mm<sup>2</sup>;  $p < 0.001$ ) y un área 1.4 veces mayor al grupo únicamente tratado con GMP ( $9.75 \pm 0.64$  mm<sup>2</sup>;  $p < 0.001$ ).

#### 7.4.7. Determinación de niveles séricos de histamina de animales con AA tratados con GMP y/o LGG

La determinación de los niveles séricos de histamina se realizó el día 27 del protocolo de provocación de alergia con suero obtenido 30 min luego del refuerzo oral. Como se señala en la figura 37, en este día los niveles séricos del grupo AA fueron los más altos, observándose en estos animales 1.89 veces más histamina que la del grupo SHAM ( $19.91 \pm 3.12$  ng/mL vs  $10.48 \pm 0.71$  ng/mL;  $p < 0.01$ ). Por su parte, el grupo GMP presentó niveles 58.21% menores que el grupo sin tratamiento ( $8.32 \pm 1.21$  ng/mL;  $p < 0.0001$ ), los grupos LGG y GMP + LGG presentaron a su vez niveles 42.69% menores que el grupo AA ( $11.41 \pm 0.85$  y  $0.65$ , respectivamente;  $p < 0.01$ ).

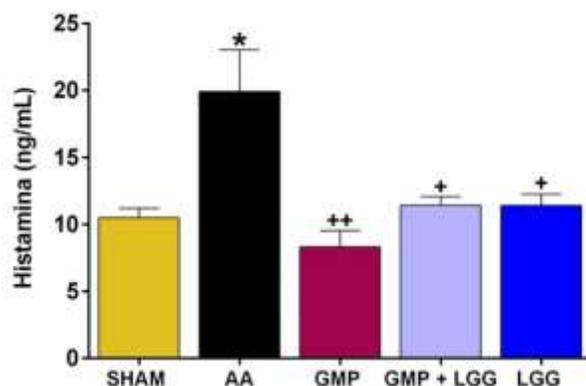


Figura 37. Niveles de histamina en grupos de alergia, con o sin tratamiento (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) y su correspondiente SHAM.  $n = 9$ ; \* $p < 0.01$  vs SH, \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.0001$  vs AA, ANOVA de una vía, *post-hoc* de Bonferroni.

#### 7.4.8. Diferencias en la expresión relativa de genes asociados con la reacción de hipersensibilidad tipo I en tejido intestinal de animales con AA tratados con GMP y/o LGG

A partir del tejido intestinal de los animales de los diferentes grupos evaluados, se analizó las diferencias en la expresión génica de diversas proteínas relacionadas con el desarrollo o regulación de la respuesta de hipersensibilidad de tipo I (figura 38).

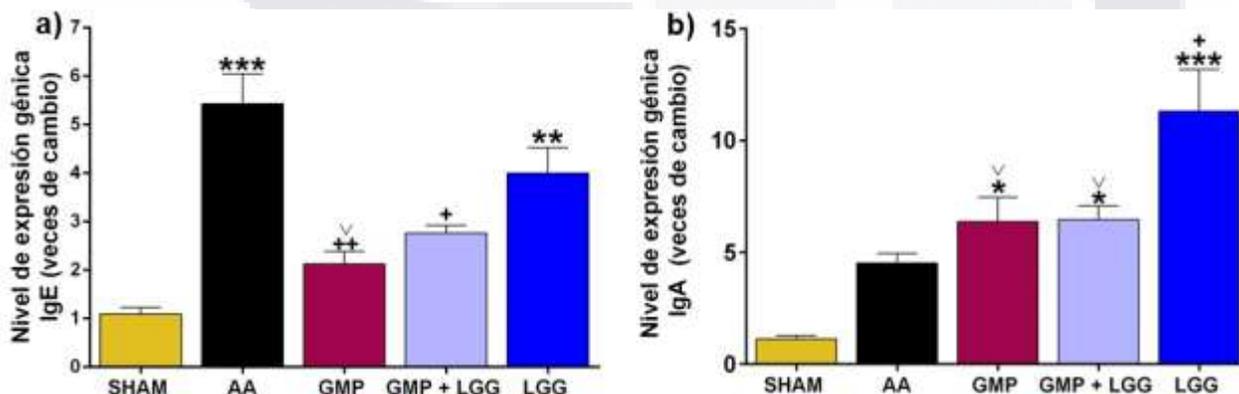


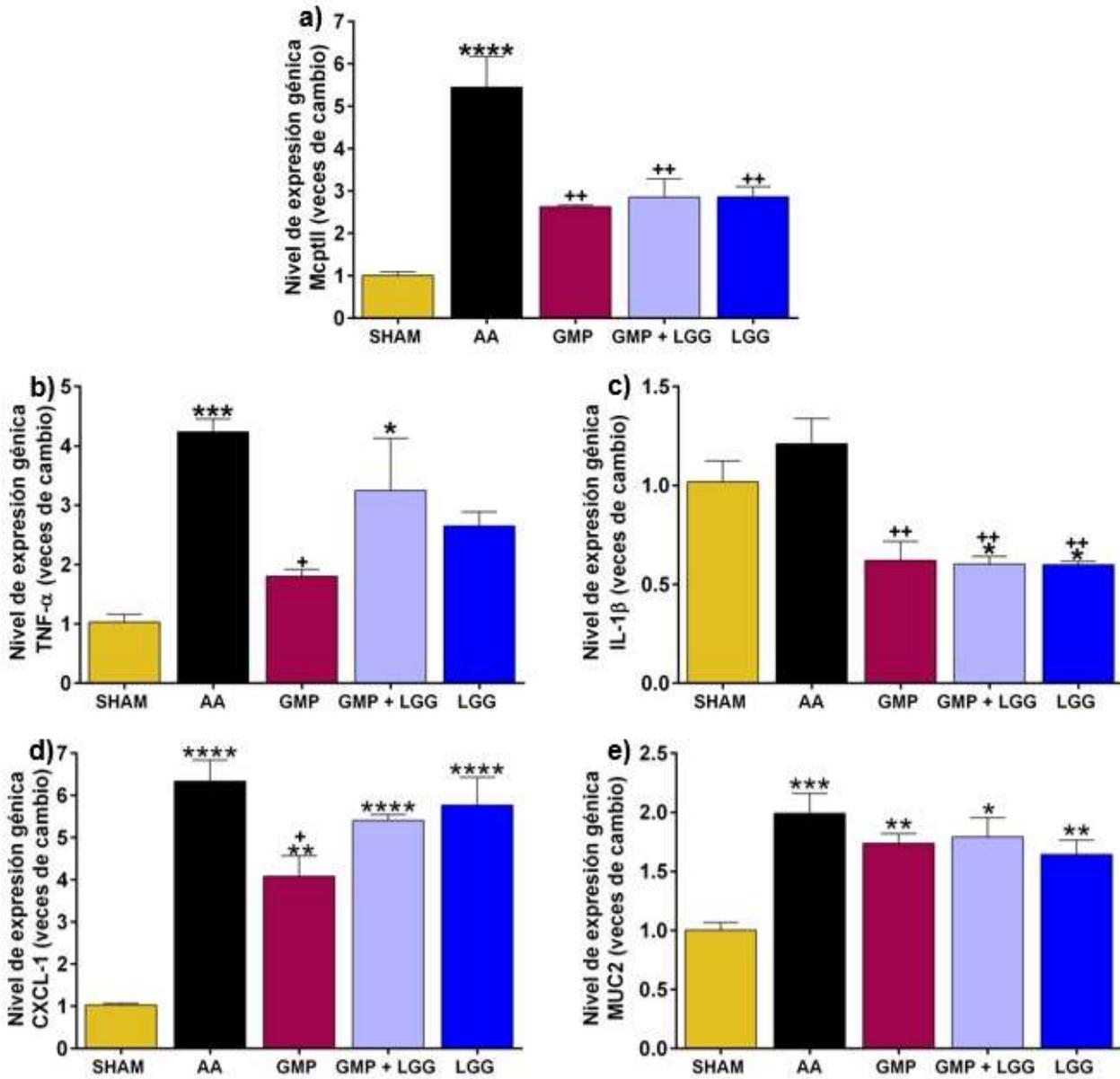
Figura 38. Expresión génica relativa de inmunoglobulinas asociadas con la reacción de hipersensibilidad tipo I en el intestino de animales alérgicos con o sin tratamiento (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) y su correspondiente SHAM.  $n = 4$ . a) IgE; b) IgA.  $n = 4$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.0001$  vs SHAM, \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$  vs AA, \* $p < 0.01$  vs LGG. ANOVA de 1 vía, *post-hoc* de Bonferroni.

En cuanto a la expresión génica relativa de la IgE (figura 38a) se observó en el grupo AA un incremento en sus niveles de expresión de 4.98 veces al comparar con el grupo SHAM ( $5.43 \pm 0.62$  vs  $1.09 \pm 0.13$ ;  $p < 0.0001$ ). El tratamiento con GMP y con GMP + LGG disminuyó la expresión de este anticuerpo 60.77% ( $2.13 \pm 0.26$ ;  $p < 0.001$ ) y 49.17% ( $2.76 \pm 0.16$ ;  $p < 0.01$ ) respectivamente, en relación con los niveles de expresión de los animales del grupo AA. El tratamiento con LGG no mostró diferencias significativas contra los no tratados ( $4.00 \pm 0.53$ ), pero sí tuvo 1.88 veces mayor expresión de la inmunoglobulina que el grupo tratado con GMP ( $p < 0.05$ ). En el caso de la IgA (figura 38b), solo se observó una tendencia al incremento en el nivel de expresión génica de esta Ig en los animales del grupo AA al comparar contra los del grupo SHAM ( $4.53 \pm 0.43$  vs  $1.12 \pm 0.15$ , NS). El único tratamiento que mostró una elevación significativa en la expresión de IgA de más del doble de lo que muestra el grupo AA fue el grupo de animales alérgicos tratados con LGG ( $11.32 \pm 1.86$ ;  $p < 0.01$ ). Además, este tratamiento generó 1.7 veces mayor expresión de IgA ( $6.47 \pm 0.62$ ;  $p < 0.05$ ) que el de GMP + LGG y 1.77 más ( $6.38 \pm 1.08$ ;  $p < 0.05$ ) que el grupo tratado con GMP.

Posteriormente, en la figura 39 se muestran los niveles de expresión de 5 genes que se analizaron para evaluar la magnitud del daño inflamatorio en tejido intestinal. En primer lugar, se determinó de forma indirecta el efecto de la AA y los tratamientos sobre el número de mastocitos intestinales a través del análisis de la expresión relativa de McptII en los diferentes grupos (figura 39a). En los animales alérgicos, el nivel de expresión génica de la McptII fue 5.4 veces mayor que en los SHAM ( $5.44 \pm 0.74$  vs  $1.01 \pm 0.08$ ;  $p < 0.0001$ ), indicando que hubo una hiperplasia de mastocitos en tejido intestinal como consecuencia del desarrollo de la AA. Los tres tratamientos lograron disminuirla, siendo el GMP el que la disminuyó en mayor cantidad (51.65%:  $2.63 \pm 0.03$ ;  $p < 0.01$ ) al comparar con el grupo sin tratamiento. Los tratamientos con GMP + LGG ( $2.86 \pm 0.24$ ;  $p < 0.07$ ) y con LGG ( $2.85 \pm 0.43$ ;  $p < 0.01$ ) redujeron 47.4 y 47.6 veces respectivamente los niveles de expresión de esta proteasa en comparación con su expresión en los animales del grupo AA.

A continuación, se evaluó el grado de inflamación aguda localizada a través de la expresión génica intestinal relativa de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y CXCL-1. La expresión de la primera citocina inflamatoria (figura 39b) en el grupo AA fue 4.1 veces mayor que en el grupo SHAM ( $4.24 \pm 0.22$  vs  $1.03$  vs  $0.14$ ;  $p < 0.001$ ), y el único tratamiento con el que se apreció una disminución significativa en su expresión fue el de GMP, siendo esta reducción del 57.31% ( $1.8 \pm 0.11$ ;  $p < 0.05$ ) al comparar con el grupo AA. Al analizar IL-1 $\beta$  (figura 39c), no hubo variación significativa en los niveles de expresión de esta citocina entre los grupos AA y SH ( $1.21 \pm 0.13$  vs  $1.02 \pm 0.11$ , NS); sin embargo, en los tres grupos de animales con tratamiento se logró una disminución significativa en su expresión al comparar con el grupo AA. El grupo GMP redujo un 48.76% la expresión relativa de IL-1 $\beta$  ( $0.62 \pm 0.09$ ;  $p < 0.01$ ), y los grupos LGG y GMP + LGG, la disminuyeron 50.41% ( $0.60 \pm 0.04$  y  $0.60 \pm 0.02$ ;  $p < 0.01$ ). Con relación a la expresión relativa de CXCL-1 (figura 39d), en el grupo AA se incrementó 6.1 veces al comparar con los animales SHAM ( $6.34 \pm 0.50$  vs  $1.04 \pm 0.04$ ;  $p < 0.0001$ ); el único tratamiento capaz de ocasionar una disminución significativa en la expresión de esta quimiocina inflamatoria (35.64%) fue el de GMP ( $4.08 \pm 0.49$ ;  $p < 0.05$ ).

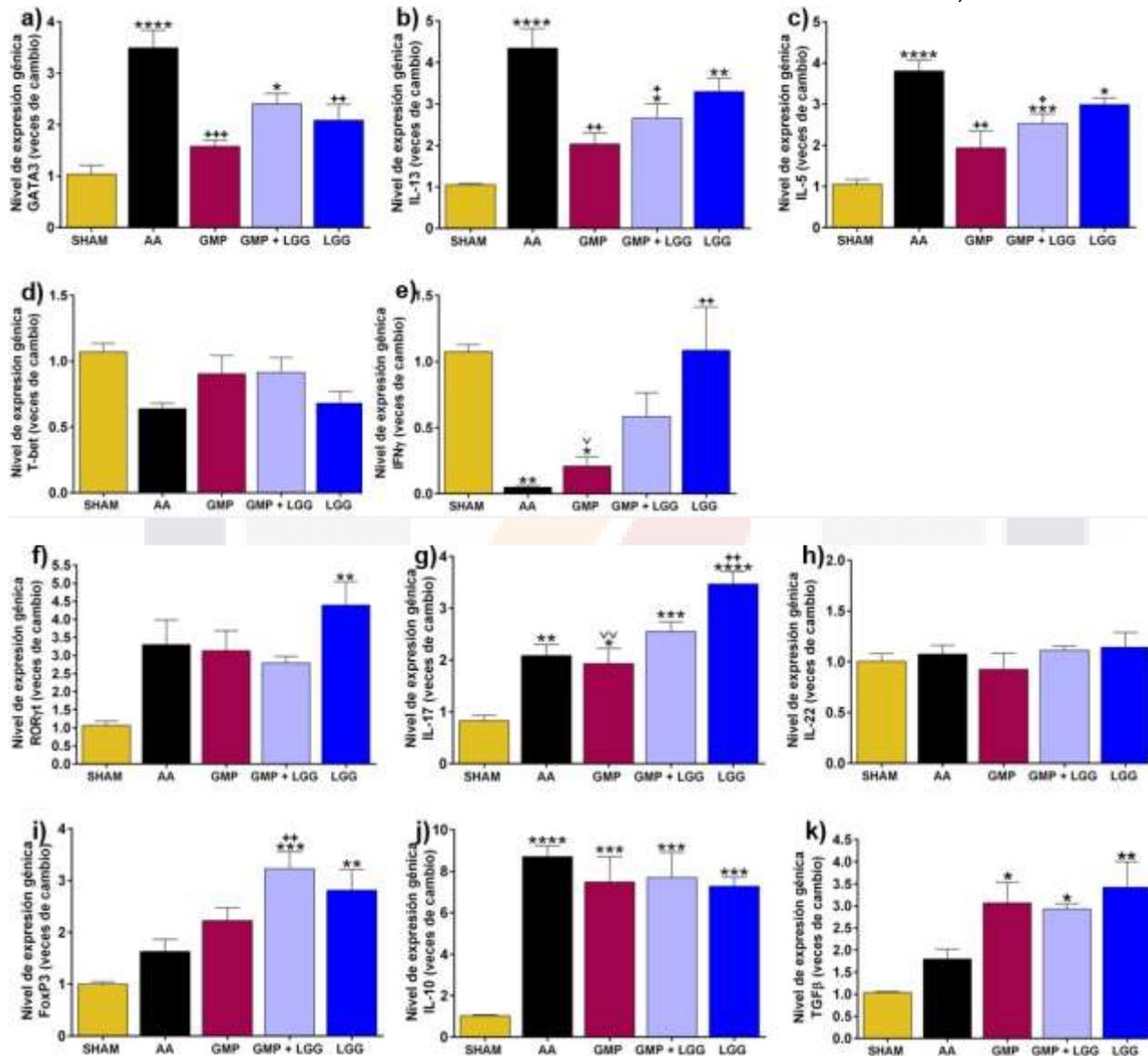
Por último, otro parámetro que se analizó fue la expresión relativa de MUC2 en tejido intestinal. Aunque la expresión de MUC2 (figura 39e) se incrementó 1.9 veces ( $1.99 \pm 0.17$  vs  $1.00 \pm 0.06$ ;  $p < 0.001$ ) en los animales con AA al comparar con el grupo SHAM, los diferentes tratamientos no modificaron significativamente el nivel de expresión de esta mucina.



**Figura 39. Expresión génica relativa de genes asociados con la reacción de hipersensibilidad tipo I en el intestino de animales alérgicos con o sin tratamiento (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) y su correspondiente SHAM. n= 4. a) McpII, b) TNF-α, c) IL-1β, d) CXCL-1 y e) MUC2. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001 vs SHAM, +p < 0.05, ++p < 0.01, +++p < 0.001 vs AA. ANOVA de una vía, *post-hoc* de Bonferroni.**

En cuanto a la expresión génica en tejido intestinal de factores reguladores de transcripción claves en la diferenciación de las células inmunes hacia perfiles inflamatorios o reguladores específicos, así como de citocinas características de cada perfil, los resultados se muestran en la figura 40. Al analizar la expresión relativa de GATA3, factor maestro de diferenciación hacia el perfil tipo 2 (figura 40a), se observó que en el grupo AA estaba 3.3 veces incrementada en tejido intestinal al comparar con el grupo SHAM ( $3.49 \pm 0.34$  vs  $1.04 \pm 0.17$ ,  $p < 0.0001$ ). A su vez, el tratamiento con mejor efecto para disminuir la expresión de GATA3 hasta niveles cercanos a los del grupo SHAM, fue el GMP (disminución del 54.73%,  $1.58 \pm 0.12$ ,  $p < 0.001$ ). La reducción lograda con GMP + LGG fue de 31.23% ( $2.40 \pm 0.2$ ; NS) y con LGG de 40.11% ( $2.09 \pm 0.31$ ;  $p < 0.01$ ), en comparación con el grupo AA. En el caso de la IL-13 (figura 40b), el grupo alérgico tuvo 4.1 veces más expresión relativa de esta citocina tipo 2 en tejido intestinal que el SHAM ( $4.35 \pm 0.47$  vs  $1.05 \pm 0.03$ ;  $p < 0.0001$ ). Igual

que con GATA3, el tratamiento con GMP logró la mayor disminución de los niveles de expresión de la citocina (53.10%:  $2.04 \pm 0.27$ ;  $p < 0.01$ ) al comparar con el grupo sin tratamiento, mientras que el tratamiento con GMP + LGG sólo la disminuyó un 38.85% ( $2.66 \pm 0.36$ ;  $p < 0.05$ ). Al analizar los niveles de IL-5 (figura 40c), se apreció un comportamiento similar al de la citocina anterior. El grupo AA mostró 3.6 veces más expresión relativa al comparar contra el grupo SHAM ( $3.80 \pm 0.27$  vs  $1.05 \pm 0.12$ ;  $p < 0.0001$ ), el tratamiento con GMP logró una disminución de 48.94% al comparar con el grupo alérgico ( $1.94 \pm 0.42$ ;  $p < 0.01$ ) y el de GMP + LGG una reducción de 33.59% ( $2.53 \pm 0.24$ ;  $p < 0.05$ ).



**Figura 40. Expresión génica relativa de factores de crecimiento y citocinas asociadas con la diferenciación de las células inmunes a perfiles inflamatorios o reguladores en el intestino de animales alérgicos con o sin tratamiento (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) y su correspondiente SHAM. n = 4. a) GATA3, b) IL-13, c) IL-5, d) T-bet, e) IFN- $\gamma$ , f) ROR $\gamma$ t, g) IL-17, h) IL-22, i) FoxP3, j) IL-10 y k) TGF- $\beta$ . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs SHAM, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs AA, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs LGG. ANOVA de una vía, *post-hoc* de Bonferroni.**

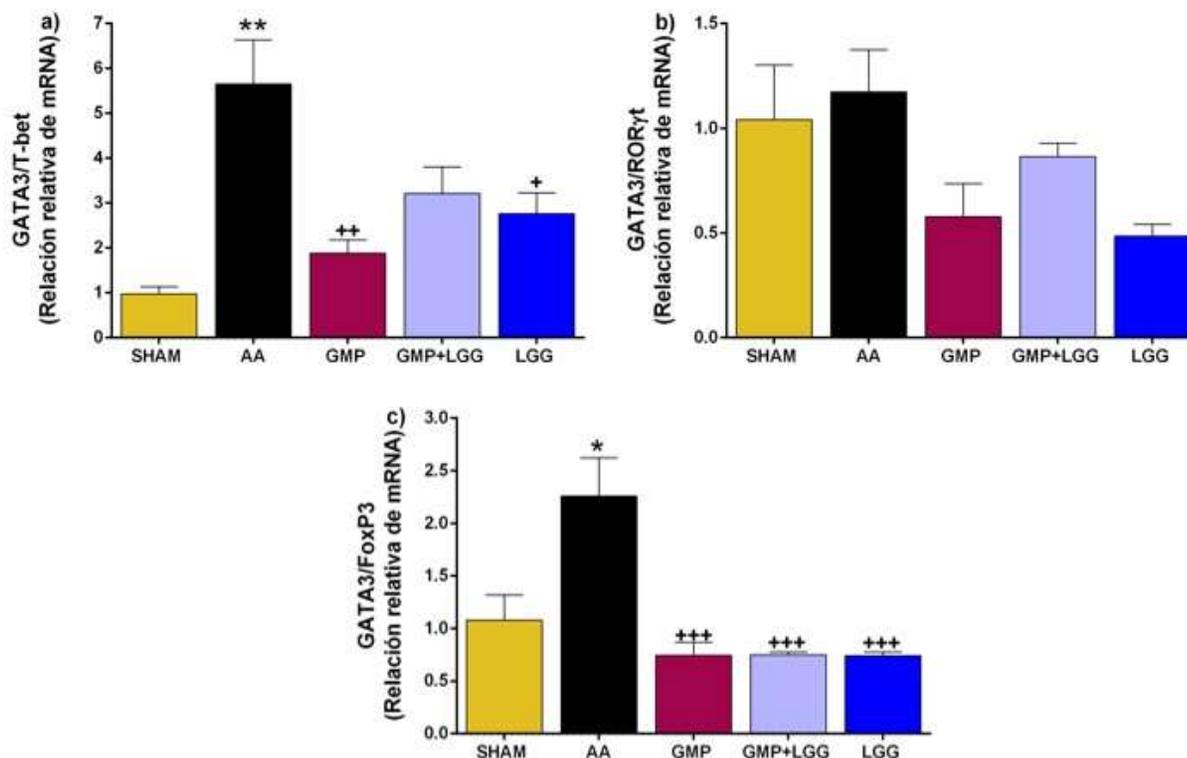
Con relación al análisis del perfil celular tipo 1, se observó que los animales AA tuvieron 40.18% menos expresión génica relativa intestinal del factor regulador de la transcripción T-bet (figura 40d) que el grupo SHAM ( $0.64 \pm 0.04$  vs  $1.07 \pm 0.06$ ; NS). Se apreció solo una tendencia al reestablecimiento de los niveles de expresión de T-bet en el grupo con tratamiento con GMP ( $0.90$

$\pm 0.14$ ; NS) y en el tratado con GMP + LGG ( $0.91 \pm 0.11$ ; NS), sin ser esto estadísticamente significativo. En cuanto al IFN- $\gamma$  (figura 40e), el grupo AA mostró una caída del 95.37% en la expresión génica relativa intestinal de esta citocina con respecto a la del grupo SHAM ( $0.05 \pm 0.01$  vs  $1.08 \pm 0.05$ ;  $p < 0.01$ ). Dicha caída se recuperó en los animales del grupo con LGG, los cuales presentaron una expresión 21.8 veces mayor que el grupo alérgico sin tratamiento ( $1.09 \pm 0.33$ ;  $p < 0.01$ ). Además, este mismo grupo tuvo 5.2 veces más expresión del gen que el grupo tratado con GMP ( $0.21 \pm 0.07$ ;  $p < 0.05$ ).

A continuación, se exploraron los perfiles celulares tipo 17 y regulador. En el primer caso (figura 40f, g, h), se cuantificó la expresión génica relativa de ROR $\gamma$ t (figura 40f). En el grupo alérgico, ésta fue 3.1 veces mayor que en el grupo SHAM, sin ser significativamente diferente ( $3.3 \pm 0.69$  vs  $1.07 \pm 0.12$ ; NS). Aunque ninguno de los grupos de tratamiento modificaron el nivel de mRNA intestinal de ROR $\gamma$ t de los animales alérgicos, el grupo LGG mostró una tendencia al incremento ( $4.39 \pm 0.65$ ; NS). Las interleucinas IL-17 e IL-22 también fueron analizadas a nivel intestinal. En el primer caso (figura 40g, los animales del grupo AA incrementaron 2.5 veces su expresión génica relativa al comparar con el grupo SHAM ( $2.09 \pm 0.22$  vs  $0.83 \pm 0.10$ ;  $p < 0.01$ ). El grupo tratado con LGG aumentó 1.6 veces la expresión génica relativa de IL-17 al comparar contra el AA ( $3.47 \pm 0.24$ ;  $p < 0.01$ ), y además este grupo presentó valores 1.3 veces mayores que el tratado con GMP ( $1.23 \pm 0.29$ ;  $p < 0.01$ ). Al analizar la segunda citocina (IL-22: 40h) no se apreciaron cambios en su expresión génica relativa intestinal entre el grupo AA y el SHAM, ni entre los diferentes tratamientos y el AA.

En el caso del perfil celular regulador, la expresión relativa de FoxP3 (figura 40i) fue semejante entre el grupo AA y el SHAM. Sin embargo, el tratamiento con GMP + LGG incrementó 1.9 veces ( $3.23 \pm 0.32$ ;  $p < 0.01$ ) la expresión relativa del gen al comparar con el grupo AA. Por otro lado, los niveles de IL-10 (figura 40j) fueron significativamente diferentes entre el grupo alérgico y el SHAM, teniendo el primero 8.4 veces más expresión relativa de la citocina a nivel intestinal ( $8.71 \pm 0.52$  vs  $1.03 \pm 0.05$ ;  $p < 0.0001$ ). Ninguno de los grupos tratados mostraron diferencia alguna con el grupo AA. En el caso de TGF- $\beta$  (figura 40k), los animales con alergia presentaron un incremento en los niveles de expresión génica relativa, aunque éste no llegó a ser significativo; con los tratamientos el incremento del nivel de expresión génica relativa de TGF- $\beta$  se acentuó, sin ser tampoco significativo con respecto a los animales del grupo AA ( $1.80 \pm 0.23$ ) y siendo el grupo LGG el de mayor tendencia a la diferencia, con una expresión relativa 1.9 veces mayor ( $3.42 \pm 0.48$ ; NS).

Por último, para indagar sobre el perfil celular predominante en el tejido intestinal de los animales de los diferentes grupos, se calculó la proporción relativa de GATA3 en relación a los otros factores maestros con base en el mRNA (figura 41). Al analizar la relación GATA3/T-bet (figura 41 a), se pudo observar un incremento de 5.8 veces al comparar el grupo AA con el SHAM ( $5.71 \pm 1$  vs  $0.98 \pm 0.16$ ;  $p < 0.001$ ), indicativo del sesgo hacia la respuesta tipo 2 característica del perfil alérgico. Esta relación disminuyó considerablemente con los diferentes tratamientos: 67.07% en el caso del GMP ( $1.88 \pm 0.30$ ;  $p < 0.01$ ), 52.36% con GMP + LGG ( $2.72 \pm 0.49$ ; NS) y 43.78% con LGG ( $3.21 \pm 0.59$ ;  $p < 0.05$ ), resaltando el hecho de que los 3 tratamientos redujeron la respuesta inmune tipo 2 a nivel intestinal a expensas de un aumento en la respuesta del perfil tipo 1.



**Figura 41. Relación relativa de mRNA entre factores reguladores de transcripción en el intestino de animales alérgicos con o sin tratamiento (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) y su correspondiente SHAM. n= 4. a) GATA3/T-bet, b) GATA3/ROR $\gamma$ t y c) GATA3/FoxP3. \*p < 0.01, \*\*p < 0.001 vs SHAM, +p < 0.05, ++p < 0.01, +++p < 0.001 vs AA, ANOVA de una vía, *post-hoc* de Bonferroni.**

No existieron diferencias al comparar la relación GATA3/ROR $\gamma$ t del grupo AA con el SHAM (figura 43b). Sin embargo, con el tratamiento con LGG se apreció una tendencia a la disminución al comparar con los animales alérgicos no tratados ( $0.48 \pm 0.05$  vs  $1.17 \pm 0.20$ ; NS) indicando la posible predominancia del perfil tipo 17. Para finalizar, la relación GATA3/FoxP3 (figura 43c) se encontró incrementada 2.1 veces en los animales AA respecto a los SHAM ( $2.26 \pm 0.37$  vs  $1.07 \pm 0.24$ ;  $p < 0.01$ ). Éste efecto se abolió con los tres tratamientos, teniendo los tres grupos una disminución de 67.26% ( $0.74 \pm 0.12$ ,  $0.74 \pm 0.03$ ,  $0.74 \pm 0.03$ ;  $p < 0.001$ ), y por tanto un aumento de la respuesta reguladora en relación a la alérgica (tipo 2).

#### 7.4.9. Modificaciones histopatológicas en animales con AA tratados con GMP y/o LGG

Se analizaron diferentes variables histológicas en el tejido intestinal extraído 24 h posteriores al reto con el alérgeno, con el objetivo de determinar las modificaciones tisulares inducidas por el desarrollo de la AA así como por los tratamientos administrados a los animales alérgicos. Para ello, cortes de intestino delgado de los animales de los diferentes grupos experimentales se tiñeron con HES (figura 42) que permitió el análisis morfológico del tejido (vellosidades, criptas y muscular interna), así como la identificación de eosinófilos infiltrados en la lámina propia (figura 42a). Los tejidos intestinales de los animales con AA mostraron formas irregulares de las vellosidades, hiperplasia en las criptas, engrosamiento de la capa muscularis interna e infiltrados eosinofílicos, características morfológicas ausentes en los tejidos de los animales del grupo SHAM (figura 42a). Estos resultados muestran las características patológicas típicas de la alergia hacia los alimentos.

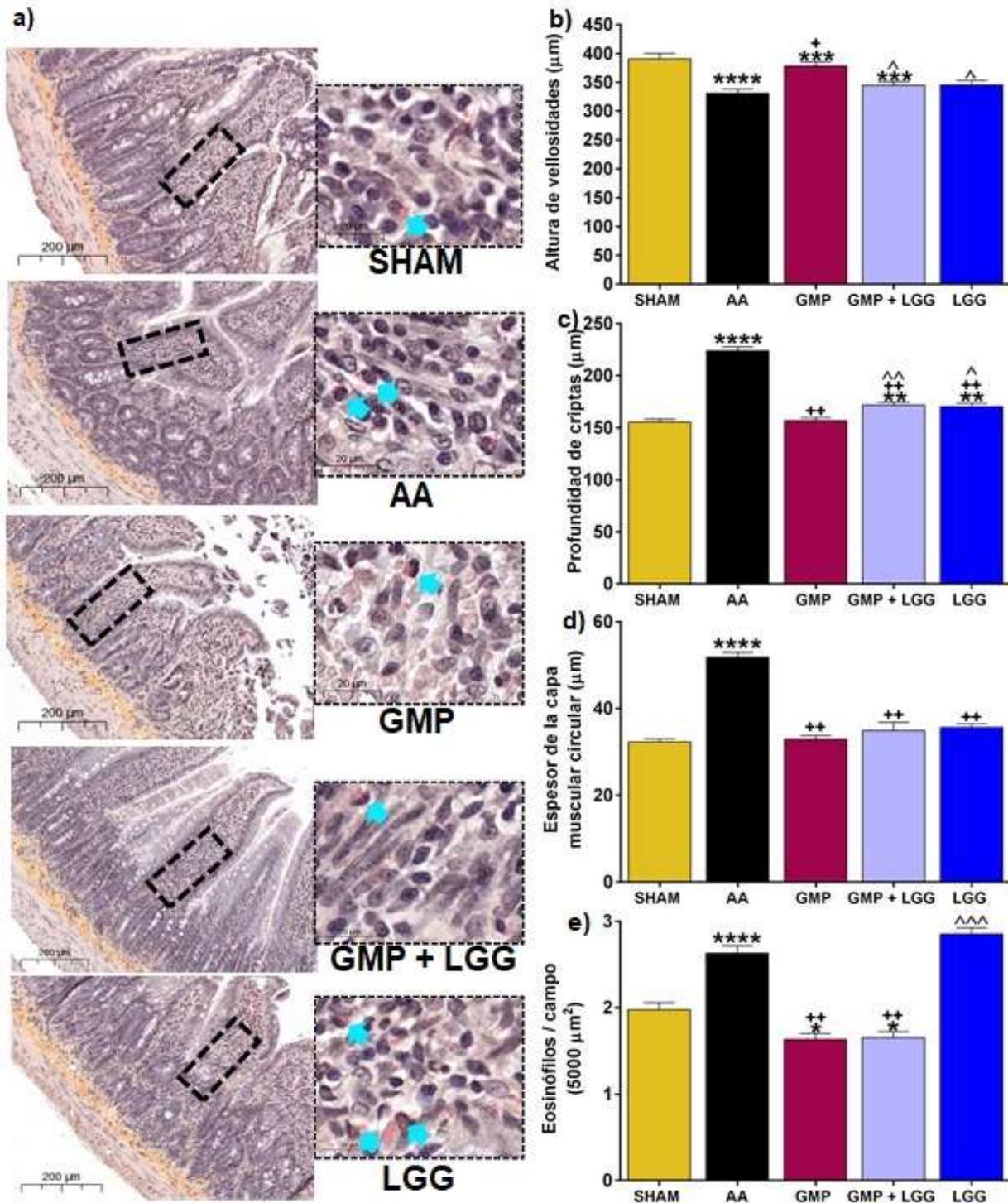


Figura 42. Análisis morfológico y del infiltrado de eosinófilos en el intestino de animales alérgicos con o sin tratamiento (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) y su correspondiente SHAM mediante la tinción de Hematoxilina y Eosina (HES). n= 4. a) Imágenes de la tinción, se marcan con flechas los eosinófilos (HES); b) Altura de vellosidades; c) Profundidad de criptas; d) Espesor de la capa circular muscular; e) Número de eosinófilos/campo (5000µm<sup>2</sup>) \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 \*\*\*\*p < 0.0001 vs SHAM, +p < 0.001, \*\*p < 0.0001 vs AA, ^ p < 0.05, ^^ p < 0.01, ^^ p < 0.0001 vs GMP. ANOVA de una vía, *post-hoc* de Bonferroni.

Se realizó un análisis morfométrico para constatar cuantitativamente las observaciones microscópicas. La primera de las variables morfológicas analizada fue la altura de las vellosidades intestinales (figura 42b), determinándose que los animales con AA presentaron una altura promedio

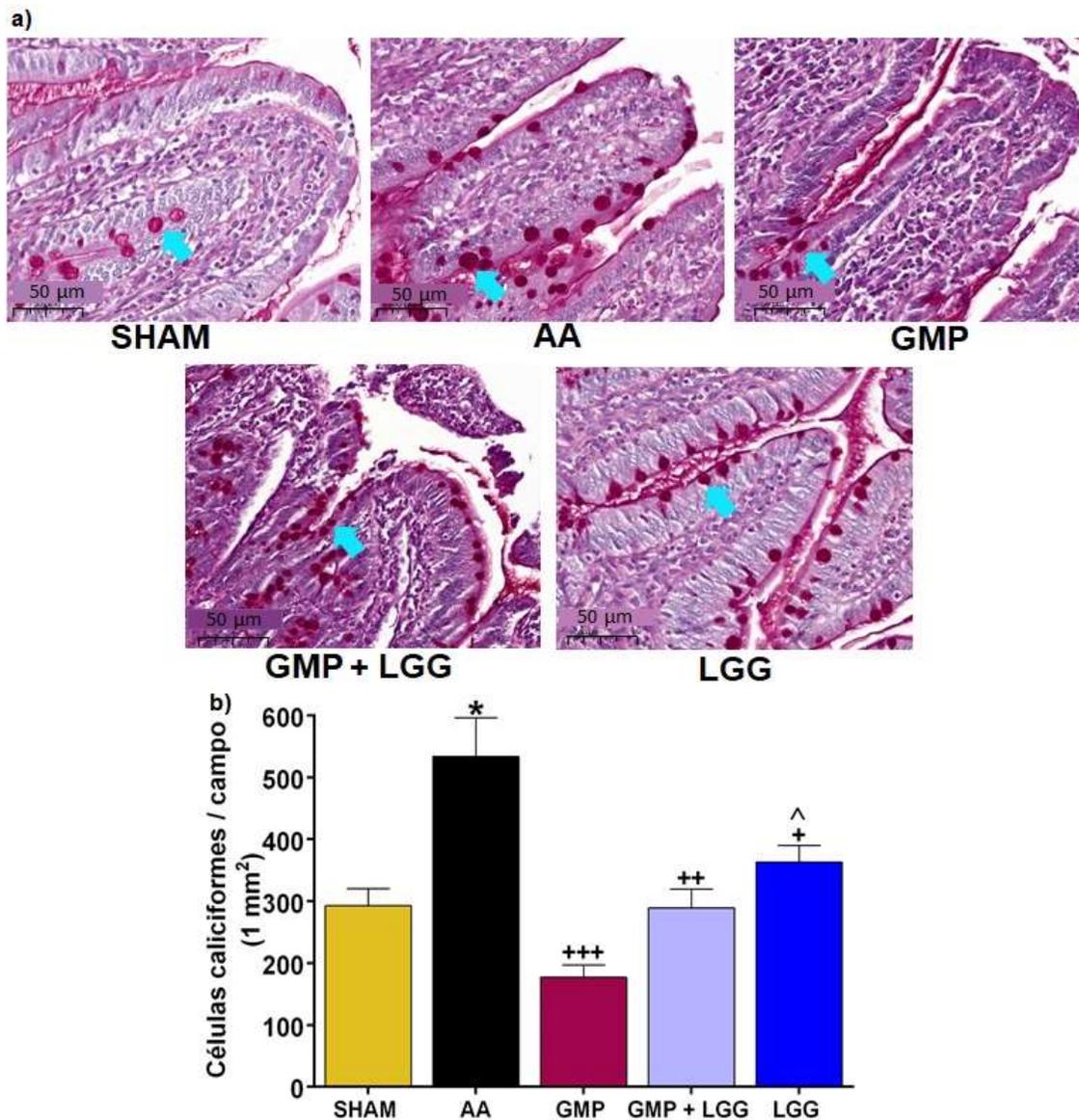
de vellosidades 15.25% menor que los animales SHAM ( $331 \pm 7.27 \mu\text{m}$  vs  $390.6 \pm 9.62 \mu\text{m}$ ;  $p < 0.0001$ ). El tratamiento con GMP mantuvo la altura de las vellosidades semejante a la del grupo SHAM ( $378.4 \pm 7.17 \mu\text{m}$ ;  $p < 0.001$ ), y además este tratamiento mostró vellosidades 1.1 veces mayores a las de los otros tratamientos ( $p < 0.05$ ), los cuales no tuvieron efecto sobre esta variable.

En cuanto al análisis de la profundidad de las criptas intestinales (figura 42c), el grupo AA presentó un incremento 1.4 veces mayor al del grupo SHAM ( $224.00 \pm 3.64 \mu\text{m}$  vs  $155.40 \pm 2.73 \mu\text{m}$ ;  $p < 0.0001$ ). Dicho incremento en la profundidad de la cripta fue abolido en su totalidad en los animales tratados con GMP ( $156.50 \pm 2.79 \mu\text{m}$ ;  $p < 0.0001$ ), mientras que en los animales LGG este incremento solo fue reducido en un 75.86% ( $170.40 \pm 3.20 \mu\text{m}$ ;  $p < 0.0001$ ) y en los animales del grupo GMP + LGG en 78% ( $171.90 \pm 2.76 \mu\text{m}$ ;  $p < 0.0001$ ). Además los grupos GMP + LGG ( $p < 0.01$ ) y el LGG ( $p < 0.05$ ) conservaron criptas con una profundidad 1.1 mayor a las del grupo tratado con GMP.

Al evaluar las diferencias en el espesor de la capa muscular circular (figura 42d), resultó evidente que el grupo AA tuvo un incremento en la misma de 1.6 veces al comparar con el grupo SHAM ( $51.84 \pm 1.06 \mu\text{m}$  vs  $32.32 \pm 0.72 \mu\text{m}$ ;  $p < 0.0001$ ). Esta hipertrofia, fue reducida en los animales que recibieron los diversos tratamientos: GMP (36.4%:  $32.97 \pm 0.80 \mu\text{m}$ ;  $p < 0.0001$ ), GMP + LGG (32.68 %:  $34.9 \pm 1.91 \mu\text{m}$ ;  $p < 0.0001$ ) y LGG (31.23%:  $35.65 \pm 0.82 \mu\text{m}$ ;  $p < 0.0001$ ).

En el caso de los infiltrados de eosinófilos por campo ( $5000 \mu\text{m}^2$ ) en lámina propia (figura 42e), el grupo AA tuvo 1.3 veces más células por campo que el grupo SHAM ( $2.63 \pm 0.08$  vs  $1.98 \pm 0.08$ ;  $p < 0.0001$ ). Los tratamientos con GMP y GMP + LGG redujeron la eosinofilia en un 38.03% y un 36.88% respectivamente ( $1.63 \pm 0.07$  y  $1.66 \pm 0.07$ ;  $p < 0.0001$ ) al comparar contra el grupo alérgico, mientras que el tratamiento con LGG no tuvo efecto sobre la cantidad de estas células en tejido intestinal ( $2.85 \pm 0.07$ ), teniendo 1.7 veces más eosinófilos que los tratamientos con GMP y GMP + LGG ( $p < 0.0001$ ).

Por último, los cortes de los diferentes grupos de animales se tiñeron con PAS (figura 43) para identificar células caliciformes (figura 43a). Los tejidos teñidos con PAS revelaron una marcada hiperplasia de células caliciformes en el epitelio intestinal de las ratas con alergia (figura 43a). Como dato extra, se observó también la presencia de zonas con explosiones exocíticas de moco con destrucción parcial o total de células PAS+.



**Figura 43. Análisis morfológico y del infiltrado de eosinófilos en el intestino de animales alérgicos con o sin tratamiento (AA, GMP, GMP + LGG, LGG) y su correspondiente SHAM mediante la tinción de Hematoxilina y Eosina (HES). n= 4. a) Imágenes de la tinción, se marcan con flechas las células caliciformes; b) Número de células caliciformes/campo (1mm<sup>2</sup>). \*p < 0.001 vs SHAM, \*p < 0.05, \*\*p < 0.001, +++p < 0.0001 vs AA, ^ p < 0.01vs GMP. ANOVA de una vía, *post-hoc* de Bonferroni.**

Por último, se analizó también la cantidad de células caliciformes en el tejido intestinal de los animales de todos los grupos (figura 45 e), observando como el grupo AA presentó casi el doble de células por mm<sup>2</sup> (1.8 veces más) que el grupo SHAM (533.4 ± 62.5 vs 292.7 ± 27.60; p < 0.001). Los tres grupos de alergia con tratamiento registraron una reducción significativa en el número de células caliciformes al comparar con el grupo sin tratamiento. El grupo GMP tuvo 66.81% menor cantidad de células caliciformes (177.00 ± 19.58; p < 0.0001), el grupo GMP + LGG un 45.80% menos (289.10 ± 30.32; p < 0.001) y el grupo LGG un 31.91% menos (363.20 ± 26.37; p < 0.01) al comparar con el grupo AA. Además, el grupo GMP tuvo 51.27% menos células que el tratado con LGG (p < 0.01).

## 8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se logró evaluar el efecto de un péptido bioactivo, el GMP, y un probiótico, el LGG, en un modelo experimental específico de AA. Dicho modelo se caracterizó, logrando así discernir qué variables eran más representativas, y posteriormente se verificaron los cambios en dichas variables tras la implementación de los tratamientos propuestos. Además, simultáneo a la utilización del probiótico LGG junto al GMP *in vivo*, se analizó el crecimiento de la bacteria al adicionar el péptido bioactivo *in vitro*, para así, tener elementos para evaluar más objetivamente el beneficio del tratamiento conjunto con estos agentes.

Primero se determinó el efecto del péptido bioactivo lácteo sobre la proliferación de LGG *in vitro*. La elección de este probiótico se debió a que es un lactobacilo comensal que ha sido uno de los más investigados en la prevención y tratamiento de patologías gastroentéricas (Chaurasia *et al.*, 2016); así como, en su efecto benéfico en patologías alérgicas en modelos murinos (Kim *et al.*, 2012; Jang *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2014).

Los ensayos *in vitro* aquí presentados demostraron el efecto prebiótico del GMP sobre *Lactobacillus rhamnosus*. Dicho efecto se observó con la determinación de la biomasa en condiciones aerobias y anaerobias a las diferentes concentraciones evaluadas de GMP; sin embargo, estas fueron más evidentes en anaerobiosis a la concentración de 0.5% en su medio de crecimiento, lo que se puede asociar con un efecto dependiente de la dosis, como se observó en el trabajo del grupo de Robitaille (2013), donde se reporta que a mayor dosis de GMP, mayor el efecto del péptido sobre la generación de biomasa de *L. rhamnosus* de la cepa RW-9595 en una cinética de 24 h. El anterior efecto, se confirmó con la determinación del porcentaje de acidez en función del ácido láctico; pues se sabe que LGG es una bacteria ácido láctico positiva (Zotta *et al.*, 2014). Tal evaluación solo se determinó en condiciones de anaerobiosis, pues está bien definido que este lactobacilo es un microorganismo fermentativo, anaerobio tolerante al oxígeno (Gammar-Nourani *et al.*, 1998; Zotta *et al.*, 2014). Finalmente, estos resultados sugieren que la colonización de LGG en presencia del prebiótico podría potenciarse en modelos *in vivo* en sitios donde prevalecen condiciones con limitaciones de oxígeno, sobre todo en los primeros meses de vida, etapa en la que se sabe que prevalece el desarrollo de anaerobiosis intestinal (Flemer *et al.*, 2017; Friedman *et al.*, 2018).

Aunado a esto, en modelos *in vitro* también se ha observado que algunos hidrolizados de GMP son capaces de incrementar significativamente la biomasa y producción de ácidos en condiciones anaerobias de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Quian *et al.*, 2014), lo que sería prometedor para numerosas bacterias intestinales benéficas para el hospedero. Así mismo, el crecimiento de numerosos lactobacilos, y otras especies como bifidobacterias y bacteroides ha sido demostrado *in vivo* tras la administración del GMP (Jiménez *et al.*, 2016).

La capacidad del LGG para adherirse y colonizar el tracto digestivo ha sido considerada como una característica importante para que esta bacteria pueda modular ciertos aspectos inmunológicos, como la limitación de patógenos (Tuomola *et al.*, 1999, Tuomola-Salminen, 1998), y aunque ya se tienen algunos datos de que es buen productor de biopelículas *in vitro* (Lebeer *et al.*, 2007), hasta lo que se sabe ahora, no se había estudiado el efecto del efecto del péptido en el metabolismo de la cepa aquí reportada de esta bacteria. Sin embargo, aún falta trabajo por hacer para demostrar cuales son los mecanismos mediante los cuales el GMP modula la propagación de LGG.

Las AA continúan siendo una patología compleja con mecanismos multicausales que constituye un riesgo para la salud y calidad de vida de quienes la padecen (De Martinis *et al.*, 2020; Reyes-Pavón

*et al.*, 2020). Si bien existen ya algunos tratamientos que intentan disminuir la sintomatología y preservar la homeostasis en los individuos alérgicos a alimentos (Sampath *et al.*, 2018; Licari *et al.*, 2019), éstos aún no son accesibles a toda la población ni han logrado resolver definitivamente el problema (Boyce, 2009). Algunas otras estrategias como la utilización de componentes bioactivos en alimentos (Kurup-Barrios, 2008; Gallo *et al.*, 2014), así como la utilización de probióticos (de Azevedo *et al.*, 2013; Sharma-Im, 2018) han sido exploradas para evaluar sus efectos en diferentes escenarios de AA.

Además, muchos de los tratamientos de la alergia han sido descritos como caros y por la historia natural de la enfermedad, el costo de hospitalizaciones y días de cuidado de los pacientes normalmente pediátricos también es inaccesible para muchas familias. Se estima que el costo total anual de servicios médicos por el tratamiento de la AA llega a \$2016 dólares (\$40,320 pesos) en los adultos (Fox *et al.*, 2013), mencionándose que en los niños esto puede ser hasta de \$724 dólares (equivalente a 14,480 pesos) (Gupta *et al.*, 2013); partiendo de estos datos, se puede observar que el tratamiento propuesto en nuestro trabajo, además de ser de origen natural podría considerarse mucho más accesible para pacientes que tengan la patología. En el caso del tratamiento con GMP, el precio actualizado del Lacprodan 20, producto con el ingrediente activo utilizado en este proyecto es de 125 dólares/kg (2500 pesos), lo que se utilizaría en un periodo de un mes en el tratamiento de un adulto, tomando como base otros trabajos donde ya se ha utilizado en pacientes (Hvas *et al.*, 2016) y podría pensarse que en un niño la dosis se reduce a un tercio de lo establecido para adultos, por lo que el precio mensual del tratamiento ascendería a 830 pesos mensuales.

En el caso del tratamiento con probióticos, el precio depende del tipo de bacteria utilizada, el tiempo de colonización de la misma, así como la formulación y el vehículo del probiótico; sin embargo, existen pocos datos del impacto económico del tratamiento preventivo o terapéutico de los probióticos, aunque para patologías como la diarrea secundaria a infección por *Clostridium difficile*, se estimó en un estudio en niños y adolescentes con antibioterapia que el precio de un tratamiento promedio con probióticos entre los que incluyeron *Saccharomyces boulardii* y *Lactobacillus rhamnosus* está en 2.38 dólares diarios, sumando en promedio 71.4 dólares mensuales, lo que equivaldría a 1530 pesos mexicanos (Li *et al.*, 2018).

En este trabajo se utilizaron ratas Wistar macho como sujetos de estudio, ya que la cepa se ha reportado capaz de presentar una respuesta inflamatoria de hipersensibilidad tipo I, mediada por IgE, así como las manifestaciones clínicas asociadas a la patología (Shihabor *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2013; Bheroo *et al.*, 2015). En este trabajo se evaluaron dos modelos uno sistémico y otro oral, la gran diferencia entre ellos radicaba en las inmunizaciones, una de las cuales fue v.o. y la otra i.m. además de que en la segunda se emplearon adyuvantes. La caracterización del modelo de AA por OVA evidenció que el protocolo de sensibilización realizado en los animales del grupo AA-IM fue el más adecuado para reproducir los efectos de la patología en variables clínicas, extravasación intestinal, niveles de IgE alérgeno-específica e histamina séricos. Lo anterior, probablemente se deba a que algunos de los modelos de AA en los que no se utilizan adyuvantes han mostrado poca reproducibilidad y resultados variables en cuanto al grado de sensibilización logrado, ya que se puede desarrollar tolerancia a los antígenos alimenticios además de que numerosas modificaciones de éstos pueden tener lugar durante su paso por el tracto GI, lo que puede modificar el potencial alérgico de la molécula (Knippels *et al.*, 1999; Dearmen *et al.*, 2001; Chehade *et al.*, 2005, Dunkin *et al.*, 2011). Por lo anterior, se propone que la sensibilización con adyuvantes y la administración de retos orales son necesarios para desarrollar el modelo de AA con la presentación GI de signos en rata Wistar.

La caracterización del protocolo se llevó a cabo de acuerdo con lo reportado anteriormente para modelos de sensibilización oral con o sin adyuvantes (Abri-Gil *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2013). La IgE ha sido considerada desde 1970 (Stechschulte, 1970) una parte crucial del establecimiento de las reacciones anafilácticas mediadas por mastocitos sensibilizados y expuestos a antígenos de numerosas especies murinas como el ratón (Shida *et al.*, 2000) o la rata, animal en el que se ha demostrado la producción de IgE específicas como variable clásica de la patología alérgica (Anvari, 2019). En nuestro modelo IM, la producción de la IgE se perpetuó mediante la administración de retos orales, sin presentarse tolerancia al alérgeno en las condiciones antes mencionadas. La presencia de esta Ig puede deberse al efecto sinérgico entre el hidróxido de aluminio y *B. pertussis* que se utilizaron como adyuvantes (Dong *et al.*, 2003; Terhune-Deth, 2013).

Por otro lado, se evaluó el nivel sérico de histamina y de rMCP-II el día 40, en el cual estas variables no resultaron descriptivas de la manifestación de la AA, probablemente por una saturación del sistema de cuantificación. Incluso en el caso de la rMCP-II, se sabe que los mastocitos productores de la misma residen principalmente en la mucosa intestinal (Fu *et al.*, 2015; Albert-Bayo *et al.*, 2019). Debido a ésto, se cuantificó nuevamente la histamina, pero ahora el día 27, día en que ya se ha establecido la alergia oral tras las administraciones de los refuerzos orales de OVA, encontrándose que estos valores se ven significativamente incrementados, como se ha visto en otros modelos (Li *et al.*, 1999; Akiyama *et al.*, 2001). La liberación de histamina sérica por los mastocitos de la mucosa intestinal desencadena manifestaciones GI, semejantes a las evaluadas para otros modelos de AA en ratón (Benedé-Berín, 2018; Li *et al.*, 2000), reportándose a la diarrea como un signo importante de afectación localizada del proceso alérgico. Sin embargo, no se apreció el desarrollo del choque anafiláctico por no existir cambios en temperatura ni en presión arterial. En otros modelos con ratones BALB-c y trinitrofenil-OVA como alérgeno (Strait *et al.*, 2011) se ha observado que el antígeno ingerido debe ser absorbido sistémicamente para inducir anafilaxia sistémica, por lo que se comprobó que la sola interacción con los mastocitos en la interfaz entre las vellosidades y el lumen intestinal no es suficiente para desencadenar el proceso alérgico sistémico ni sus manifestaciones completas. Como se ha reportado en la literatura, la diarrea alérgica implica la participación de mecanismos dependientes de IgE y mastocitos, y no se acompaña con signos de choque anafiláctico (Brandt *et al.*, 2003; Yesim-Kucuck *et al.*, 2012). Los niveles de histamina y rMCP-II evaluados en suero en el modelo de estandarización AA-IM no lograron provocar choque anafiláctico, pero sí inducen signos GI propios de la AA. Además, en el modelo AA-O ninguno de estas variables se modificaron durante el desarrollo del modelo. Junto a las manifestaciones GI, nuestros animales mostraron otros signos como conducta de rascado y piloerección, lo cual puede estar relacionado con la secreción de otros mediadores relacionados con la reacción de urticaria tras la ingesta de ciertos alimentos, ya descritos en artículos clínicos (Commins *et al.*, 2019).

El GMP derivado de la porción  $\kappa$ -caseína láctea tiene numerosas actividades biológicas que implican un impacto positivo en la salud de quien lo consume (Córdova-Dávalos *et al.*, 2019). En este trabajo se demuestra que su administración profiláctica logra atenuar el desarrollo del fenómeno alérgico GI inducido por OVA disminuyendo las IgE e IgG1 alérgeno-específicas, cuya síntesis es mediada por el perfil celular tipo 2 (Gracie-Bradley, 1996; deJonge *et al.*, 2008). Ambas Igs han sido mencionadas como actores importantes de la AA en modelos murinos (Sun *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2019; Jiang *et al.*, 2019) aunque se sabe que también forman parte de las respuestas anafilácticas humanas (Muñoz-Cano *et al.*, 2016). En el caso de la IgE se aprecia un incremento progresivo luego de la sensibilización y las dosis orales, el cual se mantiene hasta el día 40 de la evaluación, mientras que para la IgG1 se observa su pico máximo luego de las dosis orales. El GMP reduce los niveles

de IgE al día final de su evaluación, y en el caso de IgG1, se aprecia igualmente una disminución en el momento del pico máximo. La IL-13 se ha relacionado con la síntesis de IgE y el TGF- $\beta$  con la diferenciación al perfil Th2 (Punnonen *et al.*, 1993; Kuwahara *et al.*, 2012). Además, anteriormente ya se había constatado que la administración oral del péptido disminuye IL-13 e incrementa TGF- $\beta$  en esplenocitos de rata Wistar (Jiménez *et al.*, 2012; Jiménez *et al.*; 2016). Estos mismos efectos podrían mediar la disminución de IgE en este modelo de AA. Además, se ha demostrado la necesidad de altas cantidades de citocinas del tipo 2 durante la síntesis de esta Ig, mientras que para IgG1 la cantidad de citocinas necesaria es menor (Snapper *et al.*, 1998). Los efectos moduladores del GMP en dichas citocinas puede ser suficiente para disminuir la producción de IgE, alterando parcialmente la síntesis de IgG1 y ralentizando la aparición de su pico máximo. En este sentido, en un modelo en ratón con sensibilización a  $\beta$ -lactalbúmina y utilización del adyuvante completo de Freund con una alimentación suplementada con GMP y que incluía OVA, se aprecia que las respuestas de IgE e IgA no se modifican mientras que la de IgG OVA específica y  $\beta$ -lactalbúmina específica se anula (Monnai *et al.*, 1998). La actividad reguladora del GMP parece estar inclinada hacia la respuesta sistémica humoral predominantemente desencadenada por el alérgeno.

Por su parte, LGG es un lactobacilo con actividad inmunomoduladora que tiene efectos reguladores a nivel intestinal que suelen repercutir en otras variables sistémicas citoprotectoras (Yan-Polk, 2012). Actualmente, existen datos de la administración del LGG durante periodos más cortos a ratones que apuntan hacia la disminución del patrón alérgico (Jang *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014). En nuestro modelo, la administración de LGG fue el tratamiento que generó una mayor reducción de los niveles de IgE sérica, pero no moduló los niveles de IgG1. El efecto sobre los niveles de IgE sérica concuerda con los datos de otros modelos de AA murina donde se ha utilizado esta terapéutica con LGG o con otros probióticos. En el primer caso, al analizar un modelo de alergia a  $\beta$ -lactoglobulina con administración de LGG, se apreció una disminución importante en esta Ig relacionada al perfil Th2 (Fu *et al.*, 2019). Igualmente, en un modelo de ratón con sensibilización a OVA, tratado con *Lactobacillus casei shirota* se demostró una disminución de la respuesta IgE e IgG1 (Shida *et al.*, 2002), lo que apoya el efecto positivo de la administración de probióticos en las AA, aunque los efectos en humanos aún no se han aclarado. En ratas el mecanismo mediante el cual se logra la disminución en los títulos del anticuerpo en este grupo podría ser el cambio de perfil celular predominante, que como ya se sabe está relacionado con la producción de diferentes inmunoglobulinas (Mossmann *et al.*, 1986), que en este grupo tiene una tendencia al tipo 1 y regulador, mientras que en AA la tendencia apunta al tipo 2, lo que se discute en detalle más adelante.

En el caso de la IgG1, se aprecia un incremento al día final de la evaluación. Los niveles de este anticuerpo son controversiales, aunque la mayoría de los estudios apunta a que esta Ig suele disminuir en organismos alérgicos luego del tratamiento con probióticos (Shida *et al.*, 2002; Yeun *et al.*, 2008; Thang *et al.*, 2011).

Además de la respuesta fundamental de tipo IgE, se sabe que los niveles de histamina se asocian con los signos clínicos, fundamentalmente los de tipo GI (Lin *et al.*, 2000; Golden *et al.*, 2004). Nuestros resultados muestran que los valores séricos de histamina se encuentran disminuidos en el tratamiento con GMP, lo que a su vez se refleja en la disminución de los signos clínicos. Además, otra variable importante en el desarrollo de la anafilaxia son los infiltrados de mastocitos (Ahrens *et al.*, 2012). La activación de éstos durante su encuentro con el alérgeno induce su desgranulación y la liberación de numerosos mediadores vasoactivos, enzimas y citocinas (Santos *et al.*, 1999, Rivera

*et al.*, 2006). De todos ellos, la histamina puede inducir efectos como la vasodilatación, el incremento en la permeabilidad vascular y la inflamación tisular (Claesson-Welsh, 2015) y ha sido asociada con la aparición de diarrea en los animales con AA (Wang *et al.*, 2016). LGG ha demostrado ser capaz de regular la expresión génica en mastocitos humanos luego de unas horas de estimulación. Si bien se observó que esta bacteria es capaz de regular más de 300 genes de la célula, es de interés mencionar que logra regular genes de activación mastocitaria, como las subunidades  $\alpha$  (Fc $\epsilon$ RIA) y  $\gamma$  (Fc $\epsilon$ RIG) y el receptor de histamina HRH4 (Oksajarhu *et al.*, 2011). Como ya se ha demostrado anteriormente, los ratones deficientes en el receptor Fc $\epsilon$ RI son incapaces de desarrollar respuestas anafilácticas luego de la sensibilización (Kinet, 1999).

Tal como diversos autores lo han mencionado ya, la modulación de la respuesta inmune en modelos murinos hacia un perfil Th2 frente a alérgenos alimenticios, favorece dicha respuesta inflamatoria (Van Kampen *et al.*, 2005, Cardoso *et al.*, 2009). Algunas citocinas como el TNF- $\alpha$  se han relacionado con el reclutamiento de células inflamatorias como neutrófilos y eosinófilos y se sabe que se encuentra incrementado en el caso de pacientes con AA (Galli *et al.*, 2008; Kara *et al.*, 2020). Por su parte, la IL-1 se ha relacionado al proceso de anafilaxia intestinal en modelos de cuyos donde la administración del antagonista de IL-1 previene la hipersecreción colónica inducida por alérgeno (Theodorou *et al.*, 1993; Theodorou *et al.*, 1994). Además, existe retroalimentación positiva entre esta citocina y la histamina: la IL-1 logra inducir la secreción mastocitaria de histamina y a su vez los mediadores mastocitarios incrementan la producción de IL-1 (Subramanian *et al.*, 1987; Rola-Pleszczynski *et al.*, 1985). Así, un menor número de mastocitos intestinales en los animales tratados con GMP y la expresión disminuída de TNF-  $\alpha$  e IL-1 $\beta$  podría causar la supresión de la diarrea y la inflamación intestinal tras el reto con el alérgeno. Esto concuerda con el efecto antiinflamatorio del péptido descrito ampliamente en modelos experimentales de ileítis, enteropatía por uso de antiinflamatorios no esteroideos y donde también se acompaña con disminución en la expresión de dichas citocinas (Requena *et al.*, 2008; Cervantes-García *et al.*, 2020), e incluso con modelos experimentales de otras patologías como la fenilcetonuria donde se evalúa una reducción en estas mismas citocinas a nivel plasmático y por tanto en la inflamación en ratones que recibieron tratamiento con el péptido (Sawin *et al.*, 2015).

En el caso de los animales con tratamiento con LGG, el efecto del probiótico sobre las manifestaciones clínicas luego del reto con el alérgeno es contrario a lo que se esperaba al ver el descenso de los títulos de IgE. Como se ha mencionado anteriormente, la inversa del título de anticuerpos IgE antiOVA específicos comprobó en este grupo no se desarrollan manifestaciones que concuerden con el proceso de anafilaxia además la presentación de los síntomas, tampoco concuerda con el inicio precoz de este cuadro que suele ser minutos después de la ingesta del alérgeno, normalmente antes de la primera hora de contacto con éste (Li *et al.*, 2000, Finkelman *et al.*, 2005). La gravedad del patrón diarreico final y algunos cambios no incluídos en la evaluación de la puntuación de signos de los animales que denotaban mayor irritabilidad, malestar así como molestias GI en estos animales podrían relacionarse con efectos de modificación de la microbiota propia del huésped por el lactobacilo, que ya se ha demostrado capaz de colonizar el estómago en modelos en ratas Sprague-Dawley desde el tercer día del tratamiento (Lam *et al.*, 2007) y de colonizar intestino (DebMandal *et al.*, 2012). Como se ha mencionado en artículos recientes, un aspecto central en la colonización del probiótico y de los efectos que ocasione es el impacto individualizado dependiendo del microbioma intestinal preexistente y de las características específicas del huésped, cepa y otras diferencias (Zmora *et al.*, 2018). En este caso, el daño GI por la alergia podría ocasionar la sobre-colonización de la bacteria lo que generaría modificaciones en

el equilibrio de la microbiota de los animales. En el caso de otros probióticos como *Bifidobacterium longum* AH1206 se ha abordado ya el hecho de que las características de persistencia de un microorganismo de colonización alóctona sean determinadas por el nicho al que se introduce (Maldonado-Gómez, 2016) teniendo por tanto efectos positivos o negativos. El único dato donde se menciona un efecto nocivo secundario a dosis diarias más altas del lactobacilo durante un periodo corto de tiempo es el de su administración en ratones durante un modelo de enteropatía por antiinflamatorios no esteroideos, donde el lactobacilo incrementa la ulceración en el tejido así como la actividad de la mieloperoxidasa (Kamil *et al.*, 2007). Sería importante evaluar la existencia de una disbiosis o de traslocación bacteriana en el microambiente intestinal del huésped, que luego del reto final con el alérgeno sea el origen de la diarrea y las manifestaciones GI observadas en estos animales, por el incremento de bacterias capaces de generar mayor cantidad de citocinas proinflamatorias y estimular otras células que agraven las manifestaciones en este nivel.

Por su parte, el GMP tiene efectos de tipo regulador mastocitario (Jiménez *et al.*, 2016), observándose como logra inhibir la activación de dichas células y la liberación de histamina en respuesta al alérgeno. Además, otros autores han descrito también que junto con anafilaxia intestinal sobreviene un proceso de incremento en la permeabilidad intestinal en ratones (Brandt *et al.*, 2013), en ratas (Chen *et al.*, 2014) y en humanos con AA (Ventura *et al.*, 2006). La IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  son capaces de alterar la función de barrera en este órgano, mientras que el TGF- $\beta$  la preserva (Lee, 2015). En este trabajo no se evaluó el cambio en la permeabilidad intestinal como una variable asociada a la AA, pero nosotros inferimos que el efecto inhibitorio del GMP sobre la expresión de las citocinas inflamatorias IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , así como el incremento en la expresión de TGF- $\beta$  inducido por el péptido en el intestino de los animales AA, podría estar participando en el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal, como se ha demostrado *in vitro* en líneas celulares de enterocitos y células caliciformes (Feeney *et al.*, 2017; Arbizu *et al.*, 2020). Esta propuesta se fundamenta en estudios donde se observa que el GMP es capaz de inhibir cascadas de señalización de la expresión de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  como las de NF- $\kappa$ B y MAPK en mucosa intestinal de ratones con colitis ulcerativa (Cui *et al.*, 2017), líneas celulares caliciformes (Arbizu *et al.*, 2020), enterocitos maduros (Foisys-Sauvé *et al.*, 2020) y macrófagos (Cheng *et al.*, 2015). Además, la homeostasis a nivel de barrera intestinal se mantiene a través de las células de la barrera, el sistema inmune de mucosas y las bacterias de microbiota intestinal (Maloy-Powrie, 2011), por lo que la terapéutica con probióticos sería de utilidad. Específicamente, la administración del LGG se ha propuesto como capaz de disminuir la inflamación intestinal mediante la disminución de citocinas inflamatorias (Hougee *et al.*, 2010; Schiavi *et al.*, 2011). Nuestros resultados muestran que la administración de LGG inhibe la expresión génica de IL-1 $\beta$  y aumenta la de TGF- $\beta$  en tejido intestinal de animales con AA, así como se ha mostrado en pacientes lactantes con dermatitis atópica por alergia a la proteína de leche de vaca, en los que se observó una disminución de TNF- $\alpha$  y anti-tripsina  $\alpha$ -1 fecal (Majamaa-Isolauri, 1997). Del mismo modo, en el caso del tratamiento con LGG se tienen datos de que, su utilización en ratas lactantes simultánea a un estímulo alérgico continuo con leche de vaca que es capaz de incrementar la permeabilidad intestinal, contrarrestan este efecto, contribuyendo en la estabilidad de las funciones de barrera de la mucosa de este órgano (Isolauri *et al.*, 1993). Otros modelos de daño intestinal que evalúan la terapéutica con este lactobacilo, también muestran como el tratamiento promueve el efecto de barrera a través de la modulación de TLRs (Wang *et al.*, 2019) y como numerosos metabolitos suyos disminuyen la permeabilidad normalizando la expresión de proteínas de unión estrecha con mecanismos dependientes de la activación de MAPK/ERK (Han *et al.*, 2019), lo que resalta que las terapéuticas actuales más novedosas no solo incluyan al lactobacilo si no a postbióticos derivados de éste que

logran la disminución de la permeabilidad intestinal (Gao *et al.*, 2019). Por último, ya se ha descrito para otra cepa de *L. rhamnosus* JB-1, que la administración oral de la misma dosis usada en este trabajo logra efectos sistémicos inhibiendo canales de calcio  $IK_{Ca}$  de los mastocitos peritoneales, lo que puede contribuir de igual forma a la disminución en la desgranulación de estas células (Forsythe *et al.*, 2012). Se requiere continuar con la investigación en esta área para demostrar el efecto directo del GMP y del LGG sobre la permeabilidad intestinal.

La exposición continua al alérgeno induce cambios tisulares que se relacionan con la fase tardía de la reacción de AA y al estado inflamatorio crónico intestinal (Yang *et al.*, 2001). En este trabajo, la inducción de AA generó reducciones en la longitud de las vellosidades, incremento en la profundidad de las criptas y engrosamiento de la capa muscular interna. Esto se acompañó de hiperplasia de eosinófilos en lámina propia y de células caliciformes en epitelio intestinal. Además, se presume que existe un incremento en las poblaciones mastocitarias ya que se evaluó un incremento en la expresión génica relativa de McptII. Estas alteraciones intestinales coinciden con lo reportado por diversos autores (Nakajima-Adachi *et al.*, 2014; Saldanha *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2016). El tratamiento con GMP previno las alteraciones histopatológicas intestinales de la AA, un efecto que podría disminuir la gravedad de la diarrea como se ha manifestado al evaluar esta relación en manifestaciones GI de niños con AA (McCalla *et al.*, 1980). Además, el tratamiento conjunto de GMP + LGG no modificó el efecto logrado por el péptido mientras que la sola administración del LGG sólo disminuyó la profundidad de las criptas y el espesor de la capa muscular interna. Anteriormente se ha reportado que la sobreexpresión de IL-5 en ratones incrementa los eosinófilos en lámina propia, submucosa y vellosidades GI (Mishra *et al.*, 2001). La IL-13 producida por células inflamatorias se relaciona con el incremento en la cantidad de eosinófilos, mastocitos y células caliciformes (McKenzie *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2010). Por lo anterior, el efecto inhibitorio del tratamiento con GMP sobre el aumento en la cantidad de estas células, principalmente de los mastocitos y células caliciformes, en los animales alérgicos concuerda con la disminución de la expresión de IL-5 e IL-13 en tejido intestinal. Estos resultados coinciden con el efecto protector reportado anteriormente en procesos inflamatorios crónicos en pulmón o piel asociados al asma o la dermatitis atópica (Roldán *et al.*, 2016; Muñoz *et al.*, 2017; Jiménez *et al.*, 2020). Además, se refuerzan por el hecho de que el tratamiento con LGG no redujo significativamente la expresión IL-5 e IL-13, ni tampoco la eosinofilia intestinal. Por último, el incremento en células caliciformes, así como la hipersecreción de moco ya han sido ligados a la inflamación alérgica, pudiendo ser un fenómeno dependiente de IL-4 (Dabaggh *et al.*, 1999), una interleucina bien conocida en el caso de la alergia; dicha sobreproducción de moco podría intentar limitar la absorción del alérgeno en las AA en el intestino en un intento de protección tisular. En el caso del tratamiento con LGG, al igual que en el de GMP, la disminución en la hiperplasia de estas células podría asociarse con un efecto benéfico, disminuyendo la cantidad de algunas mucinas a nivel intestinal, tal como ha sido demostrado con el *Lactobacillus casei rhamnosus* (Kim *et al.*, 2020); aunque ninguno de los tratamientos modificó la sobreexpresión de MUC2 inducida por el desarrollo de la AA. Por otro lado, se ha demostrado que los factores solubles de LGG, p70 y p40 juegan un papel protector en el intestino, ya que disminuyen la apoptosis de las células epiteliales inducida por citocinas proinflamatorias (Yan-Polk *et al.*, 2002), mejoran la supervivencia de las criptas intestinales y preservan la integridad del citoesqueleto intestinal en modelos murinos de colitis (Yan *et al.*, 2011; Yan Fong *et al.*, 2016).

Para poder evaluar el mecanismo de acción del GMP y el LGG; así como de la combinación de los tratamientos, se evaluó la expresión de citocinas y factores de la transcripción de los perfiles celulares tipo 1, 2, 17 y regulador, en tejido intestinal de los animales de los diferentes grupos

experimentales. En la patología alérgica, la aparición de la inflamación intestinal se genera en gran medida por las citocinas tipo 2, sintetizadas principalmente por células Th2 (Reyes-Pavón, 2020). El factor maestro de la transcripción que rige la diferenciación de células al perfil tipo 2 y la síntesis de citocinas específicas (IL-5 e IL-13) es GATA-3 (Zhu *et al.*, 2004). Dentro de la patogenia de la AA, la IL-5 participa en la diferenciación eosinofílica, la activación y supervivencia de estas células, quienes logran infiltrarse en el tejido intestinal y prolongar la inflamación (Furuta *et al.*, 2014; Travers *et al.*, 2015). Además, la IL-13 participa en la diferenciación de células Th2 y la producción de IgE (McKenzie *et al.*, 1998; Nussbaum *et al.*, 2013; Travers *et al.*, 2015). En este trabajo, la respuesta celular más importante fue la de tipo 2, caracterizada por niveles altos de expresión de GATA-3, IL-5 e IL-13, así como de la relación GATA3/Tbet y GATA3/FOXP3, tal como se ha demostrado anteriormente en modelos experimentales y humanos (Schade *et al.*, 2000; Brandt *et al.*, 2003; Gowthaman *et al.*, 2019). Además, en los animales con AA, la expresión intestinal de IFN- $\gamma$  y T-bet disminuyeron y la de IL-10, IL-17 y ROR $\gamma$ t incrementaron como lo indica la literatura (Brandt *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2017).

La administración de GMP disminuyó significativamente la expresión de GATA-3, IL-5 y IL-13 en el intestino de los animales alérgicos lo que acompaña los hallazgos en cuanto a la reducción de eosinófilos, células caliciformes y expresión intestinal de IgE en estos animales. El efecto antiinflamatorio del GMP en modelos de asma y dermatitis atópica también se ha relacionado con disminución en estas interleucinas en el tejido afectado (Roldán *et al.*, 2016; Muñoz *et al.*, 2017). Por su parte, el tratamiento con LGG logró también disminuir los niveles de GATA3, con una tendencia a la disminución de la IL-5 y la IL-13, lo cual ya se ha comprobado en otros modelos de tratamiento de la AA con el lactobacilo, observando como disminuye también la expresión de IL-4 y mantiene los valores normales de IFN- $\gamma$  (Fu *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2020). Además, la administración de este lactobacilo, mostró una tendencia al incremento de ROR $\gamma$ t e IL-17. Particularmente se ha identificado que uno de los principales motivos para el desencadenamiento o agravamiento de las AA, puede ser la microbiota (Ling *et al.*, 2014), y estudios recientes indican que la expresión de ROR $\gamma$ t en células T reguladoras inducidas por bacterias clostridiales comensales y analizadas en muestras fecales humanas, se relaciona con la tolerancia a las AA mediante una vía dependiente de Myd88 (Abdel-Gadir *et al.*, 2019). Aunque se han destacado varios mecanismos en probióticos que conducen a la generación de estas células reguladoras luego de la administración de probióticos, los mecanismos difieren del microorganismo que se usa como agente terapéutico y desencadena la producción del factor de transcripción (Ohnmacht *et al.*, 2015; Britton *et al.*, 2019). Las citocinas del perfil Th17 han sido exploradas a nivel intestinal en modelos de diarrea infecciosa en cerdos, donde se aprecia que dosis altas del probiótico ocasionan una respuesta Th17 mientras que dosis bajas únicamente ejercen un efecto regulador (Zhu *et al.*, 2014).

Otras variables que relacionadas con la actividad inmunomoduladora del GMP fueron la sobreexpresión de TGF- $\beta$  en el intestino de los animales junto con incrementos en IFN- $\gamma$ , T-bet, así como Foxp3, además de las disminuciones en las relaciones GATA3/T-bet, y GATA3/Foxp3. Se sabe que TGF- $\beta$  es capaz de disminuir la diferenciación celular de los linfocitos Th2 inhibiendo la expresión del factor de transcripción GATA3. Además, hacia 2005 Okamoto y colaboradores notaron que esta misma citocina era capaz de suprimir a GATA3 e incrementar la expresión de IFN- $\gamma$  y T-bet en un modelo de AA en ratones transgénicos, lo que se acompaña de una disminución en los niveles de IgE OVA-específicos y de la magnitud de la reacción anafiláctica (Okamoto *et al.*, 2005). Además, hay constancia del efecto anti-alérgico que ejercen algunos probióticos que logran cambiar la respuesta predominante Th2 de la AA a las de tipo Th1 y Treguladora (Zhang *et al.*,

2017; Shin *et al.*, 2018). Anteriormente se describió que la administración oral del péptido a ratas sensibilizadas aumenta la cantidad de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Bacteroides*, así como la producción de TGF- $\beta$  por esplenocitos estimulados por alérgeno (Jiménez *et al.*, 2016). En este modelo, la evidencia apunta a que el GMP protege de las manifestaciones clínicas y las alteraciones intestinales con base inflamatoria que ocurren durante la AA mediante el redireccionamiento de las respuestas inmunológicas hacia los perfiles Th1 y T reguladores evitando el desarrollo excesivo de la respuesta Th2. Esto, podría estar mediado en cierta medida, por la producción de TGF- $\beta$  intestinal. Se ha demostrado que en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de ratones con AA, GATA3 forma un complejo con Foxp3 que previene el desplazamiento de este último hacia el *locus* promotor de TGF- $\beta$  (Hong *et al.*, 2019). Cuando la expresión de T-bet se incrementa, este se une a GATA3 y disocia a Foxp3 que puede moverse hacia el promotor de TGF- $\beta$ . Además, ya se ha demostrado que el GMP incrementa la expresión de Foxp3 en esplenocitos de rata, lo que contribuye a la diferenciación de las células T reguladoras (Requena *et al.*, 2010).

Por su parte el LGG exhibió rasgos tolerogénicos que ocasionan mejoría en las variables de las AA. Al evaluar el efecto del LGG en la producción de TGF- $\beta$  se apreció un incremento que ya ha estado muy relacionado al efecto de muchos probióticos en las alergias (Barletta *et al.*, 2013; Kozakova *et al.*, 2015; Khaleva *et al.*, 2019; Cervantes-García *et al.*, 2020), mediante la reducción del perfil inmunológico Th2, la disminución del infiltrado de mastocitos, la inducción de células T reguladoras. Además, el perfil tolerogénico logrado mediante la utilización de este bacilio también implica el incremento en la expresión intestinal relativa de FoxP3. Este factor de transcripción se ha descrito como capaz de controlar la desgranulación mastocitaria (Gri *et al.*, 2008). Este mecanismo junto con la disminución de la expresión intestinal de McptII se relacionan íntimamente con el equilibrio de las respuestas tolerogénicas en las ratas tratadas con el lactobacilo. Globalmente, al analizar las relaciones entre los perfiles celulares en estos animales, se aprecia un efecto descrito anteriormente en diversos modelos (Sharma *et al.*, 2014; Saliganti *et al.*, 2015; Fu *et al.*, 2019) donde existe un sesgo marcado hacia la disminución de los ratios GATA3/ T-bet así como GATA-3/ Foxp3, lo que indica un ajuste de los perfiles celulares predominantes en los animales como en el caso del tratamiento con GMP, sin embargo con una inclinación también hacia el perfil Th17.

Aunque en los resultados de este trabajo la expresión intestinal de IL-10 no se modificó luego de la administración del GMP, otros estudios sobre su efecto regulador en sistema inmune en condiciones alérgicas muestran incrementos en la expresión de IL-10 en el tejido afectado por la inflamación alérgica, como pulmón en asma o piel en dermatitis atópica (Roldán *et al.*, 2016; Muñoz *et al.*, 2017). La participación de dicha interleucina ha sido anteriormente reportada inhibiendo la proliferación y la síntesis de células Th2 (Del Prete *et al.*, 1993). El predominio de respuestas reguladoras que logren controlar la inflamación alérgica luego de la administración del GMP podría ser distinto dependiendo de las características específicas de cada tejido. En el microambiente intestinal, existen células productoras de TGF- $\beta$  que logran mantener un microambiente tolerogénico e inducen la síntesis de IgA, la cual colabora activamente en las funciones reguladoras y protectoras a nivel de mucosas (Favre *et al.*, 2005; Konkel-Chen, 2011; Corthésy, 2013). La expresión relativa de IgA en el tejido intestinal de los animales alérgicos tratados con GMP mostró una tendencia al incremento. En un modelo experimental de colitis ulcerativa desarrollado en ratones, el tratamiento con GMP logra recuperar los niveles de IgA secretora a nivel de mucosa intestinal. Además, potencia la transducción de señales antiinflamatorias vía TGF- $\beta$  (Cui *et al.*, 2017). En otro estudio se aprecia que, en animales sanos, el GMP también incrementa el número de células plasmáticas IgA-positivas de lámina propia (Ye *et al.*, 2014). Aunque el papel de este anticuerpo en AA es controversial, se cree que es capaz de restringir la cantidad de antígenos en mucosa intestinal,

disminuyendo así la sensibilización a estos (Frossard *et al.*; 2004; Järvinen *et al.*, 2014). Además del papel crucial que desempeña el TGF- $\beta$  durante el cambio de isotipo del linfocito B para la producción de IgA, se requiere IL-5 para la diferenciación terminal de estos linfocitos hacia células productoras de IgA (Matsumoto *et al.*, 1989; Sonoda *et al.*; 1989), por lo que el incremento en TGF- $\beta$  aunado a la disminución de IL-5 en el tejido de nuestros animales tratados con GMP podrían explicar que la producción de la IgA no esté significativamente aumentada en estos animales.

Sin embargo, la producción de IgA fue significativamente mayor en los animales tratados con LGG. Dicha Ig ha sido relacionada a la presencia de características tolerogénicas e incrementos en Foxp3, lo que puede lograrse a través del mejoramiento de los sustratos para la nutrición y el desarrollo de las especies de la microbiota intestinal y además facilita que la diversidad en ésta sea mayor (Kawamoto *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2016). Incluso, se ha explorado cómo la producción del butirato de algunas especies bacterianas logra regular epigenéticamente a numerosos genes como FoxP3, a partir de la inhibición de las deacetilasas de histona (Licciardi *et al.*, 2011). Además, se sabe que los antígenos alimenticios contribuyen a la producción de IgA en las placas de Peyer probablemente gracias a la diferenciación de células foliculares, y se cree que para esto es necesaria la participación de la microbiota intestinal (Hara *et al.*, 2019). Lo anterior pone de manifiesto que los cambios en la microbiota gracias a la utilización de prebióticos como el GMP o probióticos podrían tener un efecto protector intestinal mediante la producción de IgA de mucosa. Si bien todos nuestros tratamientos tuvieron una tendencia a incrementar la expresión intestinal de este anticuerpo, el único que lo hizo significativamente fue el tratamiento con LGG, el cual además incrementó la de Foxp3. Además, las placas de Peyer constituyen importantes sitios de activación del linfocito B (Reboldi-Cyster *et al.*, 2016; Lycke-Bemark *et al.*, 2017). Se sabe que las células B antígeno específicas que se encuentran en éstas, son capaces de interactuar con las células M de la región asociada al folículo para capturar a los antígenos luego de la inmunización oral (Komban *et al.*, 2019). En AA se aprecia un incremento en el área de las placas de Peyer que podría explicar la interacción antigénica continua durante el proceso de la patología. Además, todos los tratamientos tienen tendencia a incrementar esta área lo que podría relacionarse directamente con la producción de IgA. En el tratamiento con LGG, dicho incremento en el área de las placas de Peyer es consistente con el incremento en la expresión relativa de IgA intestinal.

## 9. Conclusiones

El GMP tiene efecto prebiótico en el crecimiento del LGG *in vitro* a la concentración de 0.5%; aunque aún se necesita evaluar los mecanismos de acción para consolidar esta información, los conocimientos aquí logrados sugieren el uso del GMP como una herramienta para la propagación de probióticos que pueden ser utilizados como herramientas terapéuticas o biotecnológicas.

Para lograr desarrollar el modelo experimental de AA con manifestaciones GI, inflamación intestinal, así como modificaciones histopatológicas intestinales de la patología en rata Wistar, es necesario sensibilizar a los animales sistémicamente con el alérgeno en presencia de adyuvantes, antes de iniciar las resensibilizaciones vía oral.

A través de este trabajo, se ha obtenido evidencia para indicar que el tratamiento con GMP por sí solo atenúa la respuesta alérgica mediada por IgE en animales con AA, lo que se refleja en la disminución de las manifestaciones GI y de la inflamación y las alteraciones histopatológicas en intestino. Este efecto está mediado, al menos en parte, por un cambio del perfil celular y de citocinas

tipo 2 característico de la AA en tejido intestinal, hacia un perfil regulador. Lo anterior, hace del GMP un prometedor tratamiento en pacientes con AA.

Por otro lado, aún cuando LGG modula la síntesis de IgE, y algunas variables de inflamación intestinal, esto no se ve reflejado en un efecto protector sobre las manifestaciones GI inducidas por el alérgeno; además la adición del lactobacilo al tratamiento del péptido bioactivo lácteo no mejora los efectos inducidos por el GMP por si solo. De ahí, que no se recomienda la adición del lactobacilo en el tratamiento con GMP de paciente con AA. Además, se sugieren más estudios que permitan entender el papel de este probiótico en la AA.

## 10. Bibliografía

- Abbas, A K, Lichtman, A H, Pillai, S (2012) *Inmunología celular y molecular*, Elsevier, 7ª edición, Barcelona, España
- Abd El-Salam, M H, El-Shibiny, S, Buchheim, W (1996) Characteristics and potential uses of the casein macropeptide, *Int Dai J*; 6 (4): 327-341
- Abdel-Gadir, A, Scheneider, L, Casini, A, Charbonnier, L M, Little, S V, Harrington, T, Umetsu, D T, Rachid, R, Chatila, T, A (2018) Oral Immunotherapy With Omalizumab Reverses the Th2 CellLike Program of Regulatory T cells and Restores their Function, *Clin Exp Allergy*; 48(7): 825–836
- Abdel-Gadir A, Stephen-Victor, E, Gerber, G K, Noval-Rivas, M, Wang, S, Harb, H, Wang, L, Li, N, Crestani, E, Spielman, S, Secor, W, *et al.* (2019) Microbiota therapy acts via a regulatory T cell MyD88/ROR $\gamma$ t pathwat to suppress food allergy, *Nature Medicine*; 25 (7): 1164-1174
- Abril-Gil, M, García-Just, A, Pérez-Cano, F J, Franch, À, Castell, M (2015) Development and Characterization of an effective food allergy model in brown norway rats, *PLOS ONE*, 10(4); 20
- Ahrens, B, De Oliveira, L C, Grabenhenrich, L, Schulz, G, Niggeman, B, Wahn, U, Beyer, K (2012) Individual cow's milk allergens as prognostic markers for tolerance development?, *Clin Exp Allergy*; 42 (11): 1630–1637
- Aldemir, H, Bars, R, Herouet- Guicheney, C (2008) Murine models for evaluating the allergenicity of novel proteins and foods, *Regul Toxicol Pharmacol*, 54: S52-S57
- Álvarez-Castelló, M, Hevia, X, Gómez, I, M, Castro-Almarales, R, Rodríguez-Canosa, J (2004). Algunas consideraciones sobre las reacciones adversas por alimentos, *Rev. Cuba. Med. Gen. Integral*, 20(5-6)
- Antunes-Dourado, L P, Meirelles-Noviello, M L, Moreira-Alvarenga, D, Menezes, Z, Alves-Perez, D, Vieira-Batista, N, Batista-Menezes, G, Matos-Ferreira A V, da Glória-de Souza, D, Carmona-Lara, D (2011) Experimental food allergy leads to adipose tissue inflammation, systemic metabolic alterations and weight loss in mice, *Cell. Immunol.*; 270: 198–206
- Anvari, S, Miller, J, Yeh, C Y, Davis, C M (2019) IgE-Mediated Food Allergy, *Clin. Rev. Allergy Immunol*; 57, 244–260
- Arbizu, S, Chew, B, Mertens-Talcott, S U, Noratto, G (2020) Commercial whey products promote intestinal barrier function with glycomacropeptide enhanced activity in downregulating bacterial endotoxin lipopolysaccharides (LPS)-induces inflammation in vitro, *Food Funct.*; 11, 5842–5852
- Arumugam, M, Ahrens, R, Osterfeld, H, Kottyan, L C, Shang, X, Maclennan, J A, Zimmermann, N, Zheng, Y, Finkelman, F D, Hogan, S P (2011) Increased susceptibility of 129SvEvBrd mice to IgE-Mast cell mediated anaphylaxis, *BMC Immunology*; 12:14
- Azamar-Jácome, A A, Azamar-Jácome, M A, Borjas-Aguilar, K L, Mendoza-Hernández, D A (2017) Perfil clínico-epidemiológico del síndrome de alergia oral en población de 6 a 18 años, *Rev Alerg Mex*; 64(2): 142-152

- Barletta, B, Rossi, G, Schiavi, E, Butteroni, C, Corinti, S, Boirivant, M, Di Felice, G (2013) Probiotic VSL#3-induced TGF- $\beta$  ameliorates food allergy inflammation in a mouse model of peanut sensitization through the induction of regulatory T cells in the gut mucosa, *Mol. Nutr. Food Res.*; 57: 2223-2244
- Barnard, A, Mahon, B P, Watkins, J, Redhead, K, Mills, K H G (1996) Th1/Th2 cell dichotomy in acquired immunity to *Bordetella pertussis*: variables in the *in vivo* priming and *in vitro* cytokine detection techniques affect the classification of T-cell subsets as Th1, Th2 or Th0, *Immunology*; 87: 372-380
- Barrios, C, Brawand, P, Berney, M, Brandt, C, Lambert, P H, Siegrist, C A (1996) Neonatal and early life immune responses to various forms of vaccine antigens quantitatively differ from adult responses: predominance of a Th2-biased pattern which persists after adult boosting, *Eur J Immunol*; 26(7):1489-1496
- Berin, M C, Mayer, L (2013) Can we produce true tolerance in patients with food allergy?, *J Allergy Clin Immunol*; 131: 14-22
- Baghdadi, M, Jinushi, M (2014) The impact of the TIM gene family on tumor immunity and immunosuppression, *Cell Mol Immunol*; 11: 41–48
- Berin, M C, Sampson, H, A (2013) Food Allergy: An enigmatic epidemic, *Trends Immunol*; 34 (8): 390-397
- Berin, M C, Sampson, H, A (2013) Mucosal immunology of food allergy, *Curr Biol*; 23 (9): R389-R400
- Berin, M C (2015) Pathogenesis of IgE-mediated food allergy, *Clin Exp Allergy*; 45: 1483–1496
- Berni, R, Sangwan, N, Stefka, A, Nocerino, R, Paparo, L, Aitoro, R, Calignano, A, Khan, A, Gilbert, J, Nagler, C (2016) *Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants, *The ISME Journal*; 10: 742–750
- Bheroo, L (2015) Fascinating Findings from Sensitizing the Wistar Strain Rats Recruited as Peanut-Allergy Model, *EC Nutr*; 1, 192–202
- Bilaver, L A, Kester, K M, Smith, B M, Gupta, R S (2016) Socioeconomic Disparities in the Economic Impact of Childhood, Food Allergy, *PEDIATRICS*; 137 (5): 1-8
- Bock, S A, Muoz-Furlong, A, Sampson, H A (2001) Fatalities due to anaphylactic reactions to foods, *J Allergy Clin Immunol*; 107 (1): 191–193
- Bonaille, L M, Tomasula, P M (2008) Whey protein fractionation, Whey processing, functionality and health benefits, Onwulata, C.I., Huth, P.J., Eds.; Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, USA, 2008; 15–38
- Brandt, E B, Strait, R T, Hershko, D, Wang, Q, Muntel, E E, Scribner, T A, Zimmermann, N, Finkelman, F D, Rothenberg, M E (2003) Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea, *J Clin Invest*; 112(11): 1666-1677
- Breiteneder, H, Ebner, C (2000) Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens, *J Allergy Clin Immunol*; 106: 27-36
- Breiteneder, H, Radauer, C (2004) A classification of plant food allergens, *J Allergy Clin Immunol*; 113: 821-30
- Britton, G J, Contijoch, E J, Mogno, I, Vennaro, O H, Llewellyn, S R, Ng, R, Li, Z, Mortha, A, Merad, M, *et al.* (2019) Microbiotas from Humans with Inflammatory Bowel Disease Alter the Balance of Gut Th17 and ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> Regulatory T Cells and Exacerbate Colitis in Mice, *Immunity*; 50(1): 212-224.e4
- Brody, E P (2000) Biological activities of bovine glycomacropeptide, *British Journal of Nutrition*; 84 (1): S39-S46
- Broom, B (2010) Integrative medicine and leaky gut syndrome, *SA Fam Pract*; 52(4): 314-316

Brown, S J, Asai, Y, Cordell H J, Campbell, L E, Zhao, Y, Liao, H, Northstone, K, Henderson, J, Alizadehfar, R, Ben-Shoshan, M, *et al.* (2011) Loss-of-function variants in the filaggrin gene are a significant risk factor for peanut allergy, *J Allergy Clin Immunol*; 127:661–667

Brück, W M, Kelleher, S L, Ribson, G R, Graverholt, G, Lönnerdal, B L (2006) The effects of  $\alpha$ -lactalbumin and glycomacropeptide on the association of CaCo-2 cells by enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri*, *FEMS Microbiol Lett*; 259: 158–162

Brück, W M, Redgrave, M, Tuohy, K M, Lönnerdal, B, Graverholt, G, Hernell, O, Gibson, G (2006) Effects of Bovine  $\alpha$ -lactalbumin and casein glycomacropeptide-enriched infant formulae on faecal microbiota in healthy term infants, *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*; 43: 673-679

Bruijnzeel-Koomen, C, Ortolani, C, Aas, K, Bindslev-Jensen, C, Bjorksten, B, Moneret-Vautrin, D, Wuthrich, B (1995) Adverse reactions to food, *Allergy*; 50: 623-635

Brunton, L L, Chabner, B A, Knollmann, B C (2012) *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, Goodman & Gillman, McGraw-Hill, 12ª edición, p.p. 2066

Burks, W A, Laubach, S, Jones, S M (2008) Oral tolerance, food allergy and immunotherapy: implications for future treatment, *J Allergy Clin Immunol*; 121 (6): 1344-1350

Burton, O T, Darling, A R, Zhou, J S, Noval-Rivas, M, Jones, T G, Gurish, M F, Chatila, T A, Oettgen, H C (2013) Direct effects of IL-4 on mast cells drive their intestinal expansion and increase susceptibility to anaphylaxis in a murine model of food allergy, *Nature*, 6(4); 740-750

Burton, O T, Oettgen, H C (2011) Beyond immediate hypersensitivity: evolving roles for IgE antibodies in immune homeostasis and allergic diseases, *Immunol Rev*; 242(1): 128–143

Cao, S, Feehley, T J, Nagler, C R (2014) The role of commensal bacteria in the regulation of sensitization to food allergens, *FEBS Lett* 2014; 588:4258-66

Caraballo, L, Zakzuk, J (2012) Consideraciones sobre la evolución de la respuesta inmunitaria Th2 y sus posibles relaciones con parasitosis y alergia, *Revisión, Biomédica*; 32: 145-57

Cardoso, C R, Provinciatio, P R, Godoi, D F, Ferreira, B R, Teixeira, G, Rossi, M A, Cunha, F Q, Silva, J S (2009) IL-4 regulates susceptibility to intestinal inflammation in murine food allergy, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296: G593–G600

CENETEC, Secretaría de Salud, (2011), *Diagnóstico y tratamiento de la alergia alimentaria en niños, guías de práctica clínica*, México, D.F., p.p. 37

Cervantes-García, D, Jiménez, M, Rivas-Santiago, C E, Gallegos-Alcalá, P, Hernandez-Mercado, A, Santoyo-Payán, L S, Montes de Oca-Luna, R, Salinas, E (2020) *Lactococcus Lactis* NZ9000 Prevents asthmatic airway inflammation and remodelling in rats through the improvement of intestinal barrier function and systemic TGF- $\beta$  production, *Int Arch Allergy Immunol*

Chaurasia, P, Pratap, S, Von Ossowski, I, Palva, A, Krishnan, V (2016) New insights about pilus formation in gut-adapted *Lactobacillus* GG from the crystal structure of the SpaA backbone-pilin subunit, *Sci. Rep.*; 6(28664): 1-17

Chehade, M, Mayer L (2005) Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities, *J Allergy Clin Immunol*; 115 (1): 3-12

Chen, Q, Wang, H, Zhu, C, Yan, Y, Pang, G (2014) Anti-apoptotic effects of milk-derived casein glycomacropeptide on mice with ulcerative colitis, *Food Agr Immunol*; 25(4): 453-466

Chen, T, Liu, X, Ma, L, He, W, Li, W, Cao, Y, Liu, Z (2014) Food allergens affect the intestinal tight junction permeability in inducing intestinal food allergy in rats, *Asian Pac J Allergy Immunol*; 32: 345-353

Cheng, C H, Wu, H Y, Wu, C F, Jang, T R (2016) Pacific oyster-derived polysaccharides attenuate allergen-induced intestinal inflammation in a murine model of food allergy, *J. Food Drug Anal.*; 24, 121–128

Cheng, X, Gao, D, Chen, B, Mao, X (2015) Endotoxin-Binding Peptides Derived from Casein Glycomacropeptide Inhibit Lipopolysaccharide-Stimulated Inflammatory Responses via Blockade of NF- $\kappa$ B activation in macrophages, *Nutrients*; 7, 3119–3137

Chevriaux, A, Pilot, T, Derangère, V, Simonin, H, Martine, P, Chalmin, F, Ghiringhelli, F, Rébé, C (2020) Cathepsin B is Required for NLRP3 Inflammasome Activation in Macrophages, Through NLRP3 Interaction, *Front. Cell. Dev. Biol.*; 8: pp.8

Claesson-Welsh, L (2015) Vascular permeability-the essentials, *Upsala J. Med. Sci.*; 120, 135–143

Córdova-Dávalos, L E, Jiménez, M, Salinas, E (2019) Glycomacropeptide Bioactivity and Health: A Review Highlighting Action Mechanisms and Signaling Pathways, *Nutrients*; 11, 598

Corthésy, B (2013) Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces, *Front. Immunol.*; 4, 185

Cravioto, S T (2001) Inhibidores de enzima convertidora o bloqueadores de receptores AT1, *Archivos de cardiología de México*; 71, (1): S171-S176

Cuello-García, C A, Brozek, J L, Fiocchi, A, Pawankar, R, Yepes-Nuñez, J J, Terraciano, L, Gandhi, S, Agarwal, A, Zhang, Y, Shünemann, H J (2015) Probiotics for the prevention of allergy: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *J Allergy Clin Immunol*, 136 (4)

Cui, Y, Zhu, C, Ming, Z, Cao, J, Yan, Y, Zhao, P, Pang, G, Deng, Z, Yao, Y, Chen, Q (2017) Molecular mechanisms by which casein glycomacropeptide maintains internal homeostasis in mice with experimental ulcerative colitis, *PLoS ONE*; 12, e0181075

Curry, B, Crow, V: *Lactobacillus casei* group. En: Roginski, H, Fuquay, J, Fox, P (2004) *Encyclopedia of Dairy Science*. San Diego: Academic Press, pp. 1479–1484.

Dabaggh, K, Takeyama, K, Lee, H M, Ueki, I F, Lausier, J A, Nadel, J A (1999) IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo, *J Immunol*; 1999, 162: 6233–6237

Dai, Y, Hou, L F, Chan, Y P, Cheng, L, But, P P H (2004) Inhibition of immediate allergic reactions by ethanol extract from *Plumbago zeylanica* stems, *Biol Pharm Bull*; 65: 429-432

De Azevedo, M S P, Innocentin, S, Dorella, F A, Rocha, S C, Mariat, D, Pontes, D S, Miyoshi, A, Azevedo, V, Langella, P, Chatell, J M (2013) *J. Appl. Microbiol.*; 115: 319-333

DebMandal, M, Mandal, S, Kumar-Pal, N (2012) Detection of intestinal colonization of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* by stool culture in modified selective media, *Asian Pac. J. Trop. Dis.*: 205-210

de Jonge, J D, Pennings, J L A, Baken, K A, Konings, J, Ezendam, J, Van Loveren, H (2008) Gene expression changes in the mesenteric lymph nodes of rats after oral peanut extract exposure, *J. Immunotoxicol.*; 5,385–394.

De Martinis, M, Sirufo, M M, Suppa, M, Ginaldi, L (2020) New perspectives in Food Allergy, *Int. J. Mol. Sci.*; 21(4): 1474

Del Prete, G, De Carli, M, Almerigogna, F, Giudizi, M G, Biagiotti, R, Romagnani, S (1993) Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production, *J. Immunol.*;150, 353–360

Dieu-Nosjean, M C, Vicari, A, Lebecque, S, Caux, C (1999) Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J Leukoc Biol*; 66: 252-262

Dong, W, Selgrade, M J K, Gilmour, M I (2003) Systemic Administration of *Bordetella Pertussis*, *Toxicol. Sci*; 72: 114-121

Doron, S, Snyderman, D R, Gorbach, S L (2005) *Lactobacillus GG*: Bacteriology and clinical applications, *Gastroenterol Clin N Am*; 34: 483-498

Dubois, A E J, Turner, P J, Hourihane, J, Ballmer-Weber, B, Beyer, K, Chan, C H, Gowland, M H, O'Hagan, S, Regent, L, Remington, B, *et al.* (2018) How does dose impact on the severity of food-induced allergic reactions, and can this improve risk assessment for allergenic foods? Report from an ILSI Europe Food Allergy Task Force Expert Group and Workshop, *Allergy*; 73: 1383-1392

Dunkin, D, Berin, C, Mayer, L (2011) Allergic sensitization can be induced via multiple physiologic routes in an adjuvant-dependent manner, *J Allergy Clin Immunol*; 125:1-1258

Eisenbarth, S C, Colegio, R O, O'Connor, W Jr, Sutterwale, F S, Flavell, R A (2008) Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminum adjuvants. *Nature*; 453 (7198): 1122–1126

Elgamily, H, Safwat, E, Soliman, Z, Salama, H, El-Sayed, H, Anwar, M (2019) Antibacterial and Remineralization Efficacy of Casin Phosphopeptide, Glycomacropeptide Nanocomplex, and Probiotics in Experimental Toothpastes: An In Vitro Comparative Study, *Eur J Dent*; 13(3): 391-398

Falzollahi, M, Chun, Y, Grishin, A, Wood, R A, Burks, A W, Dawson, P, Jones, S M, Leung, D Y M, Sampson, H A, Sicherer, S H, Bunyavanich, S (2018) *Allergy*; 73: 1515–1524

Farrell, H M, Jimenez-Flores, R, Bleck, G T, Brown, E T, Butler, J E, Creamer, L K, Hicks, C L, Hollar, C M, Ng-Kwai-Hang, K F, Swaisgood, H E (2004) Nomenclature of the proteins of cows' milk—sixth revision, *J Dairy Sci*; 87: 1641-1674

Favre, L, Spertini, F, Corthésy, B (2005) Secretory IgA Possesses Intrinsic Modulatory Properties Stimulating Mucosal and Systemic Immune Responses, *J. Immunol*; 175, 2793–2800

Feeney, S, Ryan, J T, Kilcoyne, M, Joshi, L, Hickey, R (2017) Glycomacropeptide Reduces Intestinal Epithelial Cell Barrier Dysfunction and Adhesion of Entero-Hemorrhagic and Entero-Pathogenic *Escherichia coli* in Vitro, *Foods*; 6, 93

Fiocchi, A, Burks, W, Bahna, S L, Bielory, L, Boyle, R J, Cocco, R, Dreborg, S, Goodman, R, Kuitunen, M, Haahtela, T, *et al.* (2012) Clinical use of probiotics in pediatric allergy (CUPPA): A world allergy organization position paper, WAO position paper, *WAO journal*: 148-167

Finkelman, F D, Rothenberg, M E, Brandt, E B, Morris, S C, Strait, R T (2005) Molecular mechanisms of anaphylaxis: lessons from studies with murine models, *J Allergy Clin Immunol*; 115, 449-457

Finegold, I, Dockhorn, R J, Ein, D, Dolen, W K, Oppenheimer, J, Potter, L (2010) Immunotherapy throughout the decades: from Noon to now, *Allergy Asthma Immunol*; 105: 328 –337

Flemer, B, Gaci, N, Borrel, G, Sanderson, I R, Chaudary, P P, Tottey, W, O'Toole, P W, Brugère, J F (2017) Fecal microbiota variation across the lifespan of the healthy laboratory rat, *Gut Microbes*; 8(5): 428-439

Foisy-Sauvé, M, Ahmarani, L, Delvin, E, Sané, A T, Spahis, S, Levy, E (2020) Glycomacropeptide Prevents Iron/Ascorbate-Induced Oxidative Stress, Inflammation and Insulin Sensitivity with an Impact on Lipoprotein Production in Intestinal Caco-2/15 Cells, *Nutrients*; 12, 1175

Fox, M, Mugford, M, Voordouw, J, Cornelisse-Vermaat, J, Antonides, G, de la Hoz-Caballer, B, Cerecedo, I, Zamora, J, Rokicka, E, Jewczak, M, *et al.* (2013) Health sector costs of self-reported food allergy in Europe: a patient-based cost of illness study, *Eur. J. Public Health*; 23(5): 757-762

Franchi, L, Núñez, G (2008) The NLRP3 Inflammasome is Critical for Alum Mediated IL-1 $\beta$  Secretion but dispensable for Adjuvant Activity, *Eur J Immunol*; 38(8): 2085–2089

Friedman, E S, Bittinger, K, Esipova, T V, Hour, L, Chau, L, Jiang, J, Mesaros, C, Lund, P J, Liang, X, FitzGerald, G A, *et al.* (2018) Microbes vs. chemistry in the origin of the anaerobic gut lumen, *Proc Natl Acad Sci*; 115(16): 4170-4175

Fries, J H (1981) Food allergy, current concerns, *Ann Allergy*; 46(5): 260-263

Frossard, C P, Hauser, C, Eigenmann, P A (2004) Antigen-specific secretory IgA antibodies in the gut are decreased in a mouse model of food allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.*; 114, 377–382

Furuta, G T, Atkins, F D, Lee, N A, Lee, J J (2014) Changing roles of eosinophils in health and disease, *Ann. Allergy Asthma Immunol.*; 113, 3–8



- Galli, S J, Tsai, M, Piliponsky, A M (2008) The development of allergic inflammation, *Nature*; 454 (7203): 445-454
- Gallo, M, Naviglio, D, Ferrara, L (2014) Nasunin, an antioxidant anthocyanin from eggplant peels, as natural dye to avoid food allergies and intolerances, *Eur. Sci. J.*; 10 (9): p.p. 11
- Ganeshan, K, Neilsen, C V, Hadsaitong, A, Schleimer, R P, Luo, X, Bryce, P J (2009) Impairing oral tolerance promotes allergy and anaphylaxis: a new murine food allergy model, *J Allergy Clin Immunol*; 123(1): 231-8 e4
- Gao, J, Li, Y, Wan, Y, Hu, T, Liu, L, Yang, S, Gong, Z, Zeng, Q, Wei, Y, Yang, W, et al., (2019) A novel postbiotic from *Lactobacillus rhamnosus* GG with a beneficial effect on intestinal barrier function, *Front. Microbiol.*; 10: 477
- Gell, P G H, Coombs, R R A (1963) *Clinical aspects of immunology*, 1a ed, Oxford: Blackwell
- Gizzarelli, F, Corinti, S, Barletta, B, Iacovacci, P, Brunetto, B, Butteroni, C, et al (2006) Evaluation of allergenicity of genetically modified soybean protein extract in a murine model of oral allergen-specific sensitization, *Clin Exp Allergy*; 36 (2): 238-48
- Gocki, J, Bartuzi, Z (2016) Role of immunoglobulin G antibodies in diagnosis of food allergy, *Adv Dermatol Allergol*; 33 (4): 253-256
- Golden, D B K (2004) Patterns of anaphylaxis: Acute and late phase features of allergic reactions. *Novartis Found. Symp.*; 257, 101-110
- Goldin, B R, Gorbach, S L, Saxelin, M, Barakat, S, Gualtieri, L, Salminen, S (1992) Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract, *Dig Dis Sci*, 37 (1): 121-128
- Góngora-Meléndez, M A, Sienna-Monge, J J L, Del Río-Navarro, B E, Ávila Castañón, L, (2010) Aproximación práctica al diagnóstico de la alergia alimentaria, *Bol Med Hosp Infant Mex*, 67(5): 390-398
- Gould, H J, Sutton, B J, Beavil, A J, Beavil, R L, McCloskey, N, Coker, H A, Fear, D, Smurthwaite (2003) The biology of IgE and the basis of allergic disease, *Ann Rev Immunol*; 21: 579-628
- Gowthaman, U, Chen, J S, Zhang, B, Flynn, W F, Lu, Y, Song, W, Joseph, J, Gertie, J A, Xu, L, Collet, M A, et al. (2019) Identification of a T follicular helper cell subset that drives anaphylactic IgE, *Science*; 365, eaaw6433
- Gracie, J A, Bradley, J A (1996) Interleukin-12 induces interferon--dependent switching of IgG alloantibody subclass, *Eur. J. Immunol.*; 26, 1217-1221
- Gri, G, Piconese, S, Frossi, B, Manfroi, V, Merluzzi, S, Tripodo, C, Violo, A, Odom, S, Rivera, J, Colombo, M P, et al. (2018) CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction, *Immunity*; 29(5): 771-781
- Gupta, R, Holdford, D, Bilaver, L, Dyer, A, Holl, J L, Meltzer, D (2013) The Economic Impact of Childhood Food Allergy in the United States, *JAMA Pediatrics*; 167 (11): 1026-1031
- Hamelmann, E, Beyer, K, Gruber, C, Lau, S, Matricardi, P M, Nickel, R, Niggemann, B, Wahn, U (2007) Primary prevention of allergy: avoiding risk or providing protection?, *Clin Exp Allergy*, 38, 233-245
- Han, X, Lee, A, Huang, S, Gao, J, Spence, J R, Owyang, C (2019) *Lactobacillus rhamnosus* GG prevents epithelial barrier dysfunction induced by interferon-gamma and fecal supernatants from irritable bowel syndrome patients in human intestinal enteroids and colonoids, *Gut Microbes*; 10(1): 59-76
- Hara, S, Sasaki, T, Satoh-Takayama, N, Kanaya, T, Kato, T, Takikawa, Y, Takahashi, M, Tachibana, N, Soon-Kim, K, Surh, et al. (2019) Dietary antigens induce germinal center responses in Peyer's Patches and Antigen Specific IgA production, *Frot Immunol*; 10: 2432

Harte, C, Gorman, A L, McCluskey, S, Carty, M, Bowie, A G, Scott, C J, Meade, K G, Lavelle, E C (2017) Alum activates the Bovine NLRP3 Inflammasome, *Frontiers Immunol*; 8: pp 10

He, P, Zou, Z, Hu, Z (2015) Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism, *Hum Vaccin Immunother*; 11 (2): 477-488

Heng, N C K, Haji-Ishak, N S, Kalyan, A, Wong, A Y, Lovric, M, Bridson, J M, Artamonova, J, Stanton, J A, Wescombe, P A, Burton, J P, *et al.* (2011) Genome sequence of the bacteriocin-producing oral probiotic *Streptococcus salivarius* strain M18, *J. Bacteriol.*; 193: 6402–6403

Hermes, R G, Molist, F, Pérez, J F, Gómez de Segura, A, Ywazaki, M, Davin, R, Nofrarías, M, Korhonen, T K, Virkola, R, Martín-Orúe (2013) Casein glycomacropeptide in the diet may reduce *Escherichia coli* attachment to the intestinal mucosa and increase the intestinal lactobacilli of early weaned piglets after an enterotoxigenic *E.coli* K88 challenge, *Br. J. Nutr.*; 109: 1001-1012

Hill, D A, Spergel, J M (2017) The atopic march Critical evidence and clinical relevance, *Ann Allergy Asthma Immunol*; 120: 131–137

Hirano, T, Kawasaki, N, Miyataka, H, Satoh, T (2001) Wistar Strain Rats as the Model for IgE Antibody Experiments, *Biol Pharm Bull*; 24(8): 962-963

Hoarau, C, Lagaraine, C, Martin, L, Velge-Roussel, F, Lebranchu, Y (2006) Supernatant of *Bifidobacterium breve* induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway, *J Allergy Clin Immunol*; 117:696–702

Hougee, S, Vriesema, A J M, Wijering, S C, Knippels L M J, Folkerts G, Nijkamp, F, P, Knol, J, Garseen, J (2010) Oral Treatment with Probiotics Reduces Allergic Symptoms in Ovalbumin-Sensitized Mice: A Bacterial Strain Comparative Study, *Int Arch Allergy Immunol*; 151: 107-117

Hrubec, Z, Robinette, C, D (1984) The study of human twins in medical research, *New Eng J Medicine*; 310(3): 435-441

Huong, P T T Lee, C H, Li, M H, Lee, M Y, Kim, J K, Lee, S M, Seon, J H, Lee, D C, Jeon, Y J (2011) Characterization and Immunopotentiating effects of the Glycoprotein Isolated from *Dioscorea Batatas*, *Korean J Physiol Pharmacol*; 15: 101-106

Hussey-Freeland, D M, Fan-Minogue, H, Spergel, J M Chatila, T A, Nadeau, K C (2016) *Curr Opin Immunol*; 42: 119-123

Hvas, C L, Dige, A, Bendix, M, Wernlung, P G, Christensen, L A, Dahlerup, J F, Agnholt, J (2016) *Eur J Clin Invest* ; 46 (6): 555–563

Igea, J M (2013) The history of the idea of allergy, *Allergy*; 68: 966–973

Imaoka, A, Shima, T, Kato, K, Mizuno, S, Uehara, T, Matsumoto, S, Setoyama, H, Hara, T, Umesali, Y (2008) Anti-inflammatory activity of probiotic *Bifidobacterium*: Enhancement of IL-10 production in peripheral blood mononuclear cells from ulcerative colitis patients and inhibition of IL-8 secretion, *World J Gastroenterol*; 14(16): 2511-2516

Isolauri, E, Arvola, T, Sütas, Y, Moilanen, E, Salminen, S (2000) Probiotics in the management of atopic eczema, *Clin Exp Allergy*; 30: 1604-1610

Isolauri, E, Majamaa, H, Arvola, T, Rantala, I, Virtanen, E, Arvilommi, H (1993) *Lactobacillus casei* Strain GG Reverses Increased Intestinal Permeability Induced by Cow Milk in Suckling Rats, *Gastroenterology*; 105: 1643-1650

Jackson, J A, Friberg, I M, Little, S, Bradley, J E (2009) Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis. Immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: Coevolutionary legacies?, *Immunology*; 126:18-27

Jang, S O, Kim, H J, Kim, Y J, Kang, M J, Kwon, J W, Seo, J H, Kim, H Y, Kim, B J, Yu, J, Hong, SJ (2012) Asthma Prevention by *Lactobacillus Rhamnosus* in a Mouse Model is Associated With CD4+ CD25+ Foxp3+ T Cells, *Allergy Asthma Immunol Res*; 4(3): 150-156

Järvinen, K M, Westfall, J E, Seppo, M S, James, A K, Tsuang, A J, Feustel, P J, Sampson, H A, Berin, C (2014) Role of maternal elimination diets and human milk IgA in the development of cow's milk allergy in the Infants, *Clin. Exp. Allergy*; 44, 69–78

Jenkins, J A, Breiteneder, H, Mills, C (2007) Evolutionary distance from human homologs reflects allergenicity of animal food proteins, *J Allergy Clin Immunol*; 120: 1399-405

Jiang, T, Ji, H, Zhang, L, Wang, Y, Zhou, H (2019) Chitosan Oligosaccharide Exerts Anti-Allergic Effect against Shrimp Tropomyosin-Induced Food Allergy by Affecting Th1 and Th2 Cytokines, *Int. Arch. Allergy Immunol.*; 180, 10–16

Jiménez, E, Fernández, L, Marín, M L, Martín, R, Odriozola, J M, Nueno-Palop, C, Narbad, A, Olivares, M, Xaus, J, Rodríguez, J M (2005) Isolation of Commensal Bacteria from Umbilical Cord Blood of Healthy Neonates Born by Cesarean Section, *Curr Microbiol*; 51: 270–274

Jiménez, M, Cervantes-García, D, Muñoz, Y H, García, A, Haro, Jr L M, Salinas, E (2016) Novel Mechanisms Underlying the Therapeutic Effect of Glycomacropeptide on Allergy: Change in Gut Microbiota, Upregulation of TGF- $\beta$ , and Inhibition of Mast Cells, *Int Arch Allergy Immunol*; 171:217–226

Jiménez, M, Chávez, N A, Salinas, E (2012) Pretreatment with glycomacropeptide reduces allergen sensitization, alleviates immediate cutaneous hypersensitivity and protects from anaphylaxis, *Clin Exp Immunol*; 170: 18–27

Jiménez, M, Muñoz, F C, Cervantes-García, D, Cervantes, M M, Hernández-Mercado, A, Barrón-García, B, Moreno Hernández-Duque, J L, Rodríguez-Carlos, A, Rivas-Santiago, B, Salinas, E (2020) *J Med Food*; 1-9

Jiménez-Saiz, R, Rupa, P, Mine, Y (2011) Immunomodulatory effects of heated ovomucoid-depleted egg white in a BALB/c mouse model of egg allergy, *J. Agric. Food Chem.*; 59 (24): 12195-13202

Johansson, S G O, O'B Hourihane, J, Bousquet, J, Brujinzeel-Koomen, C, Dreborg, S, Haahtela, T, Kowalski, M L, Mygind, N, Ring, J, Van Cauwenberge, P, *et al.* (2001) A revised nomenclature for allergy, An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force, *Allergy*; 56: 813-824

Kalliomaki, M, Salminen, S, Poussa, T, Isolauri, E (2007) Probiotics during the first 7 years of life: a cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo- controlled trial, *J Allergy Clin Immunol*; 119: 1019-1021

Kamemura, N, Tada, H, Shimojo, N, Morita, Y, Kohno, Y, Ichioka, T, Suzuki, K, Kubota, K, Hiyoshi, M, Kido, H (2012) Intrauterine sensitization of allergen-specific IgE analyzed by a highly sensitive new allergen microarray, *J Allergy Clin Immunol*; 130: 113–121, e112

Kamil, R, Geier, M S, Butler, R N, Howarth, G S (2007) *Lactobacillus rhamnosus* GG Exacerbates Intestinal Ulceration in a Model of Indomethacin-Induced Enteropathy, *Dig Dis Sci*; 52: 12447-1252

Kara, M, Beser, O F, Konukoglu, D, Cokugras, H, Erkan, T, Kutlu, T, Cokugras, F C (2020) The utility of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 in the diagnosis and/or follow-up food allergy, *Allergol. Immunopathol. (Madr.)*, 48, 48–55

Kawamoto, S, Maruya, M, Kato, L M, Suda, W, Atarashi, K, Doi, Y, Tsutsui, Y, Qin, H, Honda, K, Okada, *et al.* (2014) Foxp3 (+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis, *Immunity*; 41(1): 152-165

Kelleher, S L, Chatterton, D, Nielsen, K, Lönnerdal, B (2003) Glycomacropeptide and  $\alpha$ -lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys, *Am J Clin Nutr*; 77: 1261-1268

Khaleva, E, Gridneva, Z, Geddes, D T, Oddy, W H, Colicino, S, Blyuss, O, Boyle, R J, Warner, J O, Munblit, D (2019) Transforming growth factor beta in human milk and allergic outcomes in children: A systematic review, *Clin Exp Allergy*; 49 (9): 1201-1213

- Kim, B G, Kim, J N, Jang, A S, Shin, M (2020) Combined effects of *Lactobacillus rhamnosus* and Egg Oral Immunotherapy in a Mouse Model of Egg allergy, *Allergy Asthma Immunol Res*; 12(4): 701-711
- Kim, H J, Kim, YJ, Kang, M J, Yu, H S, Jung, Y H, Lee, E, Seo, J H, Kwon, J W, Kim, B J, Yu, J, Park, H M, Hong, S J (2012) Effects of *Lactobacillus rhamnosus* on asthma with an adoptive transfer of dendritic cells in mice, *J Appl Microbiol*; 115: 872-879
- Kim, H J, Kim, Y H, Lee, S H, Yu, J, Jeong, S K, Hong, S J (2014) Effects of *Lactobacillus rhamnosus* on allergic march model by suppressing Th2, Th17, and TSLP responses via CD4+CD25+Foxp3+ Tregs, *Clin Immunol*; 153: 178–186
- Kim, B, Park, K Y, Ji, Y, Park, S, Holzapfel, W, Hyun, C K (2016) Protective effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG against dyslipidemia in high-fat diet-induced obese mice, *Biochem. Biophys. Res.*; 473 (2): 530-536
- Kinet, J P (1999) The high-affinity IgE receptor (FC $\epsilon$ R1): From physiology to pathology, *Annu Rev Immunol*; 17: 931-972
- Knippels, L M J, Penninks, A H, Van Meeteren, M, Houben, G F (1999) Humoral and cellular immune responses in different rat strains on oral exposure to ovalbumin, *Food Chem Toxicol*; 37 (1999): 881-888
- Komban, R J, Strömberg, A, Biram, A, Cervin, J, Lebrero-Fernández, C, Mabbott, N, Yrlid, U, Shulman, Z, Bemark, M, Lycke, N (2019) Activated Peyer's patch B cells sample antigen directly from M cells in the subepithelial dome, *Nat Commun*; 10 (1): 2423
- Konkel, J E, Chen, W J (2011) Balancing acts: The role of TGF- $\beta$  in the mucosal immune system, *Trends Mol. Med.*; 17, 668–676
- Kozakova, H, Schwarzer, M, Tuckova, L, Strutkova, D, Czarnowska, E, Rosiak, I, Hudcovic, T, Schabussova, I, Hermanova, P, Zakostelska, Z, *et al.* (2016) Colonization of germ-free mice with a mixture of three lactobacillus strains enhances the integrity of gut mucosa and ameliorates allergic sensitization, *Cell Mol Immunol*; 13(2): 251-262
- Kosecka, U, Berin, M C, Perdue, M H (1999) Pertussis Adjuvant Prolongs Intestinal Hypersensitivity, *Int Arch Allergy Immunol*; 119: 205-211
- Krystel-Whittemore, M, Dileepan, K N, Wood, J G (2016) Mast Cell: A multi-functional master cell, *Front. Immunol.*; 6: 1-12
- Kucharsky, M (2017) Is a Leaky Gut Syndrome a Cause of Food Allergy?, *RRJZS*; 5(2): 35-37
- Kulis, M D, Patil, S U, Wambre, E, Vickery, B P (2018) Immune mechanisms of oral immunotherapy, *J Allergy Clin Immunol*; 141 (2): 491-498
- Kunder, C A, St John, A L, Li, G, Leong, K W, Berwin, B, Staats, H F, Abraham, S, N (2009) Mast cell-derived particles deliver peripheral signals to remote lymph nodes, *J. Exp. Med.*; 206 (11): 2455-2467
- Kurup, V P, Barrios, C S (2008) Immunomodulatory effects of curcumin in allergy, *Mol. Nutr. Food Res.*; 52: 1031-1039
- Kuwahara, M, Yamashita, M, Shinoda, K, Tofukuji, S, Onodera, A, Shinnakasu, R, Motohashi, S, Hosokawa, H, Tumes, D, Iwamura, C *et al.* (2012) The transcription factor Sox4 is a downstream target of signaling by the cytokine TGF- $\beta$  and suppresses T(H)2 differentiation, *Nat. Immunol.*; 13, 778–786
- Lahtinen, S J, Boyle, R J, Kivivuori, S, Oppedisano, F, Smith, K R, Robins-Browne, R, Salminen, S J, Tang, M L (2009) Prenatal probiotic administration can influence Bifidobacterium microbiota development in infants at high risk of allergy, *J. Allergy Clin. Immunol*; 123: 499–501
- Lam, E K Y, Tai, E K K, Koo, M W L, Wong, H P S, Wu, W K K, Yu, L, So, W H L, Woo, P C Y, Cho, C H (2007) Enhancement of gastric mucosal integrity by *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Life Sci.*; 80: 2128–2136

Lebeer, S, Claes, I, Tytgat, H L, Verhoeven, T L, Marien, E, Von-Ossowski, I, Reunanen, J, Palva, A, Vos, W M, Keersmaecker, S C, Vanderleyden, J (2012) Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells, *Appl Environ Microbiol*; 78: 185-193

Lebeer, S, Verhoeven, T L A, Pérea-Vélez, M, Vanderleyden, J, De Keersmaccker S C J (2007) Impact of Environmental and Genetic Factors on Biofilm Formation by the Probiotic Strain *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Appl Environ Microbiol*; 73 (21): 6768–6775

Lee, S H (2015) Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases, *Intest. Res.*; 13, 11–18

Leff, A R (2001) Regulation of leukotrienes in the management of asthma: biology and clinical therapy, *Annual review of medicine*; 52: 1-14

Lenardon, L, Zanchetti-Meneghini, L, Barcellos-Hoff, R, Campos-Motta, T M, Pizzolato, T M, Flôres-Ferrão, M, Bergold, A, M (2017) Determination of Caseinomacropeptide in Brazilian Bovine Milk by High-Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry, *Analytical Letters*; 50 (13): 2068-2077

Li, E W, Mine, Y (2004) Immunoenhancing effects of bovine glycomacropeptide and its derivatives on the proliferative response and phagocytic activities of human macrophage like cells, U937, *J. Agric. Food Chem*; 52: 2704–2708

Li, N, Zheng, B, Cai, H F, Chen, Y H, Qiu, M Q, Liu, M B (2018) Cost-effectiveness analysis of oral probiotics for the prevention of *Clostridium difficile* associated diarrhoea in children and adolescents, *J Hosp Infect*; 99(4): 469-474

Li, X M, Serebrisky, D, Lee, S Y, Huang, C K, Bardina, L, Schofield, B H, Stanley, S, Burks, W, Bannon, G, Sampson, H (2000) A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses, *J Allergy Clin Immunol*, 106(1): 151-158

Licari, A, Manti, S, Marseglia, A, Brambilla, I, Votto, M, Castagnoli, R, Leonardi, S, Marseglia, J L (2019) Food Allergies: Current and Future Treatments, *Medicina (Kaunas)*; 55 (5): 120

Licciardi, P V, Ververis, K, Karagiannis, T K (2011) Histone Deacetylase Inhibition and Dietary Short-Chain Fatty Acids, *IRSN Allergy*; 2011: 869657

Lindsay, D S J, Parton, R, Wardlaw, A C (1994) Adjuvant effect of Pertussis Toxin on the Production of Anti-Ovalbumin IgE in Mice and Lack of Direct Correlation between PCA and ELISA, *Int Arch Allergy Immunol*-, 105: 281-288

Ling, Z, Li, Z, Liu, X, Cheng, Y, Luo, Y, Tong, X, Yuan, L, Wang, Y, Sun, J, Li, L, *et al.* (2014) Altered Fecal Microbiota Composition Associated with Food Allergy in Infants, *Appl Environ Microbiol*; 80(8): 2546-2454

Lin, R Y, Schwartz, L B, Curry, A, Pesola, G R, Knight, R J, Lee, H S, Bakalchuk, L, Tenenbaum, C, Westfal, R E (2000) Histamine and tryptase levels in patients with acute allergic reactions: An emergency department-based study, *J. Allergy Clin. Immunol.*; 106, 65–71

Liu, Q M, Zhang, Y F, Gao, Y Y, Liu, H, Cao, M J, Yang, X W, Su, W J, Liu, G M (2019) Coumarin alleviates ovalbumin induced food anaphylaxis in a mouse model by affecting mast cell function, *Food Funct.*; 10, 6767–6778

Lorenz, A R, Scheurer, S, Vieths, S (2015) Food Allergy: Molecular Basis and Clinical Practice, *Chem Immunol Allergy, Basel Karger*; 101: 18–29

Lycke, N Y, Bemark, M (2017) The regulation of gut mucosal IgA B-cell responses: recent developments. *Mucosal Immunol.*; 10: 1361–1374

Ma, S, Sicherer, S H, Nowak-Wegrzyn, A (2003) A survey on the management of pollen-food allergy syndrome in allergy practices, *J Allergy Clin Immunol*; 112(4): 784-788

Macedo-Mendoza, M (2015) Elaboración de un sistema ELISA para la cuantificación de IgE anti-ovoalbúmina, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México

- MacGinnitie, A J, Rachid, R, Gragg, H, Little, S V, Lakin, P, Cianferoni, A, Heimall, J, Makhija, M, Robison, R, Chinthrajah, S (2017) Omalizumab facilitates rapid oral desensitization for peanut allergy, *J Allergy Clin Immunol*;139:873-81
- McKenzie, G J, Emson, C L, Bell, S E, Anderson, S, Fallon, P, Zurawski, G, Murray, R, Grecis, R, McKenzie, A N (1998) Impaired Development of Th2 Cells in IL-13-Deficient Mice, *Immunity*; 9, 423–432
- Majamaa, H, Isolauri, E (1997) Probiotics: A novel approach in the management of food allergy, *J Allergy Clin Immunol*; 99: 179-85
- Maldonado-Gómez, M X, Martínez, I, Botaccini, F, Knights, D, Hutkins, R W, Walter, J (2016) Stable Engraftment of *Bifidobacterium longum* AH1206 in the Human Gut Depends on Individualized Features of the Resident Microbiome, *Cell Host Microbe*; 20: 1–12
- Maloy, K J, Powrie, F (2011) Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease, *Nature*; 474 (7351): 298-306
- Manohar, M, Nadeau, K C (2014) The potential of Anti-IgE in Food Allergy Therapy, *Curr Treat Options Allergy*; 1(2): 145–156
- Mari, A, Iacovacci, P, Afferni, C, Barletta, B, Tinghino, R, Di Felice, G, Pini, C (1999) Specific IgE to cross-reactive carbohydrate determinants strongly affect the in vitro diagnosis of allergic diseases, *J Allergy Clin Immunol*; 103: 1005-1111
- Marschan, E, Kuitunen, M, Kukkonen, K, Poussa, T, Sarnesto, A, Haahtela, T, Korpela, R, Savihlati, E, Vaarala, O (2008) Probiotics in infancy induce protective immune profiles that are characteristic for chronic low-grade inflammation, *Clin Exp Allergy*; 38: 611–618
- Martin, P E, Eckert, J K, Koplin, J J, Lowe, A J, Gurrin, L C, Dharmage, S C, Vuillermier, P, Tang, M L K, Ponsonby, A, L, Matheson, M, *et al.* (2014) Which infants with eczema are at risk of food allergy? Results from a population-based cohort, *Clin Exp Allergy*; 45: 255-264
- Martín, R, Langa, S, Reviriego, C, Jiménez, E, Marín, M, Xaus, J, Fernández, L, Rodríguez, J, M (2003) Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut, *Pediatrics*; 143(6): 754-758
- Maassen, C B, Van Holten-Neelen, C, Balk, F, den Bak-Glashouwer, M J, Leer, R J, Laman, J D, Boersma, W J, Classen, E (2000) Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains, *Vaccine*; 18: 2613–23
- Matsumoto, R, Matsumoto, M, Mita, S, Hitoshi, Y, Ando, M, Araki, S, Yamaguchi, N, Tominaga, A, Takatsu, K (1989) Interleukin-5 induces maturation but not class switching of surface IgA-positive B cells into IgA-secreting cells, *Immunology*; 66, 32–38
- McCalla, R, Savilahti, E, Perkkio, M, Kuitunen, P, Backman, A (1980) Morphology of the Jejunum in Children with Eczema due to Food Allergy, *Allergy*; 35, 563–571
- McKenzie, G J, Emson, C L, Bell, S E, Anderson, S, Fallon, P, Zurawski, G, Murray, R, Grecis, R, McKenzie, A N (1998) Impaired Development of Th2 Cells in IL-13-Deficient Mice, *Immunity*; 9, 423–432
- Medina-Hernández, A, Huerta-Hernández, R E, Góngora-Meléndez, M A, Domínguez-Silva, M G, Mendoza-Hernández, D A, Romero-Tapia, S J, Iduñate-Palacios, F, Cisneros-Rivero, M G, Covarrubias-Carrillo, R M, Juan-Pineda, M A, Zárate-Hernández, M C (2014) Perfil clínico-epidemiológico de pacientes con sospecha de alergia alimentaria en México. Estudio Mexipreval\*, *Rev Alerg Mex*; 62(1): 28-40
- Metcalf, D (2008) Mast cell and mastocytosis, *Blood*; 112(4): 946-956

Miettinen, M, Matikainen, S, Vuopio-Varkila, J, Pirhonen, J, Varkila, K, Kurimoto, M, Julkunen, I (1998) Lactobacilli and Streptococci induce Interleukin-12, il-18 and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells, *Infection and immunity*; 66 (12): 6058–6062

Mikkelsen, T L, Rasmussen, E, Olsen, A, Barkholt, V, Frøskjær, H (2006) Immunogenicity of  $\kappa$ -Casein and Glycomacropeptide, *J Dairy Sci*; 89: 824-830

Mills, E N C, Mackie, A R, Burney, P, Beyer, K, Frewer, L, Madsen, C, Botjes, E, Crevel, R W R, van Ree, R (2007) The prevalence, cost and basis of food allergy across Europe, *Allergy*; 62: 717-722

Mine, Y, Yang, M (2008) Recent Advances in the Understanding of Egg Allergens: Basic, Industrial and Clinical perspectives, *J Agric Food Chem*; 56: 4874-4900

Miquel, S, Martin, R, Rossi, O, Bermudez-Humaran, L G, Chatel, J M, Sokol, H, et al (2013) *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health, *Curr Opin Microbiol*; 16: 255–261

Mishra, A, Hogan, S P, Brandt, E B, Wagner, N, Crossman, M W, Foster, P S, Rothenberg, M E (2002) Enterocyte expression of the eotaxin and interleukin-5 transgenes induces compartmentalized dysregulation of eosinophil trafficking, *J. Biol. Chem.*; 277, 4406–4412

Mohamadzadeh, M, Olson, S, Kalina, W V, Ruthel, G, Demmin, G L, Warfield, K L, Bavari, S, Klaenhammer, T R (2005) Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization, *PNAS*; 1028 (8): 2880-2885

Molloy, J, Allen, K, Collier, F, Tang, M L K, Ward, A C, Vuillermin, P (2013), The potential link between gut microbiota and IgE mediated food allergy in early life, *Int J Environ Res Public Health*; 10: 7235- 7256

Monnai, M, Horimoto, Y, Otani, H (1998) Immunomodulatory effect of dietary bovine k-caseinoglycopeptide on serum antibody levels and proliferative responses of lymphocytes in mice, *Milchwissenschaft*; 53: 129–132

Mossmab, T R, Cherwinski, H, Bond, M W, Griedlin, M A, Coffman, R L (1986) Pillars article: Two types of Murine Helper T Cell Clone. I. Definition According to Profiles of Lymphokine Activities and Secreted Proteins, *J Immunol*; 136: 2348-2357

Motzer, R J, Hoosen, S, Bello, C L, Christensen, J G (2006) Sunitinib malate for the treatment of solid tumours: a review of current clinical data, *Expert Opin Investig Drugs*; 15: 553–61

Muñoz-Cano, R, Picado, C, Valero, A, Batra, J (2016) Mechanisms of Anaphylaxis Beyond IgE, *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*; 26, 73–82.

Muñoz, F C, Cervantes, M M, Cervantes-García, D, Jiménez, M, Ventura-Juárez, J, Salinas, E (2017) Glycomacropeptide Attenuates Inflammation, Pruritus, and Th2 Response Associated with Atopic Dermatitis Induced by 2,4-Dinitrochlorobenzene in Rat, *Journal of Immunology Research* Volume 2017, 11 p.p

Muraro A, Dreborg S, Halken S, Host, A, Niggeman, B, Aalberse R, Arshad S H, von Berg Av A, Carlsen K-H, Duschén K *et al.* (2004) Dietary prevention of allergic diseases in infants and small children – Part III: critical review of published peer-reviewed observational and interventional studies and final recommendations, *Pediatr Allergy Immunol*; 15:291–307

Muraro, A, Werfel, T, Hoffmann-Sommergruber, K, Roberts, G, Beyer, K, Bindslev-Jensen, C, Cardona, V, Dubois, A, DuToit, G, Eigenmann, P, *et al.* (EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group) (2014) EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines. Diagnosis and management of food allergy, *Allergy*; 69: 1008–1025

Muto, T, Fukuoka, A, Kabashima, K, Ziegler, S F, Nakanishi, K, Matsushita, K, Yoshimoto, T (2014) The role of basophils and proallergic cytokines, TSLP and IL-33, in cutaneously sensitized food allergy, *Int Immunol*, 26 (10): 539–549

Nadeau, K C, Schneider, L C, Hoyte, L, Borrás, I, Umetsu, D T (2011) Rapid oral desensitization in combination with omalizumab therapy in patients with cow's milk allergy, *J Allergy Clin Immunol*; 127(6): 1622–1624

Nakajima-Adachi, H, Kikuchi, A, Fujimura, Y, Shibahara, K, Makino, T, Goseki-Sone, M, Kihara-Fujioka, M, Nochi, T, Kurashima, Y, Igarashi, O, *et al.* (2014) Peyer's patches and mesenteric lymph nodes cooperatively promote enteropathy in a mouse model of food allergy, *PLoS ONE*; 9, e107492

National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine (2017) Finding a path to safety in food allergy. Assessment of the global burden, causes, prevention, management, and public policy, Washington, DC: The National Academies Press, REPORT. Recuperado de: <https://www.nap.edu/read/23658/chapter/4#50>

Neelima, Sharma, R, Rajput, Y S, Mann, B (2013) Chemical and functional properties of glycomacropeptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk: a review, *Dairy Sci Technol*, 93(1), 21–43

Neeser, J R, Golliard, M, Woltz, A, Rouvet, , Dillmann, M L, Guggenheim, B (1994) In vitro modulation of oral bacterial adhesion to saliva-coated hydroxyapatite beads by milk casein derivatives, *Oral Microbiol Immunol*; 9: 193-201

Ney, D M, Hull, A K, van Calcar, S C, Liu, X, Etzel, M (2008) Dietary Glycomacropeptide Supports Growth and Reduces the Concentrations of Phenylalanine in Plasma and Brain in a Murine Model of Phenylketonuria, *J Nutr*; 138: 316-322

Ney, D M, Stroup, B M, Clayton, M K, Murali, S G, Rice, G M, Rohr, F, Levy, H L (2016) Glycomacropeptide for nutritional management of phenylketonuria: a randomized, controlled, crossover trial, *Am J Clin Nutr*; 104: 334–45

Niers, L E, Timmerman, H M, Rijkers, G T, vanBleek, G M, vanUden, N O, Knol, E F, Kapsenberg, M L, Kimpen, J L, Hoekstra, M O (2005) Identification of strong interleukin10 inducing lactic acid bacteria which down-regulate T helper type 2 cytokines, *Clin. Exp. Allergy*; 35: 1481–1489

Noon, L, Cantab, B C, Eng, F R C S (1911) Prophylactic inoculation against hay fever, *The Lancet*; 1: 1572-1573

Nussbaum, J C, Van Dyken, S J, von Moltke, J, Cheng, L E, Mohapatra, A, Molofsky, A B, Thornton, E E, Krummel, M F, Chawla, A, Liang, H E, *et al.* (2013) Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis, *Nature*; 502, 245–248

Nwaru, B I, Hickstein, L, Panesar, S S, Roberts, G, Muraro, A, Sheikh, A (EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group) Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis, *Allergy*; 69: 992–1007

Ohmacht, C, Park, J H, Cording, S, Wing, J B, Atarashi, K, Obata, Y, Gaboriau-Routhiau, V, Marques, R, Dulauroy, S, Fedoseeva, M, *et al.* (2015) The microbiota regulates type 2 immunity through ROR  $\gamma$  + T cells, *Science*; 349(6251): 989-993

Olveira-Fuster, G, González-Molero, I (2007) Probióticos y prebióticos en la práctica clínica, *Nutr Hosp.* 2007; 22(Supl. 2):26-34

Okada, H, Kuhn, C, Feillet, H, Bach, J F (2010) The “hygiene hypothesis” for autoimmune and allergic diseases: an update, *British Society for Immunology, Clin Exp Immunol*, 160: 1–9

Okamoto, A, Kawamura, T, Kanbe, K, Kanamaru, Y, Ogawa, H, Okamura, K, Nakao, A (2005) Suppression of serum IgE response and systemic anaphylaxis in a food allergy model by orally administered high-dose TGF-beta, *Int. Immunol.*; 17, 705–712

Oksaharju, A, Kankainen, M, Kekkonen, R A, Lindstedt, K A, Konaven, P T, Korpela, R, Miettinen, M (2011) Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* downregulates FCER1 and HRH4 expression in human mast cells, *World J Gastroenterol*; 17 (6): 750-759

O’Riordan, N, O’Callaghan, J, Buttò, L F, Kilcoyne, M, Joshi, L, Hickey, R M (2018) Bovine glycomacropeptide promotes the growth of *Bifidobacterium longum ssp. infantis* and modulate its gene expression, *J. Dairy Sci*; 101: 1–12

Ortolani, C, Bruijnzeel-Koomen, C, Bengtsson, U, Bindslev-Jensen, C, Björkstén, B, Høst, A, Ispano, M, Jarish, R, Madsen, C, Nekam, K, *et al.* (1999) Controversial aspects of adverse reactions to food, *Allergy*, 54: 27-45

Owen, J A (2017) *Inmunología de Kuby*, McGraw-Hill, 7ª edición, p.p. 690

Oyoshi, M K, Oettgen, H C, Chatila, T A, Geha, R S, Bryce, P J (2014) Food allergy: Insights into etiology, prevention, and treatment provided by murine models, *J Allergy Clin Immunol*; 133(2): 309-17

Özdemir, Ö (2010) Various effects of different probiotic strains in allergic disorders: an update from laboratory and clinical data, *Clin Exp Immunol*; 160: 295–304

Palosuo, K, Varjonen, E, Kekki, O M, Klemola, T, Kalkkinen, N, Alenius, H, Reunala, T (2001) Wheat  $\omega$ -5 gliadin is a major allergen in children with immediate allergy to ingested wheat, *J Allergy Clin Immunol*; 108 (4): 634-638

Pawankar, R, Nonaka, M, Yamagishi, S, Yagi, T (2004) Pathophysiologic mechanisms of chronic rhinosinusitis, *Immunol Allergy Clin*; 24 (1): 75-85

Papizadeh, M, Nahrevanian, H, Rohani, M, Nezamedin-Hosseini, S, Abbas-Shojaosadati, S (2016) Lactobacillus rhamnosus Gorbach-Goldin (GG): A Top Well-Researched Probiotic Strain, *J. Med. Bacteriol.*; 5 (5-6): 2016

Pena, M J, Pinto, A, Daly, A, MacDonald, A, Azevedo, L, Rocha, J C, Borges, N (2018) The Use of Glycomacropeptide in Patients with Phenylketonuria: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Nutrients*; 10, 1794

Pihlanto-Leppälä, A (2001) Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides, *Trends Food Sci Technol*; 11: 347-356

Pochard, P, Gosset, P, Grangette, C, Andre, C, Tonnel, A B, Pestel, J, Mercenier, A (2002) Lactic acid bacteria inhibit TH2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients, *J. Allergy Clin. Immunol.*; 110: 617–623

Praveen, P, Jordan, F, Priami, C, Morine, J (2015) The role of breast-feeding in infant immune-system: A systems perspective on the instestinal microbiome, *Microbiome*; 3: 41

Prescott, S L, Pawankar, R, Allen, K J, Campbell, D E, Sinn, J, Fiocchi, A, Ebisawa, M, Sampson, H, Beyer, K, Lee, B W (2013) A global survey of changing patterns of food allergy burden in children, *World Allergy Organ J*; 6: 21

Prescott, S L, Macaubas, C, Holt, B J, Smallacombe, T B, Loh, R, Sly, P D, Holt, P D (1998) Transplacental Priming of the Human Immune System to Environmental Allergens: Universal Skewing of Initial T Cell Responses Toward the Th2 Cytokine Profile, *J Immunol*; 160: 4730-4737

Prince, B T, Mandel, M J, Nadeau, K, Singh, A M (2015) Gut Microbiome and the Development of Food Allergy and Allergic Disease, *Pediatr Clin North Am*; 62(6): 1479–1492

Punnonen, J, Aversa, G, Cocks, B G, McKenzie, A N, Menon, S, Zurawski, G, de Waal Malefyt, R, de Vries, J E (1993) Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 90, 3730–3734

Quian, T, Ting-Ting, W, Xi, T, Ming-Zhao, H, Xiao-Jing, L, Xue-Ying, M (2014) Developing a potential prebiotic of yogurt: growth of Bifidobacterium and yogurt cultures with addition of glycomacropeptide hydrolysate, *Int J Food Sci Technol*; 50(1): 120-127

Radauer, C, Bublin, M, Wagner, S, Mari, A, Breiteneder, H (2008) Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions, *J Allergy Clin Immunol*;121: 847-852

Reboldi, A, Cyster, J G (2016) Peyer's patches: organizing B-cell responses at the intestinal frontier, *Immunol. Rev.*; 271: 230–245

Requena, P, Daddaoua, A, Guadix, E, Zarzuelo, A, Suárez, M D, Sánchez de Medina, F, Martínez-Augustín, O (2009) Bovine glycomacropeptide induces cytokine production in human monocytes through the stimulation of the MAPK and the NF- $\kappa$ B signal transduction pathways, *Br J Pharmacol*; 157: 1232-1240

Requena, P, Daddaoua, A, Martínez-Plata, E, González, M, Zarzuelo, A, Suárez, M D, Sánchez de Medina, F, Martínez-Augustín, O (2008) Bovine glycomacropeptide ameliorates experimental rat ileitis by mechanisms involving downregulation of interleukin 17, *Br J Pharmacol*; 154: 825–832

Requena, P, González, R, López-Posadas, R, Abadía-Molina, A, Suárez, M D, Zarzuelo, A, De Medina, F, S, Martínez-Augustin, O (2010) The intestinal antiinflammatory agent glycomacropeptide has immunomodulatory actions on rat splenocytes, *Biochem Pharmacol*; 79(12): 1797-1804

Rivera, J, Gilfillan, A M (2006) Molecular regulation of mast-cell activation, *J. Allergy Clin. Immunol.*; 117, 1214–1225

Robitaille, G (2013) Growth-promoting effects of caseinomacropeptide from cow and goat milk on probiotics, *J Dairy Sci*; 80: 58–63

Roldán, N R, Jiménez, M, Cervantes-García, D, Marín, E, Salinas, E (2016) Glycomacropeptide administration attenuates airway inflammation and remodeling associated to allergic asthma in rat, *Inflamm Res*, 65: 273-283

Rodríguez-Hernández, G, Rentería-Monterrubio, A L, Rodríguez-Figueroa, J C, Chávez-Martínez, A (2014) Biopéptidos en la leche y sus derivados: funcionamiento y beneficios a la salud, *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, Vol 1, Num 3

Rojas, E, Torres, G (2013) Isolation and recovery of glycomacropeptide from milk whey by means of thermal treatment. *Food Sci. Technol (Campinas)*, 33(1), 14-20

Rola-Pleszczynski, M, Lemaire, I (1985) Leukotrienes augment interleukin 1 production by human monocytes. *J. Immunol.*; 135, 3958–3961

Rong, Y, Lu, Z, Zhang, H, Zhang, L, Song, D, Wang, Y (2015) Effects of casein glycomacropeptide supplementation on growth performance, intestinal morphology, intestinal barrier permeability and inflammatory responses in *Escherichia coli* K88 challenged piglets, *Animal Nutrition*; 1: 54- 59

Rossel, M, Araya, M (2011) Alergia alimentaria en la infancia, *Rev med clin condes*; 22(2) 184-189J

Saito, T, Itoh, T (1992) Variations and distributions of O-glycosidically linked sugar chains in bovine  $\kappa$ -casein A, *J Dairy Sci*; 75: 1768-1774

Saldanha, J C S, Gargiulo, D L, Silva, S S, Carmo-Pinto, F H, Andrade, M C, Alvarez-Leite, J I, Teixeira, M M, Cara, D C (2004) A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37: 809-816

Saliganti, V, Kapila, R, Sharma, R, Kapila, S (2015) Feeding probiotic *Lactobacillus rhamnosus* (MTCC 5897) fermented milk to suckling mothers alleviates ovalbumin-induced allergic sensitization in mice offspring, *Br J Nutr*; 114(8): 1168-1170

Salinas, J (2012) Mecanismos de daño inmunológico, *Rev. Med. Clin. Condes*; 23(4): 458-463J

Sánchez, J, Sánchez, J (2013) Epidemiology of food allergy in Latin America, *Allergol Immunopathol*; 546: 1-11

San Mauro-Martín, I, Bodega-Villanueva, P, Romero-Caamaño, E, Micó-Moreno, V, Garicano-Vilar, E, (2014), Asociación entre el momento de introducción de alimentos en el primer año de vida y la prevalencia de alergias alimentarias, *Rev Esp Nutr Hum Diet.*; 18(3): 145 - 154

Sampath, V, Sindher, S B, Zhang, W, Nadeau, K C (2018) New treatment directions in food allergy, *Ann Allergy Asthma Immunol*; 120 (3): 254-262

Sampson, H, A, Muñoz-Furlong, A, Campbell, R L, Franklin-Adkinson, N, Bock, N A, et al (2006) 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, *Ann Emerg Med*; 47 (4): 373- 380

Sampson, H, A, O'Mahony, L, Wesley Burks, A, Plaut M, Lack, G, Akdis, C A (2018) Mechanisms of food allergy, *J Allergy Clin Immunol*; 141:11-9

Santos, J, Bayarri, C, Saperas, E, Nogueiras, C, Antolín, M, Mourelle, M, Cadahia, A, Malagelada, J R (1999) Characterisation of immune mediator release during the immediate response to segmental mucosal challenge in the jejunum of patients with food allergy, *Gut*; 45, 553–558

Sawin, E A, De Wolfe, T J, Aktas, B, Stroup, B M, Murali, S G, Steele, J L, Ney, D M (2015) Glycomacropeptide is a prebiotic that reduces *Desulfovibrio* bacteria, increases cecal short-chain fatty acids and is anti-inflammatory in mice, *A, J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 309 (7): G590-G601

Schade, R P, Van Ieperen-Dan Dijk, A, Van Reijssen, F C, Versluis, C, Kimpen, J L, Knol, E F, Bruijnzeel-Koomen, C A, Van Hoffen, E (2000) Differences in antigen-specific T-cell responses between infants with atopic dermatitis with and without cow's milk allergy: Relevance of TH2 cytokines, *J. Allergy Clin. Immunol.*; 106, 1155–1162

Schiavi, E, Barletta, B, Butteroni, C, Corinti, S, Boirivant, M, Di Felice, G (2011) Oral therapeutic administration of a probiotic mixture suppresses established Th2 responses and systemic anaphylaxis in a murine model of food allergy, *Allergy*; 66(4): 499-508

Schüpbach, P, Neeser, J R, Golliard, M, Rouvet, M, Guggenheim, B (1996) Incorporation of Caseinoglycomacropeptide and Caseinophosphopeptide into the Salivary Pellicle Inhibits Adherence of Mutans Streptococci, *J Dent Res*; 75(10): 1779-1788

Segers, M, E, Lebeer, S (2014) Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG-host interactions, *Microbiol Cell Factories*; 13(Suppl 1): S7

Serra, S, De Simeis, D (2018) Use of *Lactobacillus rhamnosus* (atcc 53103) as Whole-cell biocatalyst for the regio- and stereoselective hydration of oleic, linoleic and linolenic acid, *Catalysts*; 8 (109): 1-14

Setia, A, Bhandari, S K, House, J D, Nyachoti, C M, Krause, D O (2009) Development and in vitro evaluation of an *Escherichia coli* probiotic able to inhibit the growth of pathogenic *Escherichia coli* K88, *J. Anim.Sci.*; 87: 2005–2012

Schmittgen, T D, Livak, KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols* 3: 1101-1108.

Shah, N P, (2000) Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods, *J. Dairy Sci.*; 83, 894-907

Sharma, G, Im, S H (2018) Probiotics as a potential Immunomodulating Pharmabiotics in Allergic Diseases: Current Status and Future Prospects, *Allergy Asthma Immunol Res*; 10(6): 575-590

Sharma, R, Kapila, R, Dass, G, Kapila, S (2014) Improvement in Th1/Th2 immune homeostasis, antioxidative status and resistance to pathogenic *E. coli* on consumption of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* fermented milk in ageing mice, *Age (Dordr)*; 36 (4): 9686

Shreffler, W G, Castro, R R, Kucuk, Z Y, Charlopowers, Z, Grishina, G, Yoo, S, et al (2006) The major glycoprotein allergen from *Arachis hypogaea*, Ara h 1, is a ligand of dendritic cell-specific ICAM - grabbing nonintegrin and acts as a Th2 adjuvant in vitro, *J Immunol*; 177(6): 3677-85

Shin, H S, Eom, J E, Shin, D U, Yeon, S H, Lim, S I, Lee, S Y (2018) Preventive Effects of a Probiotic Mixture in an Ovalbumin-Induced Food Allergy Model, *J. Microbiol. Biotechnol.*; 28, 65–76

Shida, K, Hachimura, S, Ametani, A, Ishimori, M, Ling, M, Hashiguchi, M, Ueda, Y, Sato, T, Kumagai, Y, Takamizawa, Y (2000) Serum IgE response to orally ingested antigen: A novel IgE response model with allergen-specific T-cell receptor transgenic mice, *J. Allergy Clin. Immunol.*; 105 (4): 788-795

Shida, K, Takahashi, R, Iwadate, E, Takamizawa, K, Yasui, H, Sato, T, Habu, S, Hachimura, S, Kaminogawa, S (2002) *Lactobacillus casei* strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model, *Clin Exp Allergy*; 32(4): 563-570

Shi-Ping, X, Xue-Ying, M, Xue, Ch, Bin, C (2012) Ameliorating effects of casein glycomacropeptide on obesity induced by high-fat diet in male Sprague-Dawley rats, *Food Chem Toxicol*; 56: 1-7

Shishehbor, F, Behroo, L, Ghafouriyan-Broujerdnia, M, Namjoyan, F, Latifi, S.M (2010) Quercetin effectively quells peanut-induced anaphylactic reactions in the peanut sensitized rats, *Iran. J. Allergy Asthma Immunol*; 9, 27–34

Sicherer, S, H (2001) Clinical implications of cross-reactive food allergens, *J Allergy Clin Immunol*; 108: 881-90

Sicherer, S H, Allen, K, Lack, G, Taylor, S L, Donovan, S M, Oria, M (2017) Critical issues in food allergy: a National Academies Consensus Report, *Pediatrics*; 140(2): e20170194

Sicherer, S H, Furlong, T J, Maes, H H, Desnick, R J, Sampson, H A, Gelb, B D (2000) Genetics of peanut allergy: a twin study, *J Allergy Clin Immunol*; 106: 53-56

Sicherer, S H, Leung, D Y M (2013) Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2012, *J Allergy Clin Immunol*, 131 (1): 55-66

Sicherer, S H, Sampson, H A (2018) Food allergy: a review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention and management, *J Allergy Clin Immunol*; 141: 41-58

Siddiqui, A A, Miner, P B (2004) The role of mast cells in common gastrointestinal diseases, *Curr. Allergy Asthma Rep.*; 4:47–54

Silva, M, Jacobus, N V, Deneke, C, Gorbach, S L (1987) Antimicrobial substance from a Human *Lactobacillus* Strain, *Antimicrob Agents Chemother.*; 31 (8): 1231-1233

Simons, F E, Gu, X, Simons, K J (2001) Epinephrine absorption in adults: intramuscular versus subcutaneous injection, *J Allergy Clin Immunol*; 108: 871-873

Simons, F E, Roberts, J R, Gu, X, et al (1998) Epinephrine absorption in children with a history of anaphylaxis, *J Allergy Clin Immunol*;101: 33-37

Smaldini, P L, Orsini-Delgado, M L, Alberto-Fossati, C A, Docena, G H (2016) Avances en las inmunoterapias para alergias alimentarias, *Acta Bioquím Clín Latinoam*; 50 (1): 61-7

Smith, P K, O'B Hourihane, J, Lieberman, P (2015) Risk multipliers for severe food anaphylaxis, *World Allergy Organ J*; 8(30): 1-6

Smits, H H, Engering, A, van der Kleij, D, de Jong, E C, Schipper, K, van Capel, T M M, Zaat, B A J, Yazdanbakhsh, M, Wierenga, E A, van Kooyk, Y (2005) Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells *in vitro* by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin, *J Allergy Clin Immunol*; 115: 1260-7

Snapper, C M, Finkelman, F D, Paul, W E (1998) Differential regulation of IgG1 and IgE Synthesis by Interleukin 4, *J. Exp. Med.*; 167, 183–196

Soller, L, Ben-Shoshan, M, Harrington, D W, Knoll, M, Fragapane, J, Joseph, L, St. Pierre, Y, La Vieille, S, Wilson, K, Elliott, S, J, *et al.* (2015) Prevalence and Predictors of Food Allergy in Canada: A Focus on Vulnerable Populations, *J Allergy Clin Immunol Pract*; 3: 42-9

Solverson, P, Murali, S G, Brinkman, A S, Nelson, D W, Clayton, M K, Yen, C L, Ney, D M (2012) Glycomacropeptide, a low phenylalanine protein isolated from cheese whey, supports growth and attenuates metabolic stress in the murine model of phenylketonuria, *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012 Apr 1; 302(7): E885–E895

Sonoda, E, Matsumoto, R, Hitoshi, Y, Ishii, T, Sugimoto, M, Araki, S, Tominaga, A, Yamaguchi, N, Tkatsu, K (1989) Transforming Growth factor  $\beta$  induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production, *J. Exp. Med.*; 170, 1415–1420

Stechschulte, D J, Orange, R P, Austen, K F (1970) Immunochemical and biologic properties of rat IgE. I. Immunochemical identification of rat IgE, *J Immunol*; 105: 1082-1086.

Stefka, A T, Feehley, T, Tripathi, P, Qiu, J, McCoy, K, Mazmanian, S K, et al (2014) Commensal bacteria protect against food allergen sensitization, *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 13145–13150

Stone, K, D, Prussin, C, Metcalfe, D (2010) IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils, *J Allergy Clin Immunol*; 125 (2): S73-S80

Strait, R T, Mahler, A, Hogan, S, Khodoun, M, Shibuya, A, Finkelman, F D (2011) Ingested allergens must be absorbed systemically to induce systemic anaphylaxis, *J Allergy Clin Immunol*; 127(4): 982-989

Subramanian, N, Bray, M A (1987) Interleukin 1 releases histamine from human basophils and mast cells in vitro, *J. Immunol.*; 138, 271–275

Sudo, N, Sawamura, S, Tanaka, K, Aiba, Y, Kubo, C, Koga, Y (1997) The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction, *J Immunol*; 159:1739–45

Sun, N, Zhou, C, Pu, Q, Wang, J, Huang, K, Che, H (2013) Allergic reactions compared between BN and Wistar rats after oral exposure to ovalbumin, *J. Immunotoxicol*, 10:1, 67-74

Szymlec-Gay, E A, Lönnnerdal, B, Abrams, S A, Kvistgaard, A S, Domellöf, M, Hernell, O (2012)  $\alpha$ -Lactalbumin and Casein-Glycomacropeptide do not affect iron absorption from formula in healthy term infants, *J Nutr*; 142: 1226–1231

Tan, H T, Ellis, J A, Koplin, J J, Matheson, M C, Gurrin, L C, Lowe, A J, Martin, P E, Dang, T D, Wake, M, Tang, M L K, *et al.* (2012) Filaggrin loss-of-function mutations do not predict food allergy over and above the risk of food sensitization among infants, *J Allergy Clin Immunol*; 130:1211–1213

Tan, J, McKenzie, C, Vuillermin, P J, Govere, G, Vinuesa, C G, Mebius R E, Macia L, Mackay, C R (2016) Dietary Fiber and Bacterial SCFA Enhance Oral Tolerance and Protect against Food Allergy through Diverse Cellular Pathways

Tang, A W (2003) A practical Guide to Anaphylaxis, *Am Fam Physician*; 68: 1325-1332

Tang, M L K, Martino, D J (2013) Oral immunotherapy and tolerance induction in childhood, *Pediatr Allergy Immunol*; 24: 512–520

Tan-Lim, C S C, Esteban-Ipac, N A R (2018) Probiotics as treatment for food allergies among pediatric patients: a meta-analysis, *World Allergy Organ J*; 11(25): pp.13

Terhune, T D, Deth, R C (2013) How aluminum adjuvants could promote and enhance non-target IgE synthesis in a genetically-vulnerable sub-population, *J. Immunotoxicol.*; 10, 210–222

Thang, C L, Baurhoo, B, Boye, J I, Simpson, B K, Zhao, X (2011) Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation on cow's milk allergy on a mouse model, *Allergy Asthma Clin Immunol*; 7(1): 20

Theodorou, V, Fioramonti, J, Bueno, L (1993) Recombinant interleukin-1 receptor antagonist protein prevents sensitization and intestinal anaphylaxis in guinea pigs, *Life Sci.*; 53, 733–738

Theodorou, V, Fioramonti, J, Junien, J L, Bueno, I (1994) Anaphylactic colonic hypersecretion in cow's milk sensitized guinea-pigs depends upon release of Interleukin-1, prostaglandins and mast-cell degranulation, *Aliment. Pharmacol. Ther.*; 8, 301–307

- Thomä-Worringer, C, Sørensen, J, López-Fandiño, R (2006) Health effects and technological features of caseinomacropeptide, *Int Dairy J*;16(11): 1324-1333
- Todorov, S D, Furtado, D N, Saad, S M, Gombossy de Melo Franco, B D (2011) Bacteriocin production and resistance to drugs are advantageous features for *Lactobacillus acidophilus* La-14, a potential probiotic strain, *NewMicrobiol*; 34, 357–370
- Toh, Z Q, Anzela, A, Tang, M L K, Licciardi, P V (2012) Probiotic therapy as a novel approach for allergic disease, *Front Pharmacol*; 21(3):171
- Tordesillas, L, Goswami, R, Benedé, S, Grishina, G, Dunkin, D, Järvinen, K M, Maleki, S, J, Sampson, H A, Berin, C A (2014) Skin exposure promotes a Th2-dependent skin sensitization to peanut allergens, *J Clin Invest*; 124(11):4965–4975
- Torres-Yanez, M J, Vallejo-Cordoba, B, González-Córdova, A F (2005) Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche, *Arch Latinoam Nutr*, 55 (2), 111-117
- Travers, J, Rothenberg, M E (2015) Eosinophils in Mucosal Immune Responses, *Mucosal Immunol.*; 8, 464–475
- Tuomola, E M A C, Ouwehand, S J, Salminen (1999) The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus, *FEMS Immunol, Med. Microbiol*, 26: 137–142
- Tuomola, E M S J, Salminen (1998) Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures, *Int J Food Microbiol*, 41:45–51
- Turner, P J, Wainstein, B K (2017) Crossing the threshold: can outcome data from food challenges be used to predict risk of anaphylaxis in the community? *Allergy*; 72:9-12
- Urrego-Álvarez, J R, Hernández-Bonfante, L C, Marrugo-Cano, J (2009) Factores epidemiológicos en la inmunopatogénesis de la alergia a los alimentos, Artículo de revisión, *Salud Uninorte*; 25 (2): 258-279
- Yamaki, K, Yoshino, S (2012) Preventive and therapeutic effects of rapamycin, a mammalian target of rapamycin inhibitor, on food allergy in mice, *Allergy*; 67: 1259–70
- Yan, F, Polk, B (2002) Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells, *The journal of biological chemistry*; 277 (52): 50959-50965
- Yan-Fong, F L, Kirjavainen, P V, El-Nezami, H (2016) Immunomodulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)- derived soluble factors on antigenpresenting cells of healthy blood donors, *Nature, Scientific Reports*; 6(22845): 1-17
- Yan, F, Polk, B (2012) *Lactobacillus rhamnosus* GG: An Updated Strategy to Use Microbial Products to Promote Health, *Funct Food Rev*; 4(2): 77-84
- Yang, P C, Berin, M C, Yu, L, Perdue, M H (2001) Mucosal pathophysiology and inflammatory changes in the late phase of the intestinal allergic reaction in the rat, *Am. J. Pathol.*; 158, 681–690
- Yang, P C, Xing, Z, Berin, C M, Soderholm, J D, Feng, B S, Wu, L, et al (2007) TIM-4 expressed by mucosal dendritic cells plays a critical role in food antigen-specific Th2 differentiation and intestinal allergy, *Gastroenterology*; 133: 1522-33
- Ye, L, Chen, Q S, Li, W, Yan, Y L, Zhao, P, Pang, G C, Hu, Z H (2014) Effect of Casein Glycomacropeptide on Phagocytic Cells and Intestinal Mucosa Immune Cells in Mice, *Food Sci.*; 35, 234–240
- Yeun, K J, Choi, Y O, Ji, G E (2008) Effects of Oral Probiotics (*Bifidobacterium lactis* AD011 and *Lactobacillus acidophilus* AD031) Administration on Ovalbumin-Induced Food Allergy Mouse Model, *J. Microbiol. Biotechnol.*; 18(8): 1393-1400
- Yu, W, Hussey-Freeland, D M, Nadeau, K C (2016) Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy, *Nat. Rev. Immunol.*; 11: 15
- Van Kampen, C, Gauldie, J, Collins, S M (2005) Proinflammatory properties of IL-4 in the intestinal microenvironment, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288: G111–G117

- VanGramberg, J L, De Veer, M J, O'Hehir, R E, Meeusen, E N T, Bischo, R J (2013) Use of Animal Models to Investigate Major Allergens Associated with Food Allergy, *J. Allergy*; vol 2013: 10
- Van Halteren, A G, Van der Cammen, M J, Biewenga, J, Savelkoul, H F, Kraal, G (1997) IgE and mast cell response on intestinal allergen exposure: a murine model to study the onset of food allergy, *J Allergy Clin Immunol*; 99 (1 Pt 1): 94-9
- Vázquez-García, R E, Huerta-López, J, Pedroza-Meléndez, Á (2005) Antileucotrienos, revisión de la literatura, *Alergia e Inmunol. Pediatr.*; 14(2): 56-59
- Ventura, M T, Polimeno, L, Amoroso, A C, Gatti, F, Annoscia, E, Marinaro, M, Di Leo, E, Matino, M G, Buquicchio, R, Bonini, S, *et al.* (2006) Intestinal permeability in patients with adverse reactions to food. *Dig. Liver Dis.*; 38, 732–736
- Viljanen, M, Kuitunen, M, Haahtela, T, Juntunen-Backman, K, Korpela, R, Savilahti, E (2005) Probiotic effects on faecal inflammatory markers and on faecal IgA in food allergic atopic eczema/dermatitis syndrome infants, *Pediatr Allergy Immunol*; 16: 65–71
- Wang, M, Han, J, Domenico, J, Shin, Y S, Jia, Y, Gelfand, E W (2016) Combined blockade of the histamine H1 and H4 receptor suppresses peanut-induced intestinal anaphylaxis by regulating dendritic cell function, *Allergy*; 71, 1561–1574
- Wang, M, Takeda, K, Shirashi, Y, Okamoto, M, Dakhama, A, Joetham, A, Gelfand, E W (2010) Peanut-induced intestinal allergy is mediated through a mast cell-IgE-FcepsilonRI-IL-13 pathway, *J. Allergy Clin. Immunol.*; 126, 306–316
- Wang, Y, Gong, L, Wu, Y P, Cui, Z W, Wang, Y Q, Huang, Y, Zhang, X P, Li, W F (2018) Oral administration of *Lactobacillus rhamnosus* GG to newborn piglets augments gut barrier function in pre-weaning piglets, *J Zhejiang Univ Sci B*; 20 (2): 180-192
- Wang, Y J, Song, S D, Chen, J C, Wang, X F, Jiang, Y L, Xie, Q M, Chen, J Q, Li, Z G, Tang, H F (2014) Effects of Inactivated *Bordetella pertussis* on Phosphodiesterase in the Lung of Ovalbumin Sensitized and Challenged Rats, *Hindawi*; 2014: 11pp
- Werfel, T, Asero, R, Ballmer-Weber, B K, Beyer, K, Enrique, E, Knulst, A C, Mari, A, Muraro, A, Ollert M, Poulsen, L K, *et al.* (2015) Position paper of the EAACI: food allergy due to immunological cross-reactions with common inhalant allergens, *Allergy*; 70: 1079-1090
- Wood, R A (2015) Advances in food allergy in 2015, *J Allergy Clin Immunol*; 138: 1541-7
- Zaki, O K, El-Wakeel, L, Ebeid, Y, Ez Elarab, H S, Moustafa, A, Abdulazim, N, Karara, H, Elghawaby, A (2016) The use of glycomacropeptide in dietary management of phenylketonuria, *J Nutr Metab*; vol 2016: 1-5
- Zárate-Hernández, M C, (2015) Perfil clínico-epidemiológico de pacientes con sospecha de alergia alimentaria en México, *Estudio Mexipreval. Rev Alerg Mex*; 62: 28-40
- Zhang, J, Su, H, Li, Q, Wu, H, Liu, M, Huang, J, Zeng, M, Zheng, Y, Sun, X (2017) Oral administration of *Clostridium butyricum* CGMCC0313-1 inhibits  $\beta$ -lactoglobulin-induced intestinal anaphylaxis in a mouse model of food allergy, *Gut Pathog.*; 9, 11
- Zhang, Q, Duan, J, Yang, B, Yu, D, Liu, L, Bai, H (2018) Cathepsin B regulates the activation of NLRP3 Inflammasome by Calcium Signaling, *Neuropsychiatry*; 8(6): 1899–1912
- Zhang, Y P, Gaffar, A (1998) Storage stable dentrifice composition containing an antibacterial casein glycomacropeptide adjuvant. U.S. Patent 5,741,773
- Zhang, Y P, Gaffar, A (2001) Fluoride free dental remineralization. U.S. Patent 6,207,138
- Zhu, J (2015) T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production, *Cytokine*; 75, 14–24

Zhu, Y H, Li, X Q, Zhang, W, Zhou, D, Liu, H Y, Wang, J F (2014) Dose-Dependent Effects of *Lactobacillus rhamnosus* on Serum Interleukin-17 Production and Intestinal T Cell Responses in Pigs challenged with *Escherichia coli*, *Appl Environ Microbiol*; 80 (5): 1787-1798

Zmora, N, Zilberman-Schapira, G, Suez, J, Halpern, Z, Segal, E, Elinav, E (2018) Personalized Gut Mucosal Colonization Resistance to Empiric Probiotics Is Associated with Unique Host and Microbiome Features, *Cell*; 174: 1388–1405

Zubeldia, J M, Baeza, M L, Jáuregui, I, Senent, C J (2012) Libro de las enfermedades alérgicas de la fundación BBVA, Fundación SEAIC, Bilbao, España, p.p. 487



11. ANEXOS



## Aceptación del Manuscrito Experimental

Dear Dr. Salinas,

We are pleased to inform you that the following paper has been officially accepted for publication:

Manuscript ID: nutrients-922436

Type of manuscript: Article

Title: Protective Effect of Glycomacropeptide on Food Allergy with Gastrointestinal Manifestations in a Rat Model through Down-regulation of Type 2 Immune Response

Authors: Diana Reyes-Pavón, Daniel Cervantes-García, Luis G. Bermúdez-Humarán, Laura Elena Córdova-Dávalos, Andrés Quintanar-Stephano, Mariela Jiménez \*, Eva Salinas \*

Received: 20 August 2020

Kind regards,

Ms. Dorothy Deng

E-Mail: [dorothy.deng@mdpi.com](mailto:dorothy.deng@mdpi.com)

--

MDPI Wuhan Office No.6 Jingnan Road, 5.5 Creative Industry Park, 25th Floor, Hubei Province, China

MDPI Nutrients Editorial Office

St. Alban-Anlage 66, 4052 Basel, Switzerland

E-Mail: [nutrients@mdpi.com](mailto:nutrients@mdpi.com)

<http://www.mdpi.com/journal/nutrients>

## Aceptación del Manuscrito de Revisión

Estimada doctora Salinas:

Informo a usted que su artículo "**Fisiopatología de la alergia alimentaria**" está programado para el número 1-2020 de Revista Alergia.

Reyes-Pavón D, Jiménez M, Salinas E.

Recibido: 2020-02-18

Aceptado: 2020-02-29

DOI: 10.29262/ram.v67i1.731

Gabriela Ramírez

XqRevista Alergia México

Colegio Mexicano de Inmunología y Alergia, A. C.

Sitio: [revistaalergia.mx](http://revistaalergia.mx)

Contacto: [revista.alergia@gmail.com](mailto:revista.alergia@gmail.com)