



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ING. BIOQUÍMICA

TESIS

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO INMUNOMODULADOR DEL
GLICOMACROPÉPTIDO BOVINO (GMPb) EN LA HIPERSENSIBILIDAD
MEDIADA POR MASTOCITOS.”**

PRESENTA

Mariela Jiménez Vargas

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTORAS

Dra. Eva María Salinas Miralles

Dra. Norma Angélica Chávez Vela

ASESOR

Dr. Rodolfo González Segovia

Aguascalientes, Ags, Enero del 2013.



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

L.A.Q.B. MARIELA JIMÉNEZ VARGAS
ALUMNO (A) DEL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E .

Estimado (a) alumno (a) Jiménez:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **“Evaluación del efecto inmunomodulador del glicomacropéptido bovino (GMPb) en la hipersensibilidad mediada por mastocitos”**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE
Aguascalientes, Ags., 17 de enero de 2013.
“SE LUMEN PROFERRE”
EL DECANO SUSTITUTO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



c.c.p.- Archivo
JJRG,mjda



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES

Aguascalientes, Ags., 15 de Enero de 2013.

M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos
Decano del Centro de Ciencias Básicas y presidente del
CONSEJO ACADEMICO DEL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes
PRESENTE

Por este conducto hacemos de su conocimiento que la aspirante a Doctor en Ciencias estudiante del doctorado en Ciencias Biológicas **Mariela Jiménez Vargas**, ha cumplido con los objetivos y metas del proyecto doctoral titulado "**Evaluación del efecto inmunomodulador del glicomacropéptido bovino (GMPb) en la hipersensibilidad mediada por mastocitos**". Adicionalmente, los resultados de este proyecto se publicaron en la revista *Clinical and Experimental Immunology* con el artículo: "**Pretreatment with glycomacropptide reduces allergen sensitization, alleviates immediate cutaneous hypersensitivity and protects from anaphylaxis**", con lo que cumple con los requisitos para obtener el grado de Doctor en Ciencias. De igual manera, los abajo firmantes hemos revisado el contenido de la tesis y estamos de acuerdo con el contenido de la misma.

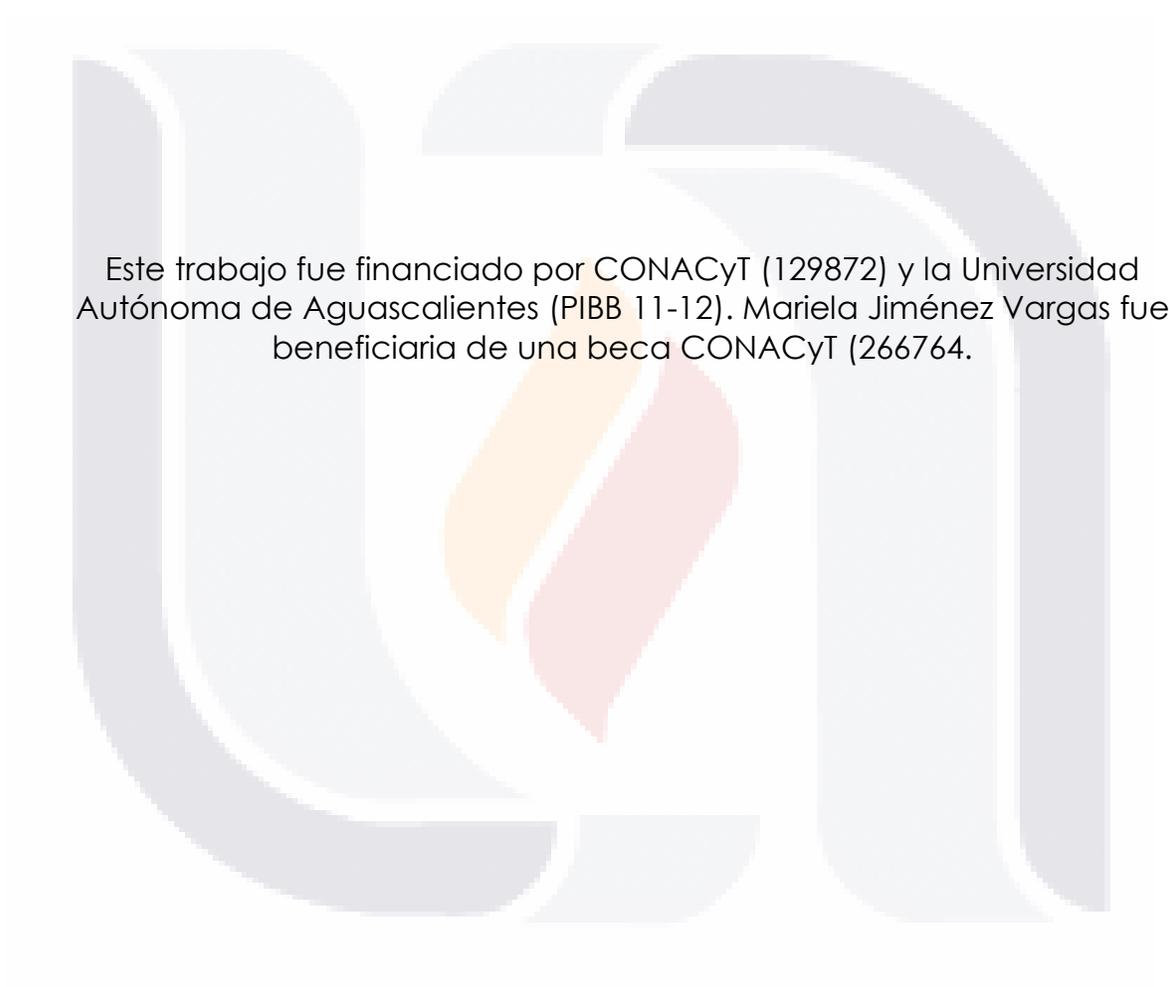
Sin más por el momento, nos despedimos de Usted con un afectuoso saludo.

Atentamente,

Dra. Eva María Salinas Miralles
Co-Directora de tesis

Dra. Norma Angélica Chávez Vela
Co-Directora de tesis

Dr. Rodolfo González Segovia
Miembro del comité tutorial



Este trabajo fue financiado por CONACyT (129872) y la Universidad Autónoma de Aguascalientes (PIBB 11-12). Mariela Jiménez Vargas fue beneficiaria de una beca CONACyT (266764).

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer profundamente a todas a aquellas personas, que sin tener obligación alguna, pusieron un granito de arena para que yo pudiera realizar este trabajo. Especialmente a:

Mi madre, que más que sus palabras, fueron sus hechos los que me enseñaron a desafiar al destino, y que este no es más que el resultado de lo que nosotros construimos.

Mi esposo, porque siempre creyó en mí aún en aquellas ocasiones en que yo dejé de hacerlo, y motivado en esa confianza hizo todo lo posible por facilitarme el camino, aún a pesar de su cansancio.

Mi hija, por su amor incondicional a pesar de las horas de juego robadas, los cuentos no contados, y mis horas de ausencia.

A mis hermanos, Che, Franbert y Niva, por las horas en que jugábamos a ser adultos y me inspiraron a luchar por mis sueños, por su apoyo, confianza y amor.

A la Dra Eva Salinas porque sin conocerme, me confió su proyecto y me dejó hacerlo mío. Porque me guió durante este largo camino, compartiendome sus conocimientos, experiencia y amistad. Porque cuando yo no veía salida, ella siempre abrió una puerta.

A la Dra Norma Chávez, quién me enseñó el gusto por la investigación y fue el medio para que yo estuviera aquí. Por sus palabras de aliento y su consejos.

A los doctores Andrés Quintanar, Javier Ventura y José Luis Quintanar, por los reactivos gastados, por las tijerras desafiladas y por los equipos descompuestos; pero sobre todo, por sus consejos oportunos y por el gran ejemplo de amor a su trabajo.

A mis compañeros de aventura, Christian Palos, Denisse Calderón, Irene Guzman y Yolanda Romo, quienes ya embarcados en la aventura, me ofrecieron su amistad y nos volvimos cómplices unos de otros en la batalla.

A mis compañeras de trabajo, Berenice Barrón, Karla Macías y Renata Roldán, quienes me facilitaron el trabajo con su experiencia e hicieron suyo este proyecto.

A Irma y Magda que sin ser parte, se hicieron parte y me brindaron su tiempo, experiencia y amistad.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a:

Mi hija Carmina quien es mi razón de ser y que con su amor e inocencia ilumina todos mis días.

A mi esposo, Miguel, quien con su amor y paciencia hizo más fácil esta travesía.

Y por último a Mariela, porqué un día soñaste que la vida podía ser diferente y fueron esos sueños, con la voluntad de Dios, los que te llevaron a vivir esta experiencia.

ÍNDICE GENERAL

Tema	Página
RESUMEN EN ESPAÑOL	14
RESUMEN EN INGLÉS	16
1. ANTECEDENTES	17
1.1. Alergia.	17
1.1.1. Epidemiología.	18
1.1.2. Predisposición genética-ambiental.	20
1.1.3. Principales elementos en la alergia.	22
1.1.3.1. Alérgeno.	22
1.1.3.2. Inmunoglobulina E.	22
1.1.3.3. Receptor de alta afinidad para IgE.	23
1.1.3.4. Mastocitos vs Basófilos.	24
1.1.3.5. Mediadores preformados y <i>de novo</i> de los mastocitos.	26
1.1.3.5.1. Mediadores preformados.	27
1.1.3.5.1.1. Aminas biogénicas.	27
1.1.3.5.1.2. Proteasas.	28
1.1.3.5.1.3. Proteoglicanos.	28
1.1.3.5.1.4. Citocinas.	29
1.1.3.5.2. Mediadores de nueva síntesis.	29
1.1.3.5.2.1. Mediadores lipídicos.	29
1.1.3.5.2.2. Citocinas.	29
1.1.3.6. Citocinas moduladoras de la alergia.	30
1.1.3.6.1. Interleucina 4.	30
1.1.3.6.2. Interleucina 13.	32
1.1.3.6.3. Interleucina 10.	33
1.1.4. Etapas de la hipersensibilidad de tipo I mediada por IgE.	33
1.1.4.1. Sensibilización.	34

Tema	Página
1.1.4.2. Inflamación alérgica.	35
1.1.4.2.1. Reacciones de fase temprana.	35
1.1.4.2.2. Reacciones de fase tardía.	37
1.1.4.2.3. Inflamación alérgica crónica.	37
1.1.5. Anafilaxia.	38
1.1.6. Vías de activación del mastocito.	40
1.1.6.1. Mecanismos de regulación de activación de mastocitos mediada por el receptor FcεRI.	40
1.1.6.2. Activación independiente de IgE.	42
1.1.7. Translocación del factor de transcripción NFκB.	44
1.1.8. Tratamiento.	45
1.2. Glicomacropéptido (GMP).	47
1.2.1. Estructura y propiedades fisicoquímicas.	47
1.2.2. Propiedades nutricionales.	49
1.2.3. Inmunogenicidad.	50
1.2.4. Farmacodinamia.	50
1.2.5. Función biológica.	51
2. JUSTIFICACIÓN	55
3. HIPÓTESIS	56
4. OBJETIVOS	57
5. METODOLOGÍA	58
5.1. Animales y protocolo experimental.	58
5.2. Sensibilización de animales.	59
5.3. Obtención de muestras de suero.	60
5.4. Anafilaxia cutánea pasiva (ACP).	60

Tema	Página
5.5. Aislamiento de esplenocitos de rata.	61
5.6. Determinación de viabilidad celular.	62
5.7. Cultivo de esplenocitos.	62
5.8. Ensayo de proliferación celular.	63
5.9. Cuantificación de citocinas.	63
5.10. Reacción anafiláctica cutánea.	64
5.11. Reacción anafilactoide cutánea.	65
5.12. Prueba de anafilaxia sistémica.	65
5.13. Reacción anafilactoide sistémica.	66
5.14. Cultivo de mastocitos peritoneales.	66
5.15. Cuantificación de histamina.	67
5.16. Cuantificación de β -hexosaminidasa.	68
5.17. Extracción de proteínas citosólicas de mastocitos.	69
5.18. Análisis de NF κ B fosforilado por electroforesis e inmunotinción.	69
5.18.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).	69
5.18.2. Electrotransferencia.	72
5.18.3. Inmunotinción de proteínas por quimioluminiscencia.	72
5.19. Análisis estadístico.	73
6. RESULTADOS	74
6.1. Efecto de la administración de GMPb vía oral sobre la producción de IgEs alérgeno-específicas en ratas sensibilizadas con alérgeno.	76
6.2. Efecto del GMPb administrado vía oral sobre la producción de citocinas asociadas a la alergia.	76
6.2.1. Efecto del GMPb vía oral sobre la proliferación de esplenocitos de ratas sensibilizadas con OVA.	76
6.2.2. Efecto del GMPb vía oral sobre la síntesis de IL-4, IL-13 e IL-10 por esplenocitos de ratas sensibilizadas con OVA.	79

Tema	Página
6.3. Efecto de la administración oral del GMPb sobre la intensidad de la respuesta inflamatoria aguda localizada y sistémica.	81
6.3.1.Efecto de la administración oral de GMPb previo a la sensibilización, sobre la intensidad de la respuesta inflamatoria aguda local.	81
6.3.2.Efecto de la administración oral de GMPb posterior a la sensibilización, sobre la intensidad de la respuesta inflamatoria aguda local.	84
6.3.3.Efecto de la administración oral de GMPb sobre la reacción anafilactoide local inducida por el C48/80.	85
6.3.4.Efecto de la administración oral del GMPb previo a la sensibilización, sobre la intensidad de la respuesta inflamatoria sistémica.	86
6.3.5.Efecto de la administración oral de GMPb sobre la reacción anafilactoide sistémica inducida por el C48/80.	88
6.4. Activación de los mastocitos bajo el efecto del GMPb en un modelo <i>in vitro</i> .	89
6.4.1.Secretión de mediadores preformados de los mastocitos bajo el efecto del GMPb en un modelo <i>in vitro</i> .	90
6.4.2.Activación del mastocito vía NF- κ B inducida por el GMPb en un modelo <i>in vitro</i> .	92
7. DISCUSIÓN	94
8. CONCLUSIONES	102
9. BIBLIOGRAFÍA	103
10. ANEXO A	121

ÍNDICE DE TABLAS

Tema	Página
TABLA 1 Tasa de supervivencia después del choque anafiláctico inducido por OVA en animales SH, S y ST.	88

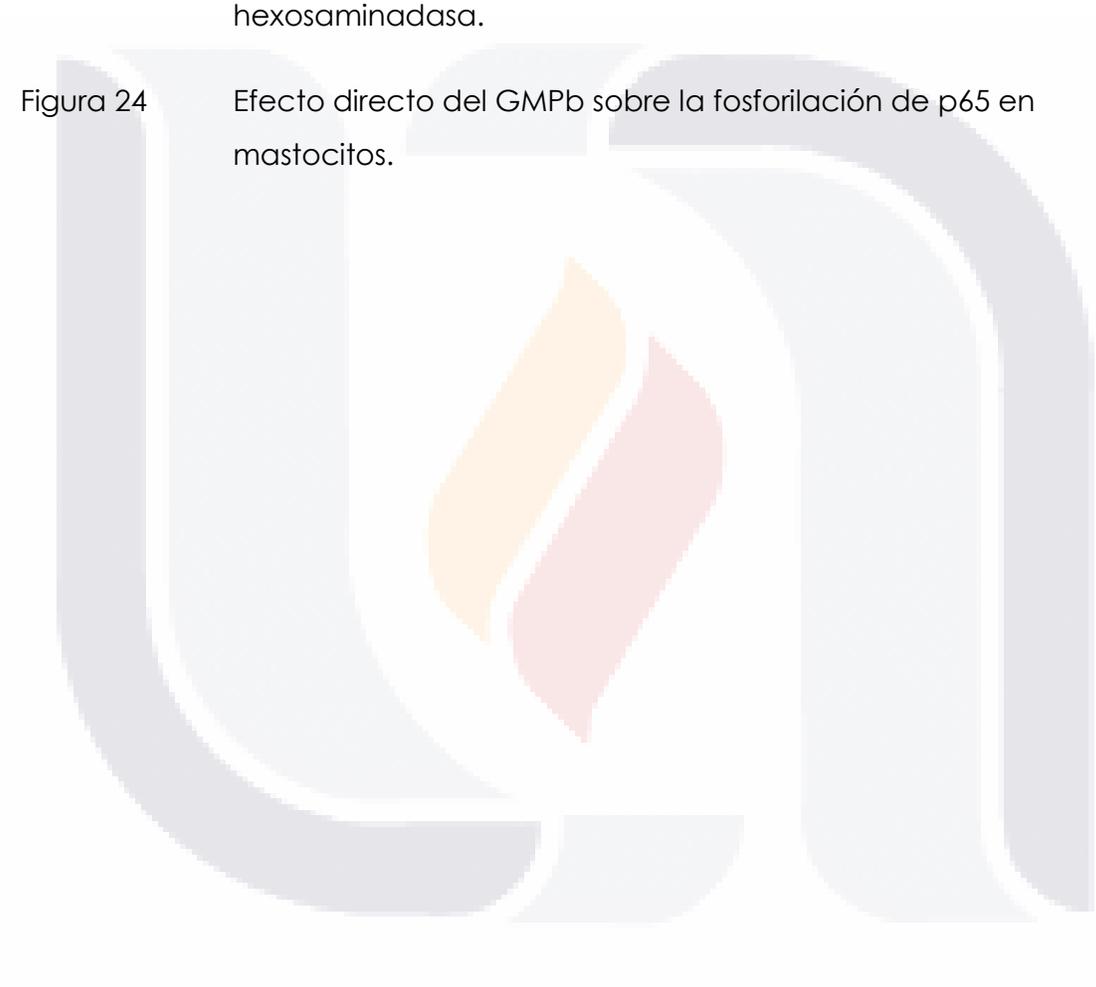


ÍNDICE DE FIGURAS

Tema	Página	
Figura 1	Porcentaje estimado de pacientes alérgicos por país encuestado.	18
Figura 2	Porcentaje de pacientes alérgicos en el total de la población encuestada en 33 países.	19
Figura 3	Mecanismo general de la "hipótesis de la higiene".	21
Figura 4	Estructura de la IgE y su receptor.	23
Figura 5	Receptor de alta afinidad para IgE (FcεRI) en su forma clásica (tetramérica) y en su forma incompleta (trimérica) (Imagen modificada de Owen, 2007).	24
Figura 6	Micrografías celulares.	26
Figura 7	Mecanismo general de las reacciones de hipersensibilidad de tipo I.	34
Figura 8	Reacciones de fase temprana en la inflamación alérgica.	36
Figura 9	Vía de activación dependiente de IgE mediada por el receptor FcεRI en los mastocitos, para la liberación de sus mediadores farmacológicamente activos.	42
Figura 10	Vías y mediadores de las reacciones dependientes e independientes de IgE.	43

Tema	Página
Figura 11 Secuencia de las variantes genéticas A y B del GMP bovino.	48
Figura 12 Titulación de IgE anti-OVA de sueros de ratas Wistar sensibilizadas con OVA con y sin tratamiento con GMPb.	75
Figura 13 Estandarización de ensayo de proliferación de esplenocitos.	77
Figura 14 El pre-tratamiento con GMPb inhibe la respuesta proliferativa alérgeno específica de esplenocitos.	78
Figura 15 Efecto de GMPb sobre la síntesis de citocinas asociadas a la alergia.	80
Figura 16 Curva dosis respuesta tras la inyección i.d. de dosis crecientes de OVA	82
Figura 17 Efecto del GMPb sobre la anafilaxia cutánea activa en ratas sensibilizadas con OVA.	83
Figura 18 Efecto del GMPb, posterior a la sensibilización con OVA, sobre la anafilaxia cutánea activa en ratas Wistar.	84
Figura 19 Efecto del GMPb sobre la respuesta anafilactoide aguda local inducida por C48/80.	85
Figura 20 Efecto inhibitorio del pret-ratamiento con GMPb en la anafilaxia sistémica inducida por el alérgeno.	87
Figura 21 Efecto del GMPb sobre la reacción anafilactoide inducida por el C48/80.	89

Tema	Página
Figura 22 Histamina secretada durante la incubación de los mastocitos solos, con GMPb.	90
Figura 23 Efecto directo del GMPb sobre la activación de mastocitos peritoneales a través de la secreción de β -hexosaminadasa.	92
Figura 24 Efecto directo del GMPb sobre la fosforilación de p65 en mastocitos.	93



ACRÓNIMOS

A23187	Ionóforo de calcio
ACA	Anafilaxia cutánea activa
ACP	Anafilaxia cutánea pasiva
APS	Persulfato de amonio
BHT	Buffer Hepes-Tirodes
BSA	Albúmina sérica bovina
BTK	Tirosin cinasa de Bruton
C3aR	Receptor de la anafilotoxina C3a
C48/80	Compuesto 48/80
C5aR	Receptor de la anafilotoxina C5a
CD	Célula dendrítica
CD23	Receptor de baja afinidad para IgE
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la
cisLTs	Cisteinil leucotrienos
CMP	Caseinomacropéptido
ConA	Concanavalina A
CR2	Receptor 2 del complemento
CR4	Receptor 4 del complemento
DAG	Diacilglicerol
DO	Densidad óptica
DPT	Vacuna celular contra difteria, <i>Bordetella pertussis</i> y tétanos
EAACI	Europea de Alergología e Inmunología Clínica
ECRHS	Comunidad Europea de la Supervivencia de la Salud Respiratoria
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
Fc	Fracción cristalizante

FcεRI	Receptor de alta afinidad para la fracción cristalizable de inmunoglobulina E
FcγRIII	Receptor de baja afinidad para la fracción cristalizable de inmunoglobulina G
FOS	Fructo-oligosacaridos
GAB2	Proteína adaptadora asociada a Grb2
Gal	Galactosa
Gal-NAc	N-acetilgalactosamina
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos
GMP	Glicomacropéptido
GMPb	Glicomacropéptido bovino
GOS	Galacto-oligosacáridos
H	Histamina
i.c.	Intracardiaca
i.d.	Intradérmica
i.m.	Intramuscular
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IL-13Ra	Cadena receptora de IL-13 α
IL-4Ra	Cadena receptora de IL-4 α
Ile	Isoleucina
INF-γ	Interferón γ
IPMA	ionóforo de calcio A23187+12-miristato 13-acetato
ISAAC	Estudio Internacional de Asma y Alergias en la Infancia
ITAM	Motivo de activación de tirosin cinasas
IκB	Inhibidores de NFκB
kDa	Kilo Daltones
Leu	Leucina

LPS	Lipopolisacárido
LT	Leucotrieno
MAFA	Antígeno asociado a la función del mastocito
Mc	Mastocitos con quimasa
Met	Metionina
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MM	Mastocito de mucosa
TGF- β	Factor transformador de crecimiento β
M _T	Mastocitos con triptasa
MTC	Mastocitos de tejido conectivo
M _{Tc}	Mastocitos con triptasa y quimasa
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)
NeuAc	Ácido neuroamínico
NF κ B	Factor nuclear κ B
NKT	Linfocito T natural asesino
NK	Célula natural asesina
NOD	Receptores con dominios de oligomerización de nucleótidos
NSAID	Drogas antiinflamatorias no esteroideas
OPA	o-ftaldialdehido
OVA	Ovoalbúmina
PA	Fosfatasa alcalina
PAF	Factor activador de plaquetas
PG	Prostaglandinas
PHA	Fitohemaglutinina
Phe	Fenilalanina
PI(3)K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PKC	Proteína cinasa C
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PLC- γ	Fosfolipasa C- γ

PM	Peso molecular
PMSF	Fluoruro de fenilmetasulfonil
PRR	Receptores de reconocimiento asociados a patrones microbianos
PtdIns(3,4,5)P ₃	Inositol trifosfato
PtdIns(4,5)P ₂	Fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato
PTK	Proteína tirosin cinasa
PVDF	Polivinildieno fluorado
RANTES	Quimiocina expresada y secretada por células T normales y regulada por activación
RAS-MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
RIPA	Ensayo de radio-inmunoprecipitación
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa de retro-transcripción
s.c.	Subcutánea
S.E.M.	Media del error estándar
s.s.	Solución salina
SCF	Factor de células madre
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio
Ser	Serina
STAT6	Factor de transducción de señales y activador de la transcripción 6
TCA	Ácido tricloroacético
TCR	Receptor de las células T
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamina
Th	Linfocitos T cooperadores
Thr	Treonina
TLR	Receptores tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
Trp	Triptófano

Tyr	Tirosina
Val	Valina
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular
VEGFA	Factor de crecimiento endotelial vascular
WAO	Organización Mundial de las Alergias



RESUMEN

Los padecimientos alérgicos son reacciones de hipersensibilidad dependientes de mastocitos, caracterizados por la participación de inmunoglobulinas (Ig) E alérgeno específicas y linfocitos T cooperadores tipo 2. La búsqueda de nuevas terapias para las enfermedades alérgicas, ha sido primordial en los últimos años. El glicomacropéptido bovino (GMPb) es un componente de la leche biológicamente activo que presenta algunas funciones inmunomoduladoras. Nosotros examinamos si la administración oral del GMPb afecta el desarrollo de la sensibilización alérgica y la severidad de las reacciones de hipersensibilidad cutánea inmediata así como de anafilaxia sistémica en un modelo *in vivo*. Por otro lado evaluamos si el GMPb ejerce alguna acción directa sobre el mastocito un modelo *in vitro*. Las ratas se trataron con o sin GMPb (500 mg/ kg /día) antes o después de la sensibilización con ovoalbúmina (OVA) o antes de la exposición al compuesto 48/80 (C48/80). Se evaluaron varios indicadores de alergia. Adicionalmente, mastocitos peritoneales de rata fueron estimulados con diferentes concentraciones de GMPb *in vitro* y se determinó su activación. El tratamiento con GMPb resultó en una reducción del 80% en el título de IgE específica después de la sensibilización con OVA. Además la administración del GMPb suprimió marcadamente la respuesta proliferativa de esplenocitos al alérgeno y la producción de interleucina (IL)-13 por esplenocitos de animales sensibilizados, pero no afectó los niveles de IL-10. Además el pre-tratamiento con GMPb atenuó la intensidad de la reacción cutánea inmediata inducida por el antígeno y protegió a las ratas sensibilizadas de un choque anafiláctico severo. Sin embargo, cuando el GMPb se administró tras la sensibilización, no modificó la intensidad de la respuesta anafiláctica cutánea desarrollada por el alérgeno. Por otro lado, la inmunomodulación del GMPb sobre la respuesta alérgica no fue directamente sobre el mastocito, ya que éste no protegió a las ratas de la reacción anafilactoide generada por el C48/80. Además el GMPb no activó la desgranulación de los mastocitos de rata ni al factor de transcripción nuclear κB *in vitro*. Estos datos demuestran, por primera

vez, que la administración del GMPb previene la sensibilización al alérgeno y reduce la severidad de la reacción de fase temprana inducida por el mismo en la hipersensibilidad cutánea y en la anafilaxia sistémica. El GMPb puede ser usado como un nuevo agente profiláctico para el control de enfermedades alérgicas.



ABSTRACT

Allergic disorders are hypersensitivity reactions mast cell dependent, characterized by the involvement of allergen-specific immunoglobulin (Ig)E antibodies and T helper type 2 cells. The search for new therapies for allergic diseases has been the primary focus of interest for many investigations in recent years. Bovine glycomacropeptide (GMPb) is a biologically active component of milk that exhibits a range of immunomodulatory functions. We examined whether oral administration of GMP could affect the development of allergic sensitization and the severity of immediate cutaneous hypersensitivity reactions and of anaphylaxis in a model *in vivo*. We also analyzed whether GMPb directly active rat mast cell *in vitro*. Rats were treated with or without GMP (500mg/ kg/ day) before or after sensitization with ovalbumin (OVA) or before exposition to compound 48/80 (C48/80). Several indicators of allergy were evaluated. Besides, rat peritoneal mast cells were stimulated with different concentrations of GMPb *in vitro* and their activation was determined. Pretreatment with GMPb resulted in reduction (80 %) of allergen-specific IgE titer in rats when sensitized with OVA. GMPb administration also markedly suppressed the proliferative response of splenocytes to allergen and the production of interleukin (IL)-13 (70 %) by splenocytes of sensitized animals, but not altered IL-10 levels. In addition, GMPb pretreatment attenuated the intensity of the immediate cutaneous reaction induced by allergen and protected the sensitized rats from severe anaphylaxis. However, when GMPb was administrated after sensitization, the intensity of the local cutaneous anaphylaxis induced by OVA was not affected. In other hands, immunomodulation by GMPb was not directly through mast cell, because GMPb does not protected rats of anaphylactoid reaction generated by compound 48/80. In addition, GMPb does not active rat mast cell degranulation or the nuclear transcription factor κ B, *in vitro*. These data demonstrate, for the first time, that the administration of GMPb prevents allergen sensitization and reduces the severity of the early-phase reaction induced by allergen in cutaneous hypersensitivity and in anaphylaxis. GMPb may be used as a novel prophylactic agent for the control of allergic diseases.

1. ANTECEDENTES

1.1. Alergia.

La alergia representa un error de programación inmune. La inmunoglobulina (Ig) E es normalmente protectora contra muchos parásitos, pero puede también causar la liberación de histamina y otros mediadores químicos en exposición a cualquier otra proteína benigna presente en el polen, en el aire, moho, caspa de animales y comida (Pawankar y cols., 2008). El término de alergia fue acuñado por primera vez por Clemen von Pirquet para diferenciar la tendencia inusual de algunos individuos a desarrollar signos y síntomas de reacción o reacciones de hipersensibilidad cuando se expone a ciertas sustancias (Galliy cols., 2008).

Las reacciones de hipersensibilidad constituyen un diverso grupo de respuestas inmunes patológicas. Los antígenos por si solos no son nocivos, es la respuesta inmune exagerada la causal de la patología. Estas reacciones son clasificadas en cuatro tipos en base al mecanismo efector empleado. El término de hipersensibilidad típicamente trae a la mente las reacciones alérgicas de tipo inmediato (tipo I) que incluye la fiebre de heno o rinitis, dermatitis atópica, urticaria, asma alérgico y anafilaxia sistémica. Los mastocitos, figura central en esta respuesta, cuando son activados por el alérgeno mediante el entrecruzamiento de los receptores de alta afinidad de la fracción cristalizable de la IgE (FcεRI) liberan una gran cantidad de mediadores presentes en sus gránulos (respuesta inmediata) e inician la producción *de novo* de moléculas que pueden actuar más tarde para sostener la inflamación. Las otras clases de respuestas hipersensitivas se consideran independientes de los mastocitos y resultan de la interacción directa de los anticuerpos IgG e IgM con un antígeno celular o hapteno (Tipo II), por la formación de complejos inmunes (Tipo III) y por la participación de las células T CD4⁺ y CD8⁺ (Tipo IV o hipersensibilidad de tipo tardía). Sin embargo la evidencia de que los mastocitos pueden ser activados por

complemento y pueden modular la respuesta celular B y T sugiere que estas reacciones de hipersensibilidad también tienen componentes dependientes de mastocitos (Sayed y cols., 2008).

1.1.1. Epidemiología.

Las enfermedades alérgicas constituyen la causa más común de enfermedades crónicas en países desarrollados, y aunque, en los países en desarrollo la frecuencia parece ser más baja, hay evidencia de un incremento constante. De acuerdo a un estudio realizado por la Organización Mundial de las Alergias (WAO), se estima que el 22% de la población de un total de 33 países en el año 2000, presentaba algún tipo de alergia (figura 1 y 2). De ahí que se ha propuesto a las enfermedades alérgicas como una epidemia mundial, la cual es una consecuencia de los cambios del entorno y de la mejora general de la salud, junto con un conjunto de susceptibilidades genéticas (Warner y cols., 2006).

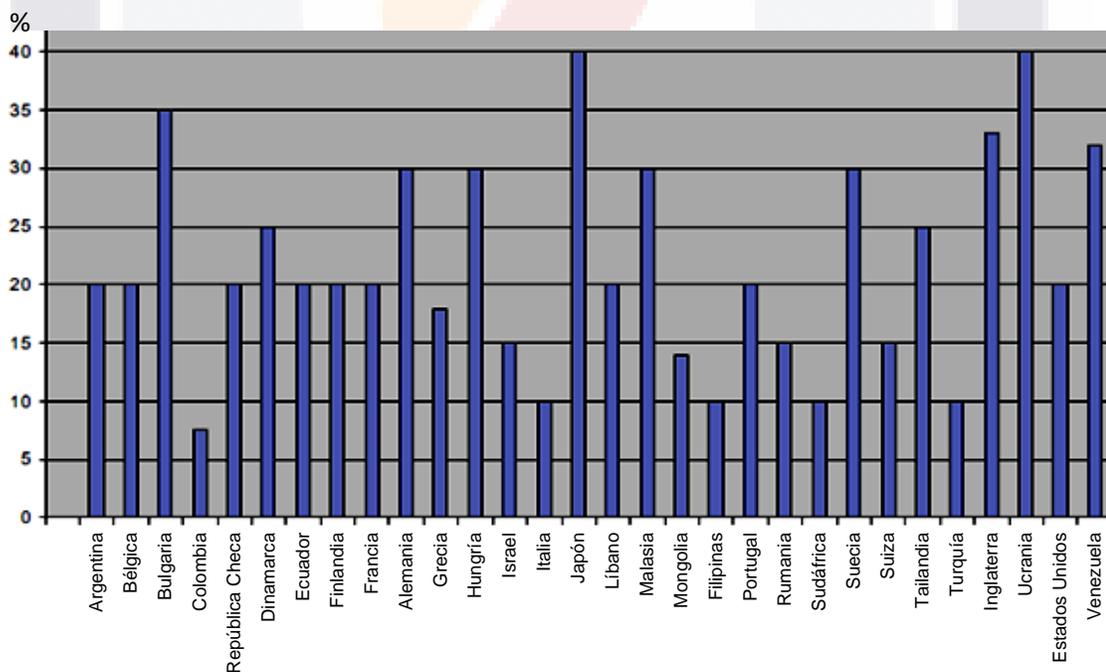


Figura 1. Porcentaje estimado de pacientes alérgicos por país encuestado. Imagen adaptada de Warner y cols., 2006.

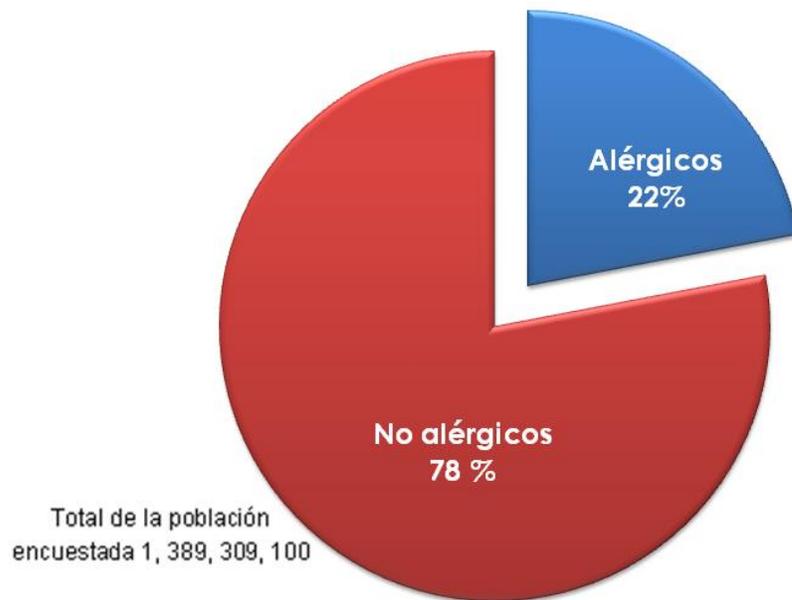


Figura 2. Porcentaje de pacientes alérgicos en el total de la población encuestada en 33 países. Imagen adaptada de Warner y cols., 2006.

El asma y la rinitis alérgica son dos de las enfermedades respiratorias crónicas más comunes en la infancia, aunque también afectan a los adultos. La prevalencia de estas enfermedades ha incrementado sustancialmente en muchas partes del mundo durante el siglo XX. Se estima que 300 millones de personas en el mundo tienen asma, mientras que 400 millones padecen rinitis alérgica. Además, el "Estudio Internacional de Asma y Alergias en la Infancia" y la "Comunidad Europea de la Supervivencia de la Salud Respiratoria", ISAAC y ECRHS respectivamente, por sus siglas en inglés, han evaluado la prevalencia de estas dos enfermedades en el mundo por medio de cuestionarios estandarizados. Ambos estudios han revelado una variación sustancial en la prevalencia de estas enfermedades entre países y regiones. La prevalencia del asma ha incrementado en un 50% cada 10 años; a nivel mundial, aproximadamente 250, 000 muertes por año son atribuidas a asma, aunque el total de las tasas de morbilidad han descendido desde 1980. La mayoría de muertes por asma se presentan en personas mayores de 45 años y son ampliamente prevenibles (Pawankar y cols., 2008). Además, se ha observado que la frecuencia de las alergias alimentarias no es menos preocupante, ya que afectan al 6% de los niños y de 3 a 4% de las

personas adultas (Benhamou y cols., 2009). En México se estima que el 40% de la población adulta y el 50% de los niños padece algún tipo de alergia (López-Pérez y cols., 2009; Pawankar y cols., 2011).

1.1.2. Predisposición genética-ambiental.

La alergia es resultado de un desbalance entre el sistema inmune innato y adaptativo como resultado de complejas interacciones genética-ambientales que pueden ser inducidas antes o después del nacimiento. Estas interacciones definen a las células Th2 como células efectoras, las cuales dirigen la producción de IgE y la sensibilización de los mastocitos y basófilos.

Se han descrito genes y *locis* de susceptibilidad para la sensibilización alérgica, entre los que se incluyen los genes implicados en la regulación de la producción o del cambio de isotipo a IgE y de la función de macrófagos alveolares o los que codifican para receptores de reconocimiento asociados a patrones microbianos (PRR, por sus siglas en inglés). La inflamación alérgica y la regulación de IgE están fuertemente influenciadas por polimorfismos en los genes codificantes de PRR extra e intracelulares como: los receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés) 2, TLR4, TLR6 y TLR10; CD14; los receptores con dominios de oligomerización de nucleótidos (NOD, por sus siglas en inglés) 1 y NOD2. El polimorfismo de PRR se discute como un posible mecanismo molecular de la hipótesis de la higiene, la cual postula que la reducida carga microbiana durante la etapa temprana de la infancia por el estilo de vida occidentalizado resulta en el decremento de la estimulación de las células inmunes innatas y reducida producción de interleucina (IL)-12, citocina responsable de la polarización al perfil Th1 y bajo estas condiciones la respuesta inmune adaptativa frente a antígenos ambientales inocuos es desplazada hacia una prevalencia de la respuesta Th2 (Figura 3) (Okada y cols., 2010; Traidl-Hoffmann, y cols., 2009; Romagnani 2004).

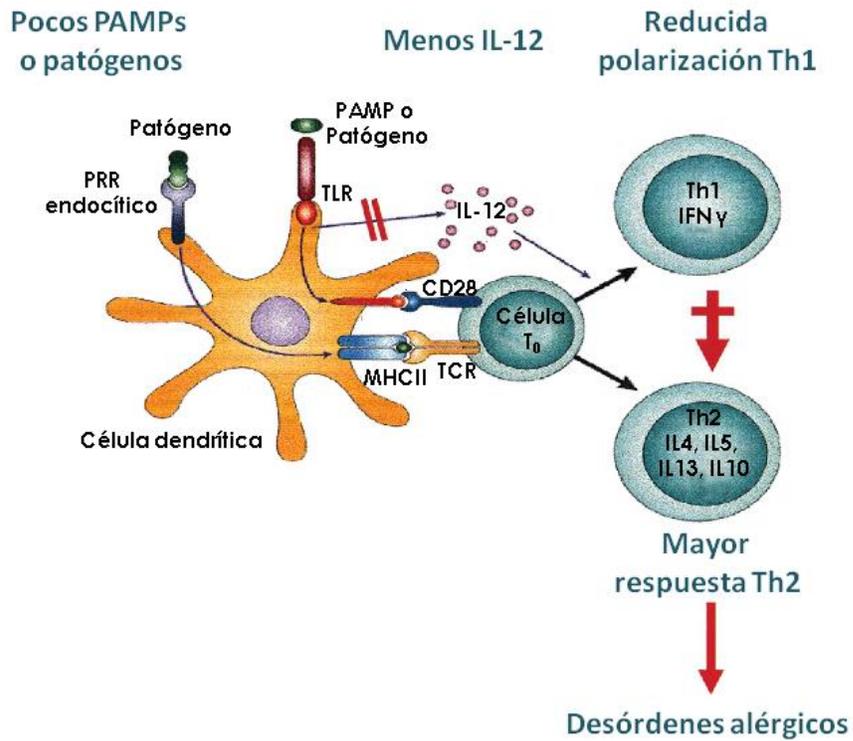


Figura 3. Mecanismo general de la “hipótesis de la higiene”. Imagen modificada de Romagnani 2004. PAMP, patrón molecular asociado a patógenos; PRR, receptor de reconocimiento de PAMP.

Además, variantes comunes de pérdida de la función en el gen que codifica la filagrina, una proteína que es esencial para la función de la barrera epidérmica, han sido identificadas como factores de predisposición para el eczema atópico y la sensibilización alérgica en estos pacientes (Traidl-Hoffmann y cols., 2009; Galli y cols., 2008). Es por esto que se dice que la inflamación alérgica es una clásica enfermedad genética, es decir, un trastorno en el que múltiples y distintos determinantes genéticos (por ejemplo, haplotipos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II, y los polimorfismos de los genes controladores de la integridad epitelial o receptores de reconocimiento de patrones) interactúan variadamente entre sí y con factores ambientales (dosis, exposición al alérgeno, adyuvantes o estímulos microbianos), lo que da lugar al fenotipo clínico y representa los resultados de distintos mecanismos patogénicos (Finkelman y Vercelli, 2007). Estas interacciones finalmente pueden promover el

desarrollo, incrementar la severidad o limitar la resolución de la inflamación alérgica.

1.1.3.Principales elementos en la alergia.

1.1.3.1. Alérgeno.

Los alérgenos son sustancias generalmente inocuas, que pueden inducir la producción de IgE, para desencadenar la sensibilización del individuo y ante una segunda exposición a la misma sustancia desarrollar una reacción alérgica. Las fuentes más comunes de alérgenos son los pólenes de gramíneas y árboles, caspa de animales, partículas fecales de ácaros, algunos alimentos (como leche, huevo, mariscos y nueces), látex, algunos medicamentos y venenos de insectos. Los alérgenos son proteínas o glicoproteínas, solas o unidas a otras proteínas, de peso molecular (PM) entre 15 y 40 kilo Daltones (kDa), cargados negativamente, de baja hidrofobicidad y alta estabilidad, en los que las glicosilaciones y enlaces disulfuros pueden aumentar su alergenidad. Así pues, la alergenidad es consecuencia de una serie compleja de interacciones, que envuelve al alérgeno, dosis, ruta de sensibilización, presencia de adyuvantes y principalmente la constitución genética del individuo (Traidl-Hoffmann y cols.otros, 2009, Galli y cols., 2008).

1.1.3.2. Inmunoglobulina E.

La IgE es la inmunoglobulina responsable de reconocer al alérgeno y desencadenar la reacción atópica. La concentración de IgE sérica en individuos sanos es 10^4 veces menos que la de IgG. De ahí, que los niveles de IgE sérico en individuos normales están en un rango de 0.1-0.4 $\mu\text{g/ml}$, los cuales se pueden ver incrementados alrededor de 10 veces en individuos alérgicos. La IgE está compuesta por dos cadenas pesadas ϵ y dos cadenas ligeras, con un PM total de 190 kDa (figura 4). Esto debido a un dominio de inmunoglobulina extra en la

región constante en cual contribuye a la conformación alterada de la porción Fc y permite su unión con los receptores en los mastocitos y basófilos (Gould y Sutton, 2008). Aunque la vida media de la IgE en el suero es de 2 a 3 días, una vez que ésta se ha unido al receptor FcεRI en los mastocitos o basófilos se vuelve estable por algunas semanas.

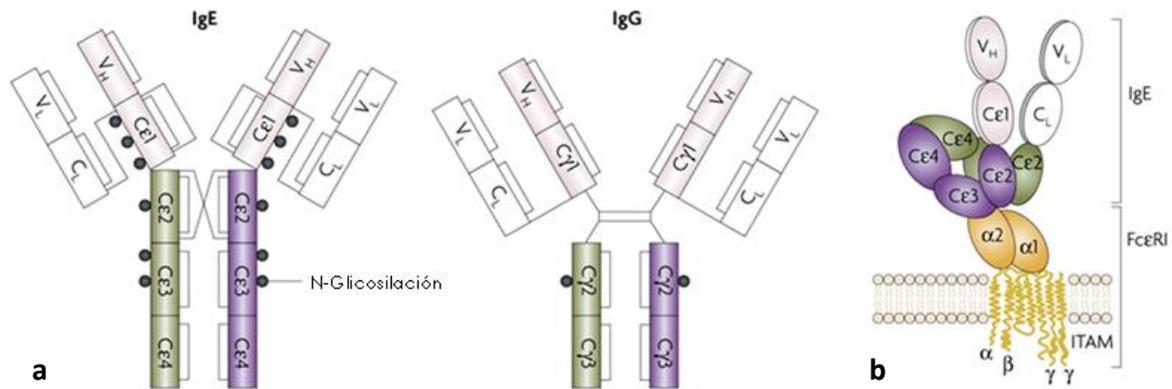


Figura 4. Estructura de la IgE y su receptor. **a)** Comparación estructural entre IgE e IgG. **b)** Esquema representativo de la molécula IgE unida a los dominios extracelulares del FcεRI con sus motivos de activación del inmunoreceptor basados en tirosina (ITAM) (Gould y Sutton, 2008).

1.1.3.3. Receptor de alta afinidad para IgE

El receptor de alta afinidad para IgE, FcεRI ($K_a \approx 10^{10} \text{ M}^{-1}$), es un receptor multimérico, expresado principalmente en las células efectoras de anafilaxia como mastocitos y basófilos. FcεRI está formado por una cadena α con dos dominios extracelulares de unión a IgE; una cadena β con cuatro dominios transmembranales y dos colas citoplasmáticas amino- y carboxi-terminal, las cuales amplifican la señal así como mejoran la maduración y expresión del receptor, y dos cadenas γ las cuales son responsables de proveer la señalización. En humanos se puede expresar una forma trimérica ($\alpha\gamma\gamma$) del receptor, principalmente en células presentadoras de antígeno, como células dendríticas y monocitos y en personas asmáticas en eosinófilos, sin la cadena β (Figura 5) (Galli y Tsai, 2012,

Gould y Sutton, 2008; Rivera y Olivera, 2008; Kambayashi y Koretzky, 2007; von Bubnoff y cols., 2003).

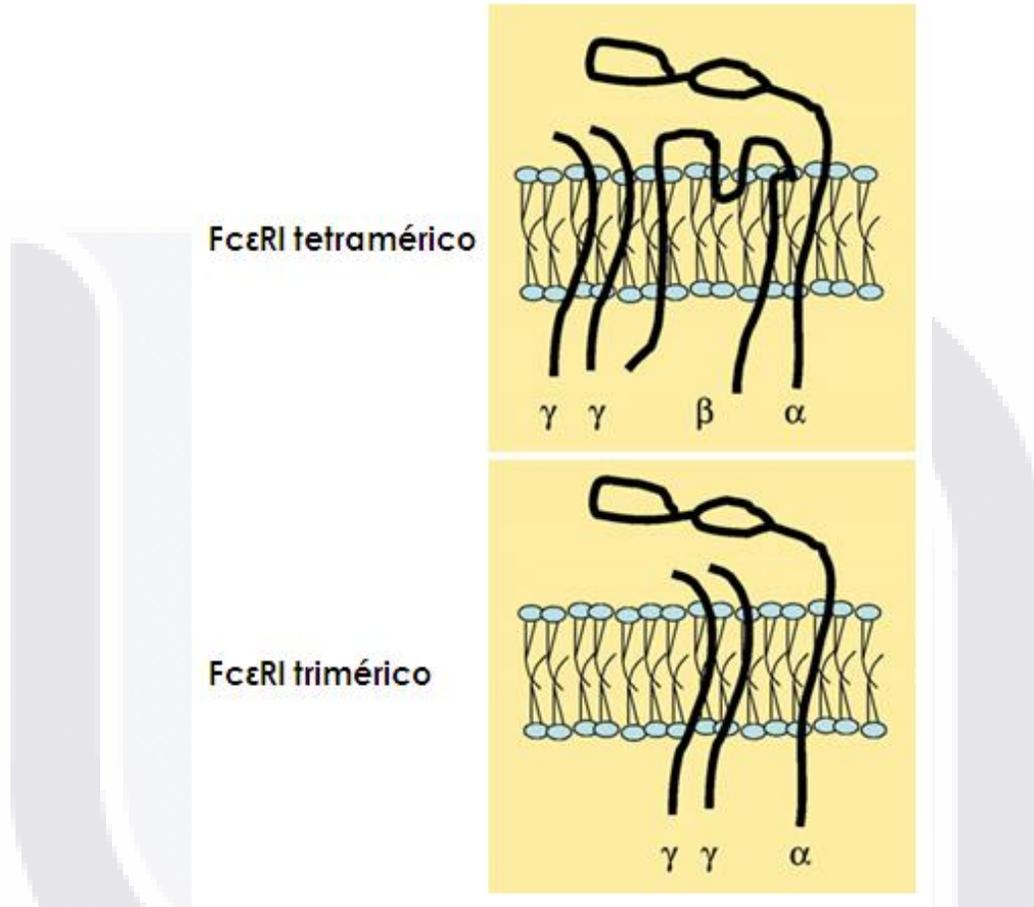


Figura 5. Receptor de alta afinidad para IgE (FcεRI) en su forma clásica (tetramérica) y en su forma incompleta (trimérica) (Imagen modificada de Owen, 2007).

1.1.3.4. Mastocitos vs Basófilos.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la IgE se une a los receptores de alta afinidad FcεRI de mastocitos y basófilos. Los mastocitos fueron descritos por primera vez por Paul Ehrlich en 1878, como células granulares de tejido conectivo con reactividad a colorantes anilínicos, a las que denominó “Mastzellen”. La palabra alemana “Mast” (del griego μαστός = pecho) implica una función relacionada con la nutrición o amamantamiento y llevó a su posterior traducción como mastocito o célula cebada (Crivellato y cols., 2003). Los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

mastocitos se encuentran asociados al tejido conectivo de todos los órganos, particularmente cerca de los vasos sanguíneos y linfáticos. Los precursores de los mastocitos son formados en la médula ósea durante la hematopoyesis, son llevados a los tejidos periféricos, donde se diferencian a células maduras. Algunos tejidos, incluyendo la piel y la superficie de la membrana mucosa de los tractos gastrointestinal y respiratorio, contienen una alta concentración de estas células. La micrografía electrónica de los mastocitos revela numerosos gránulos unidos a membrana distribuidos por todo el citoplasma, los cuales contienen mediadores farmacológicamente activos (figura 6a). Después de la activación, estos mediadores son liberados de los gránulos, resultando en las manifestaciones clínicas tempranas de las reacciones de hipersensibilidad de tipo I (Wasiuk y cols., 2008; Wang y cols., 2003). Por otro lado, la importancia de los mastocitos durante el proceso de la alergia, radica en su larga vida, que se calcula de seis a 12 meses en tejido; además, de que se ha demostrado que estas células pueden proliferar después de su maduración (Abraham y St John, 2010; Karasuyama y cols., 2009; Sur, Cavender y Malaviya, 2007).

Los mastocitos son células ampliamente heterogéneas. En roedores se describen dos tipos de mastocitos, los de tejido conectivo (MTC) y de mucosa (MM). Los primeros se encuentran en piel, cavidad peritoneal e intestino y sus gránulos contienen heparina, grandes cantidades de histamina y TNF- α . En contraste, los MM principalmente se encuentran en mucosa de pulmón y estómago y el proteoglicano principal de sus gránulos es el condroitín sulfato. Por otro lado, en el humano estas células se diferencian por su contenido de proteasas, unos contienen tanto triptasas como quimasas (M_{TC}) y se encuentran en piel y submucosa intestinal; mientras, que en otros solo encontramos triptasa (M_T) y se encuentran principalmente en la mucosa intestinal y alveolar (Rao y Brown, 2008). Se ha descrito una tercera población de mastocitos humanos que han sido menos estudiados y que contienen únicamente quimasa en sus gránulos (M_C), ubicándose mayoritariamente en la submucosa y mucosa del estómago, submucosa del intestino delgado y mucosa del colon (Irani y Schwartz, 1994).

A diferencia de los mastocitos, los basófilos son granulocitos que circulan en la sangre de la mayoría de los vertebrados. En humanos representan el 0.5 a 1.0% de las células blancas circulantes. Su citoplasma granulado se tiñe con colorantes básicos, por ello el nombre de basófilo. La microscopía electrónica revela un núcleo multilobulado, pocas mitocondrias, numerosos gránulos de glucógeno y membrana electrodensa unida a gránulos dispersos por todo el citoplasma que contienen mediadores farmacológicamente activos (figura 6b) (Wang y cols., 2003).

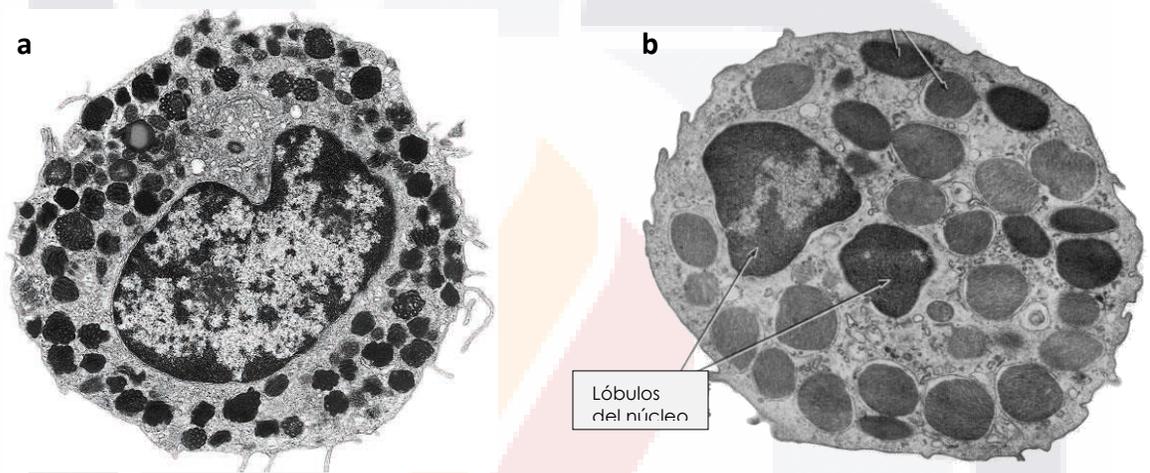


Figura 6. Micrografías celulares. **a)** Micrografía electrónica de mastocito en tejido conectivo (Lesllie, 2007). **b)** Micrografía electrónica de transmisión del basófilo (Lozano, 2003).

1.1.3.5. Mediadores preformados y de *novo* de los mastocitos.

Los mediadores producidos por los mastocitos son convencionalmente divididos en preformados y de nueva síntesis o síntesis *de novo*, dentro de estos últimos se encuentran los mediadores lipídicos, citocinas y quimiocinas. Cuando los mastocitos son activados, inmediatamente liberan los mediadores preformados contenidos en sus gránulos citoplasmáticos, como, proteasas, histamina y factor de necrosis tumoral (TNF- α); y paralelamente, comienza la producción de mediadores lipídicos tales como prostaglandinas y leucotrienos, que son secretados en minutos, así mismo, se desencadena la transcripción de

genes relacionados con citocinas, quimiocinas y factores del crecimiento que se sintetizarán y secretarán en cuestión de horas. A continuación se enlistan algunos de los mediadores con especial interés en el desarrollo de este trabajo.

1.1.3.5.1. Mediadores preformados.

1.1.3.5.1.1. Aminas biogénicas.

Dentro de las aminas biogénicas se encuentran la serotonina y la histamina. Por un lado, la serotonina tiene sus principales efectos sobre la regulación de la leucocitosis, el dolor y la broncoconstricción. Mientras que la histamina es considerada como el principal mediador responsable en la respuesta alérgica, ya que estimula la vasodilatación y aumenta la permeabilidad vascular, la frecuencia cardíaca, la contracción cardíaca y la secreción glandular. (Salinas, 2012; Finkelman, 2007). Además participa en el desarrollo de las enfermedades alérgicas y asma por sus efectos sobre las células T reguladoras y la producción de citocinas. En modelos experimentales, se ha comprobado que la histamina es el principal responsable de la hipotermia asociada al choque anafiláctico (Finkelman, 2007). La histamina fue el primer mediador descubierto en los mastocitos, es una proteína de bajo peso molecular producida por la acción de la histidina descarboxilasa en los mastocitos y macrófagos (Haas y cols., 2008). Ejerce su efecto biológico a través de sus 4 diferentes receptores acoplados a proteína G en la superficie celular. Los receptores H1 y H2 son ubicuos, ya que son expresados en una amplia variedad de tejidos humanos, incluyendo músculo liso de las vías respiratorias, cerebro, tracto gastrointestinal, sistema cardiovascular, médula adrenal y linfocitos. Los receptores H3 son expresados predominantemente en el sistema nervioso central, mientras que los receptores H4 son expresados en células hematopoyéticas, mastocitos y eosinófilos (Kharmate y cols., 2007).

1.1.3.5.1.2. Proteasas.

Los mastocitos tienen un rico reservorio de proteasas neutras empacados dentro de los gránulos, como triptasas, quimasas y carboxipeptidasa A, aunque también expresan otras enzimas lisosomales que no son específicas de los mastocitos como granzimas, neurolisinas y catepsina G. Las triptasas y quimasas son de la familia de las serin proteasas y su expresión, en cantidad y tipo, dependerá del fenotipo del mastocito. Tanto triptasas como quimasas, promueven la inflamación, destrucción y remodelación de la matrix extracelular y remodelación así como inducen dolor. Por otro lado, carboxipetidasa A, es una metaloproteasa dependiente de Zinc y juega un rol importante en la degradación de ciertos péptidos tóxicos (Pejler y cols., 2010).

Otras enzimas lisosomales contenidas ampliamente en los gránulos son las degradadoras de azúcares como β -hexosaminadasa, β -glucoronidasas, β D-galactosidasas y arilsulfatasas A. Aun cuando su función fuera del mastocito no es clara, su alto contenido y presencia ubicua en los gránulos de los mastocitos, hacen que la β -hexosaminadasa sea ampliamente utilizada como un indicador de desgranulación de estas células (Lundequist y Pejler, 2011).

1.1.3.5.1.3. Proteoglicanos.

Es sabido, que el proteoglicano de serglicina es el principal constituyente de los gránulos de los mastocitos. La serglicina actúa como núcleo proteico al que se unen glicosaminoglicanos altamente sulfatados y cargados negativamente como condroitín sulfato o heparán sulfato (heparina). Además, se ha observado en ratones "knock out" o desprovistos de serglicina, que la ausencia de este proteoglicano afecta la capacidad de sus mastocitos para almacenar cierto tipo de compuestos como algunas proteasas o aminas biogénicas. De ahí que podría decirse que su función está en el mantenimiento de la homeostasis de los gránulos secretorios (Pejler y cols., 2010; Rönnberg y Pejler, 2012).

1.1.3.5.1.4. Citocinas.

Además de todos los mediadores antes mencionados, existe diferentes citocinas, factores de crecimiento o neuropéptidos almacenados dentro de los gránulos preformados. La citocina que más destaca por su concentración es el TNF- α , la cual es una citocina pleiotrópica de 26 kDa, implicada en el reclutamiento de neutrófilos induciendo la expresión de moléculas de adhesión (Brightling y cols., 2008). Otras citocinas y factores de crecimiento que se ha reportado en los gránulos incluyen al factor de crecimiento del endotelio vascular, IL-4, factor de crecimiento nervioso, IL-15, factor de crecimiento de fibroblastos básico-2, factor transformador de crecimiento β (TGF- β), factor de células madre (SCF) (Lundequist y Pejler, 2011).

1.1.3.5.2. Mediadores de nueva síntesis.

1.1.3.5.2.1. Mediadores lipídicos.

Las prostaglandinas (PG) y los leucotrienos (LT) son metabolitos derivados del ácido araquidónico por acción de las ciclooxigenasas y lipooxigenasas, respectivamente. La PGD₂, el LTB₄ y el LTC₄, molécula precursora de los cisteinil leucotrienos (cisLTs), son los más estudiados. PGD₂ y cisLTs son reconocidos por sus propiedades broncoconstrictoras y vasoactivas, además de tener funciones fundamentales en el tráfico y activación de leucocitos, presentación de antígenos, deposición de la matriz extracelular y fibrosis. LTC₄ es quimioattractante de neutrófilos, es un potente broncoconstrictor, incrementa la permeabilidad vascular y participa en el reclutamiento de eosinófilos; mientras que LTB₄ tiene como principal función el reclutamiento de neutrófilos y eosinófilos (Boyce, 2007; Marshall, 2004).

1.1.3.5.2.2. Citocinas.

Las citocinas y quimiocinas producidas por el mastocito incluye a las pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β , así como las asociadas con efectos

antiinflamatorios como IL-10 y TGF- β . Además, los mastocitos también son fuente de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 y IL-13), así como de Th1 (interferón γ (INF- γ), IL-12 e IL-8) (Galli y cols., 2008; Marshall, 2004).

1.1.3.6. Citocinas moduladoras de la alergia.

Aun cuando los padecimientos alérgicos son dependientes del mastocito e IgE, no son los únicos factores requeridos para que se puedan desarrollar. Otros factores principales son citocinas originadas mayoritariamente por los linfocitos T y que van a participar en diferentes etapas de la alergia. En primera instancia, se encuentran las citocinas Th2, que son las que van a generar el ambiente propicio para desencadenar la sensibilización al alérgeno y posteriormente van a ejercer diferentes funciones efectoras en mayor o menor grado, en este sentido las citocinas por excelencia son IL-4, IL-5 e IL-13. Por otro lado, cuando la inflamación alérgica se ha desencadenado, se requiere de factores reguladores en busca del equilibrio como son IL-10 y TGF- β . A continuación se hace mención de aquellas citocinas que son de especial interés para el desarrollo de este trabajo.

1.1.3.6.1. Interleucina 4.

Además de los linfocitos T cooperadores, la IL-4 deriva de eosinófilos, basófilos y mastocitos. Tanto en eosinófilos como en mastocitos, esta interleucina se encuentra de forma preformada y puede ser rápidamente liberada en la respuesta inflamatoria alérgica (Kirsh y cols., 2007; Borish y Steinke, 2003; Wu cols., 2002; Wilson y cols., 2000 y Bradding y cols., 1992). La IL-4 estimula la expresión de moléculas del MHC clase II, B7, CD40, IgM de superficie y el receptor IgE de baja afinidad (CD23) en los linfocitos B, mejorando así la capacidad presentadora de antígenos de las células B. La IL-4 induce el cambio de isotipo de IgM a IgE y sinergiza con otras citocinas activadoras de células B para incrementar la secreción de IgE. La IL-4 tiene una importante influencia en el crecimiento, diferenciación y supervivencia de linfocitos T, generando una importante tendencia a la inflamación alérgica; dirige la diferenciación inicial de células Th

naive (Th0) hacia el fenotipo Th2 y es importante en el mantenimiento de la respuesta inmune alérgica por la prevención de apoptosis de los linfocitos T (Borish y Steinke, 2003).

Otra importante actividad de la IL-4 en la inflamación alérgica es su habilidad para inducir la expresión de la molécula de adhesión celular vascular (VCAM)-1 en células endoteliales, produciéndose así una mayor adhesividad de las células T, eosinófilos, basófilos y monocitos al endotelio, pero no así de los neutrófilos, tal y como es característico en las reacciones alérgicas. En los mastocitos se expresan los receptores para IL-4 de tal forma que esta citocina estimula la expresión de los receptores para la IgE. Además la IL-4 en la inflamación alérgica tiene la habilidad de inducir en mastocitos la expresión de la enzima leucotrieno C₄ sintasa, y así determinar la capacidad del mastocito para producir cisLTs. IL-4 estimula la producción de mucina y contribuye a la producción excesiva de moco en las vías respiratorias asmáticas (Borish y Steinke, 2003).

El funcionamiento de esta citocina no podría ser realmente entendido sin la existencia de su receptor. El receptor IL-4R α forma parte de diferentes complejos de receptores, conocidos como receptores Tipo I y Tipo II. En células de origen hematopoyético el receptor Tipo I está constituido por IL-4R α y la cadena gamma común (γ c), que también es compartida por las citocinas IL-2, 7, 9, 15 y 21 y reconoce a la IL-4. Mientras que en las células no hematopoyéticas, IL-4 puede usar el complejo Tipo II, el cual comprende a las cadenas IL-4R α e IL-13R α 1. Complejo que también puede ser usado por la IL-13 que comparte aproximadamente el 25% de homología con la IL-4, de ahí la explicación a la superposición en sus efectos biológicos (LaPorte y cols., 2008). La IL-4 e IL-13 están estrechamente relacionadas por medio del receptor IL-4R α , el cual activa el factor de transcripción STAT6 (Grzela K y cols., 2004). IL-4 e IL-13 son citocinas críticas en el desarrollo de la respuesta inmune humoral mediada por las células T, las cuales están asociadas con alergia y asma. El receptor para la IL-4 está presente en células hematopoyéticas, endoteliales, epiteliales, musculares,

fibroblastos, hepatocitos y del cerebro, expresándose usualmente de 100 a 5000 copias por célula, de ahí el amplio rango de acción de esta citocina (Nelms y cols., 1999).

1.1.3.6.2. Interleucina 13.

La IL-13 es una citocina derivada del perfil Th2 y juega un rol crucial en las enfermedades alérgicas. Esta citocina es también sintetizada por linfocitos TCD8⁺, mastocitos, basófilos, eosinófilos y linfocitos T asesinos naturales (NKT) (Izuhara y cols., 2006 y Izuhara, 2003), células asesinas naturales (NK) y dendríticas (Grencis y Bancroft, 2004). La IL-13 mejora la presentación de antígenos ya que favorece la expresión de CD23, moléculas del MHC clase II, CD80 y CD86, receptor de manosa, integrinas e IL1Ra en macrófagos y monocitos. Se ha demostrado que esta citocina es necesaria para la hiperrespuesta de las vías respiratorias, así como para la sobreexpresión de moco durante el desarrollo del asma (Grzela K y cols., 2004). Además se ha observado que ratones depletados de la citocina, disminuyen sus niveles basales de IgE (McKenzie y cols., 1998), esto en congruencia con la correlación entre los elevados niveles de la citocina con los de la IgE sérica de humano (van der Pouw Kraan y cols., 1998). Aunado a esto, se ha demostrado que ratones transgénicos que sobre-expresan IL-13, presentan una predisposición a manifestar una anafilaxia posterior a la sensibilización al alérgeno (Fallon y cols., 2001). Así mismo, se ha observado que el bloqueo de IL-13 previene la alergia intestinal y la inflamación inducida por extracto de cacahuete en ratones (Wang y cols., 2010). Estos estudios sugieren que mientras la IL-4 actúa principalmente sobre los linfocitos T, en especial sobre el perfil Th2, la IL-13 ejerce su función durante la fase efectora de la inmunidad mediando la respuesta fisiológica del órgano blanco hacia la inflamación (Grüning y cols., 2012). Sin embargo se ha demostrado que en el hombre puede inducir la diferenciación, proliferación y cambio de isotipo, principalmente de IgG4 e IgE; mientras que en el ratón y en ausencia de IL-4 puede inducir la producción de IgE e incrementar la supervivencia de las células B, mejorando los niveles de producción de anticuerpos (Grencis y Bancroft, 2004).

1.1.3.6.3. Interleucina 10.

En la alergia, la síntesis de IL-10 se desencadena como parte de los mecanismos de regulación del proceso inflamatorio, siendo principalmente producida por las células T reguladoras (Treg), aunque también lo hacen otros subtipos de las células T CD4⁺, incluyendo a las Th1, Th2 y Th17, células B, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (Redford y cols., 2011) así como los mastocitos (Galli y cols., 2008). Esta citocina es una citocina pleiotrópica que posee propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras (Galli y cols., 2008), probablemente como consecuencia de su capacidad para inhibir la activación y generación de citocinas por parte de los mastocitos, la producción de citocinas en los eosinófilos así como su supervivencia, así como modular la capacidad de las células presentadoras de antígeno por la disminución de la expresión de moléculas del MHC de clase II y moléculas co-estimuladoras, y la inhibición parcial del cambio de isotipo de IgG a IgE en los linfocitos B (Hawrylowicz y O'Garra, 2005) de manera que finalmente inhibe la sensibilización al alérgeno (Deo y cols., 2010).

1.1.4. Etapas de la hipersensibilidad de tipo I mediada por IgE.

Como ya se ha mencionado antes, las reacciones de hipersensibilidad de tipo I son inducidas por cierto tipo de antígenos referidos como alérgenos y tienen todas las características de una respuesta inmune humoral. Para que este tipo de reacción se lleve a cabo, se requiere de dos etapas, sensibilización e inflamación alérgica (Figura 7).

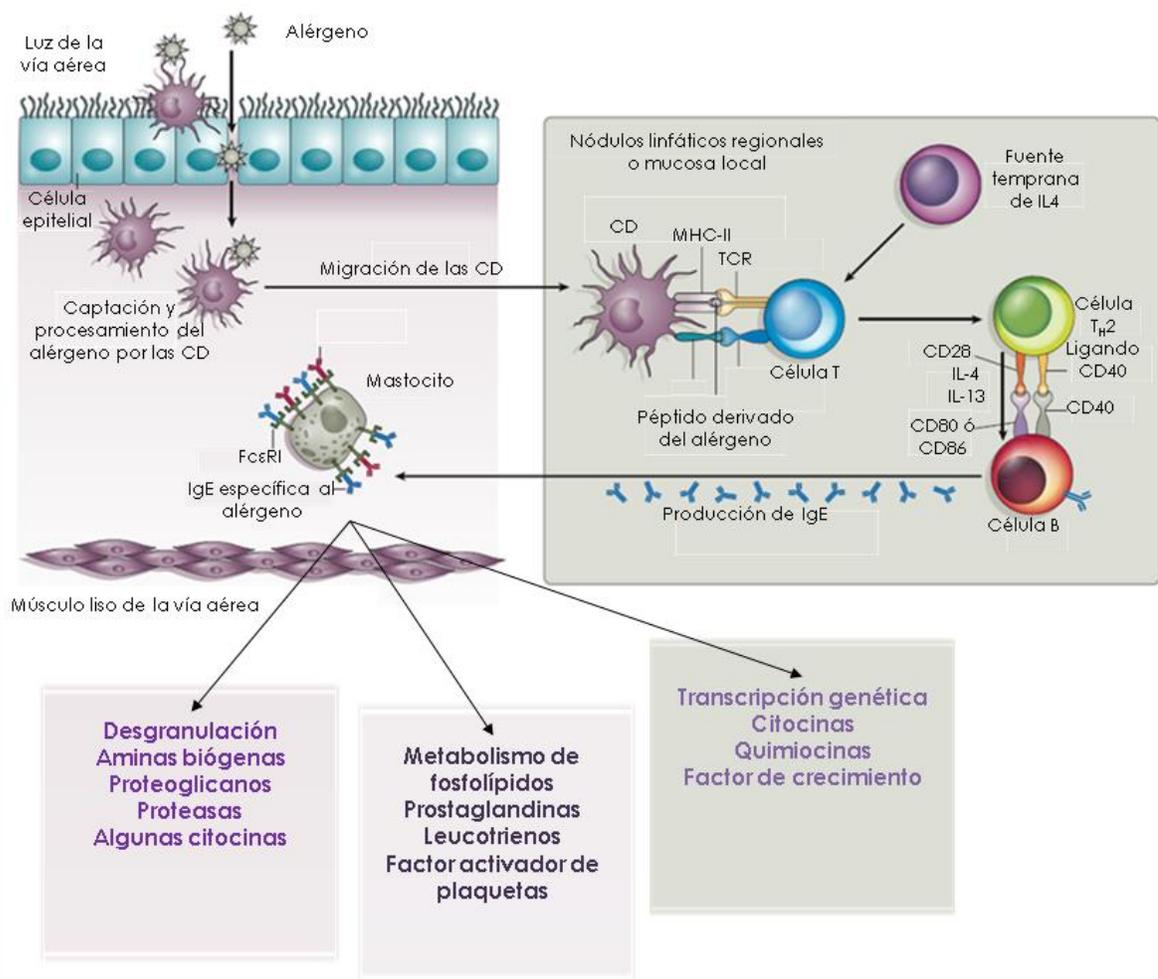


Figura 7. Mecanismo general de las reacciones de hipersensibilidad de tipo I (imagen adaptada de Galli y cols., 2008), donde CD se refiere a célula dendrítica, MHC-II a la molécula del complejo principal de histocompatibilidad de clase II, TCR al receptor de la célula T.

1.1.4.1. Sensibilización.

La sensibilización a un alérgeno refleja la habilidad de este para provocar la respuesta celular de un perfil Th2; en el cual, la IL-4 e IL-13 dirigen la producción de IgE alérgeno específica. La sensibilización al alérgeno comienza con el procesamiento del mismo por parte de las células presentadoras de antígeno y su presentación a través de las moléculas MCH de clase II al receptor de las células T (TCR) vírgenes, junto con otras moléculas co-estimuladoras. La siguiente señal deriva de una fuente temprana de IL-4 e IL-13, las cuales definirán la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

diferenciación de los linfocitos T a Th2. A su vez estas células incrementarán la producción de las mismas citocinas, las cuales junto con la participación de diferentes moléculas co-estimuladoras (CD 40 y su ligando así como CD80 o CD86 y el ligando CD28) inducirán la proliferación de células B y su diferenciación a células plasmáticas, así como el cambio de isotipo de sus inmunoglobulinas a IgE. Posteriormente la IgE producida se distribuirá local y sistémicamente, encontrándose con sus receptores de alta afinidad en los mastocitos y basófilos dejándolos sensibilizados (Galli y cols., 2008).

Puede darse una señal más para la activación de la sensibilización, la cual no es necesaria pero si puede consolidar el fenómeno. Esta señal está dada por factores adyuvantes presentes en el microambiente, que pueden ser de naturaleza intrínseca o extrínseca. Ejemplos de los primeros son el lipopolisacárido (LPS) que favorece la respuesta celular Th1 o moléculas derivadas de helmintos que favorecen la respuesta celular Th2 (Traidl-Hoffmann y cols., 2009). Mientras que los extrínsecos son inmunomoduladores que típicamente no están conectados covalentemente a antígenos y se formulan para mejorar las respuestas inmunitarias del huésped como el hidróxido de aluminio (Fahim y cols., 2003).

1.1.4.2. Inflamación alérgica.

La inflamación alérgica se clasifica dentro de tres etapas temporales. Las reacciones de fase temprana son inducidas dentro de segundos o minutos del contacto con el alérgeno, y las de fase tardía ocurren después de varias horas. En contraste, la inflamación alérgica crónica es una inflamación persistente que ocurre en exposiciones repetidas al alérgeno (Galli y cols., 2008).

1.1.4.2.1. Reacciones de fase temprana.

Las reacciones de fase temprana o reacciones de hipersensibilidad inmediata de tipo I ocurren a los pocos minutos de la exposición al alérgeno y se ven reflejadas por la secreción de mediadores preformados y lipídicos por parte

de los mastocitos del sitio afectado. El reconocimiento del alérgeno por parte de las IgEs específicas unidas a los receptores FcεRI induce la agregación del complejo IgE-FcεRI, lo cual activa la secreción de mediadores preformados y mediadores de nueva síntesis de origen lipídico. Esto desencadena broncoconstricción, vasodilatación, incremento de la permeabilidad vascular y producción de moco, sobreexpresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, secreción de mediadores quimiotácticos y quimiocinas. Esto finalmente, conduce al reclutamiento de leucocitos; desencadenando así la transición a la fase tardía (Figura 8) (Galli y cols., 2008). Además se activa en el mastocitos la transcripción de genes relacionados con citocinas y otros mediadores que participarán en el desarrollo de las reacciones de fase tardía.

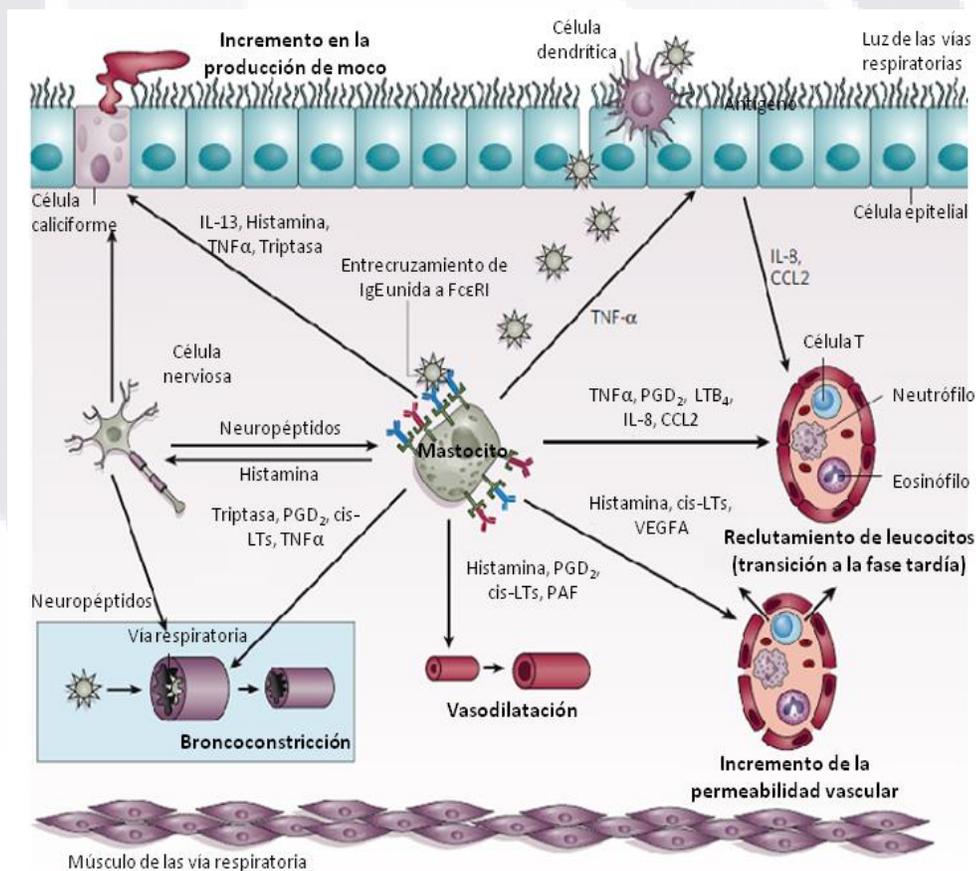


Figura 8. Reacciones de fase temprana en la inflamación alérgica. En estas reacciones el FcεRI unido a IgE en mastocitos es entrecruzado por el alérgeno, resultando en vasodilatación, incremento de la permeabilidad vascular con edema y cambios funcionales en los órganos afectados. Estos eventos son producidos por la liberación de mediadores sintetizados de novo (mediadores lipídicos) y preformados (imagen adaptada de Galli y cols., 2008).

1.1.4.2.2. Reacciones de fase tardía.

Las reacciones de fase tardía generalmente se desarrollan después de 2-6 horas de la exposición al alérgeno y frecuentemente muestran un pico después de 6-9 h. Este tipo de reacciones se caracteriza por la liberación de una amplia gama de sustancias *de novo*, como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento que tienen la capacidad de desempeñar diferentes actividades. Entre ellas, IL-8 y TNF- α reclutan otras células ya sea directa o indirectamente; IL-5 y TNF- α activan células de la inmunidad innata; e IL-10, TNF- α y el TGF- β afectan muchos aspectos de la biología de las células dendríticas, células T y células B; junto con las funciones inmunosupresoras o antiinflamatorias descritas para IL-10 y el TGF- β . Por otro lado, algunas sustancias *de novo* pueden influir en la biología de células estructurales, incluyendo células endoteliales vasculares, epiteliales, del músculo liso, nerviosas y fibroblastos (Galli y cols., 2008).

Las características clínicas de las reacciones de fase tardía, reflejan la actividad de células residentes y células circulantes que son reclutadas al sitio. Por ejemplo el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), que es producido por células epiteliales, células T, células del linaje macrófago-monocito y otras posibles fuentes, puede contribuir a la vasodilatación que está asociada con las reacciones de fase tardía (Galli y cols., 2008).

1.1.4.2.3. Inflamación alérgica crónica.

La inflamación alérgica crónica se da con exposiciones continuas o repetitivas al alérgeno. Se presenta una inflamación persistente, y se pueden encontrar en el sitio de contacto con el alérgeno, células de la respuesta inmune innata (eosinófilos, basófilos, neutrófilos y células del linaje macrófago-monocito) y adaptativa (células T y células B). Esta inflamación persistente está asociada con cambios en las células estructurales en los lugares afectados y en muchos casos con una marcada alteración de los órganos afectados (Galli y cols., 2008).

1.1.5. Anafilaxia.

El Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas y la Red de Anafilaxia y Alergias Alimenticias definen la anafilaxia como una reacción alérgica seria que es de rápido inicio y puede causar la muerte (Metcalf y cols., 2009). En la actualidad además, se define a la anafilaxia como una reacción de hipersensibilidad la cual es dependiente de mastocitos y puede variar su severidad. De acuerdo a la clasificación de Ring y Messmer puede envolver diferentes tejidos o sistemas: tipo I, se ve afectada la piel y se caracteriza por presentar urticaria y/o angioedema; tipo II, afecta a las mucosas ya sea por obstrucción de vías respiratorias, dificultad para respirar y sibilancias o dolor cólico abdominal y vomito; tipo III involucra sistemas más severos como sistema cardiovascular generando hipotensión y tipo IV que se caracteriza por ser potencialmente fatal (Worm 2013; Ibero-Iborra, 2012).

Con esta segunda definición se entra en el conflicto de agregar un nuevo término, reacciones anafilactoides, propuesto en el 2001 por la academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica (EAACI). Las reacciones anafilactoides involucran aquellas reacciones que generan el mismo resultado que la anafilaxia pero que el mecanismo de activación no puede ser de carácter inmunológico, es decir, no hay una previa sensibilización (Wang, Wang, Liu, 2011). Lo anterior se fundamenta, en que los mastocitos pueden ser activados por diferentes vías, las cuales involucran a la vía clásica o dependiente de IgE y las vías alternativas, las cuales son completamente independientes de IgE, que puede ser de carácter inmunológico como mecanismos autoinmunes, activación del sistema del complemento y activación del sistema de coagulación entre otros; o de carácter no inmunológico, que puede estar generado bajo ciertas condiciones de estrés, como ejercicio, frío intenso o la administración de ciertos compuestos comercialmente disponibles como drogas opioides, secretagogos o ionóforos de calcio (Simons, 2011; Wang y cols., 2011).

Como se mencionó en la definición, la severidad de la anafilaxia puede ser variada, esta severidad puede estar generada por la cantidad de antígeno o la vía de entrada del mismo entre otros factores. Además, se puede clasificar a este tipo de reacciones como sistémica o localizada. La anafilaxia sistémica es un choque generalizado, frecuentemente fatal, estado que se alcanza a los 5 minutos del inicio de la reacción de hipersensibilidad de tipo I (Li y cols., 2009). Por lo contrario, la anafilaxia localizada es limitada a un órgano o tejido específico, frecuentemente están envueltos superficies epiteliales y sitios de entrada del alérgeno, normalmente son conocidas como reacciones atópicas (Metcalfe y cols., 2009). En el humano, cuando el tejido afectado es la piel, se presenta la urticaria, que se caracteriza por la presencia de prurito recurrente, lesiones edematosas de rosa a rojo con centros frecuentemente pálidos, y en algunas ocasiones angioedema (40 %) (Kanani y cols., 2011).

En la investigación científica, la anafilaxia ha permitido el estudio de nuevos tratamientos, así como el entendimiento del mecanismo de la alergia. Para ello se han implementado una serie de modelos experimentales en roedores, logrando reproducir en estos animales la reacción presentada en los humanos, tras la inyección intravenosa o intraperitoneal del alérgeno a animales previamente sensibilizados y posteriormente la observación de los signos presentados, que consisten en la rápida y potencialmente reversible hipotensión, hipotermia, disminución de la movilidad e incremento en el rascado. Sin embargo, se ha encontrado que la anafilaxia sistémica en roedores a diferencia de en los humanos, puede ser el resultado de dos diferentes vías de activación: la vía dependiente de mastocitos, IgE y principalmente histamina, a través del entrecruzamiento del receptor Fc ϵ RI, y una alterna, dependiente de macrófagos, IgG y factor activador de plaquetas (PAF) que se desencadena por el entrecruzamiento del receptor de baja afinidad para IgG (Fc γ RIII). Esto se demostró porque ratones desprovistos de mastocitos son capaces de desarrollar una respuesta anafiláctica; sin embargo la vía más común es la clásica (Finkelman, 2007).

Por otro lado la anafilaxia localizada alérgeno específica, comúnmente es analizada por la técnica de anafilaxia cutánea activa (ACA), que a diferencia de la anafilaxia sistémica experimental, es completamente dependiente de mastocitos y principalmente dependiente de IgE. Aunque también se ha encontrado, que puede participar un isotipo más de inmunoglobulinas, IgG1 en ratón e IgG4 en humanos, sin embargo la respuesta generada por este anticuerpo es muy débil, debido a su baja concentración (Finkelman, 2007). La ACA consiste en la inyección intradérmica del alérgeno a animales previamente sensibilizados frente al mismo, reproduciendo la sintomatología clínica asociada a la urticaria alérgica, es decir, incremento de la permeabilidad vascular causada por los mediadores de los mastocitos. Esta se hace visible por la extravasación de un colorante inyectado simultáneamente vía intravenosa (Inagaki y Nagai, 2009).

1.1.6. Vías de activación del mastocito.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la vía de activación de los mastocitos puede ser “dependiente de IgE”, mediada por el receptor $Fc\epsilon RI$, e “independiente” de IgE (Rao y Brown, 2008) y ésta puede ser de carácter inmunológico o no (Wang y cols., 2011).

1.1.6.1. Mecanismos de regulación de activación de mastocitos mediada por el receptor $Fc\epsilon RI$.

La activación de los mastocitos mediada por $Fc\epsilon RI$ ocurre durante las reacciones alérgicas y se da cuando la IgE monomérica se une al receptor. Este tipo de activación mediada por $Fc\epsilon RI$ es una de las vías más conocidas y extensamente estudiadas en esta población celular y tiene un rol muy importante en la inmunidad de helmintos y parásitos. Sin embargo, como ya se ha mencionado anteriormente (Rao y Brown, 2008), cuando hay una predisposición a alergias, este mecanismo de activación es el responsable del desencadenamiento de las reacciones propias de la inflamación alérgica. La desgranulación mediada por

IgE, empieza cuando un alérgeno se une al complejo IgE-FcεRI en la superficie de los mastocitos (Rivera y Olivera, 2008). Lo que resulta en la transfosforilación de los motivos de activación del inmunoreceptor basados en tirosina (ITAM) de las cadenas β y γ del FcεRI por Lyn, una proteína tirosin cinasa (PTK). Adicionalmente a esto, Lyn cinasa es reclutada por la cadena β fosforilada mientras que la región ITAM fosforilada de la cadena γ sirve como sitio acoplador para Syk (bazo tirosin cinasa, llamada así porque se aisló por primera vez de bazo porcino), donde es activada por Lyn. Por otro lado Fyn fosforila a la proteína adaptadora asociada a Grb2 (GAB2), activando la ruta fosfatidilinositol 3-cinasa (PI(3)K). Lyn y Syk fosforilan muchas moléculas adaptadoras y enzimas, regulando así la activación de las vías de la proteína cinasa activada por mitógenos (RAS-MAPK), de fosfolipasa C-γ (PLC-γ) y de PI(3)K entre otras (Lyn también puede regular negativamente la actividad de Fyn). La vía de las RAS-MAPK envuelve una cascada de proteínas cinasa, que activan por un lado factores reguladores de transcripción, para inducir la síntesis de algunos mediadores, y por otro activa a la enzima fosfolipasa A₂ (PLA₂), la cual participa en el metabolismo del ácido araquidónico, regulando así la producción de mediadores lipídicos. La activación de PLCγ causa el incremento de calcio (Ca²⁺) intracelular. Los mastocitos expresan las isoformas PLCγ1 y PLCγ2 y su activación conduce a la conversión de fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato (PtdIns(4,5)P₂) a inositol trifosfato (PtdIns(3,4,5)P₃) y diacilglicerol (DAG). La generación de PtdIns(3,4,5)P₃ lleva a la movilización intracelular de Ca²⁺, lo cual resulta en un flujo sostenido del ión, mantenido por un contraflujo de Ca²⁺ extracelular. A la par el DAG causa la activación de la proteína cinasa C (PKC), quien contribuye a la producción de citocinas por parte del mastocito. Además el inositol trifosfato es un importante mediador que regula la formación de otros lípidos tales como esfingosina 1-fosfato (S1P) y la actividad de varias enzimas tales como la tirosin cinasa de Bruton (BTK), que finalmente conduce a la señalización para la transcripción genética principalmente por la vía del factor nuclear κB (NFκB). Mientras PKC participa en la desgranulación del mastocito, ya que fosforila algunos sustratos como la proteína de la cadena ligera de la miosina, la

que conduce a la liberación de mediadores preformados (figura 9) (Galli y cols., 2008, Gould y Sutton, 2008; Rivera y Olivera, 2008; Kambayashi y Koretsky, 2007).

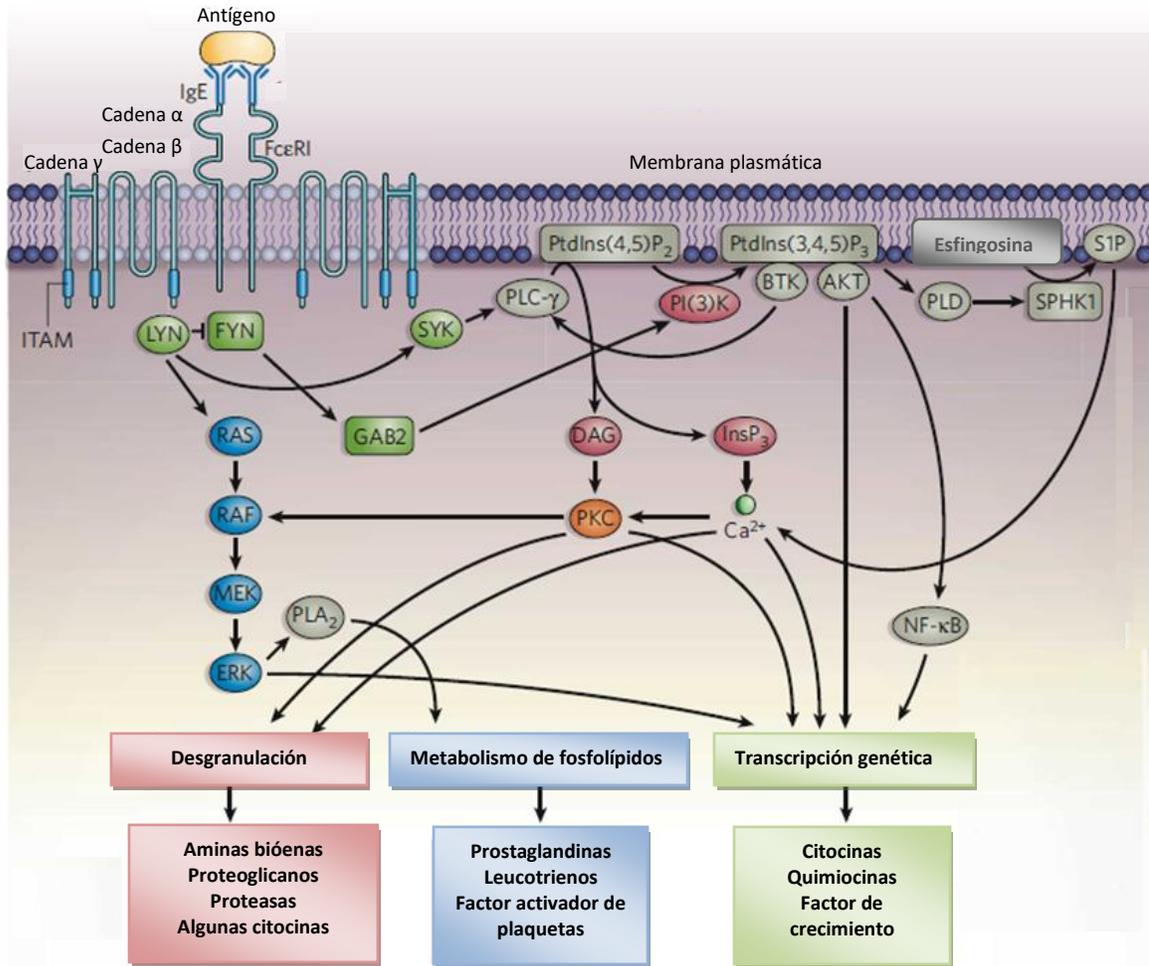
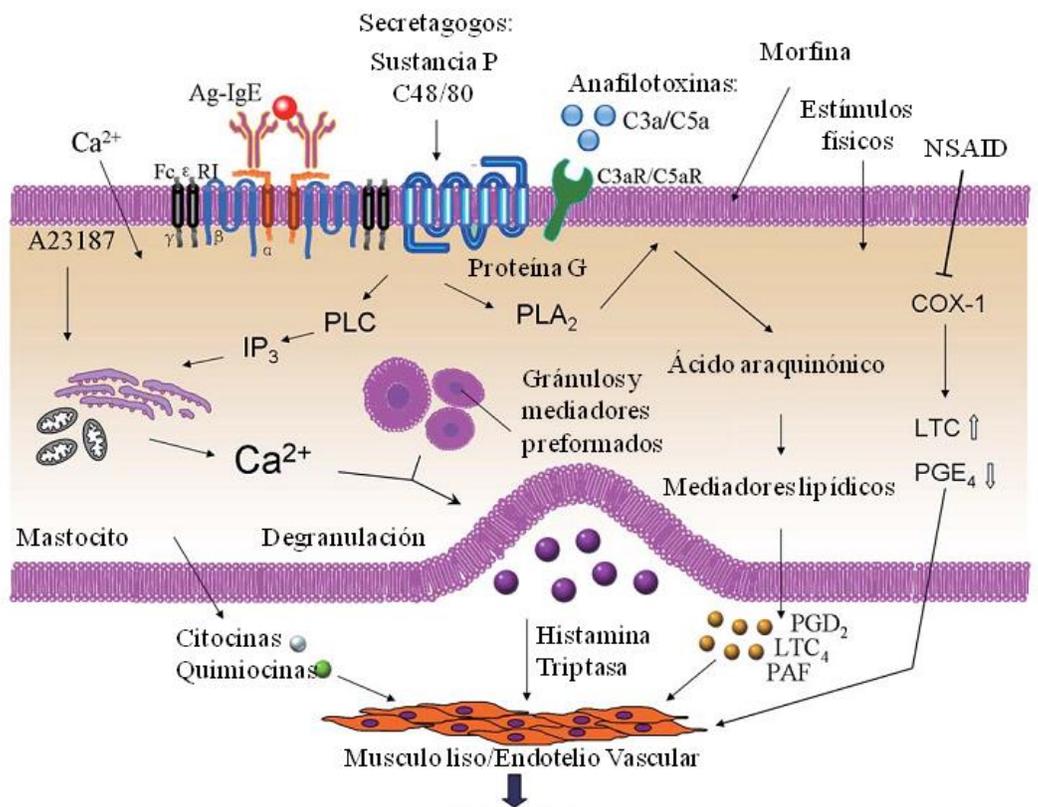


Figura 9. Vía de activación dependiente de IgE mediada por el receptor FcεRI en los mastocitos, para la liberación de sus mediadores farmacológicamente activos (figura adaptado de Galli y cols., 2008).

1.1.6.2. Activación independiente de IgE.

La activación del mastocito independiente de IgE esta generada por diferentes receptores distribuidos en el mastocito, entre los que se encuentran receptores activadores (los receptores c-kit, receptores de adenosina y receptores de proteínas GTP (G)), inhibidores (receptores MAFA (antígeno

asociado a la función del mastocito) y gp49) (Sharma y cols., 2002), así como, activadores e inhibidores (receptores de complemento (C3aR, C5aR, CR2, CR4), receptores de Fc de la IgG (Fcγ), principalmente I y III)(Wasiuk y cols., 2008). Otro tipo de receptores son los PRR, los cuales son el centro de reconocimiento directo de los patógenos por las células inmunes innatas, y son el enlace crítico entre la respuesta inmune innata y adaptativa. Los mastocitos expresan un rango muy amplio de RRP, pero los más estudiados han sido los TLRs. Así se sabe que expresan TLR 1, 2, 3, 4, 6 y 9 (Rao y Brown, 2008), aunque in vivo solo se ha demostrado la función de los TLR 2, 3 y 4.



ANAFILAXIA Y REACCIÓN ANAFILACTOIDE

Figura 10. Vías y mediadores de las reacciones dependientes e independientes de IgE. Donde NSAID se refiere a drogas antiinflamatorias no esteroidales por sus siglas en inglés y A23187 es un ionóforo de calcio. Imagen adaptada de Wang y cols., 2011.

Como se sabe, la activación de estos diferentes receptores en el mastocito es generada por diferentes estímulos, mencionados ya antes. Esta propiedad ha

sido aprovechada, para el estudio de las reacciones anafilácticas. El compuesto más utilizado para ello es el compuesto 48/80 (C48/80), el cual es conocido por ser uno de los más potentes secretagogos de los mastocitos, ya que puede activar fuertemente la exocitosis causando una rápida liberación de los mediadores alérgicos como histamina. El mecanismo activador, empleado por este compuesto es a través de los receptores acoplados a proteínas G. Además, se sabe que el efecto del C48/80 es menos efectivo en los basófilos (Figura10) (Wang y cols., 2011).

1.1.7. Translocación del factor de transcripción NFκB.

El factor nuclear κB (NFκB) pertenece a la familia de las proteínas Rel. Esta familia consiste de 5 miembros, denominadas NFκB1 (p105/p50), NFκB2 (p100/p52), p65 (RelA), RelB y c-Rel (Escoubet-Lozach y cols., 2002). El NFκB es un factor de transcripción ubicuo que mejora la transcripción de una variedad de genes, y puede ser activado por muchos estímulos, incluyendo virus, endotoxinas bacterianas, TNF-α e IL-1β (Marquardt y Walker, 2000), y se considera que juega un rol importante en el proceso inflamatorio. Elevados niveles de NFκB activados son encontrados en personas con asma, por lo que se cree, este juega un papel importante en esta condición, razón por la cual es utilizado como biomarcador de inflamación en muchos procesos fisiopatológicos. Se espera que al entender los mecanismos de activación de las proteínas NFκB, se conduzca a la comprensión de una variedad de desórdenes inflamatorios, incluyendo asma y alergia, así como su tratamiento (van de Berg y cols., 2001).

Citocinas humanas como TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y quimiocina expresada y secretada por células T normales y regulada por activación (RANTES), parecen ser regulados en cierto grado por NFκB. El NFκB sin estimular es encontrado en el citoplasma unido a inhibidores de NFκB (IκB) (Marquardt y Walker, 2000). Tras una

estimulación, I κ B es fosforilado en uno o más residuos de serina, ubiquitinándolo y degradándolo, permitiendo la liberación y migración del heterodímero p50-p65, para unirse a factores de reconocimiento en la región promotora del DNA de determinadas citocinas. La inducción óptima de NF κ B a los genes blanco, también requiere de la fosforilación de proteínas de NF κ B en el núcleo o en el citoplasma, tales como p65 dentro de su dominio de transactivación en uno o más dominios de serina (Ser276, Ser529 y Ser536 entre otras), por una variedad de cinasas en respuesta a distintos estímulos, ya sea por citocinas proinflamatorias o agentes de daño (Viatour y cols., 2005). La transformación de NF κ B en un factor activo tras la actuación del I κ B parece ser primordial para la producción óptima de ciertas citocinas derivadas de mastocitos, particularmente IL-6, pero no así IL-4 ni IL-5 (Marquardt y Walker, 2000).

1.1.8. Tratamiento.

Cuando la inflamación alérgica se presenta, no queda más que recurrir al tratamiento. Al respecto, así como ha incrementado el entendimiento del mecanismo del desarrollo de la inflamación alérgica, ha aumentado la gama de posibles tratamientos. Entre ellas, los corticoesteroides (inhiben la expresión de citocinas y quimiocinas así como de moléculas de adhesión), los agonistas de los receptores β 2-adrenérgicos de larga y corta acción (broncodilatadores de rápido alivio) y antihistamínicos, que forman la base del tratamiento del asma. Además de estos tratamientos clásicos, han surgido nuevas terapias como inmunoterapia alérgeno específica (induce tolerancia inmunológica), IgG anti-IgE (bloqueo de la IgE por medio de anticuerpos específicos), inhibidores de mastocitos e inmunoterapia basada en citocinas (Holgate y Polosa, 2008 y Galli y cols., 2008).

Por otro lado, como es sabido, en individuos atópicos (genéticamente predispuestos a producir anticuerpos IgE en el suero), la sensibilización al alérgeno es fundamental para el desarrollo de la inflamación alérgica; por lo tanto la evasión del contacto con el alérgeno antes o después de la sensibilización podría

funcionar como profilaxis primaria o secundaria. En el caso de los ácaros del polvo doméstico, los estudios de cohorte demuestran que el nivel de exposición a alérgenos en la vida temprana se correlaciona con el grado de sensibilización (Holgate y Polosa, 2008).

En el mismo sentido de la profilaxis, recientes estudios epidemiológicos e investigaciones experimentales sugieren que la estimulación microbiana del sistema inmune afecta el desarrollo de la tolerancia a alérgenos inocuos y son los probióticos la principal fuente de esta estimulación (Penders y cols., 2007). Estos son microorganismos comensales que viven en el tracto intestinal con efectos benéficos a la salud clínicamente documentados en los humanos, entre lo que destaca su acción sobre el tracto gastrointestinal y el sistema inmune asociado, principalmente en la inmunotolerancia (Gómez-Llorente y cols., 2010). Las cepas más comunes de estos microorganismos pertenecen a los géneros de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Entre ellas, la cepa L55 de *Lactobacillus acidophilus* alivia los síntomas de la rinitis alérgica en un modelo murino (Sunada y cols., 2007). Además la cepa KT-11 de *Lactobacillus crispatus* reduce los síntomas alérgicos en ratones mediante un ajuste del balance de la respuesta celular Th1 sobre la Th2 (Tobita 2010; Tobita 2009). Estudios realizados en mujeres embarazadas y sus hijos, demostraron que la administración de probióticos tiende a reducir las enfermedades atópicas asociadas a IgE, particularmente el eccema atópico (Kukkonen y cols., 2007), siendo *Lactobacillus* y *Bifidobacterias* los comensales que más frecuentemente colonizaban el intestino de los recién nacidos. Los probióticos pueden ser estimulados en su crecimiento y actividad mediante el uso de prebióticos, los cuales son ingredientes de alimentos no digeribles, entre estos se incluyen oligosacaridos de inulina, fructo-oligosacaridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GOS) y lactulosa (Kalliomäki, 2010).

1.2. Glicomacropéptido (GMP).

En años recientes se ha reforzado la evidencia científica sobre la existencia de péptidos y proteínas biológicamente activas derivadas de los alimentos que podrían tener efectos benéficos sobre la salud del humano. Los péptidos bioactivos presentes en los alimentos son derivados de proteínas alimenticias después de la digestión enzimática (Yoshikawa y cols., 2000). Cabe señalar que la mayor fuente de péptidos bioactivos hasta el momento, es la leche (Wildman, 2007). Entre los péptidos de la leche altamente estudiados, se encuentra el κ -caseino glicomacropéptido (GMP), también llamado caseinomacropéptido (CMP) y caseinglicopéptido, el cual resulta de la acción de la quimosina (renina) al hidrolizar los residuos aminoacídicos 105 y 106 de la κ -caseína (Eigel y cols., 1984; Brody, 2000; Farrell y cols., 2004), ya sea fisiológicamente como resultado de su digestión en el estómago de los neonatos o en la industria durante la elaboración del queso (Requena y cols., 2008).

Entre las múltiples propiedades funcionales del GMP, se sabe que es capaz de unirse a la toxina del cólera y enterotoxina de *Escherichia coli*, inhibe la adhesión bacteriana y viral, suprime secreciones gástricas, promueve el crecimiento bifidobacteriano, además de que modula la respuesta del sistema inmune.

1.2.1. Estructura y propiedades fisicoquímicas.

El CMP es una fracción de la κ -caseína (residuo 106-169), compuesto por 64 aminoácidos, con la peculiaridad de que carece de aminoácidos aromáticos (Phe, Trp y Tyr) así como de cisteína, consta de un solo residuo de metionina y es rico en aminoácidos de cadena ramificada (Leu, Ile y Val) (Thöma-Worringer y cols., 2006) (Figura 11). Existen 8 variantes genéticas, de las cuales 2 predominan en la leche bovina, A y B, que se diferencian entre sí por la sustitución de dos aminoácidos. En la posición 136 se encuentra una treonina en la variante A y una

isoleucina en la B, mientras que en la posición 148 existe un ácido aspártico en la variante A y una alanina en la variante B (Farell y cols., 2004).

El CMP se encuentra fosforilado de forma constitutiva en la serina 149 y en menor grado en la 127. Por otro lado el CMP cuenta con diversos sitios de glicosilación entre los que destacan las treoninas 121, 131, 133, 136 y 142, aunque también puede estar en las treoninas 165 y 135, así como las serinas 141 y 142 (Thöma-Worringer y cols., 2006; Brody, 2000) (Figura 11).

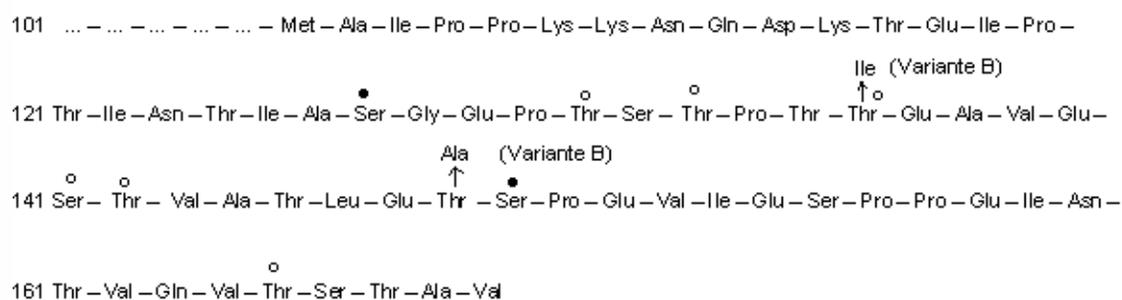


Figura 11. Secuencia de las variantes genéticas A y B del GMP bovino. Con los puntos negros se indica los residuos de aminoácidos que capaces de fosforilarse mientras con los vacíos se señalan los residuos que pueden estar glicosilados. Imagen adaptada de Thöma-Worringer y cols., 2006 y Brody, 2000.

La forma glicosilada representa aproximadamente el 50% del total del CMP bovino, es decir, del 10 al 15% del total del suero de la leche y se refiere a ella como glicomacropéptido bovino (GMPb); y consta de 5 diferentes cadenas de carbohidratos, compuestas de ácido *N*-acetilneuraminico (NeuAc), galactosa (Gal) y *N*-acetilgalctosamina (Gal-NAc) (Saito e Itoh, 1992):

- Monosacárido GalNAc-O-R
- Disacárido Gal β1→3 GalNAc-O-R
- Trisacárido NeuAc α2→3 Gal β1→3 GalNAc-O-R
- Trisacárido Gal β1→3 (NeuAc α2→6) GalNAc-O-R
- Tetrasacárido NeuAc α2→3 Gal β1→3 (NeuAc α2→6) GalNAc-O-R

El GMP tiene un PM de 7-8 kDa, con un punto isoeléctrico entre 4 y 5, altamente soluble en agua, con carga neta negativa incluso, a bajos valores de pH y estable al calor (Thöma-Worringer y cols., 2006). Debido a su ausencia de aminoácidos aromáticos es detectado únicamente a una longitud de onda 205 a 217 nm (Abd El-Salam, 1996; Tomczak y cols., 2007).

Por otro lado el GMP tiene una buena capacidad emulgente, con una máxima actividad a pH alcalino y una mínima en el rango de 4.5-5.5; sin embargo, la estabilidad de las emulsiones de GMP tratadas con calor desaparece después de 24 hrs de almacenamiento, particularmente las de pH neutro y alcalino (Thöma-Worringer y cols., 2006; Abd El-Salam, 1996; Chobert y cols., 1989).

En cuanto a las propiedades gelificantes del GMP, Burton y Skudder (1987) encontraron que una solución de CMP a 9.3 % forma un gel a pH de 4.5 a 20 °C, pero no cuando este se calentaba a 90 °C; mientras que Ahmed y Ramaswamy (2003) concluyeron que una solución de CMP al 12.5 % gelifica a 80 °C a un pH de 7. Por otro lado, Martin-Diana y cols. (2004) encontraron que la adición del GMP a fermentados de leche de cabra incrementa la elasticidad y reduce el ángulo de fase, resultando en un gel más estructurado y ordenado que el obtenido con concentrado de proteínas de suero (Thöma-Worringer y cols., 2006).

1.2.2. Propiedades nutricionales.

El GMP, además de proporcionar un buen sabor y sensación a la boca (Thomä-Worringer y cols., 2006; Mikkelsen y cols., 2005), tiene diversas funciones, entre las que destacan su uso como sustituto alimenticio en la dieta de pacientes con fenilcetonuria por carecer de fenilalanina en su composición (Tomczak y cols., 2007; Thomä-Worringer y cols., 2006; Daddaoua y cols., 2005; Nielsen y Tromholt, 1994; Eigel y cols., 1984). Además puede ser usado como ingrediente en la dieta para pacientes que sufren de enfermedades hepáticas por su bajo contenido de metionina y su alto contenido en aminoácidos de cadena

ramificada, los cuales pueden ser utilizados como fuente de energía (Abd El-Salam, 1996). Sin embargo, en ninguno de los casos se debe abusar de su consumo por su elevado contenido en treonina, lo que puede originar hipertreoninemia (Thomä-Worriger y cols., 2006).

Por otro lado, Kelleher y cols. (2003) demostraron que el GMP tiene la capacidad de incrementar la absorción del zinc en monos rhesus infantiles por su alta electronegatividad, como ya se ha mencionado anteriormente. Además, se ha encontrado que el GMP consumido antes de cualquier alimento, puede reducir la ingesta calórica efectivamente por la estimulación de la liberación de la hormona colecistoquinina, hormona promotora de la saciedad (Thomä-Worriger y cols., 2006; Portman, 2004; Yvon y cols., 1994).

1.2.3. Inmunogenicidad.

Aunado a las propiedades antes mencionadas, el GMP independientemente de la ruta de inmunización, por sí solo no es capaz de producir la inducción de anticuerpos específicos. Sin embargo, cuando los ratones son inmunizados con κ -caseína o GMP unido a una molécula inmunogénica o en presencia de adyuvantes se genera la respuesta de anticuerpos contra GMP (Chávez y cols., 2008; Mikkelsen y cols., 2005).

1.2.4. Farmacodinamia

El GMP puede ser detectado en el plasma de ratas después de la ingestión de caseína humana (Chabance y cols., 1995). Por otro lado, los máximos niveles encontrados de GMP en plasma de adultos, después de la ingestión de leche y yogur, fueron de 0.5-2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 1.05-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivamente, además de observarse que el GMP puede encontrarse en plasma humano 8 horas después de la ingesta de los mismos alimentos (Chabance y cols., 1998).

1.2.5. Función biológica.

Kawasaki y sus colaboradores en 1992 demostraron que el GMP se une a la toxina del cólera y que cuando el GMP es tratado con sialidasas, la cual hidroliza el ácido siálico, pierde completamente su capacidad de unirse a dicha toxina (Brody, 2000); lo mismo ocurre con otras toxinas bacterianas, como las enterotoxinas termolábiles de *E. coli* LT-I y LT-II (Isoda y cols., 1999); además de que protege a las células hospederas de la infección del virus de la influenza (Thomä-Worringer y cols., 2006). Por otro lado, el GMP inhibe la adhesión de bacterias cariogénicas tales como *Streptococcus mutans*, *S. sanguis* y *S. sobrinus* a la cavidad oral y modula la composición de la microbiota de la placa dental. Este efecto ayuda al control de la formación ácida en la placa dental, así como a la reducción de la disolución de la hidroxiapatita en el esmalte de los dientes y la promoción de la remineralización, razón por la cual ha sido patentado el GMP para la aplicación en productos de higiene personal para la prevención de la caries dental (Thomä-Worringer y cols., 2006; Aimutis, 2004).

Además Kawasaki y colaboradores en 1993 demostraron que el GMP a 80 partes por millón (p.p.m.) inhibe la hemaglutinación por parte de cuatro cepas del virus de la influenza; mientras que Dosako y colaboradores en 1992 encontraron que a 10 p.p.m. previene la inducción de transformaciones morfológicas de linfocitos de la sangre periférica por el virus de Epstein Barr (Brody, 2000).

Chernikov y colaboradores (1974) demostraron que las infusiones intravenosas o parenterales de GMP en perro inhiben las secreciones gástricas ácidas inducidas por diferentes estimulantes como el tetrapéptido gastrina C-terminal, pentagastrina, histamina y la administración de carne o pan; el efecto inhibitorio de las secreciones ácidas fue reproducido en ratas usando una fracción aislada de GMP por Stan y colaboradores en 1983; solo que el efecto tuvo menor duración (Yvon, 1994).

El GMPb promueve el crecimiento del género *Bifidobacterium*: *B. breve*, *B. bifidum* y *B. infantis*. La suplementación de leche con 2% de GMP, ya sea de origen bovino, ovino o caprino, incrementa el conteo de *B. lactis* por ciclos de 1.5 log después de 24 horas a 37°C al comparar con la leche no suplementada (Thomä-Worriger y cols., 2006). Investigaciones de Proulx y colaboradores en 1992 señalan que la porción aminoacídica del GMP es crítica para el crecimiento de bifidus; sin embargo, los equipos de trabajo de Idota (1996) y Yakabe y colaboradores (1994) son partidarios de que los responsables de este crecimiento son los azúcares con ácido siálico de la molécula (Brody, 2000). En este mismo sentido, Chen y colaboradores en el 2010, demostraron *in vivo*, que el tratamiento oral por 15 días con GMPb aumenta significativamente la concentración de *Lactobacillus* y *Bifidobacteria* y disminuye la de coliformes, sin alterar a *Enterococcus* en la microbiota intestinal de ratones BALBc (Chen y cols., 2010).

Por otro lado, el GMP también es capaz de modular la respuesta inmune de diversas formas. En 1992 Otani y colaboradores demostraron que la kappa caseína inhibe la proliferación de esplenocitos de ratón inducidos por el mitógeno LPS de *Salmonella typhimurium*, resultando como responsable de esta inhibición la fracción del GMP, además en base a observaciones microscópicas ellos sugieren que la célula principalmente afectada son los linfocitos B; además Otani y Monai en 1993 observaron que el efecto del GMP se veía reducido después de la digestión con neuraminidasa y quimiotripsina, indicando que el ácido siálico es crítico para este; y que la digestión con tripsina y pronasa incrementa su efecto inhibitorio; incluso, después de la digestión con pronasa se observó inhibición de la respuesta proliferativa cuando ésta era inducida con concanavalina A (ConA) o con fitohemaglutinina (PHA), aunque también pudiera deberse a que alguno de los péptidos resultantes ejerce efecto citotóxico. Contrario a estos resultados, recientemente Requena (2010) con su equipo de trabajo, reportaron que el GMP (0.01 y 0.1 mg/ml) mejora la proliferación de esplenocitos estimulados con ConA, y que cuando se aumenta su concentración (1.0 mg/ml), su efecto se pierde.

En el intento por descubrir el mecanismo por el cual el GMP inhibe la proliferación inducida por LPS en esplenocitos de ratón, se demostró que el GMP se adhiere directamente a la superficie de estos a través de la incubación de las células con y sin GMP, para posteriormente ser inmunoteñidas con el anticuerpo anti- κ -caseína, de tal forma que solo las células incubadas con GMP retenían el anticuerpo, sugiriendo que la serina 149 era la responsable de la unión al receptor del mitógeno; por otro lado, repitieron el experimento, solo que en este caso inmunotñieron con anticuerpo frente al receptor antagonista de interleucina 1 (IL-1ra), demostrando que las células incubadas con GMP retenían mayor cantidad de anticuerpo, indicando así que el GMP estimulaba la síntesis de un componente inhibitorio soluble (Otani y Monnai, 1995). Monnai y Otani en 1997 demostraron, por medio de RT-PCR en la línea celular de monocitos P388D1, que este compuesto inhibitorio era IL1-ra.

Por otro lado se ha mostrado que el GMP se une a células T CD4⁺ de ratón y suprime la expresión del receptor de IL-2 en la membrana celular, de tal forma que inhibe la proliferación inducida por PHA de esplenocitos de ratón (Otanni y cols., 1996). Además, la ingestión de GMP suprime los niveles de anticuerpos IgG en el suero de ratón contra ovoalbúmina (OVA) en la dieta y β -lactoglobulina inyectada intraperitonealmente, cuando se comparó con una dieta de OVA como única proteína (Monnai y cols., 1998). Por otro lado Yun y cols., (1996) estudiaron el efecto del GMP en la producción de inmunoglobulinas producidas por esplenocitos estimulados con LPS, encontrando que únicamente la concentración de IgA se aumenta por el GMP, así como la población de células IgA positivas (Brody, 2000). Snow Brand Milk Products (1996) patentó el uso del GMPb para acelerar el crecimiento de linfocitos B humanos en cultivos celulares, pero no así, el de linfocitos T, regulando positivamente el sistema inmune humoral.

En cuanto al efecto inmunomodulador del GMP en monocitos/macrófagos, estudios *in vitro* han demostrado que el GMP incrementa la secreción de IL-1ra, aunque no la de IL-1 α e IL-1 β en la línea celular de monocitos de ratón P388D1 (Monnai y Otani, 1997); mientras, que con

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

concentraciones de 0.001 a 0.05 mg/ml se encontró que el péptido aumenta la proliferación y actividad fagocítica de la línea celular de macrófagos humanos U937 (Li y Mine, 2004). Sin embargo, con 1 mg/ml de GMP, además de disminuir ligeramente la proliferación de los monocitos de la línea celular THP1, se aumenta la secreción de IL-1 β , IL-8 y TNF por las células, efecto que no es específico de esta línea celular, ya que reprodujeron el experimento en cultivo primario de monocitos humanos, aunque en este caso el fenómeno fue más evidente sobre la secreción de IL-8. Finalmente comprobaron que esta acción la ejerce a través de las vías MAP cinasas y NF κ B (Requena y cols., 2009).

Además, se ha observado que el GMP tiene un efecto anti-inflamatorio en modelos de colitis e ileitis inducidas con ácidos sulfónico-trinitrobenceno (Daddaoua y cols., 2005; Requena y cols., 2008) e inducida con sulfato sódico de dextrano (DSS) en rata (López-Posadas y cols., 2010). Los mecanismos exactos por los cuales lo hace aún no son muy claros, pero se ha propuesto que puede estar relacionado con la modulación sobre los linfocitos Th1 y Th17 e incluso sobre macrófagos (López Posadas y cols., 2010; Requena y cols., 2010); ya que se observó una disminución *in vivo* en la expresión de IL-1 β e iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) (Daddaoua y cols. 2005), además de TNF- α , IL-1ra, IL-17 en tejido de colon dañado. Sin embargo, este efecto no se reproduce *ex vivo* en las células mononucleares aisladas de colon de animales con ileitis inducida con DSS (Requena y cols., 2008). En este mismo sentido, en modelos *in vitro*, el péptido potencia la acción de la α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina sobre la estimulación de la quimiotaxis, producción de superóxido, desgranulación y fagocitosis de los neutrófilos humanos (Rusu y cols., 2009). Además, se ha observado que la administración oral de 50 mg de GMP/ kg de peso corporal/ día aumenta la secreción de IL-4 tanto en sangre como en la mucosa intestinal de ratón (Jia y Chen, 2010). Por último, aunque no se han demostrado los efectos inmunomoduladores del GMP sobre las reacciones de hipersensibilidad de tipo I, si se ha observado que la κ -caseína y la lactoferrina disminuyen la liberación de histamina en mastocitos de ratón *in vitro* (Otani y Yamada, 1995).

2. JUSTIFICACIÓN

El GMPb es un derivado lácteo altamente usado como suplemento alimenticio debido a su composición química, y recientemente usado en la industria de la higiene personal por sus propiedades biológicas. Además, la producción de GMPb es sencilla y económica, sin olvidar que posee diversas propiedades bioquímicas que lo hacen adecuado para su manejo en la industria farmacéutica y alimenticia.

En las últimas décadas, se le han atribuido al GMPb diversas propiedades inmunomoduladoras, entre ellas anti-inflamatorias. Por otro lado, se sabe que el GMPb promueve el crecimiento de bifidobacterias. En este sentido, se ha observado que las bifidobacterias son un tipo de bacterias probióticas que pueden generar estímulos microbiológicos esenciales para restablecer el equilibrio Th2 -Th1 de la respuesta inmune del recién nacido. Por esta razón se propone evaluar el efecto del GMPb sobre las reacciones de hipersensibilidad de tipo I.

3. HIPÓTESIS

El GMPb tiene efecto modulador *in vivo* sobre la respuesta inmune humoral y celular relacionada con la hipersensibilidad inducida por alérgenos e *in vitro* sobre la activación de los mastocitos.



4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

Evaluar los efectos de la administración oral del GMPb sobre la producción de anticuerpos, secreción de citocinas y respuesta inflamatoria relacionadas con las alergias, así como su efecto *in vitro* sobre la activación del mastocito.

4.1.1. Objetivos particulares.

- Determinar el efecto del GMPb vía oral sobre la producción de IgEs alérgeno-específicas en ratas sensibilizadas con alérgeno.
- Evaluar el efecto del GMPb vía oral sobre la producción de citocinas del perfil Th2.
- Estudiar el efecto de la administración oral de GMPb sobre la intensidad de la respuesta inflamatoria aguda localizada y sistémica.
- Cuantificar la secreción de histamina de los mastocitos bajo el efecto del GMPb en un modelo *in vitro*.
- Analizar la activación del mastocito vía NF- κ B inducida por el GMPb en un modelo *in vitro*.

5. METODOLOGÍA

5.1. Animales y protocolo experimental.

Para los ensayos *in vivo* se trabajó con ratas Wistar, macho de entre 100-120 gramos de peso corporal. Los animales fueron tratados vía esofágica (*per os*) con o sin 500 mg de GMPb/ kg de peso del animal/ día, disuelto en agua (Daddaoua y cols., 2005; Requena y cols., 2008). Para su estudio, se agruparon de la siguiente manera:

- **Controles (C)**, se le administró agua por 4 días previos a la evaluación de las diferentes variables.
- **Tratados (T)**, recibieron tratamiento con GMPb durante 4 días previos a la evaluación de las diferentes variables.
- **Sensibilizados (S)**, los animales se sensibilizaron frente a la OVA y se les administró agua 3 días antes de la sensibilización y hasta la evaluación de las diferentes variables.
- **Sensibilizados con tratamiento (ST)**, los animales se sensibilizaron frente a ovoalbúmina (OVA) y comenzaron el tratamiento con GMPb 3 días antes de la sensibilización y hasta la evaluación de las diferentes variables.
- **Controles de la sensibilización o Sham, para el grupo con tratamiento previo a la sensibilización (SH)**, se administró los adyuvantes para la sensibilización pero no el alérgeno y al igual que los animales S recibieron agua.

- **Grupo sensibilizados sin tratamiento posterior a la sensibilización (SP):** animales fueron sensibilizados frente al alérgeno y recibieron agua 11 días después del inicio de la sensibilización durante 4 días.
- **Grupo sensibilizados con tratamiento posterior a la sensibilización (STP),** los animales fueron sensibilizados frente al alérgeno y tratados con GMPb 11 días después del inicio de la sensibilización durante 4 días.
- **Controles de la sensibilización o Sham, para el grupo con tratamiento posterior a la sensibilización (SHP),** se les inyectó los adyuvantes para la sensibilización sin la OVA y se les administró agua como a los animales SP.

Todos los animales se obtuvieron del Bioterio de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, previamente desparasitados y tratados con antibiótico. Los animales se mantuvieron con temperatura controlada entre 22-24°C, ciclos de luz de doce horas y doce de oscuridad y una dieta con Rodent Laboratory Chow 5001 y agua *ad libitum*. Todos los experimentos fueron llevados a cabo con estricto cumplimiento de las normas éticas aprobadas por la Normatividad Institucional de los estándares de manejo y cuidado de los animales.

5.2. Sensibilización de animales.

Para la sensibilización de animales con OVA se tomó como día 0 el día de la primera inyección con el alérgeno. De esta manera, el día 0 se inyectó vía intramuscular (i.m.), 1 mg de OVA (Sigma-Aldrich, USA) con 7.8 mg de hidróxido de aluminio $Al(OH)_3$ (Sigma-Aldrich, Dinamarca) como adyuvante en 1 ml de solución salina (s.s.) al 0.9%; mientras, que por vía subcutánea (s.c.) se les inyectó una dosis de la vacuna DPT celular (Serum Institute of India LTD, India; una dosis de DPT contiene toxoide diftérico 10-20 Lf, toxoide tetánico 10-20 Lf y vacuna pertusis: 10-15 x 10^9 células inactivadas de *Bordetella pertussis/ml*) para favorecer una

respuesta de anticuerpos de isotipo IgE. Posteriormente, en el día 7 se les administró nuevamente, por vía i. m. 1 mg del alérgeno con 7.8 mg de Al (OH)₃ como adyuvante en 1 ml de s.s. (Salinas y cols., 2009). El protocolo se siguió de la misma manera para los grupos sham o controles de la sensibilización, pero sin la administración de la OVA.

5.3. Obtención de muestras de suero.

Se obtuvo 1 ml de sangre de las ratas, previamente anestesiadas con éter, vía intracardiaca (i.c.). Se dejó coagular la sangre a temperatura ambiente y se centrifugó a 704 x g por 8 minutos (min). Por último, se colectó el suero en alícuotas de 80 µl y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

5.4. Anafilaxia cutánea pasiva (ACP).

Para determinar los niveles de IgE específica en el suero se llevaron a cabo pruebas de anafilaxia cutánea pasiva (ACP). Para ello, se rasuró el dorso de ratas Wistar macho de entre 350 a 500 g de peso corporal. Un día después, se anestesiaron las ratas con éter y se les inyectó vía intradérmica (i.d.) 50 µl de diluciones crecientes (de 1:2 a 1:256) de cada uno de los sueros a estudiar. Al día siguiente, se administró vía i.d. en el dorso de cada rata 50 µl de solución de histamina (Sigma-Aldrich, Suiza) 0.04 µg/µl en s.s. como control positivo de la reacción y 50 µl de s.s. como control de la reacción generada simplemente por la lesión producida por la inyección. Inmediatamente y por vía intravenosa (i.v.) utilizando la yugular se inyectó 2 mg de OVA más 34 mg de azul de Evans/ kg del animal al 3% en s.s. Pasados 30 min se sacrificó a las ratas por sobredosis de anestesia (éter) para la obtención de la piel del dorso y medición de los diámetros de las reacciones inflamatorias producidas por los sueros, la histamina y la s.s. en

la cara interna del tejido. Por convenio, el título de anticuerpos IgE anti-alérgeno en cada suero se expresó como la mayor dilución que cause una lesión mayor de 5 mm de diámetro (Dai y cols., 2004). En base a lo anterior, en los casos donde solo se requirió confirmar la sensibilización de los animales y no la titulación de los sueros, se estableció que la aparición de una reacción inflamatoria en el punto de inyección de los sueros íntegros, era indicativo de que los animales estaban sensibilizados frente a la OVA; mientras que la ausencia de reacción inflamatoria marcaría la ausencia de IgE anti-OVA y por tanto de sensibilización.

Para comprobar que la extravasación del colorante estuvo generada por acción de la IgE, se inyectaron como controles sueros con IgE inactivada. Para ello los sueros se calentaron a 56°C durante 1 hora y posteriormente se diluyeron en una relación 1:2 con s.s. (Ma y cols., 2010 y Church, 1975).

5.5. Aislamiento de esplenocitos de rata.

Para la obtención de células del bazo, primeramente se sacrificaron ratas de los grupos S y ST con una sobredosis de éter. Con las debidas condiciones de esterilidad, se colocó al animal en posición horizontal sobre su lado derecho. Se retrajo la piel a partir de una incisión de 2 cm de largo aproximadamente a la altura del órgano. Se visualizó el bazo y se separó del animal, eliminando la mayor cantidad de tejido conectivo. Se colocó en una caja Petri con s.s. fría.

Una vez realizada la disección del bazo, se llevó el órgano a la campana de flujo laminar, donde se perfundió con 20 ml de s.s. con ayuda de una jeringa de 10 ml Terumo® y una aguja BD® PrecisionGlide® 25G*5/8" (0.50 mm *16 mm). La suspensión celular obtenida se centrifugó a 200 x g en tubos Corning por 10 minutos a 10 °C; la pastilla celular se resuspendió en 5 ml de solución de lisis NH₄Cl 0.15 M y se incubó 5 minutos en hielo. Pasado el tiempo se llevó a 10 ml con la s.s. y se centrifugó a 200 xg por 10 min a 10 °C, se repitió esto dos veces más para su

lavado. Las células se resuspendieron en 1 ml de medio RPMI 1640 sin rojo fenol (Sigma-Aldrich, USA) suplementado con suero de ternera fetal al 5% (Invitrogen, NY, EUA) y 1% de penicilina-streptomina (Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA). Se trabajó con suspensiones de células con viabilidad $\geq 98\%$ y pureza $\geq 90\%$. Por último los esplenocitos se sembraron en medio RPMI suplementado a la densidad requerida para cada ensayo.

5.6. Determinación de viabilidad celular.

Primeramente se hizo una dilución 1:20 de la suspensión celular obtenida. De esta solución se tomaron 10 μl más 80 μl de azul Trypan (al 0.2% para esplenocitos o 0.9% para mastocitos) y 110 μl de RPMI. Enseguida se tomó 10 μl de la mezcla y se llevó al microscopio para el conteo en la cámara de Neubauer. Se leyeron los cuatro cuadrantes externos, considerando células teñidas (muertas) y sin teñir (vivas). El rendimiento se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{(\text{No. células})(\text{Factor de la cámara})(\text{Factor de dilución})(\text{ml de suspensión celular})}{\text{No. de cuadrantes}}$$

5.7. Cultivo de esplenocitos.

Los esplenocitos aislados de cada bazo (2×10^5 células en 100 μl de medio RPMI suplementado/ pocillo) se sembraron en placas de ELISA estériles (COSTAR® CAT No. 3599; NY, EUA) en las siguientes condiciones: sin estímulo (basal), con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Concanavalina A (ConA) de *Canavalia ensiformis* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (control positivo) y 0.1, 0.5 y 2.0 mg de OVA/ ml. Cada condición se realizó por triplicado. Las placas se llevaron a cámara húmeda al 5% de CO_2 por 72 o 96 horas (hrs), en un incubador de CO_2 Imperial II. Pasado este tiempo se determinó la proliferación celular o se recolectó el sobrenadante y se centrifugó a

269 x g durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se alicuotó y se almacenó a -80°C hasta la cuantificación de citocinas.

5.8. Ensayo de proliferación celular.

La proliferación celular de los esplenocitos se determinó mediante la técnica de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) de Mossman (1983) con algunas modificaciones. Pasado el tiempo de incubación de los esplenocitos, 72 o 96 hrs, se adicionó 50 µg de MTT por cada 100 ml de medio por pocillo, se incubó a 37°C en cámara húmeda al 5% de CO₂ por 4 hrs. Para la dilución de los cristales de formazán formados durante esta incubación se adicionó ácido clorhídrico (HCl) 0.1N en isopropanol absoluto en una relación de 100 µl por cada 100 µl de medio. Finalmente se leyó la densidad óptica de cada pocillo en un lector de ELISA (550, Ca, EUA o iMark™, Japan) a 595 nm. El grado de estimulación generado para cada caso se reportó como el índice de estimulación (IE). Este se define como la DO de la muestra con estímulo entre la D0 de la muestra sin estímulo (basal).

5.9. Cuantificación de citocinas.

A la par del ensayo de proliferación se realizó la cuantificación de las siguientes citocinas: IL-4, IL-10 e IL-13. Los niveles de interleucinas en los sobrenadantes de cultivos de esplenocitos se determinaron mediante ELISA, usando un kit comercial suministrado por Invitrogen™ (Flynn Rd, CA). La determinación se basó en la adhesión de anticuerpos monoclonales frente a las diferentes citocinas, previamente fijados a la placa, a las interleucinas específicas presentes en las muestras; posteriormente, se adicionó el anticuerpo secundario biotinilado. Luego de un periodo de incubación se removió el exceso de

anticuerpo secundario y se adicionó la estraptavidina-peroxidasa. Tras un segundo tiempo de incubación se retiró la enzima no unida y se adicionó una solución del sustrato, que tras la unión con la enzima generó una solución colorida. La intensidad del producto colorido fue directamente proporcional a la concentración de interleucina presente en la muestra original. Esta concentración se determinó por espectrofotometría a 450 nm en un lector de ELISA (550, Ca, EUA o iMark™, Japan).

5.10. Reacción anafiláctica cutánea.

La respuesta inflamatoria localizada se analizó desarrollando una reacción de hipersensibilidad cutánea inmediata mediante una ACA. La prueba se llevó a cabo en la piel del dorso de las ratas, previamente rasuradas. A los 14 días de la sensibilización se inyectó a los animales vía i.d. y por triplicado 15.6 y 31.2 µg de OVA en 50 µl de s.s., así como volúmenes iguales de s.s. e histamina (0.04 µg/µl) como controles negativo y positivo respectivamente. Enseguida se inyectó vía i.v.(yugular) azul de Evans (34 mg/ kg) al 3% en s.s. Pasados 30 min se sacrificaron las ratas por sobredosis de anestesia (éter) para la obtención de la piel del dorso y medición de la extravasación del colorante, que a diferencia de la ACP, en este caso se determinó por espectrofotometría. Cada muestra de piel (aproximadamente 14 mm de diámetro) se incubó en KOH 0.1N durante toda la noche a 37 °C, pasado el tiempo se mezcló vigorosamente con una solución de H₃PO₄ 0.6 N y acetona (5:13). Las muestras digeridas se centrifugaron por 15 min a 1610 x g. La cantidad de colorante extravasado fue determinado por DO a 630 nm en un espectrofotómetro UV-Vis DU530 (Beckman, EUA) y usando una curva estándar de azul de Evans de 0.1 a 5 µg/ ml del colorante (Church, 1975; Inagaki y Nagai, 2009). A los datos de concentración de azul de Evans extravasado en cada proceso inflamatorio se les restó el dato de la concentración del colorante extravasado por la s.s. en el mismo animal, para normalizar.

5.11. Reacción anafilactoide cutánea.

La reacción anafilactoide cutánea se llevó a cabo en la piel del dorso de las ratas, previamente rasuradas, mediante la administración i.d. de soluciones del C48/80 (1 ó 5 µg en 50 µl de s.s.) por triplicado; así como volúmenes iguales de s.s. e histamina (0.04 µg/µl) como controles negativo y positivo respectivamente. Enseguida se inyectó vía i.v. (yugular) azul de Evans (34 mg/ kg) al 3% en s.s. Pasados 30 min se sacrificaron las ratas por sobredosis de anestesia, con éter, para la obtención de la piel del dorso y medición de la extravasación del colorante, que en este caso se valoró como en la ACA, donde la cantidad de colorante extravasado se determinó por DO a 630 nm.

5.12. Prueba de anafilaxia sistémica.

La anafilaxia sistémica se evaluó el día 14 de la sensibilización, tras el reto con el alérgeno vía i.v., mediante el registro de distintas variables: temperatura corporal, signos de anafilaxia y tasa de supervivencia. Para ello, se registró la temperatura del animal a través del recto (temperatura a los 0 min), se anestesió con éter y enseguida se le colocó un catéter en la yugular de forma permanente. Se dejó reposar a la rata por 2 hrs o hasta que recuperó la temperatura inicial (a los 0 min) para la aplicación posterior de 1 mg de OVA en s.s. (2.5 µg/µl) y a partir de este momento se comenzó con el registro de las variables.

La temperatura se midió a través del recto con un termómetro digital Citizen® cada 10 min después del reto con el alérgeno durante 1 hr o hasta la muerte del animal. A la par, los signos de anafilaxia se valoraron de acuerdo con la escala usada por Li y cols. (2009). Para ello se observó la severidad de las manifestaciones y se ponderó de acuerdo a la siguiente escala de puntuación: 0, no presentó signos de choque anafiláctico; 1, se rascó y frotó alrededor de nariz y

cabeza insistentemente; 2, disminuyó la actividad física y aumentó la frecuencia respiratoria; 3, presentó respiración asmática y cianosis alrededor de boca, cola y patas; 4, tuvo respuesta ligera o nula tras un estímulo punzante, presentó temblor o convulsiones; 5, el animal murió. El tiempo límite para el registro fue a los 60 min después del reto con OVA.

La tasa de supervivencia fue monitoreada durante 1 hr después de la inducción del choque anafiláctico. Se representó como el número de ratas vivas del total de casos analizados a los 30, 40, 50 y 60 min posteriores a la inducción del choque anafiláctico.

5.13. Reacción anafilactoide sistémica.

La reacción anafilactoide se realizó inyectando vía i.p. C48/80 (8 mg/ kg de peso corporal) en s.s. a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Tras la administración del mismo, se comenzó con el registro de las distintas variables: temperatura corporal, signos de anafilaxia y tasa de supervivencia, tal y como se hizo en la anafilaxia sistémica.

5.14. Cultivo de mastocitos peritoneales.

Para el aislamiento de mastocitos peritoneales se trabajó con ratas hembras Wistar, entre 150 a 250 g. Para ello se sacrificó al animal por sobre dosis de anestesia (éter etílico). Inmediatamente después se desinfectó el abdomen de la rata con etanol al 70%. Posteriormente se le colocó en posición decúbito dorsal sobre la mesa de cirugía donde se sujetaron sus patas. Enseguida y bajo las debidas condiciones de esterilidad, se retrajo la piel y posteriormente el músculo hasta dejar expuesta la cavidad peritoneal, en la que se adicionó 20 ml de solución de lavado fría, solución HEPES-TIRODES pH7.4 (NaCl 137mM, KCl 2.7 mM,

NaH₂PO₄ 0.4 mM, CaCl₂ 1mM, glucosa 5.6 mM y HEPES 12mM) al 1% en albúmina sérica bovina (BSA) (BHT-BSA). Después de dar ligeros masajes a la cavidad peritoneal se pasó casi en su totalidad la solución del lavado a un tubo de propileno y se mantuvo en frío. Las muestras se llevaron con solución BHT-BSA a centrifugación a 180 x g por 6 min a 4 °C. Enseguida el paquete celular se resuspendió sobre un gradiente de percol (Percoll™, GE Healthcare, Suiza) de 30-80% (v/v) y se llevó a centrifugación a 220 x g por 20 min a 4°C. El residuo de percol se eliminó con dos lavados por centrifugación con solución BHT-BSA. Finalmente el paquete celular se resuspendió en 1 ml de RPMI-1640 suplementado con suero de ternera fetal al 5 % y 1 % penicilina-streptomina. El conteo de viabilidad celular y pureza de mastocitos se realizó mediante la técnica del Azul Trypan en cámara de Neubauer, como se indicó anteriormente. Se trabajó con suspensiones de células con viabilidad ≥ 97 % y pureza ≥ 95 %. Por último los mastocitos se sembraron en medio RPMI suplementado a la densidad requerida para cada ensayo.

5.15. Cuantificación de histamina.

Para la cuantificación de histamina se partió de una suspensión de mastocitos de 1x10⁵ células en 1 ml de medio RPMI. Se centrifugaron a 250 x g por tres min a 4°C. Las células se incubaron a 37°C durante 30 minutos con 500 µl de diversas concentraciones de GMPb (0 (basal), 0.01, 0.05, 0.1, 1.0, 5, 10 y 50 mg/ml), C48/80 (5 µg/ml) en medio RPMI. Al término de la reacción los tubos se incubaron en hielo para detenerla. Posteriormente se centrifugaron a 250 x g por tres min a 4°C, se colectó el sobrenadante y el precipitado celular se resuspendió en 500 µl de BHT-BSA. Enseguida se tomaron 150 µl de las soluciones del sobrenadante como del pellet, y se diluyeron en 550 µl de BHT-BSA. Se inactivaron histaminasas a 100°C por 5 minutos y se precipitaron ésta y otras proteínas con ácido tricloroacético (TCA) al 5% por 15 min. Las proteínas precipitadas se eliminaron por centrifugación a 16,435 x g durante 15 min. Finalmente con el

sobrenadante de cada muestra se determinó histamina espectrofluorométricamente utilizando la reacción con o-ftaldialdehído (OPA; Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), según el método de Shore y colaboradores (1959); el cual consiste en alcalinizar la solución con NaOH 1N para llevar a cabo la reacción con OPA al 0.1% en metanol libre de acetona por 4 min. Pasado el tiempo la reacción se detiene con HCl 3 N. El producto fluorescente se determinó por espectrofluorimetría a $\lambda_{\text{excitación}} = 355 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 443 \text{ nm}$. El resultado finalmente se reportó en porcentaje, es decir:

$$\left[\frac{\text{Histamina sobrenadante}}{\text{Histamina sobrenadante} + \text{Histamina precipitado celular}} \right] \times 100\%$$

5.16. Cuantificación de β -hexosaminidasa.

Para la cuantificación de β -hexosaminidasa se partió de una suspensión de mastocitos de 3×10^5 células en 1 ml de medio RPMI. Se lavaron dos veces a $250 \times g$ por tres min a 4°C . Las células se incubaron a 37°C durante 30 min con 300 μl de diversas concentraciones de GMPb (0 (basal), 0.01, 0.05, 0.1, 1, 10, 50, 100 y 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$), C48/80 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en medio RPMI. Al término de la reacción los tubos se incubaron en hielo para detenerla. Posteriormente se centrifugaron, nuevamente a $250 \times g$ por tres min a 4°C , se colectó el sobrenadante y se llevó 50 μl de éste a un pocillo de una placa de ELISA no estéril (Nunc-Inmuno™). La pastilla se resuspendió en 300 μl de tritón X-100 al 0.1% en RPMI frío y se pasaron 50 μl a otro pocillo de la misma placa de ELISA. A la par se cargaron los mismos volúmenes de RPMI y RPMI con Tritón, para usarlos como blancos de la reacción. A cada pocillo se le adicionaron 100 μl de *p*-nitrofenil-N-acetil- β -D-Glucosaminida (Sigma-Aldrich, St. Louis EUA) 2 mM en buffer de citrato pH4.5 y se incubó durante 30 min a 37°C . Posteriormente se paró la reacción con 100 μl de glicina fría 0.2M pH 10.7 y se determinó el porcentaje de *p*-nitrofenil liberado por la β -hexosaminidasa del sustrato *p*-nitrofenil-N-acetil- β -D-Glucosaminida por espectrofotometría a una

longitud de onda de 405 nm en un lector de ELISA (550, Ca, EUA o iMark™, Japan). Finalmente el porcentaje de β -hexosaminidasa liberada se expresó como:

$$\left[\frac{\beta\text{-hexosaminidasa en sobrenadante}}{\beta\text{-hexosaminidasa en sobrenadante} + \beta\text{-hexosaminidasa en precipitado}} \right] \times 100\%$$

5.17. Extracción de proteínas citosólicas de mastocitos.

Los mastocitos peritoneales se estabilizaron por 2 hrs a 4 °C en una concentración de 2×10^6 células en 1 ml de RPMI. Se realizaron dos lavados con RPMI a 250 x g por 3 min a 4 °C. Las células se incubaron por 15 min a 37 °C con 0 (basal), 0.01 y 1 μ g de GMPb por ml de RPMI o con IPMA (ionóforo de calcio A23187 (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) 0.5 μ M más forbol 12-miristato 13-acetato 2 μ M (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). Al término del estímulo los tubos se incubaron en hielo para detenerlo. Se centrifugó a 417 x g por 5 min a 4 °C. El paquete celular se resuspendió en 30 μ l de buffer de lisis RIPA (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50mM, EGTA 1mM, SDS 0.1 %, Tritón X-100 1 %, Fluoruro de fenilmetasulfonil (PMSF) 1mM, aprotinina 0.6 μ M, leupeptina 2 μ M, pH 8) y se dejó en agitación orbital (200 rpm) durante 30 min a 4 °C. Se centrifugaron las muestras a 16,435 x g por 20 min a 4 °C. Finalmente el sobrenadante se llevó a alícuotas de 20 μ l como máximo y se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

5.18. Análisis de NF κ B fosforilado por electroforesis e inmunotinción.

5.18.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

Para la separación y caracterización de las diferentes muestras se desarrolló la metodología propuesta por Laemmli (1970); donde se utilizó el

sistema de electroforesis MiniProtean 3 de Bio-Rad, empleando geles de 8x7.3 cm y 0.75 cm de espesor a una concentración de 10% de SDS-poliacrilamida con capacidad para 10 muestras. Enseguida se presenta la composición de las distintas soluciones usadas.

Gel separador: él gel utilizado para la separación del NFκB se encontraba a una concentración final de 10% de acrilamida.

Agua destilada	4.02 ml
Tris HCl pH 8.8 (1.5 M Trizma® Base, 0.014M SDS)	2.5 ml
Acrilamida (30% Acrilamida/0.8% bisacrilamida)	3.33 ml
Persulfato de amonio (APS) 0.44 M	50 µl
N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamina (TEMED)	10 µl
Total	10 ml

Gel concentrador:

Agua destilada	3.5 ml
Tris HCl pH 6.8 (0.5 Trizma® Base, 0.014M SDS)	5.0 ml
Acrilamida (30% Acrilamida/0.8% bisacrilamida)	1.3 ml
APS 0.44 M	50 µl
TEMED	10 µl

Total

10 ml

Solución tampón para muestras:

Tris HCl pH 6.8 (0.5 Trizma® Base, 0.014M SDS) 2.5 ml

SDS 0.35 M 4.0 ml

Glicerol 2.0 ml

Azul de bromofenol 0.0058 M 400 µl

β-mercaptoetanol 1.0 ml

Solución de corrida: es una solución de 0.025 M Trizma® Base, 0.25 M Glicina, 3.5 mM SDS, pH 8.3.

Preparación de la muestra a analizar:

Las muestras eran disueltas de forma que no se excedieran los 100 µg de proteína en 20 µl de acuerdo a las necesidades de cada ensayo. Posteriormente la cantidad de proteína deseada se ajustó a 30 µl con la solución tampón para muestras y se llevó a baño maría en ebullición durante 5 minutos.

Condiciones de la electroforesis:

Se cargaron las diferentes muestras junto con un marcador de PM de amplio espectro Amersham Full-Range Rainbow (GE Healthcare) de proteínas de diferentes PM (12 000-225 000 Da). Finalmente la electroforesis se corrió a 80 volts durante hora y media aproximadamente.

5.18.2. Electrotransferencia.

Una vez terminada la electroforesis, las fracciones proteicas se transfirieron electroforéticamente a una membrana de Polivinildieno fluorado (PVDF) (Millipore Corporation, Bedford, EUA) por 2 hrs a 200 mA o 24 hrs a 12 mA con una solución de transferencia (0.024M Trizma® Base, 0.186 M glicina, 4.1 M metanol). Posterior a esto, se lavó la membrana en solución de transferencia limpia y se dejó secar para continuar con la inmunotinción.

5.18.3. Inmunotinción de proteínas por quimioluminiscencia.

Una vez seca la membrana se sumergió en metanol al 100% para equilibrarla y se bloqueó con leche en polvo al 5% en solución tampón TBS (NaCl 0.5M, Tris HCl 0.02M) por una hr en agitación a temperatura ambiente. Se incubó la membrana con los anticuerpos IgG de conejo anti-p65 fosforilado (Ser536) (PM 65 kDa; Cell Signaling CAT No. 3033, EUA) o IgG de ratón anti-β-actina (PM 42 kDa; Sigma-Aldrich CAT No. A1978; St. Louis, EUA) diluidos 1:1000 en TBS con leche en polvo al 5% durante toda la noche a 4°C y agitación constante. Enseguida se lavó la membrana 1 vez 5 min con agua destilada, 2 por 10 min con TBS a 0.2% Tween 20 (TTBS) y 1 x 5 min con TBS. Se incubó la membrana por 2 hrs a temperatura ambiente y agitación constante con el anticuerpo secundario, IgG de cabra anti-IgG de conejo unido a fosfatasa alcalina (PA) (Sigma aldrich CAT No. A3387, St. Louis, EUA) para p-65 e IgG de cabra anti-IgG de ratón unido a PA (Zymed CAT No. 81-6522, San Fco California, EUA) para β-actina, ambos en una dilución 1:5000 en leche en polvo en TBS al 5%. Se hicieron dos lavados con TTBS de 15 minutos cada uno y cinco de 5 minutos, además de uno con TBS de 5 minutos. La membrana se incubó por 5 minutos en el sustrato quimioluminiscente de fosfatasa Immobilon™Western (Millipore; Billerica, MA. EUA), posteriormente, se eliminó el exceso del mismo y se cubrió con dos capas película plástica para la exposición durante 10 minutos a una placa fotográfica en la oscuridad. En condiciones de

oscuridad, la placa se sumergió en revelador ©Kodak hasta la aparición de bandas características en los controles y se lavó en fijador ©Kodak por unos segundos. La reacción se detuvo con agua destilada. La cuantificación de las bandas proteicas se realizó por densitometría usando un sistema de análisis de imágenes de Kodak (Kodak Digital Science, Eastman Kodak Company, Rochester, USA). El resultado finalmente se reportó en porcentaje de abundancia relativa de la proteína de estudio, que se calculó como la relación de la intensidad de la media de la banda de p65 fosforilado entre la de la β -actina y fue normalizado en base al valor obtenido en los mastocitos sin estímulo (en estado basal).

5.19. Análisis estadístico.

Los datos se presentan como la media de los valores \pm S.E.M. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student. Los datos de la tasa de supervivencia se analizaron por la prueba de χ^2 . Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.



6. RESULTADOS

6.1. Efecto de la administración de GMPb vía oral sobre la producción de IgEs alérgeno-específicas en ratas sensibilizadas con alérgeno.

Previamente a la sensibilización con OVA, se extrajo sangre tanto de las ratas del grupo sensibilizado sin tratamiento (S), con tratamiento con GMPb (ST), así como control de la sensibilización (SH), quedándonos con la fracción del suero que se le conoce como "suero pre-inmune". Así mismo, en los días 7, 14, y 21 se obtuvo sangre de cada uno de los animales de los tres grupos y se separó el suero para su posterior análisis mediante la técnica de ACP.

Los resultados de la titulación de IgE muestran, en primer lugar, que ninguno de los sueros pre-inmunes contenía IgE específica para la OVA. Esto indica que los animales no estaban previamente sensibilizados a OVA y que no poseían anticuerpos IgE que pudieran generar una reacción falsa-positiva. Durante la sensibilización los sueros de los animales del grupo S, sufren un ligero aumento en los niveles de IgE anti-OVA en el día 7 ($1:21 \pm 6.11$), estos se incrementan significativamente al máximo nivel en el día 14 ($1:94 \pm 21.91$, $p < 0.001$), para posteriormente y de forma rápida disminuir en el día 21 ($1:32 \pm 19.26$). En los animales ST, los títulos de IgE anti-OVA mostraron un ligero aumento en el día 7, similar al reportado en los animales S, y se mantuvieron constantes durante el resto del estudio (título promedio de $1:18 \pm 1.60$). En el día 14, día con el pico máximo en el título de IgE anti-OVA de los animales S, el tratamiento con GMP (ST) generó una disminución significativa en los niveles de anticuerpos IgE alérgeno-específicos en las ratas, en comparación con el grupo S ($p < 0.001$) (Figura 12a). Con la finalidad de demostrar que las reacciones de extravasación producidas en la ACP durante la titulación de los sueros eran generadas por la IgE y para

excluir una posible respuesta mediada por IgG1, se inactivaron sueros de ratas S y STs a 56 °C por una hora y se analizaron por ACP. La inactivación erradicó la reacción en la ACP, indicando que la IgE era el anticuerpo inductor de la reacción (Fig. 12c). El suero de los animales SH fue negativo durante todo el estudio.

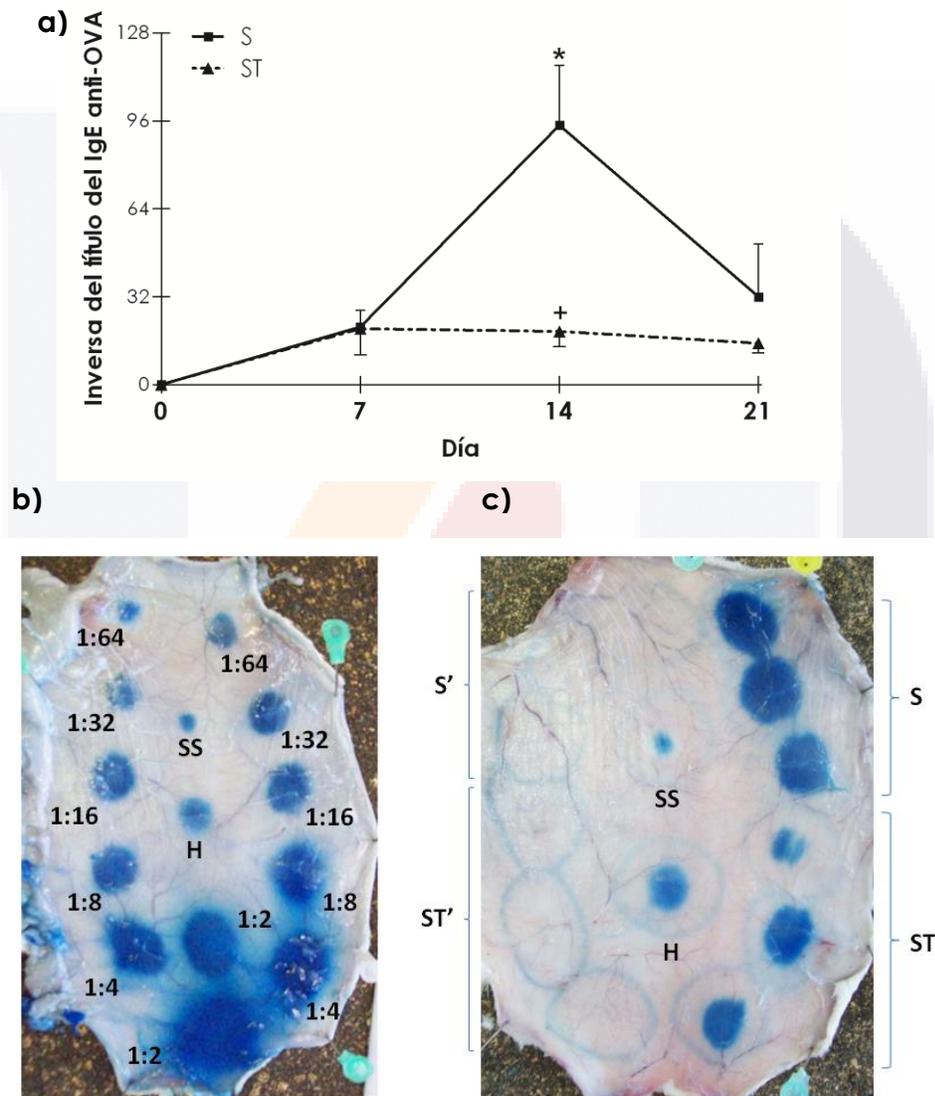


Figura 12. Titulación de IgE anti-OVA de sueros de ratas Wistar sensibilizadas con OVA con y sin tratamiento con GMPb. **a)** Títulos de IgE anti-OVA en sueros de animales sensibilizados, tratados con GMPb (▲, n=13) y sin tratamiento (■, n=10), a las 0, 7, 14 y 21 días de la sensibilización; *p < 0.001 vs día 0, 7 y 21 en S; +p < 0.01 vs día 14 en S. **b)** Fotografía de las reacciones generadas en la piel dorsal por diluciones crecientes, de 1:2 a 1:64 de dos sueros de ratas S, solución salina (SS) e histamina (H), durante la titulación por ACP. **c.** Inactivación de sueros inmunes de animales sensibilizados. El suero se calentó a 56 °C para inactivar a la IgE. Las reacciones de ACP se desarrollaron con muestras de suero (diluido 1:2 en solución salina) de tres animales S, tres animales ST y de los mismos animales pero previamente inactivados (S' y ST').

6.2. Efecto del GMPb administrado vía oral sobre la producción de citocinas asociadas a la alergia.

El efecto del GMPb vía oral sobre la síntesis de citocinas asociadas a la respuesta inmune en la alergia se determinó en esplenocitos ex vivo. En primera instancia, se evaluó el efecto del pre-tratamiento con el péptido sobre la proliferación de esplenocitos de animales sensibilizados frente a OVA y posteriormente sobre la síntesis de tres citocinas producidas durante el desarrollo de la alergia: dos asociadas al perfil Th2 (IL-4 e IL-13) y una inmuno-reguladora (IL-10), en estas mismas células.

6.2.1. Efecto del GMPb vía oral sobre la proliferación de esplenocitos de ratas sensibilizadas con OVA.

La técnica empleada para determinar la proliferación de los esplenocitos fue el ensayo del MTT (técnica adaptada de Mossman, 1983). Para ello primeramente se determinó la densidad celular y la concentración del mitógeno óptima en incubaciones celulares de 72 hrs. Los resultados indicaron que aun cuando la ConA estimuló la proliferación de esplenocitos tanto con 2 y 5 $\mu\text{g/ml}$, ya sea a una densidad de 2×10^5 células (1.39 ± 0.06 , $p < 0.05$; 1.53 ± 0.03 , $p < 0.01$) o de 5×10^5 células (1.39 ± 0.03 , $p < 0.005$; 1.33 ± 0.03 , $p < 0.01$), fue mayor el IE obtenido cuando se trabajó con 1 $\mu\text{g/ml}$ a una densidad celular de 2×10^5 (1.68 ± 0.11 , $p < 0.05$) esplenocitos en 100 μl de medio. Con estas condiciones de ensayo se aumentó la población celular en un 67 % respecto a las células sin estimular (control) (figura 13).

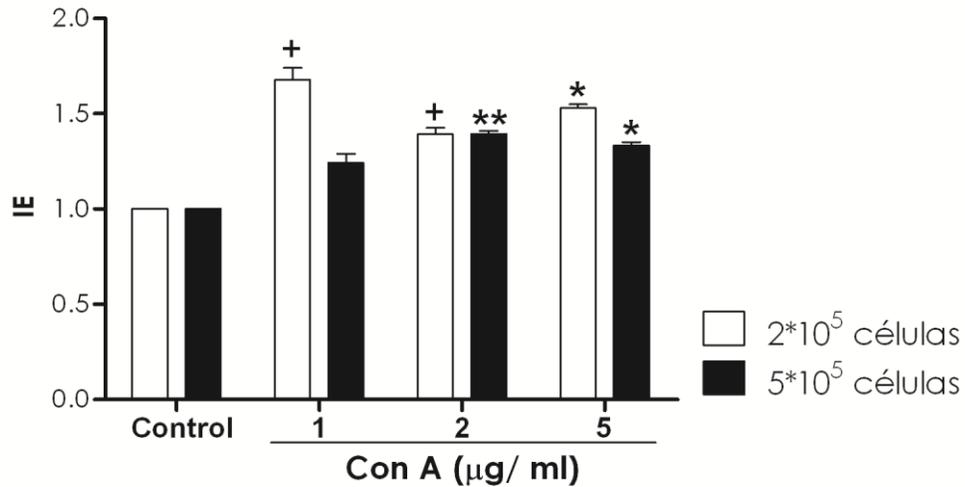


Figura 13. Estandarización de ensayo de proliferación de esplenocitos. La proliferación de $2 \cdot 10^5$ y $5 \cdot 10^5$ células del bazo de ratas estimuladas con el mitógeno Concanavalina A (ConA, 1, 2 y 5 $\mu\text{g/ml}$) se evaluó con la técnica del MTT. La respuesta proliferativa se indicó como índice de estimulación (IE), el cual resultó de dividir la DO de las células con estímulo entre las células en estado basal. $n = 3$; ** $p < 0.005$, * $p < 0.01$ y + $p < 0.05$ respecto a su control.

Para determinar el efecto de la administración del GMPb sobre la respuesta proliferativa de los linfocitos, se aislaron células de bazo de animales S y ST al día 14 de la sensibilización y se cultivaron con o sin mitógeno o en presencia de diferentes concentraciones del alérgeno.

Como se muestra en la figura 14, se observó un marcado incremento en la respuesta proliferativa generada por la ConA y el alérgeno en esplenocitos de animales sensibilizados (S). El tratamiento oral con GMPb resultó en una significativa inhibición de la respuesta linfoproliferativa a 0.1 (1.06 ± 0.02 vs 1.25 ± 0.03 ; $p < 0.05$) y 0.5 mg/ml (0.97 ± 0.04 vs 1.12 ± 0.02 ; $p < 0.05$) de OVA a las 72 hrs. Mientras que a las 96 hrs se repitió el fenómeno a las tres concentraciones usadas del alérgeno, 0.1 (0.98 ± 0.02 vs 1.22 ± 0.03 ; $p < 0.0005$), 0.5 (0.93 ± 0.03 vs 1.1 ± 0.03 ; $p < 0.05$) y 2 (0.98 ± 0.03 vs 1.12 ± 0.04 ; $p < 0.05$) mg/ml. Aunque también las células del bazo de ratas tratadas con GMPb (ST) mostraron una reducción en los niveles de proliferación en respuesta al mitógeno comparado con los de los animales no

tratados (S), tanto a las 72 (1.09 ± 0.03 vs 1.32 ± 0.04 ; $p < 0.005$) como a las 96 (1.14 ± 0.04 vs 1.47 ± 0.07 ; $p < 0.005$) hrs, la respuesta linfoproliferativa no fue eliminada totalmente. Después del tratamiento, la proliferación de los linfocitos con ConA fue significativamente mayor a la de los controles, ya sea a las 72 hrs ($^b p < 0.01$) como a las 96 hrs ($^a p < 0.001$). Estos resultados sugieren un efecto supresor del GMPb sobre la respuesta proliferativa de los linfocitos alérgeno-específicos durante el desarrollo de la alergia y solo parcialmente cuando son activados por ConA.

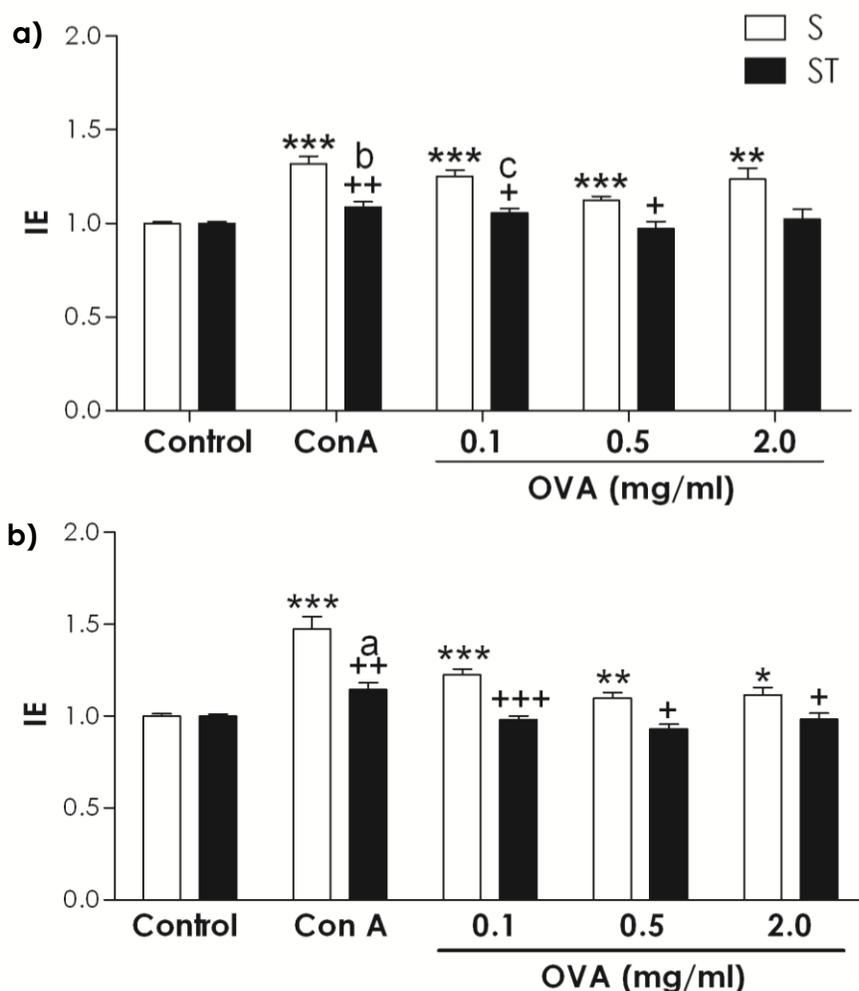


Figura14. El pre-tratamiento con GMPb inhibe la respuesta proliferativa alérgeno específica de esplenocitos. IE de esplenocitos estimulados con ConA (1µg/ml), 0.1, 0.5 y 2.0 mg/ ml de OVA o medio de cultivo solo (control) sobre células aisladas de bazo de ratas sensibilizadas a OVA con (ST) y sin tratamiento (S), a las **a)** 72 y **b)** 96 hrs. de estímulo. n= 24 en cada grupo (8 ensayos por triplicado). * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$ comparado con el control S; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.005$, +++ $p < 0.0005$ comparado con esplenocitos S en una misma condición; ° $p < 0.05$, ° $p < 0.01$, ° $p < 0.001$ comparado con el control ST.

6.2.2.Efecto del GMPb vía oral sobre la síntesis de IL-4, IL-13 e IL-10 por esplenocitos de ratas sensibilizadas con OVA.

El efecto del pre-tratamiento con GMPb sobre la síntesis de citocinas relacionadas con la respuesta alérgica, se examinó cuantificando la producción de IL-4, IL-10 e IL-13 por parte de esplenocitos de ratas sensibilizadas con OVA. Células del bazo de ratas S y ST al día 14 de la sensibilización, fueron incubadas con OVA, ConA o en medio de cultivo (control) para la cuantificación de las citocinas. Como se muestra en la figura 15a, se detectaron altos niveles de IL-10 (518.29 ± 131.56 vs 64.99 ± 27.9 , $p < 0.05$) e IL-13 (213.99 ± 55.95 vs 53.45 ± 15.97 , $p < 0.01$) en los sobrenadantes de cultivos de esplenocitos estimulados con el mitógeno, respecto a sus controles, pero no así en la IL-14. En los sobrenadantes de esplenocitos estimulados con diferentes concentraciones de OVA, 0.1 mg/ml (613.05 ± 137.36 ; $p < 0.05$), 0.5 mg/ml (999.27 ± 165.49 ; $p < 0.005$) y 2.0 mg/ml (969.89 ± 150.25 ; $p < 0.005$) nuevamente se incrementaron significativamente los niveles de IL-10 en comparación a los valores basales (control). En el caso de la IL-13 solo se vio elevada cuando los esplenocitos se estimularon con 2.0 mg/ml (838.918 ± 200.29 ; $p < 0.001$) de OVA. No se observaron cambios significativos con respecto a la secreción de IL-4 cuando se estimularon los esplenocitos con el alérgeno.

Con el propósito de determinar si la administración de GMPb tiene efecto sobre la síntesis de estas citocinas, se aislaron células del bazo de animales sensibilizados con OVA y tratados (ST). Las células se estimularon con el mitógeno o el alérgeno. Como se muestra en la figura 15b, la administración oral del GMPb no influye sobre la producción de IL-4 e IL-10 por esplenocitos estimulados, ya sea con ConA o con el alérgeno; pero si lo hace fuertemente sobre la síntesis de IL-13 (242.519 ± 43.30 , $p < 0.001$) cuando los esplenocitos son estimulados con el alérgeno, ya que inhibe su producción en un 64 % aproximadamente.

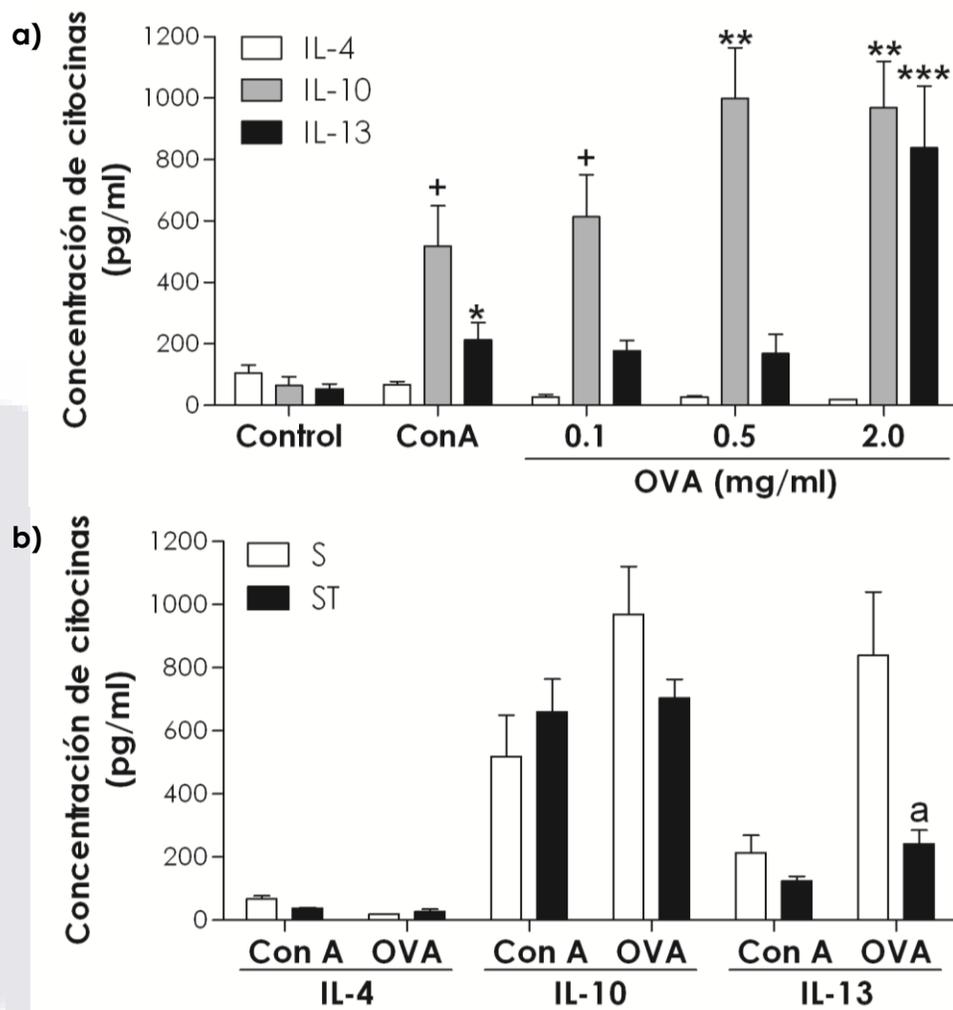


Figura 15. Efecto de GMPb sobre la síntesis de citocinas asociadas a la alergia. **a)** Concentración de IL-4, IL-10 e IL13 en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos en medio de cultivo solo (control), estimulados con ConA (1 µg/ml) u OVA (0.1, 0.5 y 2 mg/ml). **b)** Comparación de la producción de IL-4, IL-13 e IL-10 por esplenocitos de animales sensibilizados con (ST) y sin (S) tratamiento, estimulados con 1 µg/ml de ConA y 2 mg/ml de OVA. n=3 bazos. +p<0.05 respecto al control ST; +p < 0.05; *p < 0.01, **p < 0.005, ***p < 0.001 comparado con el control de cada citocina. ^ap < 0.001 comparado con IL-13 en animales S.

6.3. Efecto de la administración oral del GMPb sobre la intensidad de la respuesta inflamatoria aguda localizada y sistémica.

6.3.1. Efecto de la administración oral de GMPb previo a la sensibilización, sobre la intensidad de la respuesta inflamatoria aguda local.

Para investigar si el GMPb modifica la intensidad de la respuesta anafiláctica cutánea inducida por el alérgeno, la OVA fue inyectada i.d. en el dorso de ratas sensibilizadas y la magnitud de la respuesta inflamatoria fue evaluada 30 min después. Los datos normalizados de la cantidad de azul de Evans en el tejido indicó la extravasación activada por el alérgeno. Se sabe, que soluciones concentradas de proteínas de alto peso molecular incrementan la permeabilidad de la piel de manera dependiente de la dosis, generando un proceso inflamatorio inespecífico, tanto en animales sensibilizados como no sensibilizados (Brockner y cols., 2012). En este sentido, se ha demostrado que la inyección i.d. de los antígenos usados en las inmunizaciones puede desarrollar una reacción cutánea en animales no sensibilizados (Church, 1975). Por ello se comparó el efecto provocado por concentraciones crecientes de OVA (de 3.92 a 125 µg en 50 µl de s.s.) sobre la permeabilidad vascular en ratas sensibilizadas (S) y ratas control de la sensibilización o Sham (SH). La inyección de la OVA incrementó la permeabilidad vascular de una forma dependiente de la dosis tanto en animales S como SH. Sin embargo, la cantidad de azul de Evans extravasado por los animales S fue mayor que por los SH y esta diferencia fue significativa a menores concentraciones de OVA (figura 16a). Así, tras la inyección del alérgeno la intensidad del proceso inflamatorio generado, medido en función de la cantidad de colorante extravasado, fue significativamente mayor en los animales S que en los animales SH para las concentraciones de 3.92 µg (0.86 ± 0.11 vs 0.33 ± 0.04 µg/sitio; $p < 0.05$), 7.83 µg (1.09 ± 0.10 vs 0.37 ± 0.04 µg/sitio, $p < 0.01$), 15.6 µg (1.92 ± 0.30 vs 0.52 ± 0.08 µg/sitio; $p < 0.05$) y 31.2 µg (1.99 ± 0.07 vs 1.13 ± 0.20 µg/sitio; $p < 0.05$) de OVA. Sin embargo; con soluciones más concentradas de OVA la diferencia significativa se perdió. Se decidió elegir las concentraciones de 15.6 y 31.2 µg de alérgeno, porque además de presentar

diferencias significativas entre las extravasaciones del colorante en los animales S y SH, fueron con estas concentraciones con las que se obtuvieron las diferencias más amplias, como se puede observar en la figura 16.

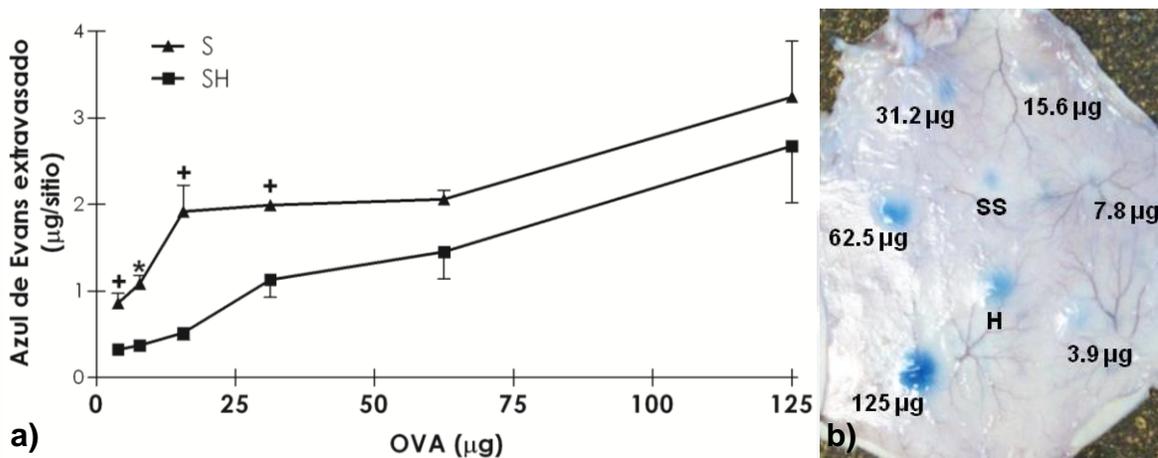


Figura 16. a. Curva dosis respuesta tras la inyección i.d. de dosis crecientes de OVA en ratas S (▲) y SH (■). n= 4; +p < 0.05; *p < 0.01 respecto a SH a la misma concentración de OVA. **b.** Ejemplo de la extravasación de azul de Evans generada por distintas concentraciones (µg) de OVA, solución salina (SS) e histamina (H) en un animal SH.

La ACA se desarrolló por inyección i.d. de 15.6 y 31.2 µg de OVA en animales SH, S y ST (figura 17b, c y d, respectivamente). Los animales del grupo S indujeron una extravasación de colorante 18 y 12 veces superior (2.81 ± 0.43 vs 0.15 ± 0.06 ; 3.08 ± 0.37 vs 0.25 ± 0.11 µg/sitio) a la obtenida en animales SH tras retarlos i.d. con 15.6 y 31.2 µg de OVA, respectivamente. Estos datos demuestran la sensibilización de los mastocitos en los animales del grupo S. La administración del GMPb redujo significativamente en un 58% (1.65 ± 0.30 vs 2.81 ± 0.43 µg/sitio) y un 54% (1.67 ± 0.09 vs 3.08 ± 0.37 µg/sitio) la intensidad de la respuesta inflamatoria generada en los animales ST por la inyección i.d. de 15.6 y 31.2 µg de OVA, respectivamente, en relación a la obtenida en los animales S (figura 17a).

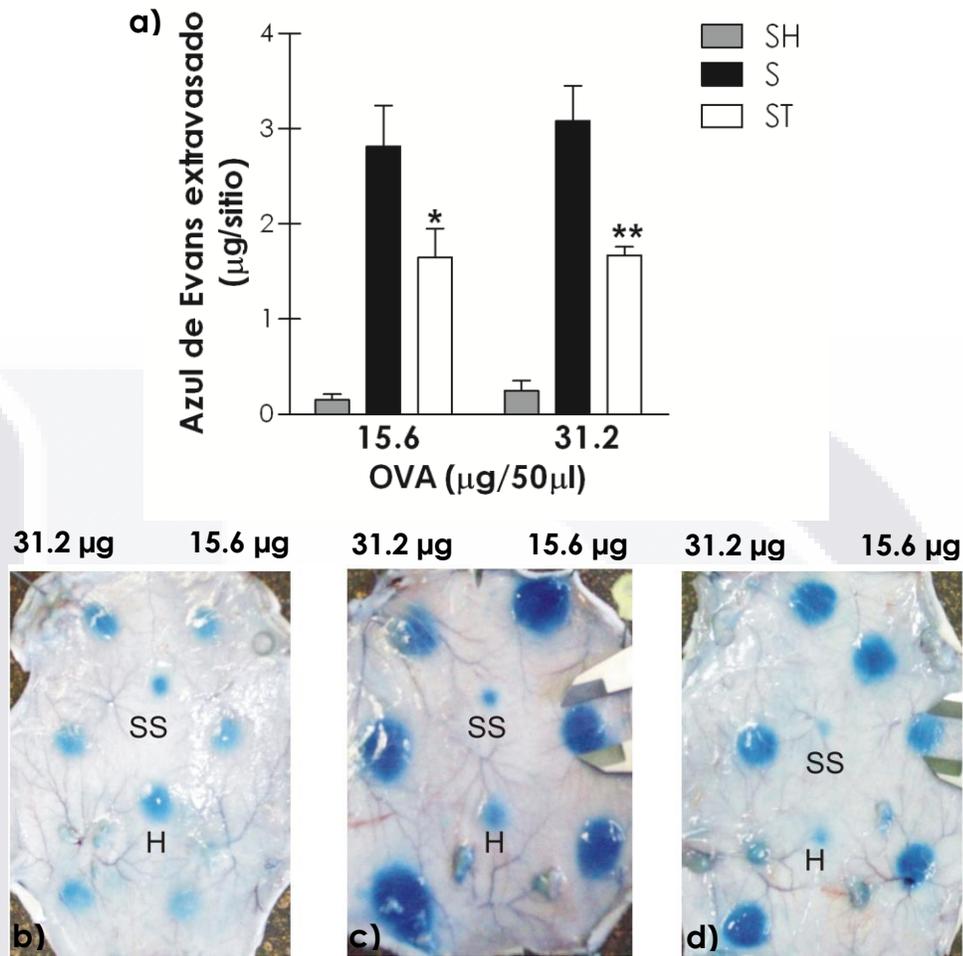


Figura 17. Efecto del GMPb sobre la anafilaxia cutánea activa en ratas sensibilizadas con OVA. **a)** Concentración de azul de Evans extravasado en ratas SH, S y ST. *p < 0.01 respecto a S con 15,63 µg/ 50 µl; **p < 0.001 respecto a S con 31.25 µg/ 50 µl; n=12 (4 ratas por triplicado). Ejemplos de procesos inflamatorios generados por la aplicación de 15.63 y 31.2 µg/µl de OVA en ratas: **b)** control de la sensibilización (SH), **c)** sensibilizada (S) y **d)** sensibilizada con tratamiento (ST).

Estos resultados demuestran que la administración oral de GMPb reduce abruptamente la intensidad del proceso inflamatorio local generado en la fase temprana de la alergia tras el contacto con el alérgeno que indujo la sensibilización.

6.3.2. Efecto de la administración oral de GMPb posterior a la sensibilización, sobre la intensidad de la respuesta inflamatoria aguda local.

Con el fin de establecer si el GMPb también ejerce algún efecto al administrarse después de la sensibilización, se trabajó con animales en los que el tratamiento comenzó después del día 11 de la primera inmunización con el alérgeno. La ACA se desarrolló por inyección i.d. de 15.6 y 31.2 μg de OVA en animales SHP, SP y STP. Después de la administración i.d. del alérgeno se generó una lesión inflamatoria muy intensa en los animales SP (2.4 ± 0.18 y 2.14 ± 0.14 para 15.6 y 31.2 μg de OVA, respectivamente) y STP (2.69 ± 0.4 y 2.18 ± 0.32 para 15.6 y 31.2 μg de OVA, respectivamente), que fue significativamente mayor a la de los animales SHP (0.18 ± 0.11 y 0.41 ± 0.14 , para 15.6 y 31.2 μg de OVA, respectivamente; $p < 0.001$). Estos datos confirman la adecuada sensibilización de los animales. Sin embargo, la administración del GMPb a los animales posterior a la sensibilización (grupo STP) no modificó la intensidad de la respuesta inflamatoria aguda local generada en los animales SP tras la inyección i.d. de 15.6 (2.69 ± 0.4 vs 2.4 ± 0.18) y 31.2 μg (2.18 ± 0.32 vs 2.14 ± 0.14) de OVA (figura 18).

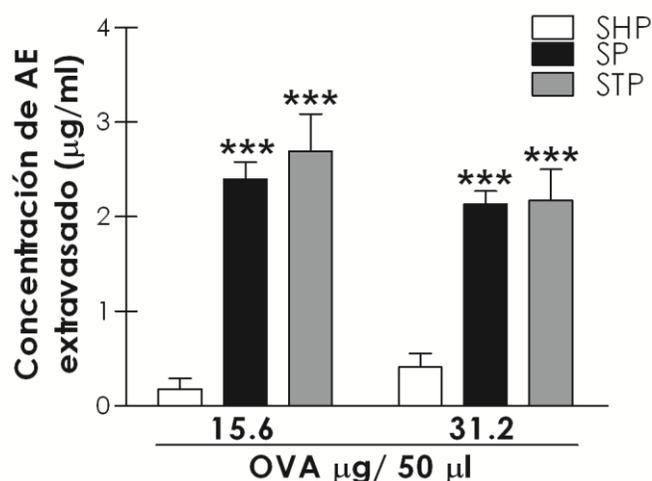


Figura 18. Efecto del GMPb, posterior a la sensibilización con OVA, sobre la anafilaxia cutánea activa en ratas Wistar. El efecto se expresó como concentración de azul de Evans (AE) extravasado en ratas SHP, SP y STP. *** $p < 0.001$; $n = 18$ (6 ratas por triplicado).

6.3.3. Efecto de la administración oral de GMPb sobre la reacción anafilactoide local inducida por el C48/80.

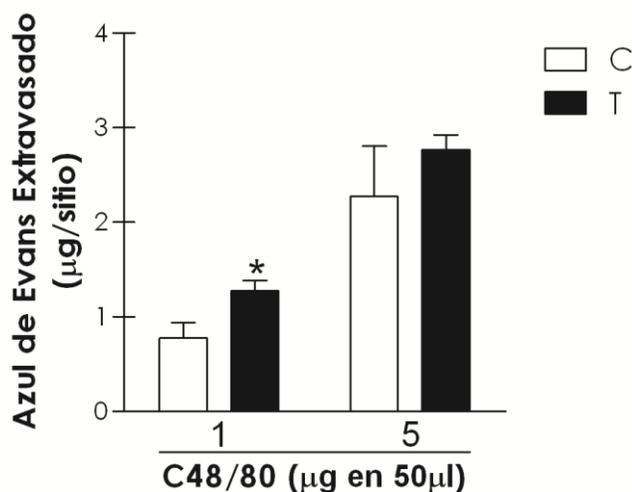


Figura 19. Efecto del GMPb sobre la respuesta anafilactoide aguda local inducida por C48/80, 1 y 5 µg en 50 µl de SS, en ratas Wistar. El efecto se expresó como concentración de azul de Evans extravasado (µg/sitio) en ratas C y T. *p < 0.05; n= 9 (3 por triplicado).

Como ya se mostró anteriormente, el GMPb reduce la intensidad de respuesta anafiláctica localizada en ratas sensibilizadas con OVA. Con la intención de establecer si esta reducción pudiera deberse a una inhibición o regulación directa sobre la activación de los mastocitos, independientemente de su acción sobre la producción de IgE e IL-13, se desarrolló una respuesta anafilactoide local por inyección i.d. del C48/80 en animales controles (C) y tratados (T). Ya se sabe que además de la activación de los mastocitos por el alérgeno, estos pueden ser activados de manera inespecífica o independiente a la IgE por otras sustancias, como el C48/80. Tras la inyección del compuesto, se observó que los animales del grupo T, generaron una extravasación de azul de Evans mayor o igual a la generada en los animales sin tratamiento, ya sea para 1 µg (1.27 ± 0.11 vs 0.77 ± 0.18 ; $p < 0.05$ µg/sitio) o 5 µg (2.27 ± 0.53 vs 2.77 ± 0.15 µg/sitio) de C48/80 en 50 µl de s.s. (figura 19). Estos resultados indican que la disminución en la intensidad de la respuesta inflamatoria alérgica en los animales

no se debe a un efecto inhibitorio directo del GMPb sobre los mecanismos de activación del mastocito. Además, la administración del GMPb a los animales exacerbó la intensidad de respuesta anafilactoide cutánea generada tras la inyección de 1 µg de C48/80 en 50 µl de s.s.

6.3.4. Efecto de la administración oral del GMPb previo a la sensibilización, sobre la intensidad de la respuesta inflamatoria sistémica.

El efecto del GMPb sobre la anafilaxia sistémica fue evaluado mediante el análisis comparativo de la severidad de la respuesta, cambios en la temperatura y la tasa de supervivencia entre animales de los grupos S y ST, tomando como control negativo los valores del grupo SH. En primer lugar, el 81.81% de los animales del grupo SH no presentaron signos característicos de la anafilaxia sistémica experimental (puntuación 0) y el 18.18% restante solo alcanzaron el nivel 1, ya que se rascaron y frotaron alrededor de la nariz y la cabeza; de ahí que la media de la puntuación fue de 0.18 (rango de puntuación: 0-1). Por otro lado los animales sensibilizados mostraron el mayor grado de intensidad en sus signos, pues el 100% de ellos murieron de anafilaxia fatal durante los 60 minutos posteriores al reto con el alérgeno (media de la puntuación: 5). Sin embargo, el pre-tratamiento con GMPb redujo significativamente ($p < 0.05$) la media de la puntuación de los animales sensibilizados a 4.3 (rango de puntuación: 2-5). En el grupo ST, los animales mostraron signos como disminución de la actividad con incremento de la frecuencia respiratoria o hinchamiento alrededor de los ojos (puntuación 2, un 7.7% de los animales), respiración asmática o cianosis alrededor de la boca o cola (puntuación 3, un 23.1% de los animales) o muerte por anafilaxia fatal (puntuación 5, 69.29% de los animales) (figura 20a).

Por otro lado, la temperatura rectal siguió un patrón que concuerda con el de la intensidad de los signos del choque anafiláctico. Como se puede ver en la figura 20b, no se observaron cambios importantes en la temperatura de los animales SH, ya que se registró en un rango entre 37 a 38 °C, manteniéndose constante durante todo el estudio. Los animales S mostraron una caída de 1 a 4

°C de su temperatura inicial durante los 50 minutos posteriores al reto con el alérgeno, observándose diferencias significativas ($p < 0.01$) respecto al grupo SH a partir de los primeros 10 minutos. Por otro lado, los animales ST mostraron un comportamiento semejante a los del grupo S los primeros 30 minutos. Sin embargo después del registro a los 40 minutos, la temperatura comenzó con una recuperación importante, sin llegar a ser significativo con respecto a los animales S y manteniéndose aún significativamente diferente respecto a SH ($p < 0.001$), pues solo se recuperó 1.1 °C. Estos datos indican que las ratas que sobrevivieron en el grupo ST se estaban recuperando de la caída en la temperatura.

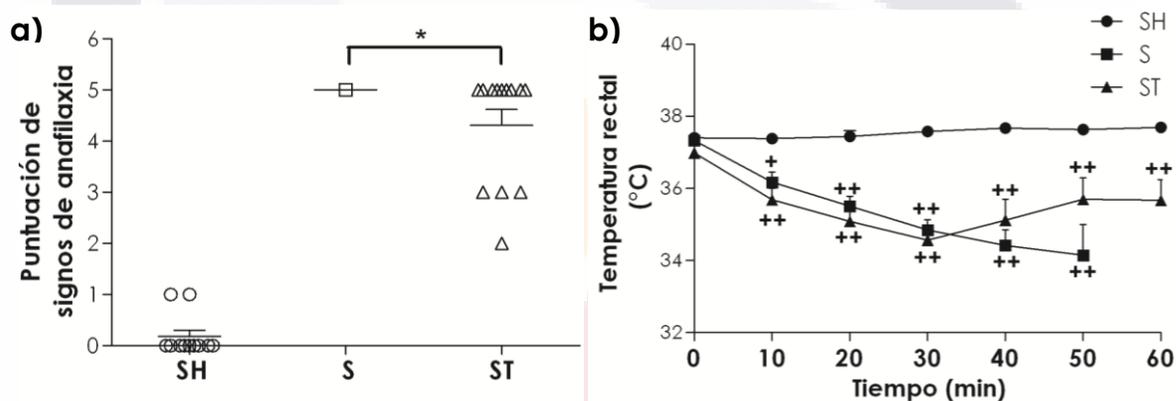


Figura 20. Efecto inhibitorio del pret-ratamiento con GMPb en la anafilaxia sistémica inducida por el alérgeno. **a)** puntuación de signos de anafilaxia a los 60 minutos posteriores al reto i.v. con OVA. Cada símbolo representa una rata. **b)** Temperatura rectal justo antes del reto con el alérgeno y cada 10 minutos durante los siguientes 60 minutos. Los valores representan la media \pm SEM, $n = 11$ en los grupos SH y S y $n = 13$ en el grupo ST. * $p < 0.05$ comparado con S; + $p < 0.01$; ++ $p < 0.001$ comparado con SH en un mismo tiempo.

Por otro lado, en relación a la tasa de supervivencia, los animales SH mostraron una tasa de supervivencia del 100% tras el reto con OVA. En las ratas sensibilizadas, el porcentaje de supervivencia disminuyó conforme avanzó el tiempo, llegando a 0 % a los 60 minutos del reto con el alérgeno. Sin embargo, la tasa de supervivencia de los animales ST solo cayó al 30.77% a los 40 minutos del reto con el alérgeno, y se mantuvo así por el resto de la evaluación, llegando a ser significativa la diferencia con respecto al grupo S a los 60 minutos de la inducción del choque anafiláctico ($p < 0.05$) (tabla 1). Este resultado finalmente

demuestra que el pre-tratamiento con GMPb fue efectivo protegiendo a las ratas en la reacción anafiláctica inducida por el alérgeno.

Tabla 1. Tasa de supervivencia después del choque anafiláctico inducido por OVA en animales SH, S y ST.

Grupo	Supervivencia (%) (vivos/total)			
	30 min	40 min	50min	60min
SH	100 (11/11)	100 (11/11)	100 (11/11)	100 (11/11)
S	72.7 (8/11)	23.27 (3/11)	9.1% (1/11)	0% (0/11)
ST	69.23 (9/13)	30.77 (4/13)	30.77 (4/13)	30.77 (4/13)*

*p<0.05 comparado con S a los 60 minutos. Analizado por la prueba de χ^2 .

6.3.5.Efecto de la administración oral de GMPb sobre la reacción anafilactoide sistémica inducida por el C48/80.

Al igual que en la anafilaxia aguda localizada se buscó determinar el efecto del GMPb sobre la activación de los mastocitos independiente de IgE. Para ello, se evaluó la respuesta anafilactoide sistémica inducida por el C48/80 en animales controles (C) y tratados (T). Primeramente se observó como en ambos grupos se reprodujeron los signos de la anafilaxia sistémica sin encontrar diferencias significativas entre ellos, ya que en el 100% de los animales T (8 de 8) y 88% de los C (10 de 11) alcanzaron una puntuación de 5 en los signos de anafilaxia (figura 21a). Sin embargo, respecto a la temperatura rectal si se observó un menor descenso en los animales con tratamiento (1.47 ± 0.09 vs 2.4 ± 0.21 ; $p < 0.001$) que en los controles, aun cuando en ambos grupos (C y T) hubo

una caída progresiva en la misma, manifestación que está asociada al choque anafiláctico sistémico (figura 21b).

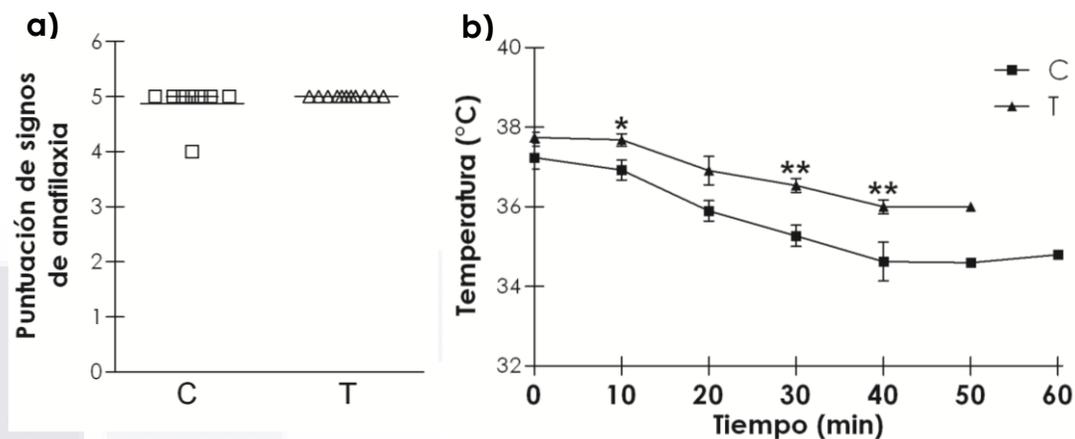


Figura 21. Efecto del GMPb sobre la reacción anafilactoide inducida por el C48/80. **a)** puntuación de signos de anafilaxia a los 60 minutos posteriores al reto intravenoso con C 48/80. Cada símbolo representa una rata. **b)** Temperatura rectal justo antes del reto con el C48/80 y cada 10 minutos durante los siguientes 60 minutos. Los valores representan la media \pm SEM. n = 8 en el grupo C y n = 11 en el grupo T. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ respecto al grupo C en un mismo tiempo.

Por último, en congruencia con los signos de anafilaxia sistémica, se observó que a los 60 minutos del registro la tasa de supervivencia en los animales C y T fue de 0 % (0 de 8) y 12 % (1 de 11) respectivamente. Estos resultados sugieren que el GMPb no ejerce efecto protector significativo sobre la reacción anafilactoide sistémica inducida por el C 48/80.

6.4. Activación de los mastocitos bajo el efecto del GMPb en un modelo *in vitro*.

El efecto directo del GMPb sobre la activación de los mastocitos se evaluó en un modelo *in vitro*. Primeramente analizando la liberación de mediadores preformados, como lo son la histamina y la β -hexosaminidasa. Posteriormente evaluando la activación del factor nuclear NF κ B para la síntesis *de novo* de diferentes citocinas.

6.4.1. Secreción de mediadores preformados de los mastocitos bajo el efecto del GMPb en un modelo *in vitro*.

Con el propósito de determinar el efecto directo del GMPb sobre la desgranulación y secreción de mediadores preformados, se desarrollaron ensayos *in vitro* para cuantificar la liberación de histamina espectrofluorométricamente. Se obtuvieron mastocitos peritoneales de rata y se incubaron con y sin GMPb a diferentes concentraciones (de 0.01 a 50 mg/ml). Se eligieron estas concentraciones debido a datos reportados anteriormente, en donde ya se ha demostrado que el GMPb tiene un efecto inmunomodulador dependiente de la dosis (Li y Mine, 2004). Como control positivo de desgranulación se utilizó C48/80. En paralelo se corrieron muestras a las mismas concentraciones de GMPb pero sin células, para eliminar cualquier interferencia que pudiera haber generado el GMPb, por su origen proteico, en el procesamiento de las mismas para su lectura por espectrofluorometría.

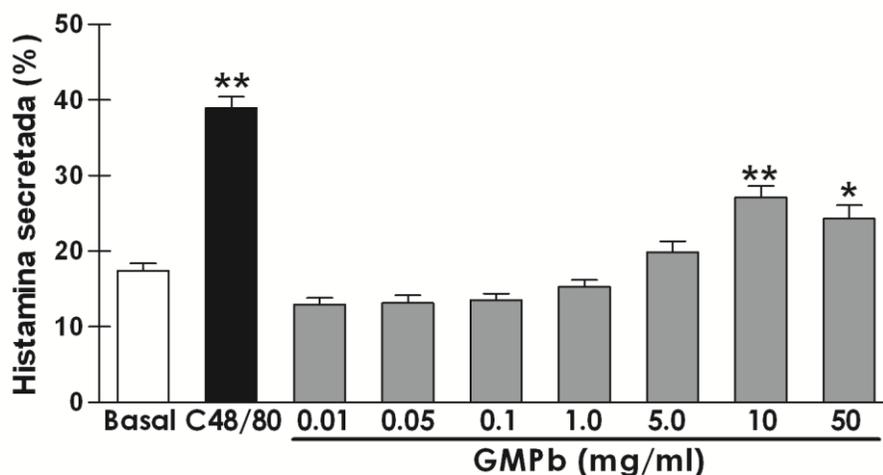


Figura 22. Histamina secretada durante la incubación de los mastocitos solos, con GMPb a 0.01, 0.05, 0.10, 1, 5, 10 y 50 mg/ml, o 5 µg/ml de C48/80. ** $p < 0.0005$, * $p < 0.001$ respecto al basal. $n = 9$ (3 por triplicado).

Aun cuando los resultados marcaron un aumento significativo en la secreción de histamina por los mastocitos estimulados con 10 (27.15 ± 1.46 %; $p <$

0.0005) y 50 ($24.31 \pm 1.75 \%$, $p < 0.001$) mg/ml de GMPb respecto a las células sin estímulo (17.45 ± 0.96), no se consideraron estos resultados como un indicador de la activación de la célula por parte del péptido, debido a que las muestras sin células, dieron lecturas semejantes a las de las muestras con células (resultados no reportados). El porcentaje de secreción de histamina alcanzado con el C48/80 ($38.94 \pm 1.5 \%$; $p < 0.0001$) dejó en claro la viabilidad de las células (figura 22). Estos resultados indican que la cuantificación de histamina por espectrofluorometría no es un ensayo adecuado para estudiar la desgranulación de los mastocitos inducida por el GMPb. Por este motivo se inició con ensayos para cuantificar secreción de β -hexosaminidasa, enzima preformada muy utilizada como indicador de desgranulación en esta población celular (Lundequist y Pejler, 2011). Además, al ser un ensayo enzimático, la probabilidad de que el GMPb genere alguna interferencia es mínima por la especificidad al sustrato.

Para ello las células fueron estimuladas con diferentes cantidades de GMPb, concentraciones ya consideradas para el ensayo de histamina (0.01 a 1mg/ml). Además se incluyeron concentraciones menores, de 10 a 500 ng/ml. En la figura 23a, se observa un aumento significativo entre la β -hexosaminidasa liberada por las células estimuladas con 10 (7.48 ± 0.43) y 100 (7.08 ± 0.57) $\mu\text{g/ml}$ de GMPb respecto a las células en su estado basal (6.09 ± 0.31). Sin embargo estas diferencias no son realmente importantes ya que solo hay un aumento de 1.39 o 0.99 %, respectivamente en la secreción de β -hexosaminidasa cuando las células se estimulan con ambas concentraciones de GMPb. En cambio, cuando las células son estimuladas con C48/80 se logró una liberación de $32.44 \pm 1.91 \%$ de la enzima, porcentaje estadísticamente significativo respecto al de los mastocitos en estado basal ($p < 0.001$).

Por otro lado, en la figura 23b, se muestran los porcentajes de β -hexosaminidasa secretada por los mastocitos al ser expuestos a cantidades más pequeñas de GMPb 10, 50, 100 y 500 ng/ml. Se encontró que dichas concentraciones de GMPb no son capaces de estimular directamente la desgranulación del mastocito ya que inducen una secreción de 8.92% de β -

hexosaminadasa, la cual es muy similar a la secretada por las células sin estímulo ($8.26 \pm 0.44\%$); mientras que nuevamente, con el C48/80 ($32.78 \pm 0.86\%$, $p < 0.001$) se incrementó significativamente el porcentaje de la enzima secretada en comparación a la secreción basal.

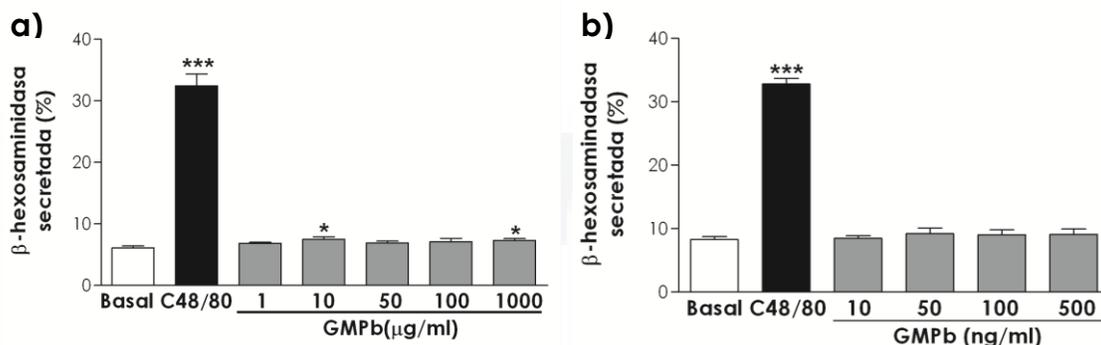


Figura 23. Efecto directo del GMPb sobre la activación de mastocitos peritoneales a través de la secreción de β-hexosaminadasa. **a)** Concentración de β-hexosaminadasa secretada por mastocitos peritoneales estimuladas con 1, 10, 50, 100 y 1000 µg/ml de GMPb o 5 µg/ml C48/80. **b)** Concentración de β-hexosaminadasa liberada por mastocitos peritoneales, estimulados con 10, 50, 100 y 500 ng/ml de GMPb o 5 µg/ml C48/80. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ respecto al basal. $n = 3$, por triplicado.

En conjunto, todos estos resultados demuestran que el GMPb no induce *in vitro* de forma directa una desgranulación fisiológicamente significativa de los mastocitos.

6.4.2. Activación del mastocito vía NF-κB inducida por el GMPb en un modelo *in vitro*.

El efecto del GMPb sobre la activación de la vía del NFκB en los mastocitos, fue evaluada por inmuno blot utilizando anticuerpos frente a la subunidad p65 fosforilada (p65-P). Como se observa en la figura 24, el ionóforo de calcio A23187 más el éster de forbol PMA (IPMA) incrementaron la fosforilación de la subunidad p65 en un 27 % ($p < 0.05$) después de 15 minutos de estímulo. La estimulación de los mastocitos con 0.01 y 1 mg/ml de GMPb durante el mismo tiempo no fue capaz de inducir un aumento significativo en la fosforilación de p65. Estos resultados

reflejan nuevamente que el GMPb por sí solo, no es capaz de activar directamente a los mastocitos de rata a través de la vía del NF- κ B.

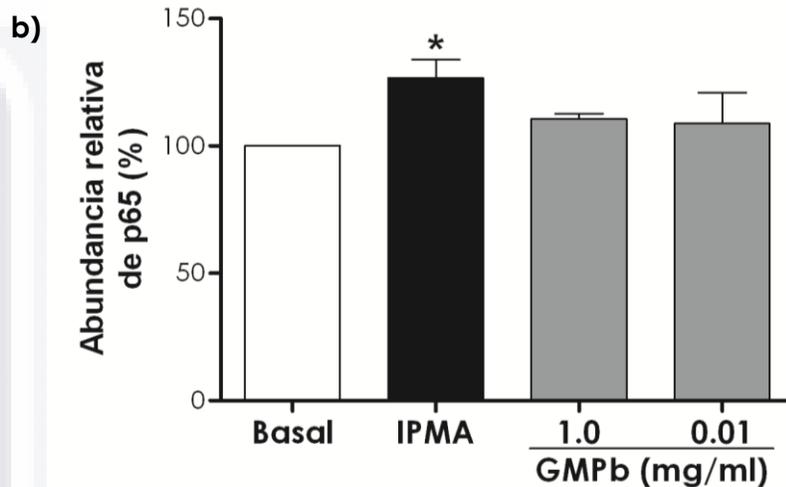


Figura 24. Efecto directo del GMPb sobre la fosforilación de p65 en mastocitos. **a)** Inmunoblot de mastocitos peritoneales en estado basal o activados con A23187 más PMA (IPMA) o GMPb (0.01 o 1.0 mg /ml). **b)** Análisis densitométrico de p65 fosforilado expresado como la media del porcentaje de abundancia relativa de las bandas \pm SEM. $n \geq 3$; * $p < 0.05$.

7. DISCUSIÓN

Durante este trabajo se ha demostrado que el pre-tratamiento oral con GMPb induce una reducción significativa en el desarrollo de la sensibilización sistémica experimental relacionada con la alergia. La administración del GMPb previo a la sensibilización con OVA reduce fuertemente los niveles de IgE antígeno-específica, inhibe la respuesta proliferativa de esplenocitos a OVA y decrece la producción de IL-13 estimulada por OVA en cultivos de células de bazo de animales sensibilizados. Además se ha mostrado que el pre-tratamiento con GMPb impacta sobre las manifestaciones clínicas de la hipersensibilidad cutánea inmediata con una reducción importante de la intensidad de la respuesta inflamatoria local. El GMPb también altera la respuesta anafiláctica sistémica de los animales mediante el aumento de la supervivencia y la disminución de los signos de la anafilaxia severa. A la par, se ha demostrado que el GMPb no ejerce un efecto directo sobre la activación del mastocito, ya sea en la desgranulación o en la translocación de NFκB al núcleo en ensayos *in vitro*.

La producción de IgE y la diferenciación de linfocitos al perfil Th2 son dos mecanismos inmunológicos esenciales para el desarrollo de la alergia (Ishizaka y cols., 1974, Okoye y Wilson, 2011). En nuestro modelo experimental, niveles elevados de IgE específica para la OVA y de IL-13 fueron cuantificados respectivamente en el suero y en los sobrenadantes de esplenocitos obtenidos de animales sensibilizados. Estas dos moléculas están relacionadas entre sí, pues ya se ha demostrado que la expresión de IgE puede ser regulada por la IL-13 en ratones (Mackenzie y cols., 1998) y en pacientes con asma alérgica, se ha reportado que niveles elevados de IL-13 se correlacionan con la producción de IgE (Van der Pouw Kraan y cols., 1998). Nosotros demostramos que el pre-tratamiento con GMPb reduce significativamente los niveles de IgE específica al antígeno cuando la síntesis de IgE es inducida experimentalmente en un modelo de alergia. Este

resultado está en concordancia con el efecto inhibitorio del GMPb en la producción de IL-13 que nosotros reportamos. En esta misma línea, estudios previos realizados en ratón muestran que el GMP administrado en la dieta reduce los niveles de IgG específica a antígenos inyectados (Monai, Horimoto y Otani, 1998). En conjunto, estos resultados demuestran una función inmunomoduladora del GMPb administrado en la dieta sobre la respuesta inmune humoral.

Estudios *in vitro* sobre el efecto del GMP en la modulación de la respuesta inmune humoral muestran un panorama diferente. En cultivos de esplenocitos murinos estimulados *in vitro* con LPS, el GMP mejora la producción de IgA como consecuencia del incremento de la población de células IgA-positivas (Yun y cols., 1996). Así, Snow Brand Milk Products (1996) ha patentado el uso del GMP para acelerar el crecimiento de linfocitos B humanos en cultivos celulares (pero no de linfocitos T), regulando positivamente el sistema inmune humoral. Este comportamiento diferente del GMPb sobre la modulación de la respuesta inmune humoral al ser empleado *in vitro* puede deberse al papel importante que desarrollan los linfocitos Th *in vivo* sobre la respuesta inmune humoral, células cuya función también es regulada por el GMPb (López Posadas y cols., 2010; Requena y cols., 2010).

La IL-10 es secretada en grandes cantidades por esplenocitos de animales alérgicos en respuesta al alérgeno (Gerhold y cols., 2002; Perrier y cols., 2010). Nosotros detectamos altos niveles de esta citocina en los sobrenadantes de esplenocitos de animales sensibilizados activados por OVA o por mitógeno. La IL-10 es una citocina reguladora secretada por un numeroso tipo de células, incluyendo células Th2, las cuales juegan un rol central en el control de los procesos inflamatorios (Fujio y cols., 2010). Se ha demostrado el papel de la IL-10 en la regulación de la respuesta inmune al alérgeno (Moore y cols., 2001). Los niveles de IL-10 en los sobrenadante de esplenocitos se incrementan significativamente después de la inmunoterapia intranasal al compararse con esplenocitos de ratones no tratados, un modelo experimental de asma (Akkoc y cols., 2008). Además, hay evidencia de que en modelos animales de asma

alérgico, las células T reguladoras antígeno-específicas y naturales pueden limitar la enfermedad, en parte por mecanismos dependientes de IL-10 (Hawrylowicz y O'Garra 2005). Nosotros demostramos que la IL-10, aparentemente, no es un elemento clave en la inmuno-regulación que ejerce GMPb, ya que no hubo cambios en la síntesis de esta citocina en respuesta al antígeno o mitógeno después del tratamiento con GMPb. Esto concuerda con el hecho de que el GMP no afecta la producción de IL-10 en células dendríticas estimuladas por LPS (Mikkelsen y cols., 2005). Además, estudios previos demuestran que la administración oral de GMPb incrementa la expresión del factor regulador de la transcripción Foxp3 en esplenocitos, indicando un efecto positivo en la diferenciación hacia células T reguladoras (Requena y cols., 2010). Por lo tanto, sería importante investigar que otro mecanismo regulador mediado por células T reguladoras pudiera estar involucrado en el efecto supresor del GMPb, tal como la secreción del factor transformador de crecimiento- β , la anergia y/o el contacto célula-célula.

La proliferación de los esplenocitos es intensa en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. La inhibición de la proliferación de esplenocitos puede ser usada para demostrar la supresión de una respuesta inmune como la alergia. Existen datos controversiales en relación al efecto *in vitro* del GMP sobre la proliferación de esplenocitos. Ya se ha demostrado que el GMP inhibe la proliferación de esplenocitos de ratón inducida por mitógenos (Otani y cols., 1992; Inagaki y Nagai, 2009). Sin embargo, estudios *in vivo* han reportado que la administración oral de una dieta suplementada con GMP a ratones, mejora la respuesta proliferativa de esplenocitos a ConA, pero sin cambios significativos en la respuesta a LPS o PHA (Monnai y cols., 1998). Nuestros resultados muestran que la administración oral de GMPb inhibe totalmente la respuesta proliferativa inducida por el alérgeno y solo en parte la generada por la ConA. Estos datos indican que la supresión inducida por el GMPb en la proliferación de esplenocitos es específica al antígeno y no altera las funciones generales inmunitarias de los linfocitos. Las diferencias observadas entre los resultados de los distintos estudios, ya sea *in vivo* o *in vitro*, pueden ser generadas por diferencias en las

concentraciones de GMP utilizadas (Otani y cols., 1992; Otani y Hata, 1995). Además, hay que recordar que en la respuesta inmune hay una interacción entre múltiples elementos celulares y moleculares, inmunológicos y no inmunológicos, que finalmente definen el resultado final de la reacción; mientras que los ensayos *in vitro* solamente muestran la respuesta individual y aislada de un elemento celular.

La reacción cutánea inmediata es un modelo para evaluar la activación de mastocitos de piel sensibilizados en respuesta al alérgeno específico inyectado intradérmicamente (Inagaki y Nagai, 2009). Nosotros observamos que el tratamiento con GMPb previo a la sensibilización disminuye de forma importante la intensidad de la reacción inflamatoria inducida por el alérgeno en la piel de ratas sensibilizadas; mientras que el tratamiento posterior a la sensibilización y previo a la activación de los mastocitos no genera cambio alguno en la intensidad de la respuesta inflamatoria tras la inyección i.d. del alérgeno. La reacción cutánea inmediata envuelve un proceso que va desde la producción de IgE hasta la activación de mastocitos de la piel mediados por IgE. Se sabe que la concentración de IgE unida a los receptores Fc ϵ RI puede determinar la intensidad de la reacción que se genera por la activación de los mastocitos (González-Espinosa y cols., 2003). En este sentido, nosotros observamos que el GMPb no modifica la respuesta inflamatoria inducida por la inyección intradérmica del C48/80, lo que aparentemente indicaría que no tiene efecto sobre la activación de los mastocitos en la piel. Nosotros proponemos que es la caída en la síntesis de IgE la causa por la que el GMPb reduce la intensidad de la respuesta inflamatoria local en animales sensibilizados cuando son enfrentados al alérgeno, debido a que solamente el tratamiento previo a la sensibilización mostró una función protectora.

La anafilaxia sistémica experimental es caracterizada por hipotermia, rascado con insistencia, disminución de la movilidad, hipotensión y finalmente la muerte en caso de un choque severo (Finkelman, 2007). Está bien establecido que la anafilaxia sistémica inducida por el alérgeno está principalmente mediada

por IgE, FcεRI, mastocitos e histamina en humanos (Simons, 2009). Recientemente se ha sugerido que una vía alternativa que involucra IgG, macrófagos, FcγRIII y el PAF se desarrolla en ratones durante la respuesta alérgeno-específica (Finkelman, 2007). En ratas los elementos inmunes exactos que envuelven el desarrollo de la anafilaxia sistémica no están bien definidos. Estudios en ratas deficientes en mastocitos han demostrado que la respuesta hipotensiva en la anafilaxia mediada por el alérgeno es independiente de la activación de los mastocitos (Guo y cols., 2001), mientras que la anafilaxia hepática es principalmente debida a la activación de los mastocitos sin la contribución de los macrófagos (Shibamoto y cols., 2007). El común denominador de todos los tipos de anafilaxia sistémica es que los mediadores liberados por mastocitos, macrófagos u otras células en respuesta al antígeno, son responsables del desarrollo de signos y síntomas de la reacción; y además, la anafilaxia es también regulada por agentes que modifican la capacidad de respuesta de estos mediadores (Finkelman, 2007). El rol de la IL-13 en la regulación de la reacción de anafilaxia está bien establecido. Datos obtenidos en ratones transgénico en IL-13 indican que los animales están altamente predispuestos a desarrollar reacciones de anafilaxia tras la sensibilización con el alérgeno (Fallon y cols., 2001). Estudios en ratones pre-tratados con IL-13 han demostrado que estos desarrollan un choque anafiláctico más severo que los animales no tratados debido a un incremento en la sensibilidad a los mediadores vasoactivos, predominantemente por un efecto en el endotelio vascular (Strait y cols., 2003). En nuestros estudios, el pre-tratamiento con GMPb induce una reducción en la severidad de la respuesta anafiláctica que llega a ser evidente por el incremento en la tasa de supervivencia de animales sensibilizados, la reducción en la media de la puntuación de los signos de la respuesta anafiláctica y la tendencia de los animales a recuperarse de la hipotermia. Sin embargo, no modifica significativamente ninguna de estas variables en la reacción anafilactoide inducida por el C48/80. Todos estos resultados, en conjunto, sugieren que una de las principales acciones biológicas del GMPb para proteger de la anafilaxia sistémica puede ser la disminución en la producción de IL-13, siendo esta la razón por la cual observamos que el GMPb no

afecta la respuesta anafilactoide sistémica. Sin embargo, aún cuando hemos reportado que el GMPb no ejerce efecto sobre la activación de los mastocitos, no podemos excluir la posibilidad de un efecto sobre otra célula efectora o mediador que desarrollan o regulan la anafilaxia. .

El GMP se obtiene fisiológicamente en el estómago de recién nacidos y adultos por la digestión de la k-caseína mediante la acción de la quimosina (Zimeki Kruzel, 2007; Brody, 2000). También podemos ingerir el GMP de muchos productos comerciales, tales como la margarina, yogurt y suplementos dietarios (Chávez y cols., 2008). Sin embargo la ingesta de GMP por los alimentos es escasa. El yogurt proporciona aproximadamente 0.12-0.15 mg de GMP/ml (Chávez y cols., 2008; Abd El-Salam, 2006), una concentración muchísimo menor a la que nosotros usamos para obtener un efecto inmunomodulador sobre el desarrollo de la alergia. Se tiene poca información sobre la farmacocinética del GMP, pero dos estudios previos han mostrado que tras la ingesta de leche o yogurt se alcanzan niveles detectables de GMP en torrente sanguíneo (aproximadamente 1 µg/ml) y la concentración permanece relativamente estable durante al menos 8 horas. Además, el GMP se detecta en el duodeno rápidamente tras la ingesta de leche o yogurt (Chabance y cols., 1998; Chabance y cols., 1995). Por lo tanto el efecto protector del GMPb sobre el desarrollo de la alergia y la severidad de las reacciones alérgicas inmediatas puede estar debido a una acción sistémica y/o intestinal. Así, además de los mecanismos sistémicos previamente mencionado, el GMPb puede también proteger de la alergia mediante efectos prebióticos. El GMP favorece el crecimiento de cepas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, como ya se ha demostrado en otros trabajos (Idota y cols., 1994; Yakave y cols., 1994; Bezkorovainy y cols., 1979). El posible papel de los probióticos en la prevención de las enfermedades alérgicas en todavía controversial (Özdemir, 2011). Sin embargo, hay datos sólidos que apoyan el efecto benéfico de cepas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* en las enfermedades atópicas a través de la modulación de la respuesta Th1/Th2 a los alérgenos, la activación de células dendríticas tolerogénicas y la producción de células T reguladoras (Özdemir,

2011). Sería interesante probar la hipótesis de un efecto prebiótico del GMPb en la modulación de la respuesta alérgica.

Las vías de activación de los mastocitos han sido clasificadas como mecanismos "dependientes de IgE" mediada por el receptor FcεRI, e "independientes de IgE" (Rao y Brown, 2008). Además los mastocitos responden a una amplia variedad de sustancias a través de receptores activadores, inhibidores o ambos (Sharma y cols, 2002 y Rao y Brown, 2008). Se ha demostrado que el GMP por si solo puede actuar de forma directa sobre algunas células, ya que experimentos *in vitro* muestran que el GMP mejora la proliferación y actividad fagocítica de la línea celular de macrófagos humanos U937 (Li y Mine 2004); mientras que en monocitos, tanto en la línea celular THP1 y en cultivos primario de monocitos de humano, se ha visto que disminuye ligeramente la proliferación celular y aumenta la secreción de IL-1β, IL-8 y TNF-α a través de las vías MAP cinasas y NFκB (Requena y cols., 2009). Por otro lado, existen evidencias de que el GMP tiene un efecto inmunosupresor sobre la proliferación *in vitro* de esplenocitos de ratón inducida por LPS (Otani y cols., 1992). Esta función es atribuida al ácido siálico contenido en la molécula (Otani y Monai, 1993), además de que se sugiere, que el fosfato de la serina 149 juega un rol importante en la unión del GMP al receptor del mitógeno (Otani y Monai, 1995). El GMP también potencia la acción de la α-lactoalbúmina y β-lactoglobulina sobre la estimulación de la quimiotaxis, producción de superóxido, desgranulación y fagocitosis de los neutrófilos humanos (Rusu y cols., 2009). En este sentido, nosotros observamos que el GMPb no es capaz de activar de forma directa e inmediata a los mastocitos, ya sea su desgranulación o la activación de genes para la síntesis *de novo* de proteínas vía NFκB. Estos resultados coinciden con lo reportado por Monnai y Otani en 1997, pues ellos reportan que el GMP por sí solo no es capaz de activar a los monocitos de la línea celular P388D1 en la producción o secreción de IL-1ra; así como tampoco activa la proliferación de esplenocitos de ratón, solo la favorece con un mecanismo dependiente de la dosis, cuando son previamente estimulados con ConA (Requena y Cols., 2010). Sería necesario investigar si el GMPb tiene algún efecto indirecto sobre la activación de los mastocitos

sensibilizados por el alérgeno, para poder reproducir *in vitro* lo que ocurre durante la respuesta alérgica *in vivo*.



8. CONCLUSIONES

La administración vía oral de GMPb antes y durante la sensibilización alérgica reduce significativamente el título de IgE específica para el alérgeno, la proliferación de esplenocitos y la síntesis de IL-13, sin modificar los niveles de IL-10.

El pre-tratamiento con GMPb antes y durante la inducción de la alergia disminuye la intensidad de la respuesta anafiláctica localizada y sistémica generadas en respuesta al alérgeno inductor de la sensibilización.

La administración de GMPb tras la sensibilización alérgica y durante los 4 días anteriores al reto con el alérgeno, no modifica la intensidad de la respuesta inflamatoria alérgica local o sistémica.

El efecto inmunomodulador del GMPb sobre la respuesta alérgica no es a través de una acción directa sobre el mastocito, ya que *in vivo* no ejerce un efector modulador significativo sobre la reacción anafilactoide cutánea y sistémica inducida por el C48/80.

El GMPb *in vitro* no activa en los mastocitos ni la desgranulación ni al factor regulador de la transcripción NFκB

Estos resultados demuestran un efecto beneficioso del GMPb como tratamiento preventivo sobre el desarrollo de las alergias y la respuesta inflamatoria de fase temprana asociada a dicha patología.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Salam MH. 2006. Separation of casein glycomacropeptide from whey: methods of potential industrial applications. *International Journal Dairy Science*; 1(1): 93–99.
- Abd El-Salam MH, El-Shibiny S, Buchheim W. 1996. Characteristics and Potential Uses of the Casein Macropeptide. *International Dairy Journal*; 6(4): 327-341.
- Abraham SN, St John AL. 2010. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nature Reviews, Immunology*; 10(6): 440-452.
- Ahmed J, Ramaswamy HS. 2003. Effect of high-hydrostatic pressure and temperature on rheological characteristics of glycomacropeptide. *Journal of Dairy Science*; 86(5): 1535–1540.
- Aimutis WR. 2004. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *The Journal of Nutrition*; 134(4): 989S–995S.
- Akkoc T, Eifan AO, Aydogan M, Ozkara S, Bachceciler NN, Barlan IB. 2008. Transfer of T cells from intranasal ovalbumin-immunized mice ameliorates allergic response in OVA-sensitized recipient mice. *Allergy and Asthma Proceedings*; 29: 411–416.
- Benhamou AH, Schächli-Tempia MG, Belli DC, Eigenmann PA. 2009. An overview of cow's milk allergy in children. *Swiss Medical Weekly*; 139(21–22): 300–307.
- Bezkorovainy A, Grohlich D, Nichols JH. 1979. Isolation of a glycopolypeptide fraction with *Lactobacillus bifidus* subspecies *pennsylvanicus* growth-promoting activity from whole human milk casein. *The American Journal of Clinical Nutrition*; 32(7): 1428–1432.

- Borish LC, Steinke JW. 2003. Cytokines and chemokines. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 111(2 Suppl): S460-475.
- Boyce JA. 2007. Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. *Immunological Reviews*; 217: 168–185.
- Bradding P, Feather IH, Howarth PH, Mueller R, Roberts JA, Britten K, Bews JPA, Hunt TC, Okayama Y, Heusser CH, Bullock GR, Church MK, Holgate ST. 1992. Interleukin 4 Is Localized to and Released by Human Mast Cells. *The Journal of Experimental Medicine*; 176(5): 1381-1386.
- Brightling C, Berry M, Amrani Y. 2008. Targeting TNF- α : A novel therapeutic approach for asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 121): 5-10.
- Brockner C, Thompson DC, Vasiliou V. 2012. The role of hyperosmotic stress in inflammation and disease. *Biomolecular concepts*; 3(4): 345–364.
- Brody EP. 2000. Biological activities of bovine glycomacropeptide. *The British Journal of Nutrition*; 84(Suppl 1): S39-46.
- Burton J, Skudder PJ. 1987. Whey proteins. *UK Patent Application GB 2188526 A1*.
- Chabance B, Jollès P, Izquierdo C, Mazoyer E, Francoual C, Drouet L, Fiat AM. 1995. Characterization of an antithrombotic peptide from kappa-casein in newborn plasma after milk ingestion. *The British Journal Nutrition*; 73(4): 583–590.
- Chabance B, Marteau P, Rambaud JC, Migliore-Samour D, Boynard M, Perrotin P, Guillet R, Jollès P, Fiat AM. 1998. Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie*; 80(2): 155–165.
- Chávez N, Salinas E, Jáuregui J, Palomares LA, Macías K. 2008. Detection of bovine milk adulterated with cheese whey by western blot immunoassay. *Food and Agricultural Immunology*; 19(4): 265-272.

- Chen Q, Cao J, Jia Y, Liu X, Yan Y, Pang G. 2010. Modulation of mice fecal microbiota by administration of casein glycomacropeptide. *Microbiology Research*; 3(1): 8-12.
- Chernikov MP, Nikol'skaya GV, Stan EY, Shlygin GK, Vasilevskaya LS. 1974. Biological significance of casein glycomacropeptide. *Voprosy Pitaniia*; 2: 21-25.
- Chobert JM, Touati A, Bertrandharb C, Dalgalarondo M, Nicolas MG. 1989. Solubility and emulsifying properties of k-casein and its caseinomacropeptide. *Journal of Food Biochemistry*; 13: 457-473.
- Church MK. 1975. Correlation of anaphylactic bronchoconstriction with circulating reaginic antibody level and active cutaneous anaphylaxis in the rat. *Immunology*; 29: 527-534.
- Crivellato E, Beltrami CA, Mallardi F, Ribatti D. 2003. Paul Erlich's doctoral thesis: a milestone in the study of mast cells. *British Journal Haematology*; 123: 19-21.
- Daddaoua A, Puerta V, Zarzuelo A, Suárez MD, Sánchez de Medina F, Martínez-Augustin O. 2005. Bovine Glycomacropeptide Is Anti-Inflammatory in Rats with Hapten-Induced Colitis. *The Journal of Nutrition*; 135(5): 1164-1170.
- Dai Y, Hou LF, Chan YP, Cheng L, But PPH. 2004. Inhibition of immediate allergic reactions by ethanol extract from *Plumbago zeylanica* stems. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*; 65: 429-432.
- Deo SS, Mistry KJ, Kakade AM, Niphadkar PV. 2010. Role played by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma. *Lung India*; 27(2): 66-71.
- Dosako S, Kusano H, Deya E, Idota T. 1992. Infection protectant. *United States Patent* 5147853.

Eigel WN, Butler JE, Ernstrom CA, Farrell HM, Harwalkar VR, Jenness R, Whitney R. McL. 1984. Nomenclature of Proteins of Cow's Milk: Fifth Revision. *Journal of Dairy Science*; 67(8):1599-1631.

Escoubet-Lozach L, Glass CK, Wasserman SI. 2002. The role of transcription factors in allergic inflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 110(4): 553-564.

Fahim REF, Vose JR, Thippawong J, Barreto L, Jackson GED, Tan LUL, Herbert A, Klein MH. 2003. Vacunas de pertussis acelulares y métodos de preparación de las mismas. *Patene Europea* 2 180 758.

Fallon PG, Emson CL, Smith P, McKenzie AN. 2001. IL-13 Overexpression Predisposes to Anaphylaxis Following Antigen Sensitization. *The Journal of Immunology*; 166(4): 2712-2716.

Farrell HM Jr., Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK, Hicks CL, Hollar CM, Ng-Kwai-Hang KF, Swaisgood HE. 2004. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *Journal of Dairy Science*; 87(6):1641-1674.

Finkelman FD. 2007. Anaphylaxis: Lessons from mouse models. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 120(3): 506-515.

Finkelman F D, Vercelli D. 2007. Advances in asthma, allergy mechanisms, and genetics in 2006. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 120(3): 544-550.

Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. 2010. The family of IL-10-secreting CD4+ T cells. *Advances Immunology*; 105: 99-130.

Galli SJ, Tsai M. 2012. IgE and mast cells in allergic disease. *Nature Medicine*; 18(5): 693-704.

Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. 2008. The development of allergic inflammation. *Nature*; 454(7203): 445-454.

- Gerhold K, Blümchen K, Bock A, Seib C, Stock P, Kallinich T, Löhning M, Wahn U, Hamelmann E. 2002. Endotoxins prevent murine IgE production, TH2 immune responses, and development of airway eosinophilia but not airway hyperreactivity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 110: 110–116.
- Gómez-Llorente C, Muñoz S, Gil A. 2010. Role of Toll-like receptors in the development of immunotolerance mediated by probiotics. *The Proceedings of the Nutrition Society*; 69(3): 381–389.
- Gonzalez-Espinosa C, Odom S, Olivera A, Hobson JP, Martinez ME, Oliveira-Dos-Santos A, Barra L, Spiegel S, Penninger JM, Rivera J. 2003. Preferential signaling and induction of allergy-promoting lymphokines upon weak stimulation of the high affinity IgE receptor on mast cells. *The Journal of Experimental Medicine*; 197: 1453–1465.
- Gould HJ, Sutton BJ. 2008. IgE in allergy and asthma today. *Nature Reviews. Immunology*; 8: 205-217.
- Grencis RK, Bancroft AJ. 2004. Interleukin-13, A Key Mediator in Resistance to Gastrointestinal-Dwelling Nematode Parasites. *Clinical Reviews. Allergy & Immunology*; 26(1):51-60.
- Grünig G, Corry DB, Reibman J, Will-Karp M. 2012. Interleukin 13 and the evolution of asthma therapy. *American Journal Clinical and Experimental Immunology*; 1(1): 20-27.
- Grzela K, Lazarczyk M, Grzela T. 2004. Protein-based Strategies of Molecular Therapy in Allergy. *Current Medical Chemistry Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents*; 3(1): 53-62.
- Guo Y, Hedqvist P, Gustafsson LE. 2001. Absence of mast cell involvement in active systemic anaphylaxis in rats. *European Journal of Pharmacology*. 430(2-3): 305-10.

- Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O. 2008. Histamine in the nervous system. *Physiological Reviews*; 88(3): 1183-1241.
- Hawrylowicz CM, O'Garra A. 2005. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nature Reviews. Immunology*; 5(4): 271-283.
- Holgate ST y Polosa R. 2008. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nature reviews. Immunology*; 8(3): 218-230.
- Ibero-Iborra M. 2012. Anaphylaxis: The great challenge. *Allergologia et Immunopathologia*; 40(6): 329-330.
- Idota T. 1996. Sialylated compounds in human milk and their physiological significance in infants. *Snow Brand R&D Reports*; 106: 1-55.
- Idota T, Kawakami H, Nakajima I. 1994. Growth-promoting effects of N-acetylneuraminic acid-containing substances of Bifidobacteria. *Bioscience Biotechnology, and Biochemistry*; 58(9):1720-1722.
- Inagaki N, Nagai H. 2009. Analysis of the Mechanism for the Development of Allergic Skin Inflammation and the Application for Its Treatment: Mouse Models for the Development of Remedies for Human Allergic Dermatitis. *Journal of Pharmacological Sciences*; 110(3): 251-259.
- Irani AM, Schwartz LB. 1994. Human mast cell heterogeneity. *Allergy Proceedings*; 15: 303-308.
- Ishizaka K, Ishizaka T, Kishimoto T, Okudairn H. 1974. Biosynthesis of IgE antibodies and mechanisms of sensitization. In: Brent IL, Holborow J, eds. *Progress in immunology II, clinical aspects*. Amsterdam: Elsevier North-Holland: 7-17.

Isoda H, Kawasaki Y, Tanimoto M, Dosako S, Idota T. 1999. Use of compounds containing or binding sialic acid to neutralize bacterial toxins. *European Patent* 0385118B1.

Izuhara K. 2003. The role of interleukin-4 and interleukin-13 in the non-immunologic aspects of asthma pathogenesis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*; 41(7): 860-4.

Izuhara K, Arima K, Kanaji S, Ohta S, Kanaji T. 2006. IL-13: a promising therapeutic target for bronchial asthma. *Current Medicinal Chemistry*; 13(19): 2291-8.

Jia Y, Chen Q. 2010. Regulation of bovine glycomacropeptide on IFN- γ and IL-4 cytokines of mice. *China Dairy Industry*; 11.

Kalliomäki M. 2010. Probiotics, prebiotics and synbiotics: a hope or hype in allergy? *Clinical and Experimental Allergy*; 40(5): 694-696.

Kambayashi T, Koretzky G. 2007. Proximal signaling events in Fc ϵ RI-mediated mast cell activation. *The Journal of allergy and clinical immunology*; 119(3): 544-552.

Kanani A, Schellenberg R, Warrington R. 2011. Urticaria and angioedema. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology*; 7(Suppl 1): S9.

Karasuyama H, Mukai K, Tsujimura Y, Obata K, 2009. Newly discovered roles for basophils: a neglected minority gains new respect. *Nature Reviews. Immunology*; 9(1): 9-13.

Kawasaki Y, Isoda H, Tanimoto M, Dosako S, Idota T, Ahiko K. 1992. Inhibition by lactoferrin and k-casein glycomacropeptide of binding of cholera toxin to its receptor. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*; 56(2): 195-198.

- Kelleher SL, Chatterton D, Nielsen K, Lönnerdal B. 2003. Glycomacropeptide and α -lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. *The American Journal of Clinical Nutrition*; 77(5): 1261–1268.
- Kharmate G, Liu Z, Patterson E, Khan MM. 2007. Histamine affects STAT6 phosphorylation via its effects on IL-4 secretion: role of H1 receptors in the regulation of IL-4 production. *International Immunopharmacology*; 7(3): 277-286.
- Kirsh R, Bokhary R, Marcon MA, Cutz E. 2007. Activated Mucosal Mast Cells Differentiate Eosinophilic (Allergic) Esophagitis From Gastroesophageal Reflux Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*; 44(1): 20–26.
- Kukkonen K, Savilahti E, Haahtela T, Juntunen-Backman K, Korpela R, Poussa T, Tuure T, Kuitunen M. 2007. Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 119(1): 192-198.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*; 227: 680-685.
- LaPorte SL, Juo ZS, Vaclavikova J, Colf LA, Qi X, Heller NM, Keegan AD, García KC. 2008. Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the Interleukin-4/13 system. *Cell*; 132(2): 259-272.
- Leslie M. 2007. Mast cells show their might. *Science*; 317: 614-616.
- Li EW, Mine Y. 2004. Immunoenhancing effects of bovine glycomacropeptide and its derivatives on the proliferative response and phagocytic activities of human macrophagelike cells, U937. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 52(9): 2704-2708.

- Li XM, Wang QF, Schofield B, Lin J, Huang SK, Wang Q. 2009. Modulation of Antigen-Induced Anaphylaxis in Mice by a Traditional Chinese Medicine Formula, Guo Min Kang. *The American Journal of Chinese Medicine*; 37(1): 113–125.
- López-Pérez G, Morfín Maciel BM, Huerta López J, Mejía Covarrubias F, López-López J, Aguilar G, Rivera Pérez JL, López Medina L, Vargas F. 2009. Prevalencia de las enfermedades alérgicas en la ciudad de México. *Revista Alergia México*; 56(3): 72-79.
- López-Posadas R, Requena P, González R, Suárez MD, Zarzuelo A, Sánchez de Medina F, Martínez-Augustín O. 2010. Bovine Glycomacropeptide Has Intestinal Antiinflammatory Effects in Rats with Dextran Sulfate-Induced Colitis. *The Journal of Nutrition*; 140(11): 2014–2019.
- Lozano, J. y Monarrez, L. (2003). Prologue Histology Resource. ECSF School of Medicine Office of Educational Technology. © 2009 University of California Regents. http://missinglink.ucsf.edu/lm/IDS_101_histo_resource/index.htm
- Lundequist A, Pejler G. 2011. Biological implications of preformed mast cell mediators. *Cellular and Molecular Life Sciences*; 68(6): 965–975.
- Ma X, He P, Sun P, Han P. 2010. Lipoic acid: an immunomodulator that attenuates glycinin-induced anaphylactic reactions in a rat model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(8): 5086-5092.
- Marguardt DL, Walker LL. 2000. Dependence of mast cell IgE-mediated cytokine production on nuclear factor- κ B activity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 105(3): 500-505.
- Marshall JS. 2004. Mast-cell responses to pathogens. *Nature reviews. Immunology*; 4(10): 787–799.

Martin-Diana, AB, Peláez C, Requena T. 2004. Rheological and structural properties of fermented goat's milk supplemented with caseinomacropeptide and whey protein concentrate. *Milchwissenschaft-Milk Science International*; 59: 383–386.

McKenzie GJ, Emson CL, Bell SE, Anderson S, Fallon P, Zurawski G, Murray R, Grecis R, Mckenzie AN. 1998. Impaired Development of Th2 Cells in IL-13-Deficient Mice. *Immunity*; 9(3): 423–432.

Metcalfe DD, Peavy RD, Gilfillan AM. 2009. Mechanisms of mast cell signaling in anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 124(4): 639-646.

Mikkelsen TL, Rasmussen E, Olsen A, Barkholt V, Frøkiær H. 2005. Immunogenicity of K-Casein and Glycomacropeptide. *Journal of Dairy Science*. 89(3): 824-830.

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-Milk Science International*. 53(3): 129–132.

Monnai M, Otani H. 1997. Effect of bovine k-caseinoglycopeptide on secretion of interleukin-1 family cytokines by P388D1 cells, a line derived from mouse monocyte/macrophage. *Milchwissenschaft-Milk Science International*. 52(4): 192-196.

Moore KW, de Waals Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*; 19: 683–765.

Mossman T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*; 65(1-2): 55-63.

Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. 1999. The IL-4 receptor: Signaling Mechanisms and Biologic Functions. *Annual Review Immunology*; 17: 701–738.

Nielsen P, Tromholt N. 1994. Method for production of a kappa-casein glycomacropeptide and use of a kappa-casein glycomacropeptide. *World Patent 9415952*.

Okada H, Kuhn C, Feillet H, Bach JF. 2010. The "hygiene hypothesis" for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clinical and Experimental Immunology*; 160(1): 1–9.

Okoye IS, Wilson MS. 2011. CD4+ T helper 2 cells – microbial triggers, differentiation requirements and effector functions. *Immunology*; 134: 368–377.

Otani H, Hata I. 1995. Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes and rabbit Peyer's patch cells by bovine k-caseinoglycopeptide. *The Journal of Dairy Research*; 62: 339–348.

Otani H, Horimoto Y, Monnai M. 1996. Suppression of interleukin-2 receptor expression on mouse CD4. T Cells by bovine k-caseinoglycopeptide. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*; 60(6): 1017-1019.

Otani H, Monnai M. 1993. Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes by bovine milk k-casein digests. *Food and Agricultural Immunology*; 5(4): 219-229.

Otani H, Monnai M. 1995. Induction of an interleukin-1 receptor antagonist-like component produced from mouse spleen cells by bovine k-caseinoglycopeptide. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*; 59(6): 1166-1168.

OTANI H, MONNAI M, HOSONO A. 1992. Bovine kappa-casein as inhibitor of the proliferation of mouse spleenocytes induced by lipopolysaccharide stimulation. *Milchwissenschaft-Milk Science International*; 47(8): 512-515.

OTANI H, YAMADA Y. 1995. Effects of Bovine Kappa-Casein and Lactoferrins on Several Experimental-Models of Allergic Diseases. *Milchwissenschaft-Milk Science International*; 50(10): 549-553.

OWEN CE. 2007. Immunoglobulin E: Role in asthma and allergic disease: Lessons from the clinic. *Pharmacology & Therapeutics*; 113(1): 121-133.

ÖZDEMİR Ö. Various effects of different probiotic strains in allergic disorders: an update from laboratory and clinical data. *Clinical and Experimental Immunology*; 160(3): 295-304.

PAWANKAR R, BAENA-CAGNANI CE, BOUSQUET J, CANONICA GW, CRUZ AA, KALINER MA, LANIER BQ. 2008. State of World Allergy Report 2008: Allergy and Chronic Respiratory Diseases. *The World Allergy Organ Journal*; 1(6 Suppl): S4-S17.

PAWANKAR R, HOLGATE ST, CANONICA GW, LOCKEY RF. WAO white book on allergy. Milwaukee, WI, USA: Word Allergy Organization, 2011.

PEJLER G, RÖNNBERG E, WAERN I, WERNERSSON S. 2010. Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood*; 115(24): 4981-4990.

PENDERS J, STOBBERINGH EE, VAN DEN BRANDT PA, THIJS C. 2007. The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. *Allergy*; 62(11): 1223-1236.

PERRIER C, THIERRY AC, MERCIENIER A, CORTHÉSY B. 2010. Allergen-specific antibody and cytokine responses, mast cell reactivity and intestinal permeability upon oral challenge of sensitized and tolerized mice. *Clinical and Experimental Allergy* 2010; 40: 153-162.

- Portman R. 2004. Composition for reducing caloric intake. *World patent* 200434813.
- Proulx M, Gauthier SF, Roy D. 1992. Effect of casein hydrolysates on the growth of *Bifidobacteria*. *Le Lait*; 72: 393-404.
- Rao KN, Brown MA. 2008. Mast Cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. *Annals of the New York Academy Science*; 1143: 83-104.
- Redford PS, Murray PJ, O'Garra A. 2011. The role of IL-10 in immune regulation during *M. tuberculosis* infection. *Mucosal Immunology*; 4(3): 261-270.
- Requena P, Daddaoua A, Guadix E, Zarzuelo A, Suárez MD, 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- κ B signal transduction pathways. *British Journal of Pharmacology*; 157: 1232-1240.
- Requena P, Daddaoua A, Martínez-Plata E, González M, Zarzuelo A, Suárez MD, Sánchez de Medina S, Martínez-Augustín O. 2008. Bovine glycomacropeptide ameliorates experimental rat ileitis by mechanisms involving downregulation of interleukin 17. *British Journal of Pharmacology*. 154: 825-832.
- Requena P, González R, López-Posadas R, Abadía-Molina A, Dolores-Suarez M, Zarzuelo A, Sánchez de Medina F, Martínez-Augustín O. 2010. The intestinal antiinflammatory agent glycomacropeptide has immunomodulatory actions on rat splenocytes. *Biochemical Pharmacology*; 79: 1797-1804.
- Rivera J y Olivera A, 2008. A Current Understanding of Fc ϵ RI-dependent Mast Cell Activation. *Current Allergy and Asthma Reports*; 8: 14-20.
- Romagnani S. 2004. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology*; 112: 352-363.

Rönnerberg E, Pejler G. 2012. Serglycin: the master of the mast cell. *Methods in Molecular Biology* 836: 201-217.

Rusu D, Drouin R, Pouliot Y, Gauthier S, Poubelle PE. 2009. A Bovine Whey Protein Extract Can Enhance Innate Immunity by Priming Normal Human Blood Neutrophils. *The Journal of Nutrition*; 139: 386–393.

Saito T, Itoh T. 1992. Variations and Distributions of O-Glycosidically Linked Sugar Chains in Bovine K-Casein. *Journal of Dairy Science*. 75: 1768-1774.

Salinas E. 2012. Neuroimmune Biology of Mast Cells. *Advances in Neuroimmune Biology*; 3: 57-72.

Salinas E, Quintanar JL, Ramírez-Celis NA, Quintanar-Stephano A. 2009. Allergen-sensitization in vivo enhances mast cell-induced inflammatory responses and supports innate immunity. *Immunology Letters*; 127(1): 48-54.

Sayed BA, Christy A, Quirion MR y Brown MA, 2008. The Master Switch: The Role of Mast Cells in Autoimmunity and Tolerance. *Annuals Reviews Immunology*; 26: 705–39.

Sharma BB, Apgar JR, Liu F. 2002. Mast Cells. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. 22: 119-148.

Shibamoto T, Shimo T, Cui S, Zhang W, Takano H, Kurata Y, Tsuchida H. 2007. The roles of mast cells and Kupffer cells in rat systemic anaphylaxis. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*; 293(6): R2202- R2209.

Simons FER. 2009. Anaphylaxis: Recent advances in assessment and treatment. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 124: 625-636.

Simons FER. 2011. Anaphylaxis pathogenesis and treatment. *Allergy*; 66(S95): 31–34.

Snow Brand Milk Products Co 1996. Human normal B lymphocyte accelerating agent. *Japanese Patent* 96018997.

Stan EY, Aleinik SI, Chernikov MP. 1983. The physiologically active x-casein peptides. *Fiziologicheskii zhurnal SSSR*; 69: 855-859.

Strait RT, Morris SC, Smiley K, Urban JF, Finkelman FD. 2003. IL-4 exacerbates anaphylaxis. *Journal of Immunology*; 170(7): 3835–3842.

Sunada Y, Nakamura S, Kamei C. 2007. Effects of *Lactobacillus acidophilus* strain L-55 on experimental allergic rhinitis in BALB/c mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*; 30(11): 2163-2166.

Sur, Cavender y Malaviya, 2007. Different approaches to study mast cell functions. *International Immunopharmacology* 7: 555–567

Thomä-Worringer C, Sørensen J, López-Fandiño R. 2006. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *International Dairy Journal*; 16: 1324–1333.

Tobita K, Yanaka H, Otani H. 2009. Heat-treated *Lactobacillus crispatus* KT strains reduce allergic symptoms in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 57(12): 5586-5590.

Tobita K, Yanaka H, Otani H. 2010. Anti-allergic effects of *Lactobacillus crispatus* KT-11 strain on ovalbumin-sensitized BALB/c mice. *Animal Science Journal*; 81(6): 699-705.

Tomczak L, Noemberg E, Bileski LM. 2007. Review: Isolation and Purification of Milk Whey Glycomacropeptide. *B. CEPPA, Curitiba*. 25(1): 121-132.

Traidl-Hoffmann C, Jakob T y Behrendt H, 2009. Determinants of allergenicity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 123: 558-66.

- Van der Berg R, Haenen GRMM, van de Berg H, Bast A. 2001. Transcription factor NF- κ B as a potential biomarker for oxidative stress. *British Journal of Nutrition*; 86(S1): S121-S127.
- Van der Pouw Kraan TCTM, van der Zee JS, Boeije LCM, de Groot ER. 1998. The role of IL-13 in IgE synthesis by allergic asthma patients. *Clinical and Experimental Immunology*; 111: 129-135.
- Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A. 2005. Phosphorylation of NF- κ B and I κ B proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends in Biochemical Sciences*; 30(1): 43-52.
- Von Bubnoff D, Novak N, Kraft S, Bieber T. 2003. The central role of Fc ϵ RI in allergy. *Clinical and Experimental Dermatology*; 28: 184-187.
- Wang H, Wang H, Liu Z. 2011. Agents that induce pseudo-allergic reaction. *Drug Discoveries & Therapeutics*; 5(5): 211-219.
- Wang J, Qi, JC, Konecny P y Krilis SA, 2003. Hemopoietic Cells with Features of the Mast Cell and Basophil Lineages and their Potential Role in Allergy. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy*; 2: 293-302.
- Wang M, Takeda K, Shiraishi Y, Okamoto M, Dakhama A, Joetham A, Gelfand EW. 2010. Peanut-induced intestinal allergy is mediated through a mast cell-IgE-Fc ϵ RI-IL-13 pathway. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 126(2): 306-316.
- Warner JO, Kaliner MA, Crisci CD, Del Giacco S, Frew AJ, Gh L, aspero J, Moon H-B, Nakagawa T, Potter PC, Rosenwasser LJ, Singh AB, Valovirta E, van Cauwenberge P. 2006. Forum Allergy Practice Worldwide A Report by the World Allergy Organization Specialty and Training Council. *Allergy Clin Immunol Int – J World Allergy Org*; 18: 4-10.

- Wasiuk A., Vries EC, Hartman K, Roers A y Noelle RJ, 2008. Mast cells as regulators of adaptive immunity to tumours. *Clinical and Experimental Immunology*; 155: 140–146.
- Wildman RE. 2007. Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods Second Edition. Taylor & Francis Group, LLC. 131-140.
- Wilson SJ, Shute JK, Holgate ST, Howarth PH, Bradding P, 2000. Localization of interleukin (IL) -4 but not IL-5 to human mast cell secretory granules by immunoelectron microscopy. *Clinical and Experimental Allergy*; 30(4): 493-500.
- Worm M, Babina M, Hompe S. 2013. Causes and risk factors for anaphylaxis. *Journal of the German Society of Dermatology*; 11(1): 44-50.
- Wu Z, Turner DR y Oliveira DBG, 2002. Antioxidants inhibit mercuric chloride-induced early vasculitis. *International Immunology*; 14(3): 267-273.
- Yakave T, Kawakami H, Idota T. 1994. Growth stimulation agent for bifidus and lactobacillus. *Japanese patent 07-267866*.
- Yoshikawa M, Fujita H, Matoba, N, Takenaka Y, Yamamoto T, Yamauchi R, Tsuruki H y Takahata K. 2000. Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases. *BioFactors*; 12: 143–146.
- Yun SS, Sugita-Konishi Y, Kumagai S, Yamauchi K. 1996. Glycomacropeptide from cheese whey protein concentrate enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated spleen cells. *Animal Science and Technology (Japan)* 67: 458-462.
- Yvon M, Beucher S, Guilloteau P, Huerou-Luron IL, Corring T. 1994. Effects of caseinomacropeptide (CMP) on digestion regulation. *Reproduction Nutrition Development*. 34: 527-537.

Zimeki M, Kruzel ML. 2007. Milk-derived proteins and peptides of potential therapeutic and nutritive value. *Journal of Experimental Therapeutics & Oncology*; 6: 89–106.



Publicación internacional indexada:

Clinical & Experimental Immunology
The Journal of Translational Immunology 

Clinical and Experimental Immunology ORIGINAL ARTICLE doi:10.1111/j.1365-2249.2012.04631.x

Pretreatment with glycomacropeptide reduces allergen sensitization, alleviates immediate cutaneous hypersensitivity and protects from anaphylaxis

M. Jiménez,* N. A. Chávez¹ and E. Salinas*

*Department of Microbiology and ¹Department of Biochemical Engineering, Basic Science Center, Autonomous University of Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico

Summary

Allergic disorders are characterized by the involvement of allergen-specific immunoglobulin (Ig)E antibodies and T helper type 2 (Th2) cells. The search for new therapies for allergic diseases has been the primary focus of interest for many investigators in recent years. Glycomacropeptide (GMP) is a biologically active component of milk that exhibits a range of immunomodulatory functions. We examined whether oral administration of GMP could affect the development of allergic sensitization and the severity of immediate cutaneous hypersensitivity reactions and of anaphylaxis. Rats treated with or without GMP were ovalbumin (OVA)-sensitized and several indicators of allergy were evaluated. Pretreatment with GMP resulted in reduction of antigen-specific IgE titre in rats when sensitized with OVA. GMP administration also markedly suppressed the proliferative response of splenocytes to antigen and the production of interleukin (IL)-13 by splenocytes of sensitized animals. In addition, GMP pretreatment attenuated the intensity of the immediate cutaneous reaction induced by antigen and protected the sensitized rats from severe anaphylaxis. These data demonstrate, for the first time, that the administration of GMP prevents allergen sensitization and reduces the severity of the early-phase reaction induced by antigen in cutaneous hypersensitivity and in anaphylaxis. GMP may be used as a novel prophylactic agent for the control of allergic diseases.

Keywords: allergy, anaphylaxis, glycomacropeptide, IgE, immediate cutaneous hypersensitivity

Accepted for publication 15 June 2012
Correspondence: E. Salinas, Av. Universidad # 940, 20131 Aguascalientes, Ags, México.
E-mail: emsalin@correo.uaa.mx

Introduction

The prevalence of allergic diseases is increasing globally, and approximately 30–40% of the world’s population is now affected by one or more allergic conditions [1]. Allergic disorders, such as anaphylaxis, allergic rhinitis (hay fever), some food allergy and allergic asthma, are characterized by the involvement of allergen-specific immunoglobulin (Ig)E antibodies and T helper type 2 (Th2) cells that recognize allergen-derived antigens [2]. IgE antibodies are bound immediately to high-affinity receptors on tissue mast cells and the individual becomes sensitized to the relevant allergen. Subsequently, antigens cross-link receptors on the surface of mast cells and induce mast cell degranulation, which results in the release of preformed mediators, such as histamine, and the synthesis and release of compounds derived from the metabolism of arachidonic acid and an array of inflammatory cytokines [3]. These mediators cause acute signs and symptoms associated with the early phase of

immediate-type allergic reactions, such as vasodilation, increased vascular permeability with oedema and functional changes in affected organs [contraction of bronchial smooth muscle, increased secretion of mucus, urticaria (hives), vomiting and diarrhoea] [2].

While the exact aetiology of allergic diseases is still unclear, important risk factors are genetic predisposition and the environment. In recent years, attention has been given to new findings in allergy research that link exposure to microbes with the development of allergic illness. This theory is called the hygiene hypothesis, which proposes that infections and unhygienic contact might protect against development of allergic illness [4]. One mechanism, which is cited frequently in relation to this hypothesis, is the skewing of the Th1/Th2 balance towards Th1 cells and away from allergy-promoting Th2 cells, under poor hygienic conditions. Microbial contact, and in particular microbial flora, play a crucial role in the maturation of the host’s immune system during the first years of life, favouring the

development of Th1 cell responses [5]. Prebiotics also play an important role in this balance, as they promote selectively the growth of microbiota that is beneficial to health [6].

Glycomacropeptide (GMP), or caseinomacropeptide, is a peptide of 64 amino acid residues obtained from κ -casein hydrolysis by the action of chymosin (rennet) during the process of cheese-making [7–9]. Due to its nutritional value, GMP is currently added to infant formulas [10]. As it has no phenylalanine in its amino acid composition, it is an excellent additive for products to be consumed by individual with phenylketonuria [11]. GMP is also considered to be one of the biologically active components of the milk [12,13]. It is included in toothpastes because of its anti-cariogenic properties [14]. Prebiotic effects have been attributed to GMP, as it can promote the growth of bifidobacteria and lactobacilli *in vitro* [15,16]. This peptide also has immunoregulatory functions, as some *in vitro* studies have described that GMP inhibits mouse splenocyte proliferation induced by lipopolysaccharide and phytohaemagglutinin [17], suppresses expression of interleukin (IL)-2 receptor on mouse CD4⁺ T cells [18], induces expression of an IL-1 receptor antagonist-like component in mouse spleen cells [19] and inhibits serum IgG antibody production by mouse lymphocytes [20]. In models of colitis and ileitis induced with trinitrobenzene sulphonic acid in rats, GMP was reported to have an anti-inflammatory effect [21,22], acting at least in part on lymphocytes [10].

The aim of this study was to investigate whether oral pretreatment with GMP can influence the development of allergic disease. We further examined the effect of GMP on the severity of immediate cutaneous hypersensitivity reactions and of anaphylaxis.

Materials and methods

Animals

Male Wistar rats (150–180 g) obtained from the Laboratory Animal Service of the Autonomous University of Aguascalientes were used throughout the study. Rats were housed under controlled conditions of temperature (22–24°C) and illumination (12 h light cycle), and maintained with Rodent Laboratory Chow 5001 and tap water *ad libitum*. All experiments were carried out with strict adherence to ethical guidelines approved by the Institutional Normative Welfare Standards.

Experimental design

Rats were assigned randomly to three different groups: sham (SH), sensitized without ovalbumin (OVA) and not GMP-treated; sensitized (S), OVA-sensitized and not GMP-treated; and sensitized with treatment (ST), OVA-sensitized and GMP-treated. Group ST was administered GMP (Lacprodan® CGMP-10; Arla Foods Amba, Viby,

Denmark) orally 500 mg/kg/day dissolved in tap water from 3 days before sensitization to the final of the study, whereas groups SH and S were administered tap water only. An oesophageal catheter was used to deliver GMP solution or water.

Protocol for induction of experimental OVA sensitization

OVA sensitization of rats has been described previously [23]. Briefly, animals from the S and ST groups were sensitized (day 0) with an intramuscular (i.m.) injection of 1 mg of OVA (Grade V; Sigma, St Louis, MO, USA) precipitated in 7.8 mg of aluminium hydroxide gel in 1 ml of saline solution. Simultaneously, and as adjuvant, 0.5 ml of *Bordetella pertussis* vaccine (Zuvirac, Mexico DF, Mexico) containing $10\text{--}15 \times 10^9$ heat-killed bacilli/ml was injected subcutaneously (s.c.). A booster sensitization was given 7 days later. SH rats were injected with aluminium hydroxide gel and the vaccine, but without OVA. Serum was collected from each rat at days 0, 7, 14 and 21 of sensitization and stored at –20°C until used to titrate IgE anti-OVA in the samples.

Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) reaction for OVA-specific IgE titre in serum

Sera from SH, S and ST rats were analysed individually by PCA. Male Wistar rats weighing 500 g were anaesthetized with ether and the dorsal skin shaved. Fifty microlitres of each serum diluted 1:256, 1:128, 1:64, 1:32, 1:16, 1:8, 1:4 and 1:2 were injected intradermally (i.d.) in the dorsal skin. Twenty-four hours later the rats were anaesthetized and injected i.d. with 50 μ l of saline solution and histamine (2 μ g) as negative and positive controls, respectively. The rats were then challenged by intravenous (i.v.) (jugular) injection of 2 mg of OVA and Evans blue (34 mg/kg) in 3% saline solution. After 30 min, the animals were killed by anaesthesia overdose. The skin was inverted and the response, in terms of the infiltration of the blue dye rings around the injection sites, was read by measuring the largest and orthogonal diameters of each blue area using a digital vernier. The titre of the anti-OVA IgE antibody was expressed as the highest dilution causing a lesion more than 5 mm in diameter [24].

Spleen cells isolation

Spleens were removed aseptically from rats on day 14 of sensitization. Organs were perfused with cold saline solution and the cell suspension centrifuged at 212 g for 10 min at 10°C. The cell suspension was depleted of erythrocytes by incubation in hypotonic lysis buffer (0.17 M Tris, 0.15 M NH₄Cl, pH 7.2) for 5 min on ice, washed twice in saline solution by centrifugation and the obtained pellet was suspended in RPMI-1640 without phenol red (Sigma-Aldrich),

supplemented with 5% fetal calf serum (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich). Cell viability was quantified in a haemocytometer using the Trypan blue exclusion assay. Only those preparations with a purity $\geq 90\%$ and a viability $\geq 98\%$ were used. Spleen cell suspensions were plated in triplicate into 96-well flat-bottomed plates (Costar, Cambridge, MA, USA) at a concentration of 2×10^5 cells in 100 μl of supplemented RPMI medium/well for cell proliferation and cytokine assays.

Cell proliferation assay

To detect lymphocyte proliferation, the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) technique was used [25]. Spleen cells were stimulated with 0.1, 0.5 and 2.0 mg/ml of OVA at 37°C under an atmosphere of 5% CO₂. Concanavalin A (ConA, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or culture medium was used as positive and negative controls, respectively. All assays were performed in triplicate. After 96 h, 10 μl of MTT (Sigma-Aldrich) solution (5 mg/ml) was added to each well and the cells were incubated further for 4 h. Then, the purple formazan crystals were solubilized with 0.04 N hydrochloride (HCL) in isopropyl alcohol, plates were mixed thoroughly and read at 595 nm on a microplate reader (Bio-Rad, Tokyo, Japan). The stimulation index (SI) was defined as the ratio of optical density of the test sample to that of the control sample.

Cytokine determination

Spleen cell suspensions were cultured in triplicate for 96 h in the presence of OVA at 37°C under an atmosphere of 5% CO₂. ConA (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or culture medium were used as positive and negative controls, respectively. Supernatants were taken and stored at -80°C until analysed. The levels of IL-10 and IL-13 were measured according to the manufacturer's protocol with commercially available rat enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Invitrogen Co., Camarillo, CA, USA).

Intradermal skin test

Rats were tested for immediate cutaneous hypersensitivity by the i.d. skin test. Reactions were elicited in the shaved dorsal skin of rats at day 14 of sensitization. Animals were injected i.d. in triplicate with different OVA amounts dissolved in 0.05 ml of sterile saline solution. A similar volume of saline and histamine (2 μg) solutions were injected as negative and positive controls, respectively. Immediately, an i.v. injection of Evans Blue (34 mg/kg) in 3% saline was performed. Thirty min after OVA challenge, rats were killed and equal areas from the injected sites (blue spots) were removed with a hollow punch and the amount of dye in the tissue samples was determined colorimetrically after dye extraction with

1 ml of 1.0 N KOH and 9 ml of a mixture of acetone and 0.6 N phosphoric acid (5:13). The amount of extravasated dye was determined by measuring absorbance at 620 nm and using a standard curve (0.1 to 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Evans blue). Negative control value was subtracted from each experimental value, obtained from the same animal, to normalize data.

Systemic anaphylaxis test

Rats were tested for anaphylactic shock by i.v. OVA (1 mg) injection at day 14 of sensitization. Allergen was injected through a catheter inserted previously into the jugular vein. Animals were challenged with OVA 2 h after surgery to be completely recovered. Shock was scored by the following scoring system [26]: 0, no sign of shock; 1, scratching and rubbing around the nose and head; 2, less activity or standing still with an increasing respiratory rate or puffing around the eyes; 3, asthmoid respiration, cyanosis around the mouth and the tail; 4, slight or no activity after prodding or tremor and convulsion; and 5, death. Mortality was monitored for 1 h after induction of anaphylactic shock. At the same time that signs were scored, rectal temperature was measured with a digital thermometer (model CT-513W; Citizen Systems, Nishi-Tokyo-Ski, Tokyo, Japan) just before challenge and every 10 min for 1 h. Changes in the temperature were expressed as time-course changes.

Statistical analysis

The data are presented as mean values \pm standard error of the mean. Statistical analysis was performed by Student's *t*-test. Survival rate data were analysed by χ^2 test. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$.

Results

Reduction of allergen-specific IgE synthesis by GMP administration

To investigate the question of whether oral intake of GMP can modify the development of an allergic response, rats were sensitized by a first OVA/alum i.m. injection in combination with *B. pertussis* s.c and a second OVA/alum i.m. injection without *B. pertussis* (Fig. 1a). Blood samples were taken before and after GMP administration and OVA-specific IgE antibody levels were measured in sera by PCA reaction (Fig. 1b). Sera from all animals before sensitization were negative to PCA, indicating that animals were not sensitized previously to OVA and had no IgE antibodies cross-reacting to OVA that could generate false-positive reactions. OVA-specific IgE titres of sensitized animals exhibited a slight rise at day 7, increased rapidly to maximum level at day 14 and declined rapidly at day 21 (Fig. 1c). The titres of OVA-specific IgE in GMP-treated rats showed a slight rise at

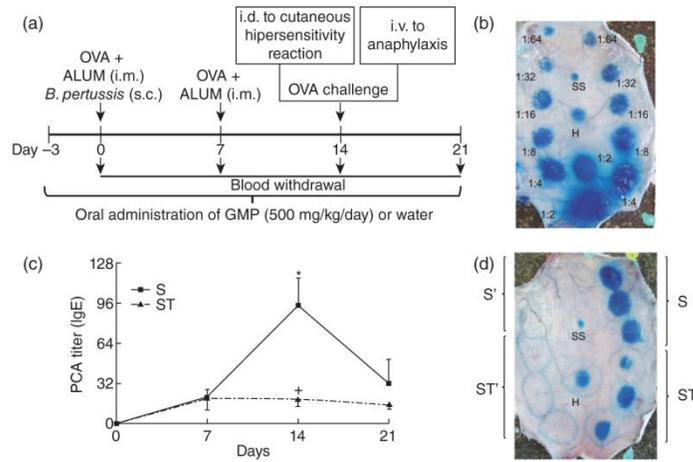


Fig. 1. Treatment with glycomacropeptide (GMP) before sensitization reduced immunoglobulin (IgE) titres in sera from ovalbumin (OVA)-sensitized rats. (a) Experimental protocol. A rat model of OVA sensitization was used to test the effect of GMP administration in the development and manifestation of allergy. Rats were sensitized on day 0 with an intramuscular (i.m.) injection of 1 mg of OVA precipitated in 7.8 mg of aluminium hydroxide (ALUM) gel in 1 ml of saline solution. Simultaneously, 0.5 ml of *Bordetella pertussis* vaccine was injected subcutaneously (s.c.). A booster sensitization of OVA/ALUM was injected 7 days later. Rats were challenged with OVA on day 14 to develop cutaneous hypersensitivity reactions or anaphylaxis. (b) Photograph of dorsal inner skin reactions generated by increasing twofold dilutions of two sera from OVA-sensitized rats titrated by passive cutaneous anaphylaxis (PCA) reaction. Saline (SS) and histamine (H) solutions were used as negative and positive controls of PCA reaction. (c) Titres of OVA-specific serum IgE before, during and after OVA sensitization. PCA titres represent the reciprocal of the highest dilution of serum which gave a lesion >5 mm in diameter. Values represent the mean \pm standard error of the mean, $n = 10$ in S and $n = 13$ in ST. * $P < 0.001$ compared to days 7 and 21 in S and * $P < 0.01$ compared to day 14 in S. (d) Inactivation of immune sera from sensitized animals. Sera were heated 56°C for 1 h to inactivate IgE. PCA reactions were developed with samples of serum (diluted 1 : 2 in saline solution) from three OVA-sensitized animals (S), three OVA-sensitized and treated animals (ST) and from the same animals but previously inactivated (S', ST'). Saline (SS) and histamine (H) solutions were used as negative and positive controls of PCA test.

day 7, similar to that reported in sensitized animals, but titres were uncharged thereafter. At day 14, the day with the maximum peak in IgE anti-OVA titre during sensitization, GMP treatment led to a profound and significant decrease of allergen-specific IgE antibodies in rats compared to sensitized animals ($P < 0.01$, ST versus S). To confirm that IgE was responsible for the induction of PCA reaction and to exclude an IgG1-mediated response, sera from sensitized animals inactivated previously by heating 56°C for 1 h were analysed by PCA. As shown in Fig. 1d, inactivation of immune sera from sensitized rats (with or without treatment) eliminated the PCA reaction, indicating that IgE was the reagenic antibody mediating PCA reaction. Sera from sham animals were negative to PCA throughout the study.

OVA-specific proliferative response is inhibited by GMP administration

To determine the effect of GMP on the lymphocyte proliferative response, spleen cells were prepared from sensitized animals at day 14 of sensitization, and cultured with or without antigen or mitogen. As shown in Fig. 2, a marked increase in proliferative response was stimulated by ConA

and OVA in splenocytes isolated from sensitized animals. Oral pretreatment with GMP resulted in a significant inhibition of lymphoproliferative responses to OVA at the three OVA concentrations used. Although spleen cells from GMP-treated rats showed a reduction in levels of proliferation to the mitogen ConA, compared to non-treated animals, the lymphoproliferative response was not abolished totally. After treatment, lymphocyte proliferation to ConA was still significantly greater than that of the control ($P < 0.001$). These results suggest that GMP totally inhibits the lymphocyte proliferation induced by allergen, and only partially when activated by ConA.

GMP administration decreases allergen-induced IL-13 release

Spleen cells obtained from rats at day 14 of sensitization were cultured with OVA or mitogen to detect T cell cytokine responses. As shown in Fig. 3a, high levels of IL-13 and IL-10 were measured in supernatants of OVA-stimulated spleen cell cultures. ConA also had a significant stimulatory effect on IL-13 and IL-10, although production of both cytokines was higher with the antigen. To determine whether GMP

M. Jiménez *et al.*

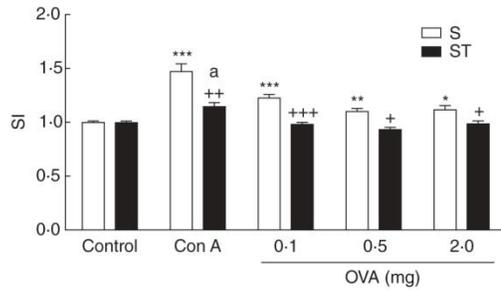


Fig. 2. Glycomacropeptide (GMP) pretreatment inhibited ovalbumin (OVA)-specific lymphocyte proliferative response. Proliferation of spleen cells isolated from sensitized rats in response to OVA (0.1, 0.5 and 2.0 mg/ml) or mitogen concanavalin A (ConA, 1 µg/ml) was assessed by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) technique. Proliferative response of splenocytes in medium alone was used as control. Each value represents the mean \pm standard error of the mean, $n = 24$ in each group (eight independent experiments in triplicate). * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.0005$ compared to control S. * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.0005$ compared to the same condition in S splenocytes. ^a $P < 0.001$ compared to control ST.

administration influences cytokine production by splenocytes *in vitro*, spleen cells isolated from treated animals were stimulated with OVA and mitogen (Fig. 3b) using 2 mg of OVA, because this led to the highest levels of IL-13 and IL-10. Oral pretreatment with GMP resulted in a significant suppression of IL-13 levels in antigen-specific stimulation, without changing IL-13 levels stimulated by mitogen. IL-10 production remained unchanged in GMP-treated animals. The decrease in IL-13 production in GMP-treated rats is in agreement with the finding of reduced levels of serum IgE anti-OVA in these animals.

Pretreatment with GMP attenuates OVA-induced immediate cutaneous hypersensitivity

To investigate whether GMP modifies the intensity of the immediate cutaneous reaction induced by allergen, OVA was injected i.d. in sensitized rats and the magnitude of local hypersensitivity reaction was examined 30 min later. Normalized data of tissue Evans blue amounts indicated the vascular extravasation activated by allergen. It has been demonstrated that intradermal injection of antigens used in sensitization can develop a cutaneous reaction in non-sensitized animals [27]. The dose-response relationships obtained in sham and sensitized rats using twofold dose increments of allergen are shown in Fig. 4a. OVA injection increased vascular permeability in a dose-related manner both in sham and sensitized animals. However, the amount of extravasated Evans blue in sensitized animals was greater than that in sham rats, and this difference was significant at lower OVA concentrations (from 3.9 to 31.2 µg). Thus, active cutaneous

anaphylaxis was developed by intradermal injections of 15.6 and 31.2 µg of OVA in sham, sensitized and GMP-treated sensitized animals (Fig. 4b). High levels of colorant were extravasated in sensitized animals to both OVA stimuli. GMP treatment decreased significantly to half the amount of extravasated Evans blue induced by allergen (Fig. 4c). These data indicate that GMP pretreatment before OVA sensitization inhibited the development of OVA-induced immediate cutaneous hypersensitivity. To study whether GMP blocks mast cell activation, immediate cutaneous reaction was developed in non-sensitized rats treated with or without GMP by intradermal injection of compound 48/80 (C48/80, 50 µg/50 µl of saline solution). Three days before C48/80 injection rats were separated into two groups to be administered orally with GMP or water. GMP did not show any effect on vascular permeability induced by C48/80, as GMP-treated and non-treated rats extravasated an equal amount

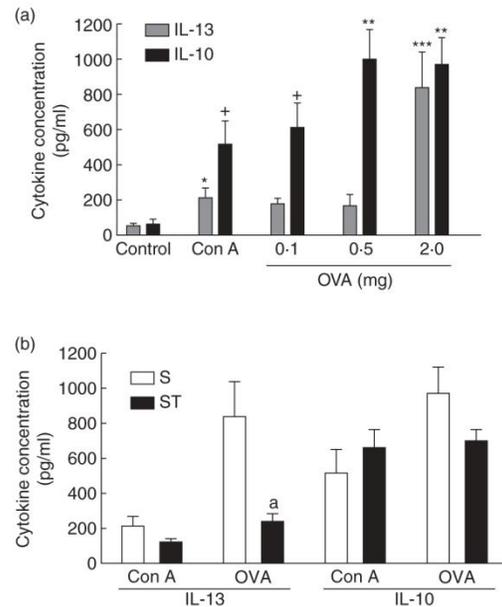


Fig. 3. Glycomacropeptide (GMP) pretreatment suppressed ovalbumin (OVA)-specific interleukin (IL)-13 production in spleen cell cultures from sensitized animals. (a) T cell cytokines (IL-13 and IL-10) production in spleen cell cultures from OVA-sensitized rats. Splenocytes were cultured with OVA (0.1, 0.5 and 2.0 mg/ml) or mitogen concanavalin A (ConA, 1 µg/ml). (b) Comparative production of T cell cytokines in splenocyte cultures from OVA-sensitized rats with and without GMP-treatment. Splenocytes were stimulated with OVA (2.0 mg/ml) or mitogen ConA (1 µg/ml). In all assays cytokine levels were determined in supernatants after 96 h of stimulation by enzyme-linked immunosorbent assay. Each value represents the mean \pm standard error of the mean, $n = 3$ spleens. * $P < 0.05$; ^a $P < 0.01$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.001$ compared to control of each cytokine. ^a $P < 0.001$ compared to IL-13 in S animals.

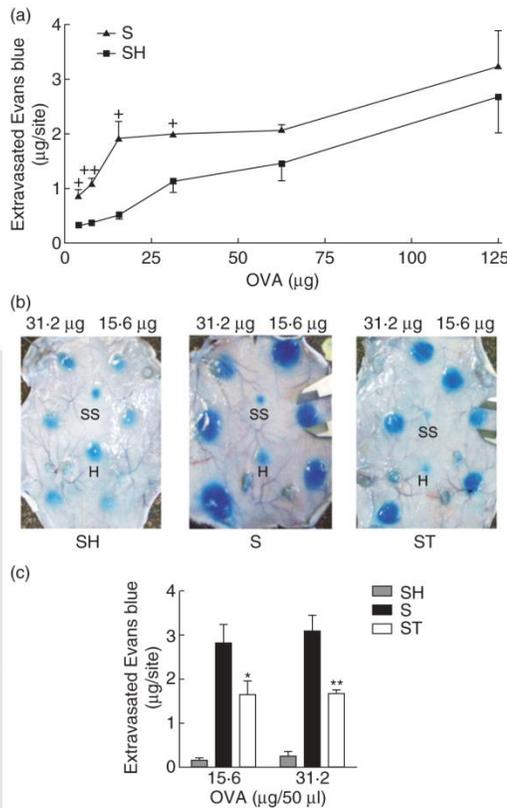


Fig. 4. Pretreatment with glycomacropeptide (GMP) reduced the intensity of immediate cutaneous reaction induced by ovalbumin (OVA) in sensitized animals. (a) Vascular extravasation induced by injection of increasing doses of OVA in sham and sensitized rats. OVA was injected at 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5 and 125.0 µg/50 µl of saline solution. Evans blue extravasated in each cutaneous reaction was calculated colorimetrically. Each value represents the mean ± standard error of the mean, $n = 4$. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ compared to the same condition in SH. (b) Photographs of dorsal inner skin reactions generated by intradermal injection of 15.6 µg (three blue spots at the right of SS) and 31.2 µg (three blue spots at the left of SS) of OVA/50 µl of saline solution in sham (SH), OVA-sensitized (S) and OVA-sensitized and GMP-treated (ST) rats. Saline (SS) and histamine (H) solutions were used as negative and positive controls. (c) Evaluation of vascular extravasation generated in immediate cutaneous reactions to OVA. The amount of Evans blue dye extravasated in the skin of SH, S and ST rats was calculated. Each value represents the mean ± standard error of the mean, $n = 12$ (four independent experiment in triplicate). * $P < 0.01$; ** $P < 0.001$ compared to S.

of colorant (2.27 ± 0.53 and 2.77 ± 0.15 µg/site of Evans blue, respectively, $n = 8$). These results indicate that GMP pretreatment does not modify the cutaneous reaction induced by mast cell activation in rats.

GMP administered orally protects from allergen-induced systemic anaphylaxis

To study the effect of GMP administration on anaphylaxis, the severity (score) of the response, changes in rectal temperature and rate of survival were monitored after intravenous challenge of sensitized rats with OVA. As shown in Fig. 5a, all rats in the sham group exhibited no signs of shock (score 0, 81.81%) or scratching and rubbing around the nose and head (score 1, 18.18%). The mean score was 0.18 (range: 0–1). Sensitized animals showed the highest degrees of severity in their signs, as 100% of the rats died of fatal anaphylaxis (mean score 5) during the 60 min following the challenge. However, GMP pretreatment reduced the mean score of sensitized animals significantly to 4.3 (range: 2–5). In GMP-treated group, animals showed signs such as less activity or standing still with an increasing respiratory rate or puffing around the eyes (score 2, 7.7%), asthmoid respiration, cyanosis around the mouth and the tail (score 3, 23.1%) or

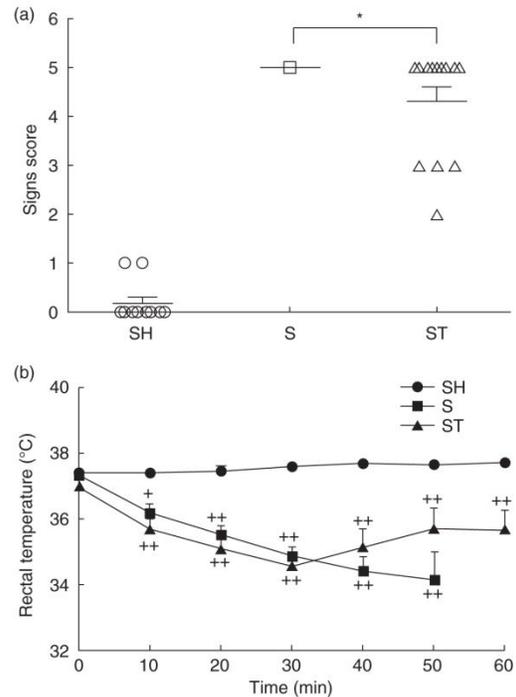


Fig. 5. Inhibitory effect of glycomacropeptide (GMP) pretreatment on allergen-induced systemic anaphylaxis. (a) Anaphylactic sign scores 60 minutes following intravenous ovalbumin (OVA) challenge. Each symbol represents each individual rat. (b) Rectal temperature was measured just before challenge and after every 10 min for 60 min. Values represent the mean ± standard error of the mean, $n = 11$ in SH and S groups and $n = 13$ in ST group. * $P < 0.05$ compared to S. ** $P < 0.01$; ** $P < 0.001$ compared to SH at the same time.

Table 1. Pretreatment with glycomacropeptide (GMP) increases the rate of survival after ovalbumin (OVA)-induced anaphylactic shock in sensitized animals.

Groups	Survival (%) (alive/total)			
	30 min	40 min	50 min	60 min
SH	100% (11/11)	100% (11/11)	100% (11/11)	100% (11/11)
S	72.7% (8/11)	23.27% (3/11)	9.1% (1/11)	0% (0/11)
ST	69.23% (9/13)	30.77% (4/13)	30.77% (4/13)	30.77% (4/13)*

* $P < 0.05$ compared to ovalbumin-sensitized (S) at 60 min analysed by χ^2 test. SH: sham; ST: sensitized with treatment.

died of fatal anaphylaxis (score 5, 69.29%). Rectal temperature showed a pattern in agreement with the score of anaphylactic response. After OVA challenge, rectal temperature in sham rats ranged between 37°C and 38°C, whereas in OVA-sensitized rats temperature was 1–4° below normal (Fig. 5b). There were significant differences in mean temperatures between sham and sensitized animals at 10–50 min after allergen challenge. GMP treatment induced an increase in rectal temperature from 40 to 60 min after OVA challenge, indicating that surviving rats in the GMP-treated group were recovering from the fall in temperature. In relation to the rate of survival (Table 1), sham animals reported a survival of 100% to the challenge with OVA. However, in sensitized rats the percentage of survival was time-decreasing, with 0% of survival 60 min after challenge. GMP pretreatment increased the rate of survival of sensitized animals to 30.77% at 40 min after OVA challenge and was uncharged thereafter. The survival rate of GMP-treated rats was increased significantly compared with sensitized animals at 60 min after OVA challenge ($P < 0.05$). These results demonstrate that pretreatment with GMP was effective in protecting rats from allergen-induced anaphylactic reactions.

Discussion

In the present study, we demonstrate that oral pretreatment with GMP induces a significant reduction in the development of experimental systemic sensitization related to allergy. GMP administration prior to OVA-sensitization strongly decreases the levels of serum antigen-specific IgE, inhibits the proliferative response of splenocytes to OVA and decreases the production of IL-13 stimulated by OVA in cultures of spleen cells from sensitized animals. Also, we show that GMP pretreatment impacts upon the clinical manifestations of immediate cutaneous hypersensitivity by largely reducing the intensity of local inflammatory response. GMP also impairs the systemic anaphylactic response of animals by increasing the survival and decreasing the signs of severe anaphylaxis.

IgE production and Th2 differentiation are clearly essential to the development of allergy [28,29]. In our experimental model, high levels of OVA-specific IgE and IL-13 were quantified, respectively, in serum and supernatants of splenocytes obtained from sensitized animals. These two mol-

ecules are related to each other, as it has been reported that IgE expression can be regulated by IL-13 in mice [30], and in allergic asthma patients elevated levels of IL-13 have been found to correlate with IgE [31]. We show that pretreatment with GMP reduces the levels of IgE specific to antigen significantly when synthesis of IgE is induced experimentally in an allergy model. This result is in line with the inhibitory effect of GMP on IL-13 production that we observed. Previous reports in mice show that a diet supplemented with GMP suppresses the level of serum IgG specific to injected antigens [20]. Taken together, these results demonstrate an immunomodulatory function of dietary GMP in the humoral immune response.

IL-10 is also highly secreted by splenocytes of allergic animals in response to antigen [32,33]. We detected high levels of this cytokine in the supernatant of splenocytes of sensitized animals activated by OVA or by mitogen. IL-10 is a regulatory cytokine secreted by numerous cell types, including Th2 cells, which plays a central role in controlling inflammatory processes [34]. A role for IL-10 in regulation of immune responses to allergens has been demonstrated [35–38]. We showed that IL-10 is not apparently a key element in GMP immunoregulation, as no significant changes in IL-10 synthesis in response to antigen or mitogen were observed after GMP treatment. This is consistent with the evidence that GMP does not affect IL-10 production by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated dendritic cells [39]. Previous studies show that oral GMP administration increases forkhead box protein 3 (FoxP3) expression in splenocytes, indicating a positive effect on regulatory T cell differentiation [10]. Whether other regulatory mechanisms mediated by regulatory T cells, such as transforming growth factor (TGF)- β secretion, anergy and/or cell–cell contact, are involved in the suppressive effect of GMP on allergy development needs to be investigated.

Splenocyte proliferation is intense in the development of adaptive immune response. Inhibition of splenocyte proliferation can be used to demonstrate the suppression of an immune response such as allergic reaction. There are controversial data in relation to the *in vitro* effect of GMP on spleen cell proliferation. GMP has been demonstrated to inhibit mouse splenocyte proliferation induced by mitogens [40,41]. However, recent studies report that GMP enhances ConA-stimulated splenocyte proliferation [10]. Studies *in vivo* have reported that oral administration to mice of a diet

supplemented with GMP enhances the proliferative response of spleen cells to ConA, with no significant changes in LPS and phytohaemagglutinin responses [20]. Our results show that oral administration of GMP inhibits the proliferative response induced by antigen totally, but reduces the response elicited by ConA only partially. These data indicate that suppression induced by GMP on splenocyte proliferation is antigen-specific without altering the general immune function of lymphocytes. Differences in the doses of GMP administered may be the cause of the different results observed *in vivo*, as in the *in vitro* assays [40,41].

Immediate cutaneous reaction is a model for evaluating sensitized skin mast cell activation in response to i.d.-injected specific antigen [42]. We observed that after GMP treatment there is an important decrease in the intensity of the inflammatory reaction induced by antigen in the skin of sensitized rats. Immediate cutaneous reaction involves a process from IgE production to IgE-mediated skin mast cell activation. It is known that concentration of IgE bound to FcεRI can determine the intensity of the reaction developed by mast cell activation [43]. As we observed that GMP does not change the inflammatory response induced by intradermal injection of C48/80, it apparently does not have effects on skin mast cell activation. We propose that the decrease in IgE synthesis caused by GMP reduces the intensity of local inflammatory response in sensitized animals when challenged by antigen.

Experimental systemic anaphylaxis is characterized by hypothermia, scratching, decreased mobility, rapid and potentially reversible hypotension, and finally by death in severe shocks [44]. It is well established that systemic anaphylaxis induced by antigen is mediated mainly by IgE, FcεRI, mast cells and histamine in humans [45]. Recently, it has been suggested that an alternative pathway involving IgG, macrophages, FcγRIII and platelet-activating factor is also developed in mice in response to antigen challenge [44]. The common denominator in all types of systemic anaphylaxis is that mediators released by mast cells, macrophages or other cells in response to antigens are responsible for the development of signs and symptoms of the reaction, although anaphylaxis is also regulated by agents that modify responsiveness to this mediators [44]. The role of IL-13 in the regulation of anaphylaxis reaction has been demonstrated. Data obtained in transgenic mice expressing IL-13 indicate that mice become highly predisposed to anaphylaxis following systemic antigen sensitization [46]. Studies in mice pretreated with IL-13 have demonstrated that these mice develop an anaphylactic shock more severe than non-treated animals due to an increase in sensitivity to vasoactive mediators, predominantly through an effect on vascular endothelium [47]. In our study, GMP pretreatment induces a reduction in the severity of anaphylactic response that becomes evident by the increase in the rate of survival of sensitized animals, the reduction in the mean score of the anaphylactic response and the tendency of animals to

recover from hypothermia. Taken together, these results suggest that one of the main biological actions of GMP to protect from systemic anaphylaxis may be the reduction in IL-13 production. However, although we report that GMP has no effect on mast cell activation, we cannot exclude a possible effect of GMP on other effector cell or mediator that develops or regulates anaphylaxis.

GMP is obtained physiologically in the stomach of neonates and adults by the chymosin digestion of native protein [8,48]. We can also ingest GMP from many commercial foods, such as margarine, yogurt and dietary supplements [49]. However, the intake of GMP by foods is poor. Yogurt provides approximately 0.12–0.15 mg of GMP/ml [49,50], much less than the concentration that we used to obtain an immunomodulatory effect on allergy development. Little is known about the pharmacokinetics of GMP, but two studies have shown previously that after milk or yogurt ingestion it reaches the bloodstream in significant amounts (approximately 1 µg/ml) and the concentration remains relatively stable for at least 8 h. In addition, GMP is detected in the duodenum shortly after milk or yogurt intake [51,52]. Therefore, the protective effect of GMP on allergy development and on the severity of immediate allergic reactions may be due to luminal and/or systemic actions. In addition to the previously mentioned systemic mechanisms, GMP may also protect from allergy by prebiotic effects. GMP has growth-promoting effects on *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains, as demonstrated by other investigators [15,16,53]. The possible role of probiotics on preventing allergic diseases is still controversial [54]. However, there are strong data indicating a beneficial role of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains in atopic diseases by the modulation of Th1/Th2 response to allergens, the activation of tolerogenic dendritic cells or the production of regulatory T cells [54]. In future experiments we plan to assess the hypothesis of prebiotic effects of GMP modulating the allergic response.

In summary, we found that GMP possesses a prophylactic effect in the development of allergy. This effect is associated with down-regulation of the specific IgE levels, T cell proliferative response and IL-13 production. In addition, GMP pretreatment protects from the severity of immediate cutaneous reaction and anaphylaxis induced by antigen. Because type I immediate disorder is a multi-factorial allergic disease that involves both humoral and cellular elements, we speculate that GMP probably possesses many actions that may regulate various immune components involved in allergic response. This study provides the first experimental basis for the therapeutic potential of GMP in the regulation of allergy.

Acknowledgements

This work was supported by grants PIBB 11-2 and 129872 from the Autonomous University of Aguascalientes and CONACyT, respectively. Mariela Jiménez has a doctoral fellowship from CONACyT. The authors wish to thank Dr

M. Jiménez *et al.*

Kalman Kovacs and Dr Istvan Berczi for reviewing the paper, Karla Macías and Renata Roldán for excellent technical assistance and MVZ José Luis Ponce for providing the animals for the study.

Disclosure

The authors confirm that there are no conflicts of interest.

References

- 1 Pawankar R, Holgate ST, Canonica GW, Lockey RF. WAO white book on allergy. Milwaukee, WI, USA: Word Allergy Organization, 2011.
- 2 Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature* 2008; **454**:445–54.
- 3 Weller CL, Collington SJ, Williams T, Lamb JR. Mast cells in health and disease. *Clin Sci (Lond)* 2011; **120**:473–84.
- 4 Schaub B, Lauener R, von Mutius E. The many faces of the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol* 2006; **117**:969–77.
- 5 Sironi M, Clerici M. The hygiene hypothesis: an evolutionary perspective. *Microbes Infect* 2010; **12**:421–27.
- 6 Michail S. The role of probiotics in allergic diseases. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2009; **5**:1–5.
- 7 Eigel WN, Butler JE, Ernstrom CA *et al.* Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. *J Dairy Sci* 1984; **67**:1599–631.
- 8 Brody P. Biological activities of bovine glycomacropeptide. *Br J Nutr* 2000; **84**:S39–46.
- 9 Farrell HM, Jimenez-Flores R, Bleck GT *et al.* Nomenclature of the proteins of cow's milk – sixth revision. *J Dairy Sci* 2004; **87**:1641–74.
- 10 Requena P, González R, López-Posadas R *et al.* The intestinal anti-inflammatory agent glycomacropeptide has immunomodulatory actions on rat splenocytes. *Biochem Pharmacol* 2010; **79**:1797–804.
- 11 Lim K, van Calcar SC, Nelson KL, Gleason ST, Ney DM. Acceptable low-phenylalanine foods and beverages can be made with glycomacropeptide from cheese whey for individuals with PKU. *Mol Genet Metab* 2007; **92**:176–8.
- 12 Saito T, Itoh T. Variations and distributions of O-glycosidically linked sugar chains in bovine k-casein. *J Dairy Sci* 1992; **75**:1768–74.
- 13 Thomä-Worringer C, Sørensen J, López-Fandiño R. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *Int Dairy J* 2006; **16**:1324–33.
- 14 Aimutis WR. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *J Nutr* 2004; **134**:S989–95.
- 15 Idota T, Kawakami H, Nakajima I. Growth-promoting effects of N-acetylneuraminic acid-containing substances of *Bifidobacteria*. *Biosci Biotech Biochem* 1994; **58**:1720–2.
- 16 Bezkorovainy A, Grohlich D, Nichols JH. Isolation of a glycopolypeptide fraction with *Lactobacillus bifidus* subspecies *pennsylvanicus* growth-promoting activity from whole human milk casein. *Am J Clin Nutr* 1979; **32**:1428–32.
- 17 Otani H, Monnai M. Induction of an interleukin-1 receptor antagonist-like component produced from mouse spleen cells by bovine k-caseinoglycopeptide. *Biosci Biotech Biochem* 1995; **59**:1166–8.
- 18 Otani H, Horimoto Y, Monnai M. Suppression of interleukin-2 receptor expression on mouse CD4⁺ T cells by bovine kappa-caseinoglycopeptide. *Biosci Biotech Biochem* 1996; **60**:1017–9.
- 19 Monnai M, Otani H. Effect of bovine k-caseinoglycopeptide on secretion of interleukin-1 family cytokines by P388D1 cells, a line derived from mouse monocyte/macrophage. *Milchwissenschaft* 1997; **52**:192–6.
- 20 Monnai M, Horimoto Y, Otani H. Immunomodulatory effect of dietary bovine k-caseinoglycopeptide on serum antibody levels and proliferative responses of lymphocytes in mice. *Milchwissenschaft* 1998; **53**:129–32.
- 21 Daddaoua A, Puerta V, Zarzuelo A, Suárez MD, Sánchez de Medina F, Martínez-Augustín O. Bovine glycomacropeptide is anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J Nutr* 2005; **135**:1164–70.
- 22 Requena P, Daddaoua A, Martínez-Plata E *et al.* Bovine glycomacropeptide ameliorates experimental rat ileitis by mechanisms involving downregulation of interleukin 17. *Br J Pharmacol* 2008; **154**:825–32.
- 23 Dai Y, Hou LF, Chang YP, Cheng L, Butt PPH. Inhibition of immediate allergic reactions by ethanol extract from *Plumbago zeylanica*. *Stem Biol Pharm Bull* 2004; **65**:429–32.
- 24 Costa HF, Bezerra-Santos CR, Barbosa-Filho JM, Martins MA, Piuvezam MR. Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, decreases immediate allergic and thermal hyperalgesic reactions in sensitized animals. *Int Immunopharmacol* 2008; **8**:519–25.
- 25 Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; **65**:55–63.
- 26 Li XM, Wang QF, Schofield B, Lin J, Huang SK, Wang Q. Modulation of antigen-induced anaphylaxis in mice by a traditional Chinese medicine formula, Guo Min Kang. *Am J Chin Med* 2009; **37**:113–25.
- 27 Church MK. Correlation of anaphylactic bronchoconstriction with circulating reaginic antibody level and active cutaneous anaphylaxis in the rat. *Immunology* 1975; **29**:527–34.
- 28 Ishizaka K, Ishizaka T, Kishimoto T, Okudairn H. Biosynthesis of IgE antibodies and mechanisms of sensitization. In: Brent IL, Holborow J, eds. *Progress in immunology II, clinical aspects*. Amsterdam: Elsevier North-Holland, 1974:7–17.
- 29 Okoye IS, Wilson MS. CD4⁺ T helper 2 cells – microbial triggers, differentiation requirements and effector functions. *Immunology* 2011; **134**:368–77.
- 30 McKenzie GJ, Emson CL, Bell SE *et al.* Impaired development of Th2 cells in IL-13-deficient mice. *Immunity* 1998; **9**:423–32.
- 31 Van der Pouw Kraan TC, Van der Zee JS, Boeijs LC, De Groot ER, Stapel SO, Aarden LA. The role of IL-13 in IgE synthesis by allergic asthma patients. *Clin Exp Immunol* 1998; **111**:129–35.
- 32 Gerhold K, Blümchen K, Bock A *et al.* Endotoxins prevent murine IgE production, Th2 immune responses, and development of airway eosinophilia but not airway hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 2002; **110**:110–6.
- 33 Perrier C, Thierry AC, Mercienier A, Corthésy B. Allergen-specific antibody and cytokine responses, mast cell reactivity and intestinal permeability upon oral challenge of sensitized and tolerized mice. *Clin Exp Allergy* 2010; **40**:153–62.
- 34 Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. The family of IL-10-secreting CD4⁺ T cells. *Adv Immunol* 2011; **105**:99–130.
- 35 Moore KW, de Waals Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; **19**:683–765.
- 36 Akkoc T, Eifan AO, Aydogan M, Ozkara S, Bachceciler NN, Barlan IB. Transfer of T cells from intranasal ovalbumin-immunized mice

- ameliorates allergic response in OVA-sensitized recipient mice. *Allergy Asthma Proc* 2008; **29**:411–6.
- 37 Hawrylowicz CM, O'Garra A. A potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**:271–83.
- 38 Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**:523–32.
- 39 Mikkelsen TL, Bakman S, Sørensen ES, Barkholt V, Frøkiær H. Sialic acid-containing milk proteins show differential immunomodulatory activities independent of sialic acid. *J Agric Food Chem* 2005; **53**:7673–80.
- 40 Otani H, Monnai M, Hosono A. Bovine κ -casein as inhibitor of the proliferation of mouse splenocytes induced by lipopolysaccharide stimulation. *Milchwissenschaft* 1992; **47**:512–15.
- 41 Otani H, Hata I. Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes and rabbit Peyer's patch cells by bovine κ -caseinoglycopeptide. *J Dairy Res* 1995; **62**:339–48.
- 42 Inagaki N, Nagai H. Analysis of the mechanism for the development of allergic skin inflammation and the application for its treatment: mouse models for the development of remedies for human allergic dermatitis. *J Pharmacol Sci* 2009; **110**:251–9.
- 43 Gonzalez-Espinosa C, Odom S, Olivera A *et al*. Preferential signaling and induction of allergy-promoting lymphokines upon weak stimulation of the high affinity IgE receptor on mast cells. *J Exp Med* 2003; **197**:1453–65.
- 44 Finkelman FD. Anaphylaxis: lessons from mouse models. *J Allergy Clin Immunol* 2007; **120**:506–15.
- 45 Simons FER. Anaphylaxis: recent advances in assessment and treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2009; **124**:625–36.
- 46 Fallon PG, Emson CL, Smith P, McKenzie ANJ. IL-13 overexpression predisposes to anaphylaxis following antigen sensitization. *J Immunol* 2001; **166**:2712–16.
- 47 Strait RT, Morris SC, Smiley K, Urban JF, Finkelman FD. IL-4 exacerbates anaphylaxis. *J Immunol* 2003; **170**:3835–42.
- 48 Zimeki M, Kruzel ML. Milk-derived proteins and peptides of potential therapeutic and nutritive value. *J Exp Ther Oncol* 2007; **6**:89–106.
- 49 Chavez NA, Salinas E, Jáuregui J, Palomares LE, Macías K. Detection of bovine milk adulterated with cheese whey by Western blot immunoassay. *Food Agric Immunol* 2008; **19**:265–72.
- 50 Abd El-Salam MH. Separation of casein glycomacropeptide from whey: methods of potential industrial applications. *Int J Dairy Res* 2006; **1**:93–9.
- 51 Chabance B, Jollés P, Izquierdo C *et al*. Characterization of an antithrombotic peptide from kappa-casein in newborn plasma after milk ingestion. *Br J Nutr* 1995; **73**:583–90.
- 52 Chabance B, Marteau P, Rambaud JC *et al*. Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie* 1998; **80**:155–65.
- 53 Yakave T, Kawakami H, Idota T. Growth stimulation agent for bifidus and lactobacillus. Japanese patent 1994, 07-267866.
- 54 Özdemir Ö. Various effects of different probiotic strains in allergic disorders: an update from laboratory and clinical data. *Clin Exp Immunol* 2011; **160**:295–304.

