

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Estandarización de un modelo murino de alergia a caseínas bovinas y ovoalbúmina para la evaluación del efecto de la suplementación con probióticos sobre la despolarización de la respuesta alérgica



Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

*"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"*

Jesús Gilberto Arámburo Gálvez

Hermosillo, Sonora

Agosto de 2018

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DEDICATORIA

En memoria del Dr. Norberto Sotelo Cruz

A mi madre por haberme apoyado incondicionalmente en todo momento, por sus consejos, sus valores y por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mi familia por todo el apoyo y motivación incondicional que siempre me han brindado.

A mi novia Laura por su apoyo, amor y motivación.

Y especialmente a Dios por ser mi fortaleza y permitirme culminar esta etapa de mi vida

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora y al Posgrado de Maestría en Ciencias de la Salud por mi formación académica.

A la Consejo Nacional de Ciencia Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención otorgada durante el tiempo que estuve cursando el posgrado.

Al proyecto 240300 de la convocatoria de investigación básica SEP-CONACyT CB-2014-01 titulado: “Estudio del efecto de las caseínas alfa bovinas tratadas térmicamente y la suplementación con probióticos sobre la respuesta inmune alérgica en un modelo murino de a alergia alimentaria”.

A mis directores y codirectores de tesis el Dr. Norberto Sotelo Cruz, el Dr. Francisco Cabrera Chávez y la Dra. Verónica López Teros, por sus enseñanzas, confianza, paciencia y tiempo invertido en mí para culminar este trabajo.

A mis asesores académicos: Dra. Adriana Garibay Escobar, Dr. Noé Ontiveros Apodaca, por sus acertados comentarios, revisiones y opiniones brindados a lo largo de mi formación.

A los profesores del posgrado por su dedicación y empeño en mi formación académica.

A mis compañeros y amigos de clases Héctor, teresita, thania y victor por todo su apoyo y compañía.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Feliznando, Giovanni, Eduardo, Aristeo, Jesús, Anna, Jorge y Oscar por su apoyo brindado en los ensayos de laboratorio.

A la M.A. Denia Abril Montes por su apoyo en los ajustes de formato de la presente tesis.

ÍNDICE

FORMA DE APROBACIÓN DEL JURADO CALIFICADOR.....	ii
AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA	iv
LISTA DE FIGURAS	viii
OBJETIVOS.....	xi
Objetivo General.....	xi
Objetivos Específicos	xi
RESUMEN.....	xii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	3
Alergia Alimentaría	3
Prevalencia de Alergia Alimentaría.....	3
Alergia a la Leche Bovina	7
Alergia al Huevo	9
Patogénesis de la Alergia Alimentaria	9
Probióticos y Alergia Alimentaria	13
Colonización Bacteriana del Tracto Gastrointestinal	13
Probióticos, Prebióticos y Simbióticos.....	15
Uso de Probióticos para Prevenir o Tratar la Alergia Alimentaria.....	16
Mecanismos Propuestos de la Acción de los Probióticos en la Patogénesis de las Alergias Alimentarias Mediadas por IgE	18
Metabolitos Microbianos y la Inducción de Tolerancia	19
Despolarización de Respuestas de Tipo Th2 a Th1	20
Uso de Modelos Animales Para la Investigación de los Principales Alérgenos Asociados con Alergia Alimentaria	21
Modelos Murinos de Alergia Alimentaria	22
Justificación	26

Hipótesis.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
Animales y Aspectos Éticos.....	27
Evaluación de Cambios de pH en Fluido Gástrico Simulado Después de la Adición de Sales de Hank's + NaHCO ₃ 7.5% y Sucralfato	27
Ensayo de Digestibilidad de Caseínas en FGS pH de 1.2 y Condiciones Alcalinas (pH 8.1)	29
Electroforesis SDS-PAGE de Caseínas	33
Fijación y Tinción de Geles SDS-PAGE	34
Sensibilización Oral a Proteínas Alimentarias	34
Sensibilización Intraperitoneal a Alérgenos Alimentarios (Caseína y Ovoalbúmina)	36
Toma de Muestra de Sangre y Sacrificio de Animales	36
Reto Oral con el Alérgeno	36
Evaluación de mMCP-1 en Suero	38
Evaluación de Anticuerpos IgE por Ensayos de Inmunoadsorción Ligado a Enzimas.....	39
Evaluación de Viabilidad del Probiótico VSL#3 y Pruebas de Reto de Crecimiento con la Biota Intestinal del Ratón	40
Análisis Estadístico.....	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
Evaluación de Cambios de pH de Fluido Gástrico Simulado.....	42
Digestibilidad de Caseínas en Fluido Gástrico Simulado	47
Sensibilización Oral a Proteínas Alimentarias en Ratones BALB/c	52
Sensibilización Intraperitoneal a Proteínas Alimentarias	59
Evaluación de mMCP-1 en Suero de Ratones BALB/c Sensibilizados de Manera Intraperitoneal a Ovoalbúmina.....	64
Evaluación de Viabilidad del Probiótico VSL#3 y Pruebas de Reto de Crecimiento con la Biota Intestinal del Ratón.	66

CONCLUSIONES	70
BIBLIOGRAFÍA.....	71
ANEXOS	92

LISTA DE TABLAS

Tablas		Página
I	Reactivos y procesos utilizados para el ensayo de digestión con pepsina.....	30
II	Ingredientes para la preparación de los geles de apilamiento y de resolución.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estudios poblacionales de prevalencia de alergia alimentaria realizados alrededor del mundo.....	5
2	Fase de sensibilización en el desarrollo de alergia alimentaria mediada por IgE.....	11
3	Fase efectora en el desarrollo de alergia alimentaria mediada por IgE.....	12
4	Evaluación de cambios de pH en FGS.....	28
5	Ensayos de digestión de caseína con pepsina en condiciones fisiológicas y alcalinas.....	31
6	Protocolo de sensibilización intragástrica.....	35
7	Protocolo de sensibilización intraperitoneal de 35 días.....	37
8	Evaluación de cambios de pH de FGS después de la adición de tres diferentes soluciones.....	44
9	Evaluación del efecto dosis-dependiente en los cambios de pH de fluido gástrico simulado después de la adición de diferentes concentraciones de Sales de Hank's + NaHCO ₃ 7.5%.....	46
10	Gel de electroforesis al 15% con muestras de digestión de caseínas tomadas a diferentes puntos de tiempo en condiciones fisiológicas (pH 1.2).....	49
11	Gel de electroforesis al 15% con muestras de digestión de caseínas en fluido gástrico simulado en un pH alcalino (pH ≥ 8.0) tomadas a diferentes puntos de tiempo.....	50
12	Sensibilización oral a caseínas bovinas en ratones BALB/c.....	54
13	Sensibilización oral a ovoalbúmina en ratones BALB/c.....	55

14	Evaluación de anticuerpos IgE específicos a caseínas bovinas en suero de ratones BALB/c sometidos a un protocolo de sensibilización intraperitoneal.....	60
15	Evaluación de anticuerpos IgE específicos ovoalbúmina en suero de ratones BALB/c sometidos a un protocolo de sensibilización intraperitoneal.....	62
16	Evaluación de mMCP-1 en suero de ratones sensibilizados de manera intraperitoneal a ovoalbúmina sometidos a un reto intragástrico.....	65
17	Evaluación de viabilidad del probiótico VSL#3 y retos de crecimiento con biota intestinal del ratón.....	69

OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar un modelo de sensibilización a caseínas bovinas y ovoalbúmina en ratones BALB/c para evaluar la despolarización de la respuesta alérgica con probióticos

Objetivos Específicos

- 1.- Sensibilizar de forma intragástrica a caseínas bovinas y ovoalbúmina mediante el uso de sucralfato a ratones BALB/c.
- 2.- Evaluar la fase efectora del modelo de sensibilización mediante la medición del marcador mMCP-1 en animales retados con el alérgeno.
- 3.- Evaluar el efecto de la suplementación con probióticos sobre la respuesta sistémica de hipersensibilidad, temperatura corporal, y niveles séricos de mMCP-1 en ratones BALB/c sensibilizados con caseínas bovinas.

RESUMEN

Antecedentes: Las proteínas de la leche bovina (caseínas) y el huevo (ovoalbúmina) son dos de las principales proteínas desencadenantes de las alergias alimentarias. La suplementación con probióticos podría representar una alternativa para acelerar la adquisición de tolerancia en los niños afectados; sin embargo, se carece de un modelo murino de alergia a caseínas y ovoalbúmina que permita su evaluación. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un modelo de sensibilización a caseínas bovinas y ovoalbúmina en ratones BALB/c que permita evaluar la respuesta alérgica. **Metodología:** Se realizaron ensayos de digestibilidad de caseína con pepsina en fluido gástrico en condiciones ácidas y alcalinas (pH 1.2 y 8.0, respectivamente). Ratones BALB/c fueron sometidos a un protocolo de sensibilización oral a caseínas y ovoalbúmina, en el cual los ratones recibieron de manera intragástrica una solución del alérgeno y el antiácido sucralfato semanalmente en 7 ocasiones. Adicionalmente, se evaluó el protocolo de sensibilización intraperitoneal de 35 días. La respuesta de anticuerpos IgE específicos al alérgeno se evaluó empleando ensayos de ELISA, mientras que la fase efectora se evaluó mediante niveles séricos de mMCP-1 después de un reto oral. La viabilidad de los probióticos se evaluó mediante retos de crecimiento con biota intestinal del ratón. **Resultados:** Las caseínas bovinas fueron lábiles a la digestión con pepsina en condiciones ácidas (pH = 1.2), mientras que permanecieron estables en condiciones alcalinas (pH = 8.0). Los ratones sometidos al protocolo de sensibilización intraperitoneal de 35 días a ovoalbúmina desarrollaron una respuesta detectable de anticuerpos IgE anti-ovoalbúmina. La presencia de mMCP-1 en suero después de un reto oral confirmó el desencadenamiento de una respuesta alérgica en ratones sensibilizados a ovoalbúmina. El protocolo de inmunización intraperitoneal no fue efectivo para sensibilizar a caseínas bovinas. El crecimiento de las bacterias del probiótico VSL#3 no se afectó por la biota residente del intestino del ratón.

Conclusión: El modelo murino de sensibilización a ovoalbúmina bajo el protocolo intraperitoneal de 35 días puede ser un modelo adecuado para evaluar la despolarización de la respuesta alérgica mediada por la suplementación con probióticos.

INTRODUCCIÓN

La alergia alimentaria mediada por IgE es una respuesta inmune adversa que se desencadena de forma reproducible tras la exposición a un alimento dado y es distinta de otras respuestas adversas a los alimentos tales como reacciones farmacológicas, reacciones mediadas por toxinas, y la intolerancia alimentaria (Ontiveros y col., 2014). Este trastorno afecta alrededor del 8% de los niños y 4% de la población adulta (Lepski & Brockmeyer, 2013). En particular, tanto la alergia a la leche bovina como la alergia al huevo afectan alrededor del 3% de los niños en el primer año de vida (Eggesbø y col., 2001; Gupta y col., 2011; Martorell-Aragón y col., 2015; McGowan & Keet, 2013; Rona y col., 2007; Sicherer, 2011) y aunque pronóstico de estos es bueno, la alergia puede persistir hasta la edad adulta. Esto último se ha asociado a una respuesta de anticuerpos IgE, específicamente a epítopes lineales de estos alérgenos (Järvinen y col., 2007).

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud en el hospedero (FAO, 2001). La suplementación con probióticos podría representar una alternativa para acelerar la adquisición de tolerancia a las proteínas de la leche y del huevo en niños con alergia a estos alimentos, debido a que la suplementación con microorganismos probióticos tales como lactobacilos o bacteroides ha mostrado en modelos murinos de alergia alimentaria capacidad para despolarizar la respuesta alérgica a proteínas de los alimentos (Barletta y col., 2013; Schiavi y col., 2011). Sin embargo, se carece de un modelo murino de alergia a las proteínas de leche de bovina o huevo, sin el uso de adyuvantes que permita evaluar de manera precisa el efecto de la suplementación con probióticos sobre la modulación de la respuesta alérgica a estas proteínas. En la presente investigación se propuso utilizar la cepa de ratones BALB/c para estandarizar las condiciones para el desarrollo de un modelo murino de alergia a las caseínas bovinas y ovoalbúmina mediante el uso del sucralfato, capaz de producir una

respuesta alérgica medible (niveles de mMCP-1), que posteriormente permita evaluar el efecto de la suplementación con probióticos sobre la modulación de respuesta alérgica.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Alergia Alimentaria

La alergia alimentaria mediada por IgE ha sido definida como un “efecto adverso para la salud derivado de una respuesta inmune específica, que ocurre de manera reproducible tras la exposición a un alimento dado” y es distinta de otras reacciones adversas a los alimentos tales como farmacológicas (ej. cafeína), reacciones mediadas por alimentos contaminados con toxinas o intolerancias alimentarias (ej. intolerancia a la lactosa) (Sicherer & Sampson, 2014). Los síntomas típicos de la alergia alimentaria incluyen alteraciones de la piel, de las vías respiratorias y del tracto gastrointestinal, así como alteraciones cardiovasculares. En ocasiones puede ocurrir una respuesta más severa y potencialmente mortal conocida como anafilaxis, en la cual pueden estar implicados varios órganos de diferentes sistemas e inducir un choque hipovolémico y un compromiso respiratorio (Renz y col., 2018).

Prevalencia de Alergia Alimentaria

La prevalencia de alergia a los alimentos ha ido en incremento en las últimas dos décadas y actualmente se considera como un trastorno común entre la población general y se reconoce como un problema de salud pública (Keet y col., 2014). Algunos estudios muestran que este trastorno puede llegar a alcanzar una prevalencia de hasta el 10% (Osborne y col., 2011). A pesar de la alta prevalencia de alergia alimentaria, se ha reportado que solo una pequeña lista de 8 alimentos es responsable del 90% de los casos de alergia. Esta lista de alimentos incluye leche, huevo, pescado, mariscos, nueces, cacahuates, trigo y (FDA, 2009).

Sin embargo, la estimación de la prevalencia de alergia alimentaria a nivel mundial es sólo una estimación, ya que el estándar de oro para confirmar el diagnóstico en la práctica clínica es la realización de un reto oral simple-ciego

placebo-controlado con el alimento sospechoso, este procedimiento se debe realizar en centros especializados bajo supervisión médica y suele ser un proceso costoso (Renz y col., 2018). Así, la mayoría de las estimaciones de alergia alimentaria se basan en estudios de prevalencia por auto-reporte o por reporte parenteral (en infante), y algunos otros se basan en combinación de síntomas clínicos de alergia y niveles séricos de anticuerpos IgE específico al alérgeno o en pruebas de punción cutánea (Prescott y col., 2013).

La mayor parte de los estudios de prevalencia de alergia a los alimentos a nivel mundial se han enfocado en los infantes y adolescentes (< 18 años), y la mayoría se han realizado en países de América del Norte y Europa (Prescott y col., 2013). Estos estudios se basan principalmente en el auto-reporte o reporte parenteral de reacciones a los alimentos y generalmente las tasas de prevalencia derivadas de estos estudios son más altas que las prevalencias de estudios basados en retos orales con los alimentos o confirmados por niveles séricos de anticuerpos IgE. En este sentido, estudios de prevalencia de alergia alimentaria por auto-reporte en población estadounidense muestran cifras que van desde 6.5% a 8.9% (Gupta y col., 2011; McGowan & Keet, 2013; Verrill y col., 2015) y estos valores se reducen hasta un 2.5% cuando la estimación de la prevalencia se basa en la concentración de IgE sérica específica al alérgeno en suero (A. H. Liu y col., 2010). La prevalencia de alergia alimentaria por auto-reporte en Canadá (8.0%) es similar a la de Estados Unidos basados en encuestas telefónicas a nivel nacional (Soller y col., 2012) (Figura 1).

Por otro lado, la prevalencia de alergia alimentaria reportada en países de Europa mediante el auto-reporte o reporte parenteral varía entre 0.8% y 30.2% (Bulgaria 0.8 %, Austria 1.7%, Dinamarca 2.5%, Alemania 3.0-20.2%, Suiza 3.1-7.8% , Francia 3.2%, Italia 3.9-10.7% , Eslovenia 4.6 %, Grecia 4.5-5.7%, Polonia 4.8-8.3%, Bélgica 4.9%, Lituania 5.1%, Holanda 5.9-22.0%, España 7.4-8.4%,

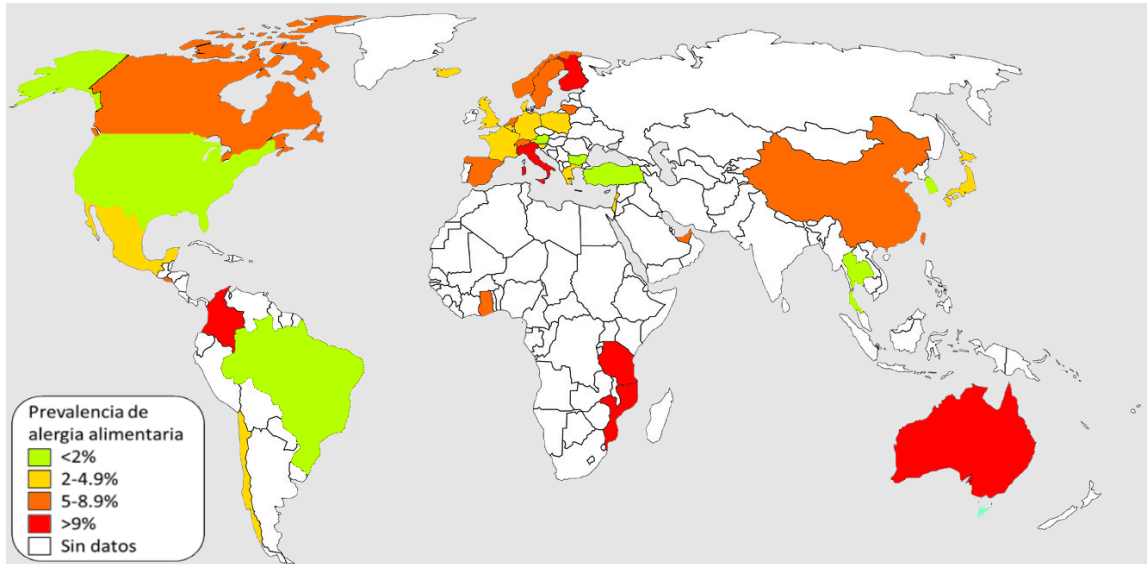


Figura 1. Estudios poblacionales de prevalencia de alergia alimentaria realizados alrededor del mundo. Si un país presentó más de un estudio de prevalencia, se tomó el valor de prevalencia por el siguiente orden jerárquico: estudios de prevalencia basados en retos orales, estudios basados en pruebas serológicas o punción cutánea, estudios basados en cuestionarios.

Finlandia 11.7%, Islandia 4.4-19.7%, Reino Unido 22.0% (Brugman y col., 1998; Burney y col., 2014; Kanny y col., 2001; McBride y col., 2012; Östblom y col., 2008; Rivas, 2009; Steinke y col., 2007)). Alternativamente, la prevalencia de alergia alimentaria basada en la historia clínica en conjunto con pruebas de punción cutánea o niveles séricos de IgE se encuentra entre 4.2% y 5.3% (Östblom y col., 2008; Roehr y col., 2004). Únicamente el Reino Unido (Venter y col., 2006) y Noruega (Kvenshagen y col., 2009) han reportado la prevalencia de alergia alimentaria confirmada mediante reto oral, teniendo una prevalencia de 4.0 y 6.5%, respectivamente.

En los países de Asia la prevalencia de alergia alimentaria por auto-reporte o reporte parenteral varía entre 3.6 y 8.4% [Israel 3.6%, Corea 3.7-5.3%, China 4.8-8.4%, Taiwán 3.4-7.6%, Japón 3.6-4.8% (Al-Hammadi y col., 2010; Graif y col., 2012; Ho y col., 2012; Kim y col., 2017; Kusunoki y col., 2013; Park y col., 2014; Wu y col., 2012; Zhang y col., 2015)]. Con base en la confirmación de alergia alimentaria mediante reto oral, la tasa de prevalencia en Asia varía entre 0.16% y 3.8% con datos de estudios realizados en China, Turquía, Tailandia y corea (Ahn y col., 2012; Chen y col., 2011; Chen y col., 2012; Lao-araya & Trakultivakorn, 2012; Mustafayev y col., 2013; Orhan y col., 2009) (Figura 1).

Con respecto a África, la información publicada con respecto a la prevalencia de alergia alimentaria a nivel poblacional es limitada (Justin-Temu y col., 2008; Lunet y col., 2005; Obeng y col., 2011), mostrando valores que van de 16.7 a 19.1% por auto-reporte y de 5.0% mediante historia clínica y anticuerpos IgE en suero. Por otro lado, en el continente Oceanía, Australia registra la prevalencia más alta a nivel mundial de alergia alimentaria confirmada mediante un reto oral (10%) en una población de niños de entre 11 y 15 meses de edad con una prueba de punción cutánea positiva. (Osborne y col., 2011) (Figura 1).

En Latinoamérica, la gran mayoría de los estudios de alergia alimentaria están basados en reporte parenteral de niños en edad escolar (5-13 años),

presentándose una prevalencia de 3.5% en México (Ontiveros y col., 2016), 5.3 % en el Salvador (Lopez-Gallardo y col., 2018) y 5.5% en Chile (Hoyos-Bachilloglu y col., 2014). Un estudio llevado a cabo en Brasil mostró que la prevalencia de alergia alimentaria por reporte parenteral fue de 23.5% y 17.6% en infantes y preescolares, respectivamente. Dichas cifras se redujeron a un 1.9% y 0.4% después de una confirmación con un reto oral con el alimento sospechoso (Gonçalves y col., 2016). En Colombia la prevalencia de alergia alimentaria por auto-reporte en población de 1-83 años de edad fue de 14.9% (Marrugo y col., 2008) (Figura 1).

Los datos de prevalencia de los distintos países alrededor del mundo son muy variables, lo cual puede estar influenciado por las diferencias en las metodologías aplicadas en los estudios, la definición de alergia alimentaria, la carga genética de las poblaciones estudiadas, la población objetivo (niños, adolescentes, adultos, población general), efectos de la exposición de la dieta, la localización geográfica, y el hecho de que algunos estudios se centran en alimentos específicos (Sicherer & Sampson, 2018).

Alergia a la Leche Bovina

La alergia a la leche bovina puede definirse como una reacción inmune adversa y reproducible a las proteínas de este alimento la cual conlleva a las manifestaciones clínicas de la hipersensibilidad inmediata (Ontiveros y col., 2014). La alergia a la leche bovina es la alergia alimentaria más común en niños, especialmente durante el primer año de vida (Kulig y col., 1999), con una prevalencia estimada entre 1.9% y 3.8% (McGowan & Keet, 2013; Sicherer, 2011). A pesar de que hay reportes de desarrollo de tolerancia en la mayoría de los afectados al llegar a la adolescencia (79% desarrolla tolerancia a los 16 años) (Skripak y col., 2007), este trastorno puede persistir durante la edad adulta. Factores como niveles elevados de anticuerpos IgE específicos a la leche (>10 kU_A/L), reacción positiva a pruebas de punción cutánea con un diámetro superior

a 10 mm y dermatitis atópica severa al momento del diagnóstico, se han asociado con un mayor tiempo de desarrollo de tolerancia a la leche de vaca (Wood y col., 2013).

Por otro lado, algunos estudios muestran que la mayoría de los niños con alergia a la leche bovina pueden tolerar la leche extensamente calentada (Kim y col., 2011; Nowak-Wegrzyn y col., 2008). Esto puede explicarse, debido a que las altas temperaturas pueden alterar la conformación tridimensional de las proteínas de la leche, destruyendo epítopes conformacionales, reduciendo así la alergenicidad de este alimento (Tordesillas y col., 2017). Además, la introducción de leche extensamente calentada en la dieta puede tener efectos terapéuticos en niños afectados con alergia a la leche de vaca. Un estudio realizado por Kim y col. (2011), mostró que los niños que fueron capaces de tolerar la leche calentada y que la incorporaron a su dieta, presentaron mayor probabilidad de desarrollar tolerancia a la leche no calentada a la edad de 5 años, en comparación de aquellos niños con alergia a la leche de vaca que evitaban estrictamente el consumo de leche (Kim y col., 2011).

Las proteínas que componen la leche de vaca pueden dividirse en dos fracciones, caseínas (Bos d 8) que representan el 80% del contenido total de las proteínas y proteínas del suero, que componen el 20% restante. La fracción de caseína puede subdividirse en cuatro proteínas principales (α_{s1} , α_{s2} , β y κ), mientras que el suero de leche contiene β -lactoglobulina (β LG o Bos d 5), α -lactoalbúmina (ALA o Bos d 4), inmunoglobulinas (Bos d 7), albúmina sérica bovina (BSA o Bos d 6) y trazas de lactoferrina. A pesar de que todas estas proteínas pueden actuar como alérgenos y desencadenar una respuesta alérgica, se ha reportado que las caseínas, β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina son las proteínas más alergénicas en la leche de vaca (Ahrens y col., 2012; Natale y col., 2004) y pueden ocasionar reacciones alérgicas que involucran la piel, tracto respiratorio, tracto gastrointestinal y en casos extremos, un choque anafiláctico (Carrard y col., 2015).

Alergia al Huevo

Después de la leche de vaca, el huevo es uno de los principales alimentos involucrados en la alergia alimentaria en niños, presentando una prevalencia estimada de 0.6 a 2.5% (Eggesbø y col., 2001; Gupta y col., 2011; McGowan & Keet, 2013; Rona y col., 2007; Sicherer, 2011) y al igual que la leche, la alergia al huevo se desarrolla comúnmente durante el primer año de vida (Kulig y col., 1999; J. Savage y col., 2016). El pronóstico de la alergia al huevo es relativamente bueno, ya que se ha reportado que 68% de los afectados desarrolla tolerancia al huevo a la edad de 16 años (Savage y col., 2007). Similar a lo que sucede con la leche de vaca, la mayoría de los niños con alergia al huevo puede tolerar el consumo del huevo extensamente calentado (como parte de un muffin o waffle) (Lemon-Mulé y col., 2008; Leonard y col., 2012). Dentro de las proteínas de la clara de huevo, se han reportado cuatro como los principales alérgenos: ovomucoide (OVM o Gal d 1), ovoalbúmina (OVA o Gal d 2), ovotransferrina (OVT o Gal d 3) y lisozima (LYS o Gal d 4) (Mine & Yang, 2008). Varios modelos murinos de alergia alimentaria al huevo han sido desarrollados para evaluar los mecanismos inmunológicos responsables de provocar la producción de anticuerpos IgE específicos al alérgeno y otras reacciones mediadas por células (Liu y col., 2016).

Patogénesis de la Alergia Alimentaria

Los eventos básicos durante el desarrollo de la alergia alimentaria se conocen como fase de sensibilización y fase efectora (Ontiveros y col., 2014). La fase de sensibilización ocurre después de que células presentadoras de antígenos como las células dendríticas o células B han reconocido segmentos alergénicos o epítopes en el componente proteico de los alérgenos alimentarios, los cuales han atravesado la barrera epitelial por diferentes procesos (difusión paracelular, transcitosis de enterocitos, a través de células M), llegado a la mucosa o al

torrente sanguíneo. Estos son procesados en las células presentadoras de antígenos y cargados en las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II, para entonces ser presentados a las células T. Esta interacción activa a las células T específicas al alérgeno, las cuales producen citocinas de tipo Th2 como IL-4, IL5 e IL-13, las cuales promueven la producción de anticuerpos IgE por parte de las células B. Los anticuerpos IgE pueden unirse a receptores de IgE de alta afinidad (FcεRI) en la superficie de mastocitos, eosinófilos y basófilos, generando así células sensibilizadas (Figura 2). Cabe destacar, que la sensibilización a alérgenos alimentarios no sólo puede ocurrir a través del tracto gastrointestinal, otras vías como la piel y el tracto respiratorio han sido reportadas como una ruta de sensibilización (Brough y col., 2015; Galand y col., 2016).

La fase efectora inicia cuando el mismo alérgeno que dio lugar a la fase de sensibilización se entrecruza con dos IgE adyacentes en la membrana de mastocitos sensibilizados, conduciendo a su activación. Una vez activadas, estas células liberan por exocitosis gránulos que contienen mediadores proinflamatorios preformados como histamina y proteasa. Al mismo tiempo, se produce la síntesis de *novo* de metabolitos lipídicos como leucotrienos, prostaglandinas y el factor activador de plaquetas, ocasionando respuestas fisiológicas como vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y contracción del músculo liso, las cuales son manifestaciones clínicas clásicas de alergia alimentaria (Figura 3).

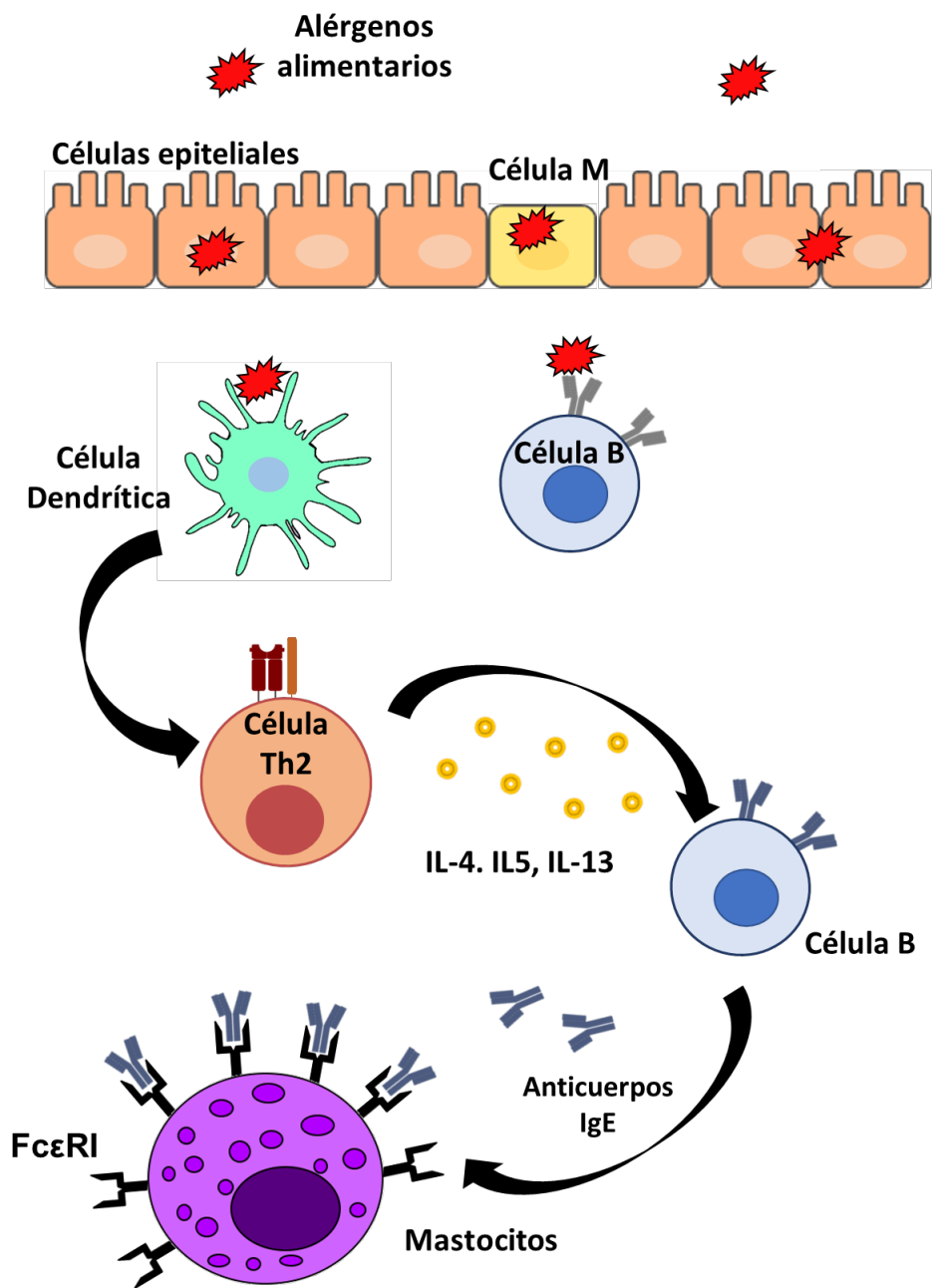


Figura 2. Fase de sensibilización en el desarrollo de alergia alimentaria mediada por IgE. Representación gráfica de la sensibilización a través del tracto gastrointestinal.

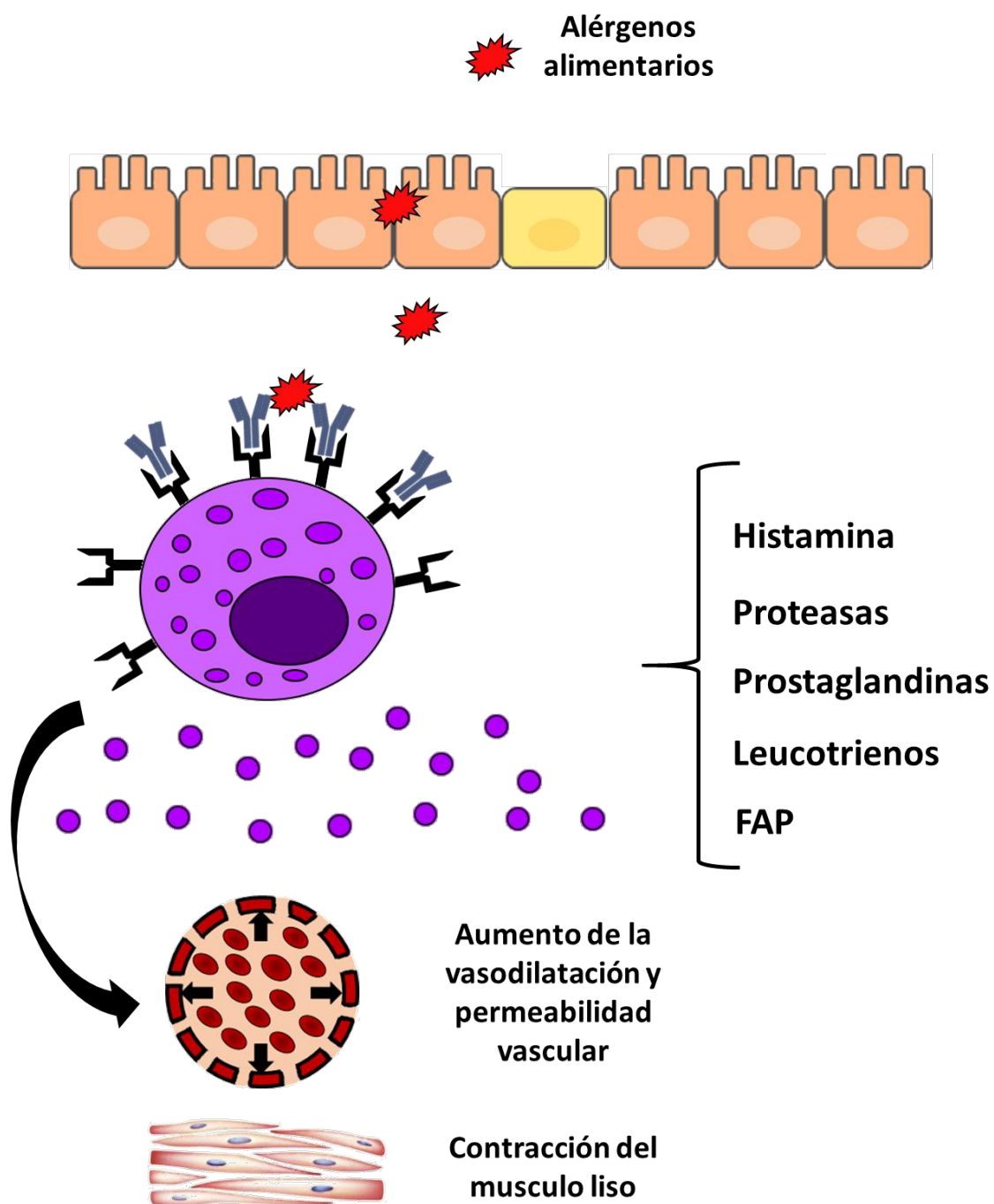


Figura 3. Fase efectora en el desarrollo de alergia alimentaria mediada por IgE. Representación gráfica de la liberación de los gránulos de mastocitos en el intestino. FAP: Factor Activador de Plaquetas.

Los incidentes que conducen a la alergia alimentaria involucran el rompimiento de la tolerancia oral, un aumento del transporte de alérgenos a través del epitelio intestinal, la generación de anticuerpos IgE específicos al alérgeno y la inducción de sensibilización de mastocitos intestinales (Ontiveros y col., 2014). Dichos eventos son producidos bajo el control de células Th2 CD4+ específicas al alérgeno, mientras que la supresión del fenotipo de alergia alimentaria requiere la inducción de células T reguladoras. Ambas respuestas son iniciadas por células presentadoras de antígenos, las cuales están sujetas a factores ambientales como la microbiota, patógenos, la dieta, metabolitos y características de los alérgenos que pueden influir en el balance entre una respuesta de tipo Th1, Th2 o T regulador (Cerovic y col., 2014; Chinthrajah y col., 2016). En este sentido, la inducción y el mantenimiento de la tolerancia a los antígenos alimentarios requiere de la generación activa de células T reguladoras específicas al antígeno alimentario. Estos procesos posiblemente están influenciados por la biota del residente (Rivas y col., 2013; Stefka y col., 2014).

Probióticos y Alergia Alimentaria

El incremento acelerado de la prevalencia de la alergia alimentaria en las últimas décadas no puede ser explicado sólo por la susceptibilidad genética, lo cual sugiere que algo en nuestro ambiente moderno está promoviendo la alergia alimentaria. Evidencia actual sugiere que la microbiota comensal puede modular la susceptibilidad al desarrollo de alergia a los alimentos y se ha despertado un gran interés en la aplicación de terapias basadas en modificar la proporción de bacterias de la microbiota intestinal para la prevención o tratamiento de la alergia alimentaria (Lee y col., 2008).

Colonización Bacteriana del Tracto Gastrointestinal

El desarrollo de la microbiota intestinal normal ocurre en varias fases durante los primeros 2 años de vida y cumple diferentes funciones. Primero, el neonato recibe

su primer inóculo oral de bacterias vaginales y colónicas maternas durante su paso por el canal de parto (Yatsunenکو y col., 2012). Esta colonización temprana sirve como estímulo para mantener una barrera de mucosa intacta, la cual es relevante para prevenir la captación de patógenos y antígenos nocivos (Artis, 2008). Así, el tracto gastrointestinal es colonizado por diferentes tipos de microorganismos tempranamente y esto es un factor crítico en el desarrollo postnatal del sistema inmune (Biasucci y col., 2008).

Segundo, durante la lactancia se lleva a cabo una segunda exposición a lactobacilos (e. g. *L. reuteri*, *L. plantarum* y *L. salivarium*) (Martín y col., 2007; Sinkiewicz & Nordström, 2005) y *Bifidobacterias* bacterias tales como *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. cantenatum*, *B. longum* (Grönlund y col., 2007). El desarrollo a nivel intestinal de estas llamadas “bacterias pioneras” es promovido por algunos componentes de la leche materna como los oligosacáridos. Dichas bacterias pueden estimular la función intestinal, favoreciendo la producción de IgA no monoméricas y una disminución de las respuestas inflamatorias intestinales mediada por la reducción de IL-6 (Bode, 2012).

Por último, el individuo se encuentra en una constante exposición a diferentes tipos de microorganismos cuando se inicia la introducción de alimentos sólidos en la dieta. De esta manera, la dieta puede modificar significativamente la composición de la microbiota, ya sea por la introducción de nuevas especies bacterianas o genes bacterianos, o por la modulación del crecimiento de bacterias residentes que ya forman parte la microbiota (Wu y col., 2011).

La colonización normal de bacterias intestinales promueve la homeostasis inmune y la ausencia de enfermedad en aquellos infantes nacidos a término por parto vaginal y no expuestos a antibióticos perinatales. Se reconoce que la presencia de “bacterias pioneras” en estos infantes tienen un efecto específico en el desarrollo normal de la defensa inmune intestinal del hospedero y tolerancia

oral (Jost y col., 2012). Por otro lado, una disrupción en la colonización debido al parto por cesárea, uso de antibióticos perinatales o parto prematuro pueden afectar negativamente el desarrollo de los mecanismos de defensa a nivel intestinal y predisponer a la inflamación, la cual conduce a una mayor susceptibilidad a enfermedades posteriores en la vida (Walker, 2017; Weng & Walker, 2013).

Probióticos, Prebióticos y Simbióticos.

Los probióticos se definen como “microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud en el hospedero” (FAO, 2001). Los probióticos son por lo general bacterias o levaduras, capaces de colonizar y restaurar la simbiosis de la microbiota en el tracto gastrointestinal y deben ser no invasivos, no cancerígenos y no patogénicos. Por lo cual, para que un microorganismo pueda ser llamado probiótico, es necesario que cumpla con varias características, como: la capacidad de adherirse a las células del epitelio intestinal, reducir o evitar la adherencia de otras bacterias patógenas, persistir, multiplicarse y producir ácidos, peróxido de hidrogeno y bacteriocinas contra el crecimiento de bacterias patógenas (Heritage & Licht, 2005). Además, debe ser seguro para la salud humana. Así, un probiótico debe tener una ausencia de resistencia a antibióticos de uso clínico o veterinario, así como la ausencia de factores de virulencia (Snydman, 2008).

Los prebióticos se definen como “ingredientes no digeribles de alimentos que producen un efecto benéfico en el hospedero por la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de un número limitado de bacterias” (*Lactobacilos* y *Bifidobacterias*) (Gibson & Roberfroid, 1995). Una gran variedad de moléculas en los alimentos puede ser prebióticos, pero la gran mayoría son fibras dietarias, tales como los oligosacáridos. Entre los principales oligosacáridos que son considerados como probióticos se encuentran la inulina, los

galactooligosacáridos (GOS), fructooligosacáridos (FOS), oligosacáridos de la soja (SOS) y xiloligosacáridos (Bode, 2012).

Por su parte, los simbióticos son alimentos que tienen una combinación de probióticos y prebióticos que pueden estimular e incrementar la supervivencia de cepas bacterianas específicas del tracto gastrointestinal (TGI). Un ejemplo de esto es la leche humana, ya que contiene tanto bacterias como oligosacáridos (Bode, 2015; Grönlund y col., 2007; Gueimonde y col., 2007). Con base en las observaciones del contenido de la leche humana y sus beneficios para la salud, algunas fórmulas infantiles han sido adicionadas con probióticos, galactooligosacáridos y fructooligosacáridos para imitar los efectos de la leche humana cuando la lactancia materna no es posible.

Uso de Probióticos para Prevenir o Tratar la Alergia Alimentaria

La idea de una correlación estricta entre la composición de la microbiota intestinal y la predisposición de enfermedades alérgicas es apoyada por varias observaciones de cambios en la microbiota intestinal de niños atópicos con alta prevalencia de *Clostridia* (Moradi y col., 2002; Šmehilová y col., 2008). El hecho de que estos cambios en la composición de la microbiota intestinal estén implicados en la patogénesis de desórdenes alérgicos, ha incrementado la atención de investigadores en el uso de probióticos con el fin de tratar y/o prevenir reacciones alérgicas (Lee y col., 2008). En este marco, se ha sugerido que una modificación inmediata de la colonización posnatal podría ser útil para prevenir enfermedades alérgicas. Con base en este principio, a un grupo de 124 infantes se les administró desde el primer día de nacimiento hasta los 6 meses de edad una fórmula de leche de vaca suplementada con los probióticos *Bifidobacterium longum* 999 y *Lactobacillus rhamnosus* y a otro grupo de 121 infantes se les administró sólo la fórmula. A la edad de 5 años, no se encontró diferencias significativas entre los dos grupos con respecto al desarrollo de asma y alergia alimentaria. Los autores concluyeron que la suplementación temprana con

probióticos no tiene un impacto en la prevención del desarrollo de enfermedades alérgicas (Lin, 2014).

Otros estudios sugieren que la suplementación de probióticos (*B. breve M-16V* y *B. longum BB536*) tanto a la madre durante las últimas semanas de gestación, como al infante durante sus primeros seis meses de vida reduce el riesgo de desarrollar dermatitis atópica a los 18 meses de edad (Enomoto y col., 2014). La suplementación prenatal o posnatal solas, no ejercen una influencia en el riesgo de sensibilización (Zhang y col., 2016). Sin embargo, un reciente metaanálisis en el cual se incluyeron 17 ensayos dirigidos a evaluar el efecto de la suplementación prenatal y/o posnatal en la reducción del riesgo de desarrollar atopia e hipersensibilidad alimentaria, indicó que la suplementación combinada de probióticos en la etapa prenatal y posnatal reduce el riesgo a la sensibilización a proteínas alimentarias. Sin embargo, el hecho de que hasta el momento el uso de los probióticos para el tratamiento de alergias alimentarias no esté consolidado no significa que deba ser descartado, ya que existe una amplia variedad de microorganismos que no han sido evaluados además del método de suplementación que incluye el tiempo y la dosis.

Los resultados de estudios dirigidos a evaluar el uso de probióticos en fórmulas lácteas como terapia para el tratamiento de alergias alimentarias son contradictorios. Mientras que algunos estudios muestran que la suplementación con *L. casei CRL431* y *Bifidobacterim lactis Bb-12* en una fórmula extensivamente hidrolizada (FEH) no es efectiva para tratar la alergia a la leche bovina en infantes (Hol y col., 2008), otros muestran que la suplementación con *Lactobacillus GG* (LGG) en una FEH es efectiva para promover la tolerancia inmunológica en niños alérgicos a la leche bovina. (Canani y col., 2012). Estas diferencias pueden ser explicadas por el hecho de que diferentes cepas de bacterias, incluso de la misma especie, pueden tener diferentes propiedades de adhesión, agregación, inhibición competitiva y desplazamiento de patógenos, por

lo cual se requiere de la comprensión de estas propiedades cuando se utilizan combinaciones de probióticos (Soh & Shek, 2016).

El posicionamiento de organismos internacionales respecto al uso de probióticos es que se requieren más evidencias para soportar el uso de probióticos para la prevención y manejo de alergias alimentarias (Muraro y *col.*, 2014). Sin embargo, también se considera que la administración de fórmulas suplementadas con probióticos y/o prebióticos no plantean problemas de seguridad con respecto al crecimiento infantil ni desarrollan efectos adversos. (Braegger y *col.*, 2011). Particularmente, la Organización Mundial de Alergias (OMA) convocó a un panel de expertos en el año 2015 para desarrollar recomendaciones basadas en evidencias sobre el uso de probióticos en la prevención de alergias. Se determinó que existe un probable beneficio del uso de los probióticos principalmente para la prevención de eccema y se sugirió la suplementación con probióticos en mujeres embarazadas y madres en lactancia, así como en niños con un alto riesgo de desarrollar alergia. Sin embargo, todas estas recomendaciones son condicionales y están respaldadas por ensayos de baja calidad (Fiocchi y *col.*, 2015).

Aunque actualmente no se ha llegado a un acuerdo en común entre los diferentes organismos internacionales pertinentes al tema, sobre si la suplementación con bacterias probióticas puede corregir las alteraciones en microbiota de niños con alergia a los alimentos. Se han propuesto algunos mecanismos por los cuales los probióticos pueden ejercer un efecto benéfico en esta patología.

Mecanismos Propuestos de la Acción de los Probióticos en la Patogénesis de las Alergias Alimentarias Mediadas por IgE

Entre los factores de riesgo genéticos y ambientales asociados a la inducción de alergia alimentaria podemos encontrar: el sexo masculino, polimorfismos en los genes de IL-10 e IL-13, parto por cesárea, bajos niveles de vitamina D, dietas

occidentales bajas en fibra y una falta de exposición microbiana en las etapas iniciales de la vida (Ashley y col., 2015). Con relación a esto último, hay un aumento en la evidencia que muestra que los patrones alterados en la exposición microbiana en las etapas iniciales de la vida, pueden conducir al desarrollo de alergia alimentaria por una influencia negativa en el desarrollo del sistema inmune (Tamburini y col., 2016). De este modo, la microbiota intestinal puede ser considerada un potencial blanco para la prevención y como terapia de intervención de la alergia alimentaria. Por todo lo anterior, se han propuesto algunos mecanismos por los cuales los probióticos pueden ejercer un efecto benéfico en esta patología, como la inducción de células T reguladoras por medio de metabolitos producidos por las bacterias, inducción de la producción de anticuerpos IgA y despolarización de respuestas de tipo Th2 a Th1.

Metabolitos Microbianos y la Inducción de Tolerancia

La tolerancia inmunológica es un estado de falta de respuesta del sistema inmune a sustancias o tejidos que tienen potencial de inducir una respuesta inmune. La evidencia actual sugiere que la microbiota y sus metabolitos, junto con la exposición de factores dietarios en etapas iniciales de la vida, influyen de manera crítica en el establecimiento de tolerancia inmune a antígenos alimentarios (Kim y col., 2016). Por ejemplo, los ácidos grasos de cadena corta producidos por bacterias probióticas durante la fermentación de fibra dietética pueden estimular a las células dendríticas para producir IL-10 (vía GRP109A) y de esta manera lograr la inducción de células T reguladoras (Smith y col., 2013). Este mecanismo está relacionado a la supresión de respuestas inflamatorias contra bacterias comensales y a un aumento en la maduración de células dendríticas reguladoras. Logrando de esta manera la inducción de tolerancia inmunológica (Aureli y col., 2011). En este contexto, el butirato, un metabolito de la fermentación de fibra dietaria por parte de las bacterias, puede regular la expresión génica mediante la inhibición de la deacetilasa de histonas (DACH). La inhibición de la DACH 9 y 6

aumenta la expresión del gen FoxP3 y la producción e inducción de células T reguladoras (Tao y col., 2007).

La microbiota intestinal también puede estimular a las células dendríticas en las placas de Peyer para producir el factor transformante de crecimiento β (TGF- β), CXCL13 y proteína activadora de células B, que conducen al cambio de clase y producción de IgA (Suzuki y col., 2010). El sistema de IgA secretoras es considerado un factor importante en la patogénesis de la alergia alimentaria, debido a que un retraso en el desarrollo de células B productoras de IgA o una insuficiente producción parecen contribuir sustancialmente al desarrollo de alergia alimentaria (Ohnmacht y col., 2015).

Despolarización de Respuestas de Tipo Th2 a Th1

La interacción de la microbiota con el tracto gastrointestinal es una de las señales ambientales que estimulan la diferenciación de las células T, principalmente hacia tipo Th1 y T reguladoras. Hay evidencias de que, a través de receptores de reconocimiento de patrones, tales como los receptores tipo toll (TLR), las bacterias probióticas intestinales pueden inducir un tipo de respuesta inmune. Se ha encontrado que la activación del TLR2 por bacterias tales como *Bacteroides fragilis* induce un cambio de respuestas de tipo Th2 a Th1 (De Kivit y col., 2014). En este sentido, Pohjavuori y col. (Pohjavuori y col., 2004) mostraron que el *Lactobacillus rhamnosus* GG puede incrementar la producción de interferón gamma (IFN- γ) por parte de las células mononucleares de sangre periférica y suprimir la secreción de IL-4, promoviendo un cambio de la respuesta hacia tipo Th1 en niños con alergia a la leche de vaca. En general, los reportes publicados muestran que una despolarización en la respuesta alérgica esta mediada por distintos metabolitos de los microorganismos que estimulan la producción de citocinas que promueven un balance hacia la respuesta Th1 o de células T reguladoras.

Uso de Modelos Animales Para la Investigación de los Principales Alérgenos Asociados con Alergia Alimentaria

Actualmente hay un gran interés por el entendimiento de los mecanismos inmunológicos y factores de riesgo asociados con el desarrollo de alergia a los alimentos. Sin embargo, la investigación de la alergia alimentaria en humanos es limitada, debido a la preocupación ética y a la posibilidad de desarrollar reacciones anafilácticas fatales (Bock y col., 2001). Por lo cual, los modelos animales tienen un gran potencial como herramienta de investigación. Estos pueden ser utilizados para predecir posibles factores desencadenantes de alergia, para identificar los posibles mecanismos implicados en el establecimiento de la alergia, así como la prueba de nuevos tratamientos terapéuticos o alimentos antialérgicos (Aldemir y col., 2009; Lehrer & McClain, 2009).

Entre los animales que han sido utilizados como modelo para investigar la alergia alimentaria, podemos encontrar a los llamados pequeños animales (ratones, ratas y conejillos de indias) y los grandes animales (perros, cerdos y ovejas). El uso de cada modelo animal tiene sus ventajas, por ejemplo, en el caso de los grandes animales, los cerdos tienen una gran similitud en la fisiología intestinal anatómica e histológica comparada con la de los humanos (Helm y col., 2003), los perros son una de las pocas especies que pueden desarrollar alergia alimentaria de manera natural (Paterson, 1995) y las ovejas tienen un tamaño y fisiología similar al de los humanos y su uso implica menores restricciones éticas (Meeusen y col., 2009).

En general, las principales ventajas del uso de modelos animales grandes son la capacidad de realizar experimentos en serie dentro de la misma cohorte de animales y su relativa longevidad, lo que permite investigaciones más relevantes sobre enfermedades crónicas y la evaluación de terapias específicas a largo plazo (Van Gramberg y col., 2013). Sin embargo, algunas de las desventajas que presenta el uso de modelos animales grandes es el

conocimiento limitado acerca de su sistema inmune y una baja disponibilidad de herramientas y reactivos para estos modelos, lo cual ha conllevado a limitar su uso en la investigación de alergias alimentarias (Van Gramberg y col., 2013).

Por otro lado, los modelos animales pequeños son predominantemente utilizados en los laboratorios de investigación por su tamaño, fácil manejo, ciclos cortos de crianza, relativo bajo costo de adquisición y mantenimiento (Aldemir y col., 2009; T. Liu y col., 2016). Entre estos, el uso de especies murinas en la investigación en las últimas décadas, ha llevado al desarrollo continuo de herramientas celulares y moleculares que han permitido realizar investigaciones de los posibles mecanismos implicados en el establecimiento de la alergia (Van Gramberg y col., 2013). En este contexto, los ratones han ganado relevancia debido a una caracterización más completa de su biología, sistema inmunológico y composición genética. Lo que ha llevado al predominante uso de los ratones para el desarrollo de modelos murinos de alergia alimentaria (Liu y col., 2016; McClain & Bannon, 2006).

Modelos Murinos de Alergia Alimentaria

Actualmente se han desarrollado diferentes modelos de alergia alimentaria en ratones y ratas, los cuales tienen algunas diferencias que pueden influir en los resultados y dificulta la comparación entre los diferentes modelos. Sin embargo, los ratones son usados de manera preferencial para el desarrollo de modelos de alergia alimentaria debido a la necesidad de usar una menor cantidad de proteína alergénica para las evaluaciones y por la mayor disponibilidad de herramientas y reactivos disponibles para este modelo su corto tiempo de generación entre camadas, la posibilidad de agregar un gran número de individuos en cada grupo de estudio y el relativo bajo costo de compra y mantenimiento, comparado con otros modelos animales (Gonipetay col., 2015). Además, se ha reportado que la estructura general del sistema inmune del ratón es muy similar a la del humano (Haley, 2003). Por su capacidad de producir anticuerpos IgE e IgG1, las cepas

de ratones C3H/HeJ, BALB/c, C57/BL6, and DBA/2 han sido la más utilizadas en las investigaciones enfocadas en desarrollo de modelos de alergia alimentaria (McClain & Bannon, 2006).

No obstante, un obstáculo involucrado en el desarrollo de modelos murinos de alergia alimentaria es la tendencia del sistema inmune a desarrollar tolerancia a los antígenos ingeridos (Bernard y col., 2014), por lo cual es recomendable evitar el consumo de la proteína de estudio por al menos dos generaciones (Bernard y col., 2014; Knippels y col., 1998). Otros factores que han sido reportados para afectar el desarrollo de una respuesta inmune específica al alérgeno (anticuerpos IgE o IgG1) son: la dosis de alérgeno implementada durante la sensibilización y el número de los retos, así como el tipo de adyuvante usados (Gonipeta y col., 2015). Además, otros factores como la ruta de exposición (Dunkin y col., 2011), daño de la barrera epitelial (alcohol o toxinas), efectos de la matriz alimentaria (lípidos, azúcares y agregados de proteínas en el extracto de proteína), contaminación microbiana de los extractos proteicos, composición de la microbiota y la cepa de animales usados en los experimentos pueden impactar en el resultado final de los modelos (Liu y col., 2016; Smit y col., 2015).

Actualmente se han desarrollado algunos modelos murinos de alergia alimentaria inducidos por vía oral e intraperitoneal, los cuales en su mayoría involucra el uso de adyuvantes (Liu y col., 2016). Con base en los parámetros que se evalúan, los modelos murinos de alergia alimentaria pueden ser divididos en dos tipos: modelos de respuesta inmune más enfermedad (enfocados tanto en la respuesta de anticuerpos IgE, así como medición marcadores de una respuesta efectora, como la evaluación de subconjuntos celulares (células Th1 y Th2), liberación de mediadores alérgicos (mMCP-1, histamina, citocinas) y la aparición de síntomas de hipersensibilidad (puntuación de anafilaxis y cambios en la temperatura corporal) (Smit y col., 2015) y modelos de respuesta inmune (sólo enfocados en la producción de anticuerpos IgE) (Gonipeta y col., 2015). El

uso de modelos murinos de respuesta inmune es utilizado por lo general para evaluar el potencial de sensibilización de nuevas proteínas alimentarias, ya que la presencia de anticuerpos IgE es un marcador de sensibilización y un prerrequisito para el desarrollo de una respuesta alérgica (Oettgen, 2016). Sin embargo, se ha reportado que la presencia de anticuerpos IgE no garantiza el desencadenamiento de la fase efectora después de un reto con el alérgeno. De esta manera, es esencial que un modelo murino de alergia alimentaria que será usado para evaluar nuevos tratamientos terapéuticos antialérgicos, sea capaz de generar tanto una respuesta de anticuerpos IgE, así como una respuesta alérgica desencadenada después de un reto oral, que pueda ser evaluada por marcadores de la fase efectora.

En este sentido, modelos murinos de alergia a la tropomiosina de camarón y a proteínas del cacahuete han sido utilizadas para evaluar el efecto terapéutico de la suplementación con probióticos (Barletta y col., 2013; Schiavi y col., 2011). La suplementación con probióticos podría representar una alternativa para acelerar la adquisición de tolerancia en niños con alergia a las proteínas de la leche o huevo. Sin embargo, actualmente no existe un modelo murino de alergia alimentaria a caseína u ovoalbúmina (principales alérgenos de la leche bovina y huevo, respectivamente) en un formato libre de adyuvantes que permita evaluar este efecto.

Debido a que en los humanos la sensibilización y la respuesta alérgica a las proteínas de los alimentos son eventos típicamente iniciados por la vía oral, la ruta oral parece ser la más relevante para el desarrollo de un modelo murino de alergia alimentaria a caseína u ovoalbúmina. Los modelos murinos de alergia alimentaria de sensibilización oral basados en el aumento del pH gástrico mediante la administración de medicamentos antiácidos, con el fin de disminuir la digestión peptídica para conservar la inmunogenicidad de las proteínas para que se pueda promover una respuesta de anticuerpos IgE, parecen ser una buena opción para desarrollar un modelo de alergia a caseína. El sucralfato es

un complejo aluminio-sacarosa-sulfato utilizado para el tratamiento de úlceras gástricas (Garnett, 1982; Untersmayr y col, 2003) y tiene la capacidad de incrementar el pH estomacal (Bruner y col, 2009), además de inhibir a la enzima digestiva pepsina y adsorber sales biliares (Garnett, 1982). Además, se ha demostrado que el consumo constante de sucralfato puede promover la sensibilización e hipersensibilidad a las proteínas de los alimentos tanto en ratones como en humanos (Schöl y col, 2005). Además, la respuesta alérgica asociada al consumo de sucralfato en el ratón conduce a cambios morfológicos intestinales e inmunológicos similares a la respuesta alérgica humana (Pali-Schöl y col, 2008). De este modo, en la presente investigación se plantea utilizar el sucralfato para sensibilizar a caseínas bovinas y ovoalbúmina de forma oral a ratones BALB/c, con el objetivo de desarrollar un modelo murino de alergia a caseína y ovoalbúmina que permita evaluar el efecto de la suplementación con probióticos sobre la modulación de la respuesta inmune.

Justificación

Las caseínas son el principal componente proteico de la leche bovina asociado a la alergia persistente a este alimento. Hasta el momento, el único tratamiento disponible para este trastorno consiste en evitar el alérgeno o consumir fórmulas de proteína de leche extensivamente hidrolizadas cuando estas son toleradas. Es posible que la suplementación con probióticos acelere la adquisición de tolerancia en niños afectados con alergia a la leche bovina. Sin embargo, hasta antes del presente estudio no existía un modelo apropiado para su evaluación.

Hipótesis

La administración intragástrica de proteínas alimentarias (caseínas bovinas y ovoalbúmina) con sucralfato a ratones BALB/c induce una sensibilización cuya respuesta efectora puede ser evaluada con el marcador MCP-1 permitiendo así estudiar la despolarización potencial de la respuesta alérgica mediada por los probióticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y Aspectos Éticos

Se utilizaron ratones BALB/c libres de patógenos de 4 a 6 semanas de edad, los cuales fueron criados y alimentados con una dieta libre de proteínas de leche bovina y proteínas de huevo de gallina por al menos dos generaciones. Ratones hembra BALB/c de segunda generación y subsecuentes fueron utilizadas en todos los ensayos. Los animales en estas condiciones estuvieron disponibles en el bioterio de la Unidad Académica de Ciencias de la Nutrición de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Agua y alimento estuvieron disponibles *ad libitum* y durante todos los experimentos se continuó empleando una dieta libre de proteínas de leche bovina y proteínas de huevo. La temperatura del ambiente se mantuvo entre 20 y 24 °C con una humedad relativa entre 45 y 55% con un ciclo de 12 h luz/oscuridad. Todos los experimentos en animales fueron aprobados por el comité de ética de la Unidad Académica de Ciencias de la Nutrición de la Universidad Autónoma de Sinaloa (CE-UACNyG-2014-JUL-001) (Anexo I).

Evaluación de Cambios de pH en Fluido Gástrico Simulado Después de la Adición de Sales de Hank's + NaHCO₃ 7.5% y Sucralfato

Se preparó fluido gástrico simulado (FGS; 0.084N HCl, 35mM NaCl) a un pH de 1.2. Se determinó el pH del FGS (10 mL) en diferentes puntos de tiempo (0 a 120 minutos) después de agregar 2.5 mL de una solución de Sales de Hank's + NaHCO₃ 7.5% (relación 1:4), 2.5 mL de sucralfato (1 g de SUC/ 5 ml de suspensión; Unival, Senosiain) o 2.5 mL de solución salina de fosfatos (PBS; control negativo). Adicionalmente, se evaluó el efecto dosis-dependiente agregando al FGS diferentes concentraciones de las sustancias evaluadas (Relación 1:10, 1:5, 1:2 y 1:1 sustancia/FGS) (Figura 4).

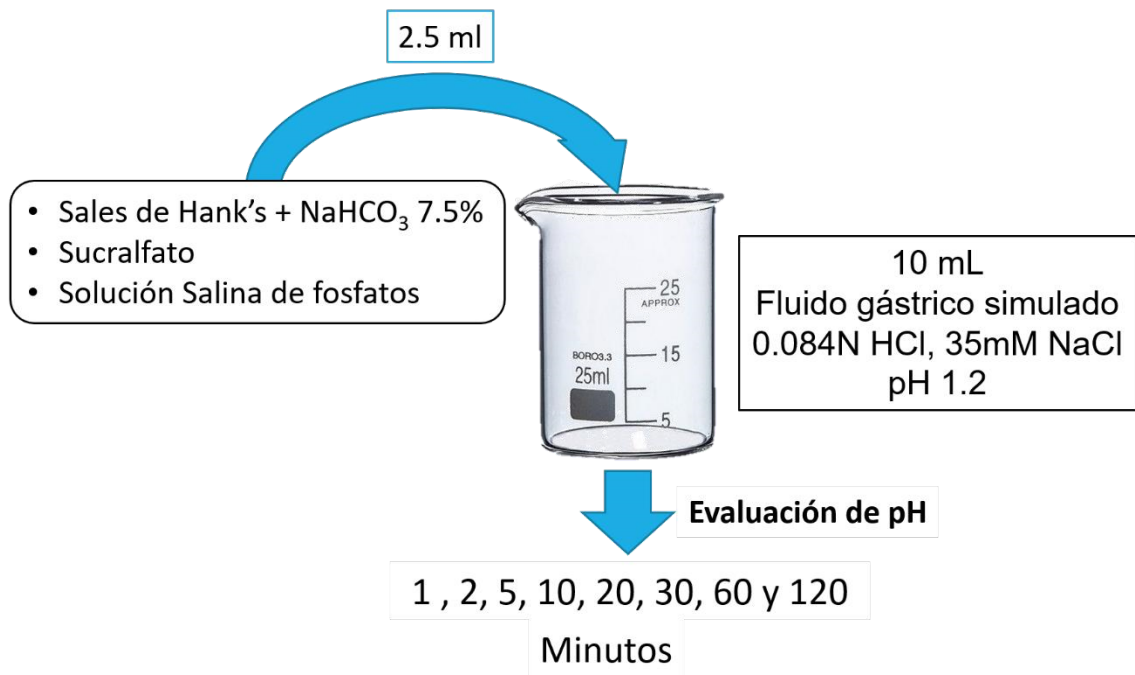


Figura 4. Evaluación de cambios de pH en FGS.

Ensayo de Digestibilidad de Caseínas en FGS pH de 1.2 y Condiciones Alcalinas (pH 8.1)

Se realizaron ensayos de digestibilidad de caseínas bajo dos diferentes condiciones: a) digestión con pepsina y fluido gástrico simulado, pH 1.2 y b) digestión con pepsina, fluido gástrico simulado, más una solución de Sales de Hank's + NaHCO₃ 7.5%, pH 8.01. Los ensayos se realizaron siguiendo la metodología establecida por Thomas y col. (Thomas y col., 2004), con algunas modificaciones (Tabla I) Para todos los ensayos se pesó una muestra de aproximadamente 10.0 mg de alfa-caseínas (MP BIOMEDICALS, #195096), la cual fue disuelta en 1.0 mL de PBS. Posteriormente, se realizó una cuantificación de proteína mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) (Scientific, 2013). Con base en la concentración de proteína, se preparó una solución a una concentración de 5 mg/mL. Para el ensayo de digestibilidad en pH de 1.2, se agregaron 60 µL de la solución de caseínas (300 mg de caseínas) en un vial que contenía 1.14 mL de fluido gástrico simulado (FGS; 0.084N HCl, 35mM NaCl, pH 1.2) y 3000 U de pepsina (10 U de actividad de pepsina/µg de caseínas). En cuanto al ensayo de digestibilidad en pH de 8.01, se agregaron 60 µL de la solución de caseínas (300mg de caseínas) en un vial que contenía 570 mL de FGS, 3000 U de pepsina y 570 mL Sales de Hank's + NaHCO₃ 7.5%, conservando una relación de 1:1 (FGS: Sales de Hank's).

En ambas condiciones, tanto el FGS como la solución de Sales de Hank's + NaHCO₃ 7.5%, fueron precalentados aproximadamente a 37°C durante 5 minutos antes de agregar la solución de caseínas. Una vez agregadas las caseínas, el contenido del vial se mezcló mediante agitación suave e inmediatamente se colocó en baño maría a 37°C. Se tomaron muestras de 100 µL a los 0.5, 2, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos después del inicio de la incubación. La reacción en cada muestra de 100µL fue detenida agregando 35 µL de una solución de 200mM NaHCO₃, pH 11.0, y 35 µL de buffer Laemmli 5X (glicerol al

Tabla I. Reactivos y procesos utilizados para el ensayo de digestión con pepsina.

	Thomas 2004	Digestión pH de 1.2	Digestión pH ≥ 8.0
	Inicio de digestión		
Volumen Total	1.6 mL	1.2 mL	1.2 mL
Volumen Fluido gástrico simulado	1.520 mL	1.14 mL	0.57 mL
Volumen SH+NaHCO₃ 7.5%	-	-	0.57 mL
Volumen (5 mg/mL)	0.08 mL	0.06 mL	0.06 mL
Pepsina	4000 U	3000 U	3000 U
	Recolección de muestras a diferentes puntos de tiempo (0.5, 2, 5, 10, 20, 30, 60 minutos)		
Volumen por tiempo	200 µL	100 µL	100 µL
	Fin de digestión (Solución Stop)		
Volumen (200 mM NaHCO₃, pH 11)	70 µL	35 µL	35 µL
Volumen (5X Laemmli buffer)	70 µL	35 µL	35 µL
	Evaluación de digestión por SDS-PAGE		
Volumen SDS- PAGE	15 µL	15 µL	15 µL
Muestra de proteína	2.2 µg	2.2 µg	2.2 µg

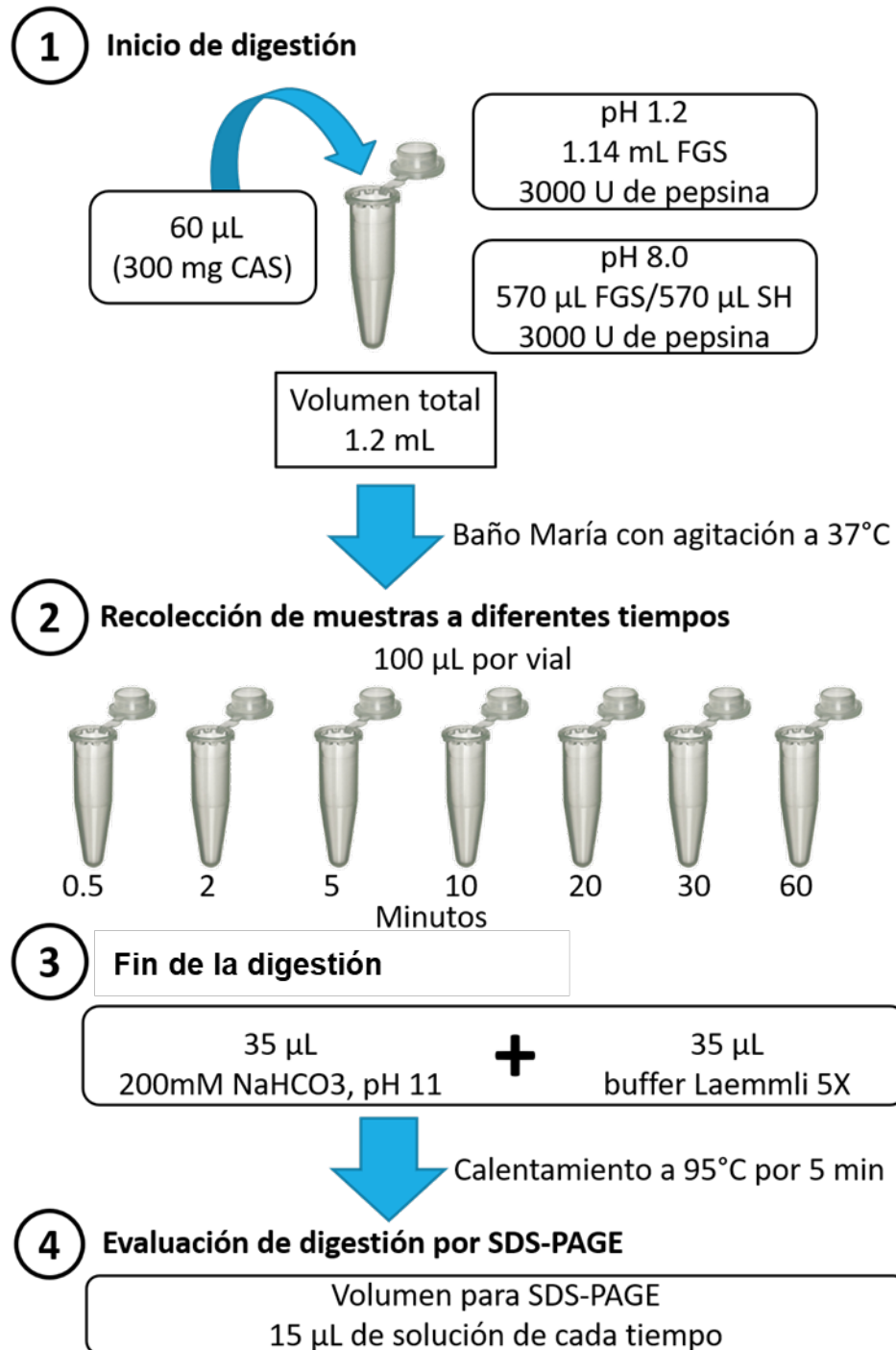


Figura 5. Ensayos de digestión de caseína con pepsina en condiciones fisiológicas y alcalinas.

Tabla II. Ingredientes para la preparación de los geles de apilamiento y de resolución.

Reactivo	Gel separador	Gel de resolución		
	4%	7.5%	12%	15%
30% Acrilamida/bis	1.98 mL	3.75 mL	6.0 mL	7.5 mL
0.5M Tris-HCl, pH 6.8	3.78 mL	-	-	-
1.5M Tris-HCl, pH 8.8	0 mL	3.75 mL	3.75 mL	3.75 mL
10% SDS	150 μ L	150 μ L	150 μ L	150 μ L
diH ₂ O	9.0 mL	7.28 mL	5.03 mL	3.52 mL
TEMED	15 μ L	7.5 μ L	7.5 mL	7.5 mL
10% APS	75 μ L	75 μ L	75 μ L	75 μ L
Volumen total	15 mL	15 mL	15 mL	15 mL

40%, β -mercaptoetanol al 5%, SDS al 10%, Tris 0.33M, azul de bromofenol al 0.05%, pH 6.8) (Laemmli, 1970). Una vez detenida la reacción, las muestras fueron inmediatamente calentadas a 95°C por 10 minutos y almacenadas a -20°C para su posterior análisis en SDS-PAGE (Figura 5).

Las muestras de digestión de caseínas en el tiempo cero para ambas condiciones de digestión, se prepararon inactivando a la enzima pepsina mediante la adición de la solución de 200mM NaHCO₃, pH 11, y de buffer Laemmli 5X antes de agregar la solución de caseínas al vial del ensayo. Adicionalmente, se incluyó en los análisis controles de autodigestión (pepsina sin la proteína de prueba) y control de estabilidad de la proteína evaluada (solución de la reacción con la proteína de prueba, pero sin pepsina). Ambos controles se trataron de la misma manera que las reacciones de prueba, pero sólo fueron preparados para los tiempos 0 y 60 minutos.

Electroforesis SDS-PAGE de Caseínas

Se utilizaron geles de poliacrilamida a una concentración de 15%, con 15 pozos en cristales de 1mm de espesor, los cuales fueron preparados en nuestro laboratorio con base en la metodología descrita en el protocolo de elaboración de geles de BIORAD (Biorad, 2018) (Tabla II). Durante el proceso de digestión, se colectaron muestras (15 μ L) en cada punto de tiempo (2.2 μ g de caseína), los cuales se cargaron en cada carril y se sometieron a electroforesis de SDS-PAGE en condiciones reductoras, de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli (Laemmli, 1970). Se utilizó un marcador de peso molecular de amplio rango (SIGMA, Cat # S8445-1VL) el cual contiene 12 proteínas con pesos moleculares conocidos que van desde 6,500- 200,000 Da. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 200 Volts con una duración entre 45 a 50 minutos en buffer de corrida.

Fijación y Tinción de Geles SDS-PAGE

Una vez terminada la electroforesis, cada gel fue colocado de manera individual en un recipiente de vidrio y lavado con 200 mL de agua destilada con agitación suave durante 5 minutos. Al final de cada lavado el agua fue retirada y el proceso fue repetido en 3 ocasiones. Después del último lavado, los geles fueron fijados con una solución de metanol (50%), ácido acético (10%) y agua destilada (40%) por 30 minutos con agitación suave. La tinción se realizó agregando 50 mL de Bio-Safe Coomassie stain (BIO-RAD, Bio-Safe™ Coomassie G-250 Stain, Cat. 161-0786) al recipiente del gel. Los geles se tiñeron durante un periodo de 2-4 horas con agitación suave. Terminado este proceso, los geles se lavaron como se describió anteriormente y desteñidos con una solución de metanol (30%) ácido acético (5%) y agua desionizada (65%).

Sensibilización Oral a Proteínas Alimentarias

Grupos de 6 ratones hembra fueron sometidos al protocolo de sensibilización intragástrica a caseína u ovoalbúmina (Brunner y col., 2009). El protocolo consta de dos principales pasos: 1) la neutralización o aumento del pH estomacal y 2) la administración intragástrica del alérgeno. Para la neutralización del pH estomacal, se les administró a los ratones de forma intragástrica mediante sondas de caucho 100 μ L de una solución de Sales de Hank's más NaHCO_3 al 7.5%. Después de 5 minutos, los ratones se sensibilizaron de manera intragástrica con una solución que contenía 0.2 mg de caseína u ovoalbúmina en 100 μ L de PBS más 50 μ L del antiácido sucralfato (1 g de SUC/ 5 mL de suspensión; Unival, Senosiain). El procedimiento de sensibilización intragástrica se repitió semanalmente en 8 ocasiones (días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49) (Figura 6). Como grupo control, ratones recibieron solamente PBS más sucralfato. Antes de cada sensibilización intragástrica los ratones se sometieron a un ayuno de 12 horas.

Sensibilización intragástrica

Grupo 1: PBS + Sucralfato + 0.2 mg caseína

Grupo 2: PBS + Sucralfato + 0.2 mg caseína

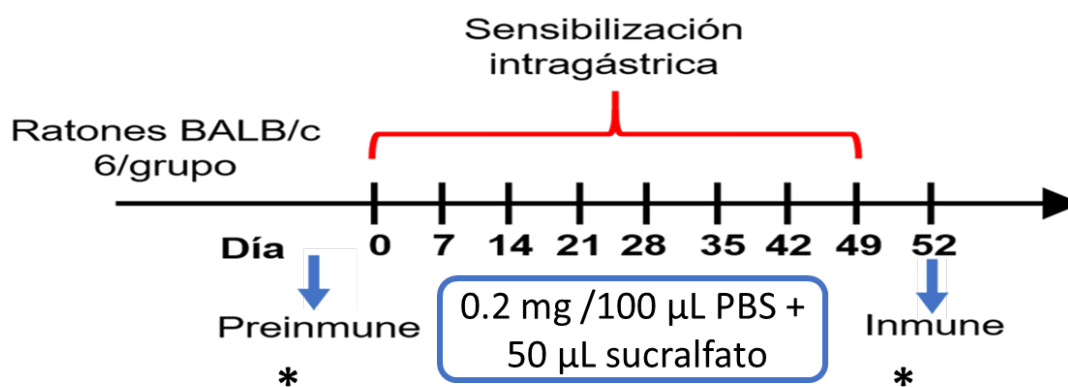
Grupo 3: PBS + Sucralfato + 0.2 mg caseína

Grupo 4: PBS + Sucralfato + 0.2 mg caseína

Grupo 5: PBS + Sucralfato + 0.2 mg ovoalbúmina

Grupo 6: PBS + Sucralfato + 0.2 mg ovoalbúmina

Grupo 7: PBS + Sucralfato + 0.2 mg ovoalbúmina



* Toma de muestra de sangre para la evaluación de anticuerpos IgE al alérgeno (caseínas u ovoalbúmina)

Antes de cada sensibilización los ratones fueron sometidos a 12 horas de ayuno.

Figura 6. Protocolo de sensibilización intragástrica.

Se tomaron muestras de sangre de la vena de la cola, previo a la primera inmunización (preinmune; día 0) y a los 52 días posteriores de la primera inmunización (inmune).

Sensibilización Intraperitoneal a Alérgenos Alimentarios (Caseína y Ovoalbúmina)

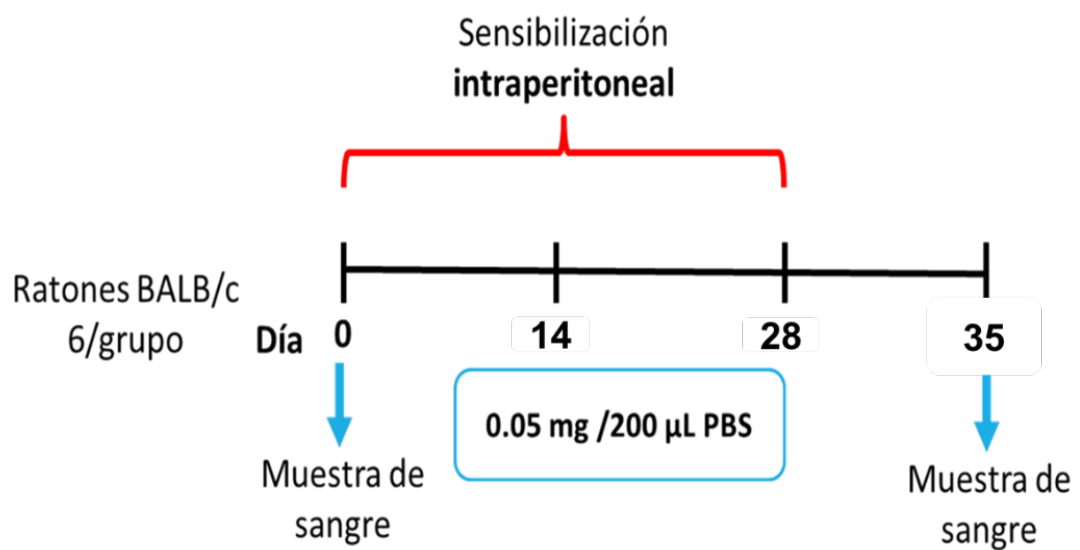
Grupos de 6 ratones hembra fueron sometidos al protocolo de sensibilización intraperitoneal de 35 días a caseína u ovoalbúmina. Los ratones recibieron una dosis de 50 µg de caseína u ovoalbúmina en 200 µL de PBS estéril de manera intraperitoneal en 3 ocasiones (día 0, 14 y 28). Se obtuvieron muestras de sangre de la vena de la cola, previo a la primera exposición intraperitoneal al alérgeno y 7 días después de la última exposición (día 35). El grupo control solo recibió de manera intraperitoneal la solución de PBS (Figura 7).

Toma de Muestra de Sangre y Sacrificio de Animales

En cada toma de muestra fue obtenido de la vena de la cola de los ratones un volumen de sangre de 100-150 µL. Las muestras se dejaron coagular toda la noche a 4°C y posteriormente fueron centrifugadas a 1500 g por 15 min. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su uso. Todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical una vez terminado los ensayos.

Reto Oral con el Alérgeno

Con el objetivo de evaluar la fase efectora de la alergia alimentaria, los ratones fueron sometidos a un reto oral con el alérgeno al que fueron sensibilizados. El reto oral fue llevado a cabo 7 días posteriores de la última exposición al alérgeno, independientemente de la vía de administración (oral o intragástrica). El reto consistió en la administración intragástrica de 2.0 mg de caseínas u ovoalbúmina (dependiendo del alérgeno al que fue sensibilizado) disueltos en 250 µL de PBS.



Día 0: Muestra de sangre preinmune
Día 35: Muestra de sangre inmune

Figura 7. Protocolo de sensibilización intraperitoneal de 35 días.

Se evaluó la temperatura corporal mediante un termómetro digital, previo a la administración intragástrica del alérgeno y 30 minutos posteriores. Adicionalmente, se tomaron muestras de sangre de la vena de la cola 30 minutos después de la administración intragástrica del alérgeno, para la evaluación de la proteasa 1 de mastocitos (mMCP-1).

Evaluación de mMCP-1 en Suero

La concentración de proteasa 1 de mastocitos (mMCP-1) en suero fue evaluada mediante el kit comercial mMCP-1 ELISA kit (BioLegend, Cat # 432702) siguiendo las instrucciones del fabricante. En breve, el anticuerpo de captura se diluyó 1:200 en buffer de cubierta y se agregó un volumen de 100 µL por cada pozo y se dejó incubar toda la noche a 4 °C. Posteriormente las placas se lavaron (4 veces) con 300 µL de buffer de lavado. Las placas se bloquearon con suero fetal bovino al 10% por 2 horas a temperatura ambiente. Subsecuentemente, las placas se lavaron (4 veces) y se agregaron por duplicado 100 µL del estándar de mMCP-1 (7 diferentes concentraciones 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125 y 62.5 pg/mL) y las muestras a evaluar. Las placas se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente y después fueron lavadas nuevamente (4 veces). Posteriormente se agregó a cada pozo 100 µL del anticuerpo de detección y se incubó de nuevo 1 h a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente en 4 ocasiones y se agregó a cada pozo 100 µL del complejo Avidina-HRP. Se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y se realizaron 5 lavados. Se agregaron 100 µL de sustrato TMB y se incubó en la oscuridad durante 30 min. La reacción se detuvo agregando 100 µL de H₂SO₄ 2N y la absorbancia se leyó a 450 nm después de 5 minutos de detenida la reacción.

Evaluación de Anticuerpos IgE por Ensayos de Inmunoadsorción Ligado a Enzimas

Los anticuerpos IgE específicos a caseínas y ovoalbúmina fueron determinados por ensayos de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA por su acrónimo en inglés; Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) como se describe a continuación: microplacas de 96 pozos fueron cubiertas con 20 µg de caseínas u ovoalbúmina en 100 µL de buffer de cubierta pH 9.5 (NaHCO₃ 0.099 mol/L; Na₂CO₃ 0.033 mol/L) e incubadas por 18 h a 4°C. Las placas fueron lavadas (200µL/pozo) con una solución de PBS pH 7.4 (NaCl 0.136.8 mM; Na₂HPO₄ 8.1 mM; KH₂PO₄ 1.4 mM; KCl 2.6 mM) / Tween 20 (FagaLab, Cat. 2377) al 0.05% y bloqueadas por 2 h con una solución de suero fetal bovino al 10% en PBS pH 7.4. Las muestras de suero de los ratones fueron diluidas 1:10 con solución de bloqueo (suero fetal bovino al 10% en PBS pH 7.4). Volúmenes de 100 µL de los sueros diluidos 1:10 fueron colocados en los pozos de las microplacas y se dejó incubar toda la noche a 4°C. Posteriormente, las placas fueron lavadas en 3 ocasiones y se agregaron 100 µL de anticuerpo anti-IgEa de ratón acoplado a biotina (BioLegend. Cat # 408804) diluido 1:250 en solución de bloqueo (concentración final de 2 µg/mL). Las placas fueron incubadas por una hora a temperatura ambiente y posteriormente lavadas (3 veces). Después de esto, se agregaron 100 µL por pozo de un conjugado estreptavidina/peroxidasa de rábano (BioLegend. Cat. 405210) diluido 1:1000 en solución de bloqueo. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente por 30 min y después lavadas (6 veces) para posteriormente agregar 100 µL de sustrato TMB (Thermo Scientific, Cat. 34028). El color se dejó desarrollar por 30 min y la reacción se detuvo agregando 50 µL de H₂SO₄ 2M. La densidad óptica se midió a 450 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific. Cat # 51119000). Todos los sueros fueron analizados por duplicado.

Evaluación de Viabilidad del Probiótico VSL#3 y Pruebas de Reto de Crecimiento con la Biota Intestinal del Ratón

Como fuente de probióticos, se utilizó la mezcla comercial disponible de probióticos VSL#3. La cual contiene una concentración de 112.5 billones de 8 diferentes microorganismos Gram positivos por cápsula (*Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaris*, *L. casei*, *L. plantarum*, *Bifidobacterium longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *Streptococcus salivaris* subsp. *thermophilus*). La concentración de cada cepa es desconocida y patentada por el fabricante. La evaluación de la viabilidad de los probióticos (VSL#3) y el análisis de la biota intestinal de los ratones se realizaron mediante análisis microbiológicos. Los medios de cultivo usados en los análisis microbiológicos se describen a continuación: se utilizó el medio Agar Lactobacilli MRS (Difco™, Cat. 288210), el cual es un medio específico para el crecimiento de lactobacilos. Para el aislamiento y detección de enterobacterias patógenas, se utilizó el medio azul de metileno eosina (EMB) (Merck, Cat. 101347) y el medio agar tripticasa de soya (TSA) (Merck, Cat. 105458) se utilizó como medio para el crecimiento abundante de microorganismos.

Para realizar la siembra de microorganismos probióticos, primero se disolvió el contenido de una cápsula del probiótico VSL#3 en 10 mL de solución salina estéril. Posteriormente, se realizaron 6 diluciones seriadas 1:10 y de la última dilución se sembraron 20 µL en agar MRS. Adicionalmente, 20 µL de la dilución 4, fueron sembrados en medio EMB. Para evaluar la biota intestinal de los ratones, se tomó un grupo de 3 animales los cuales fueron sacrificados y se extrajo un fragmento de yeyuno, el cual fue cortado longitudinalmente para dejar expuesta la parte apical. De aquí se tomaron muestras con asa microbiológica las cuales fueron sembradas en agar MRS y TSA. Veinticuatro horas después se tomó una colonia de cada uno de los medios y se cultivaron en línea en agar TSA. Posteriormente se tomaron colonias de la mezcla de probióticos VSL#3 a diferentes diluciones y se cultivaron de manera opuesta (90°) a la línea

previamente sembrada (biota del yeyuno) formando así una intersección donde se midió el desplazo y/o inhibición.

Análisis Estadístico

Los datos se presentan como la media de las mediciones con desviación estándar y se analizaron empleando el software estadístico GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). La prueba de Kruskal-Wallis se utilizó para calcular las diferencias entre grupos. La prueba U de Mann-Whitney se utilizó para comparar los niveles séricos de mMCP-1 en ratones sensibilizados y no sensibilizados. Un valor de $p < 0.05$ se consideró como diferencia estadísticamente significativa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de Cambios de pH de Fluido Gástrico Simulado

Parte de los resultados del presente estudio han sido publicados en la revista *Nutrients* (Factor de Impacto = 4.196) en el artículo de Arámburo-Gálvez y col., (2018; doi: 10.3390/nu10070903), titulado “Assessment of the Sensitizing Potential of Proteins in BALB/c Mice: Comparison of Three Protocols of Intraperitoneal Sensitization”, el cual se anexa al final del documento (Anexo II).

El modelo murino de alergia alimentaria inducido por vía oral implementado en este proyecto de investigación se basa en la elevación del pH gástrico mediante la administración de un antiácido, y por consiguiente el bloqueo o disminución de la digestión gástrica. De esta manera, las proteínas intactas o péptidos remanentes pueden ser mejor reconocidas por el sistema inmune y generar una producción de anticuerpos IgE específicos al alérgeno (Brunner y col., 2009). En este sentido, con el objetivo de establecer las condiciones idóneas para el desarrollo del modelo murino de alergia alimentaria inducido por vía oral, primero se realizaron ensayos *in vitro* de cambios de pH en fluido gástrico simulado después de la adición de 3 diferentes soluciones, dos de ellas con capacidad de elevar el pH (sucralfato y Sales de Hank's+ NaHCO₃ 7.5%) y una como solución control (PBS), esto con el fin de seleccionar tanto la dosis como la solución ideal para elevar el pH gástrico a valores alcalinos antes de la administración intragástrica del alérgeno.

En la figura 8 se muestran los resultados de la valuación de cambios de pH de FGS después de la adición de tres diferentes soluciones. Una vez agregado la solución de PBS los valores de pH del FGS se elevaron de 1.2 a 1.4 desde el primer minuto de reacción y este valor se mantuvo constante hasta los 120 minutos de reacción (Figura 8). Por otro lado, cuando el FGS fue mezclado con el antiácido comercial sucralfato, los valores de pH cambiaron de 1.2 a 2.6 al

primer minuto de reacción y el valor del pH de la mezcla fue aumentando de manera gradual hasta alcanzar un valor de pH máximo de 3.6 a los 120 minutos de reacción (Figura 8). Este aumento de pH puede explicarse debido a la presencia de hidróxido de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) en la formulación del Sucralfato, el cual funciona como una base de Brønsted-Lowry, por lo cual se pueden aceptar iones de hidrogeno y se neutraliza el ácido, con lo cual aumenta el pH del medio. Sin embargo, a pesar del aumento de pH del FGS promovido por el Sucralfato (pH de 1.2 a 3.6), estos valores de pH no son suficientes para inducir un bloqueo de la digestión gástrica de caseína, debido a que se ha reportado que el rango óptimo de actividad de la pepsina es de un pH de 1.2 a 3.5 (Jensen-Jarolim & Untersmayr, 2006) , valores de pH en los que las caseína son fácilmente degradable (Fu y col., 2002). Por lo cual el uso de Sucralfato como solución vehículo del alérgeno para la sensibilización oral, no sería suficiente para lograr un bloqueo de la digestión gástrica.

En cuanto a la solución de sales de Hank's + NaHCO_3 7.5% (relación 20:80), una vez mezclada con el FGS, los valores de pH del FGS aumentaron de 1.2 a 6.6 desde el primer minuto de reacción y continuaron aumentando de manera gradual hasta alcanzar un valor de 8.2 a los 120 minutos de reacción (Figura 8).

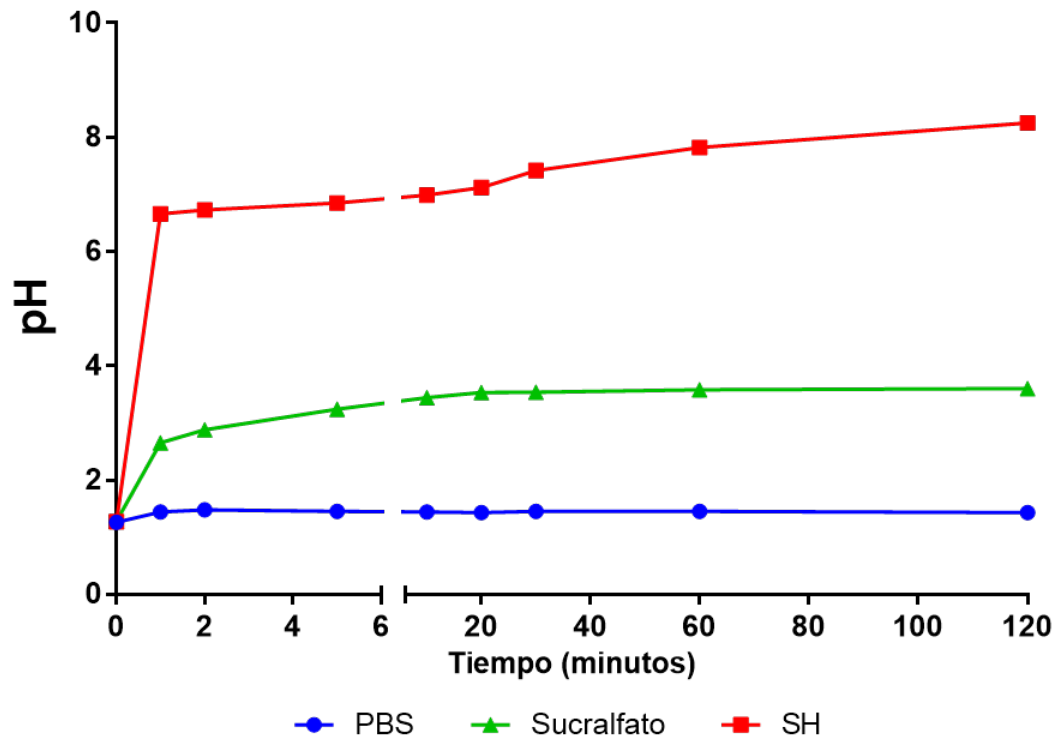


Figura 8. Evaluación de cambios de pH de FGS después de la adición de tres diferentes soluciones. Se usó una relación 1:4 de las soluciones a evaluar y el FGS. PBS: Solución de buffer de fosfatos; SH: Sales de Hank's + NaHCO₃ 7.5%.

Estudios previos muestran que la actividad de la pepsina se ve limitada en valores de pH superiores a 5.0 (Al-Janabi y col., 1972; McPhie, 1972), lo anterior con base en ensayos de digestibilidad realizados a un pH de 5.0, en los cuales alérgenos lábiles a la digestión como algunas proteínas de leche bovina (entre ellas la caseína), pescado y avellana permanecen estables (Schöll y col., 2005; Untersmayr y col., 2005; Untersmayr y col., 2005b). Esto indica que, la actividad de la pepsina se ve disminuida con el aumento del pH e incrementada con la disminución del pH gástrico (Al-Janabi y col., 1972; McPhie, 1972).

La marcada elevación de pH en el FGS promovida por la solución de sales de Hank's + NaHCO₃ 7.5% desde el primer minuto de reacción (pH 6.6), permitiría que caseínas intactas o péptidos remanentes sobrevivan a la digestión, debido a que en estos valores de pH la actividad de la pepsina se ve limitada. No obstante, en condiciones fisiológicas la presencia de proteínas en el estómago promueve la secreción de ácido clorhídrico (Soybel, 2005), lo cual dificultaría el mantenimiento del pH en valores en los cuales la actividad de la pepsina es limitada. En este sentido, se ha reportado que la pepsina es completamente desnaturalizada e irreversiblemente inactivada hasta valores de pH de 8.0 (Veličković & Gavrović-Jankulovi, 2014). De este modo, un aumento de pH del FGS a valores superiores a 8.0 en los primeros minutos de reacción, aumentaría la probabilidad de la supervivencia de un mayor número de caseínas intactas o fragmentos peptídicos con capacidad de generar una respuesta inmune.

En búsqueda de establecer las condiciones para lograr un aumento del pH del FGS a valores superiores a 8.0 en los primeros minutos de reacción, se realizó un ensayo dosis-dependiente utilizando diferentes relaciones de la solución de sales de Hank's + NaHCO₃ 7.5% y FGS (relación 1:4, 1:2 y 1:1). Como se observa en la figura 9, al utilizar una relación 1:1 de la solución de sales de Hank's + NaHCO₃ 7.5% y FGS, el pH del FGS aumentó de 1.2 a 7.8 en el primer minuto de reacción y alcanzó un valor de pH de 8.0 a los 5 minutos de

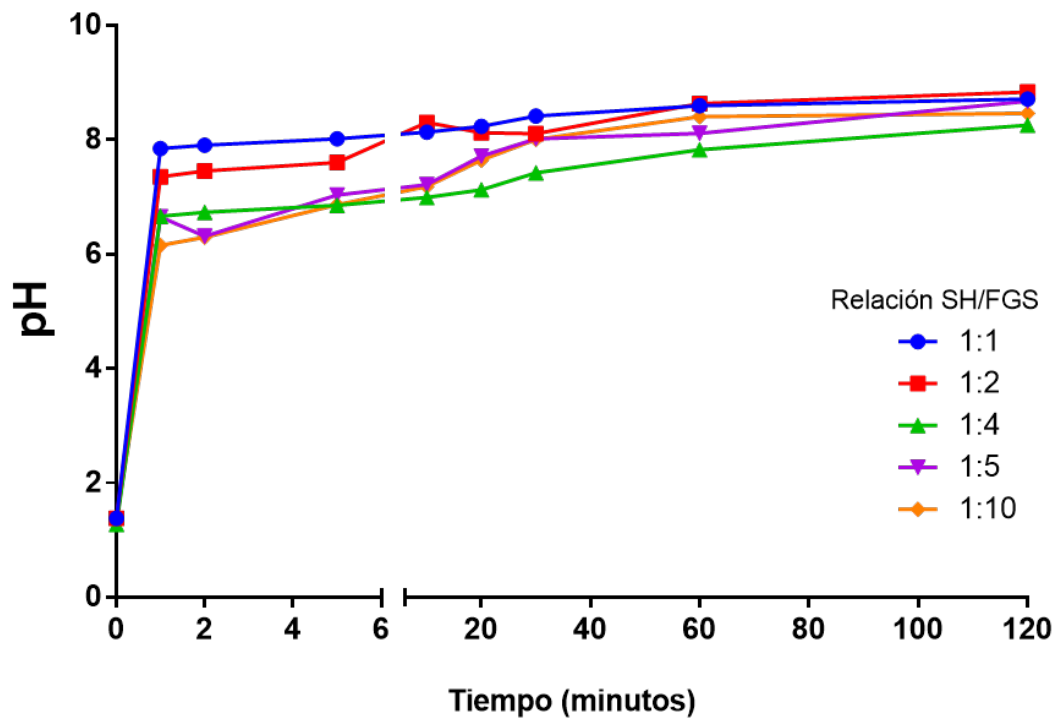


Figura 9. Evaluación del efecto dosis-dependiente en los cambios de pH de fluido gástrico simulado después de la adición de diferentes concentraciones de Sales de Hank's + NaHCO₃ 7.5%.

reacción y este fue aumentando ligeramente de manera gradual hasta alcanzar un valor de pH de 8.7 al minuto 120. Debido al rápido aumento del pH promovido por la solución de sales de Hank's + NaHCO₃ 7.5%, esta solución fue seleccionada para utilizarse previo a la administración del alérgeno en el modelo murino. De esta manera se asegura que al momento de la administración intragástrica del alérgeno el pH estomacal estará en condiciones alcalinas y la digestión gástrica disminuida.

Digestibilidad de Caseínas en Fluido Gástrico Simulado

Actualmente, no se ha establecido qué hace que una proteína alimentaria sea un alérgeno alimentario. Sin embargo, se ha propuesto que los alérgenos alimentarios comparten algunas características (glicoproteínas solubles en agua, peso molecular de entre 10 a 70 kDa, abundantes en el alimento y estables al tratamiento con calor y ácidos) (Bannon, 2004; Fu y col., 2002; Lehrer y col., 2002), entre ellas la resistencia a la digestión. En este sentido, la resistencia de proteínas alimentarias a la proteólisis en el tracto gastrointestinal ha recibido mucha atención y ha sido propuesta como un prerrequisito para que los alérgenos sean capaces de sensibilizar (Astwood y col., 1996; Bannon, 2004; Mills y col., 2004). Esto parte de la hipótesis, de que los alérgenos alimentarios resistentes a la digestión permanecen como proteínas intactas o como fragmentos grandes inmunológicamente activos, los cuales son más probable de ser absorbidos y encontrados por células del sistema inmune asociado a mucosas (placas de Peyer en el tracto gastrointestinal), aumentando la probabilidad de desarrollar una respuesta de anticuerpos IgE específicos al alérgeno (Bannon, 2004; Mills y col., 2004).

Varios estudios de digestión gástrica humana *in vivo* han sido realizados (Polovic y col., 2007; Troost, Steijns, Saris, & Brummer, 2001). Sin embargo, estos son técnica y éticamente difíciles de conducir e igualmente costosos (Wickham y col., 2009). Por lo cual, se han desarrollado varios modelos *in vitro* que simulan el

proceso de digestión gástrica. Entre los cuales destacan los ensayos de digestibilidad con pepsina, los cuales han sido diseñados para el evaluar el potencial alergénico de proteínas alimentarias basándose en su resistencia a la proteólisis con pepsina (Astwood y col., 1996; Thomas y col., 2004). Actualmente la resistencia a la proteólisis con pepsina es uno de los parámetros propuestos a evaluar cuando se estudia la alergenicidad de proteínas alimentarias (Codex Alimentarius, 2009).

En el presente estudio, en el marco del desarrollo del modelo murino de alergia alimentaria inducido por vía oral, se realizaron ensayos de digestibilidad con pepsina en fluido gástrico simulado en condiciones ácidas (pH 1.2, Figura 10) y con base en los resultados de los ensayos de cambios de pH, en condiciones alcalinas (pH \geq 8.0, Figura 11). Esto con el fin de analizar el efecto de la inactivación de la pepsina o bloqueo de la digestión gástrica en el perfil electroforético de la caseína.

La figura 10 muestra el patrón electroforético de las muestras obtenidas a diferentes puntos de tiempo en el ensayo de digestibilidad de caseína con pepsina. En los carriles 2 y 3 (controles de estabilidad) se puede observar una banda con peso molecular de entre 29 y 36 KDa, lo cual corresponde con el peso molecular reportado de la caseína. El perfil electroforético de las muestras de la digestión revela que las caseínas son totalmente digeridas después de 0.5 minutos de reacción (carril 7, Figura 10), lo cual concuerda con lo anteriormente reportado por otros autores (Fu y col., 2002; Jensen-Jarolim & Untersmayr, 2006).

La figura 11 muestra los resultados del ensayo de digestibilidad de caseína con pepsina en condiciones alcalinas (pH \leq 8.0). Este ensayo se llevó a cabo como anteriormente descrito, solo que previo a la adición de la muestra de caseína, el fluido gástrico simulado fue mezclado con una solución de sales de Hank's + NaHCO₃ 7.5% en una relación 1:1, aumentando el pH de la solución, como se mostró en la figura 9.

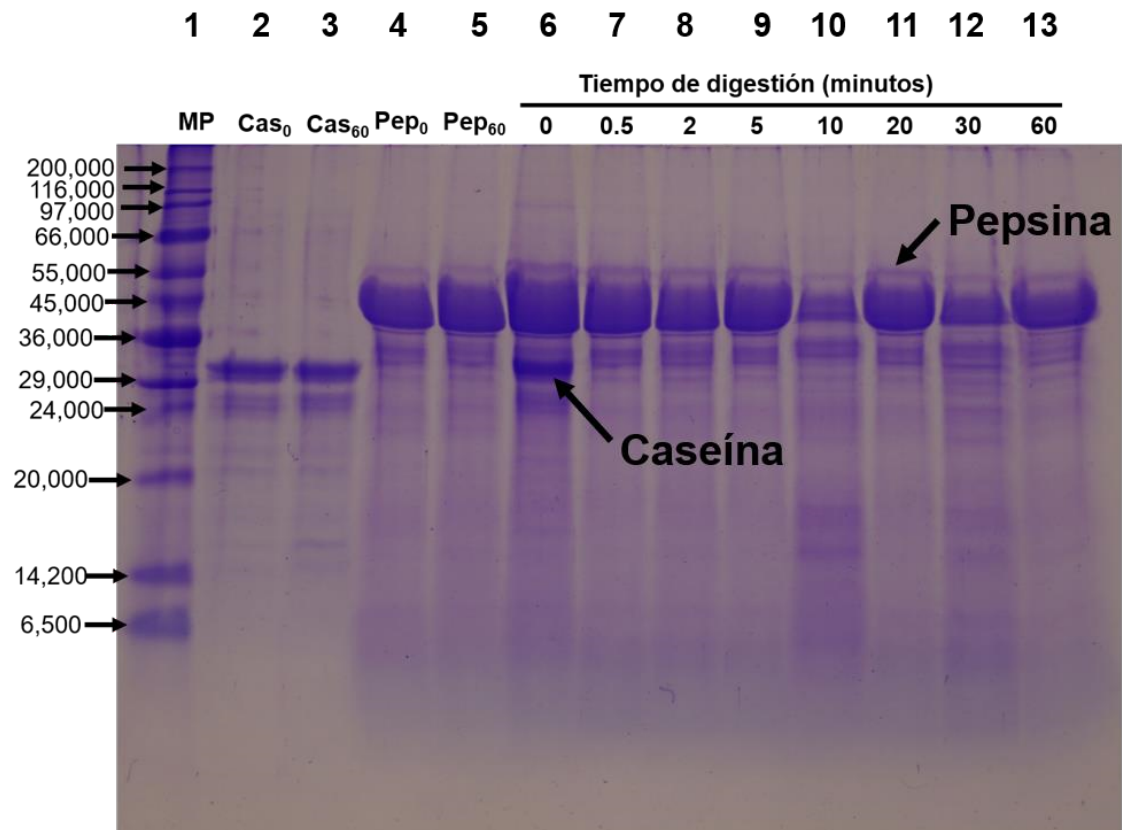


Figura 10. Gel de electroforesis al 15% con muestras de digestión de caseínas tomadas a diferentes puntos de tiempo en condiciones fisiológicas (pH 1.2). Carril 1: marcadores de peso molecular (6.5-200 kDa). Carriles 2 y 3: controles de estabilidad de la caseína. Carriles 4 y 5: controles de autodigestión de pepsina. Carriles del 6 al 13: digestión de caseína con pepsina a diferentes puntos de tiempo.

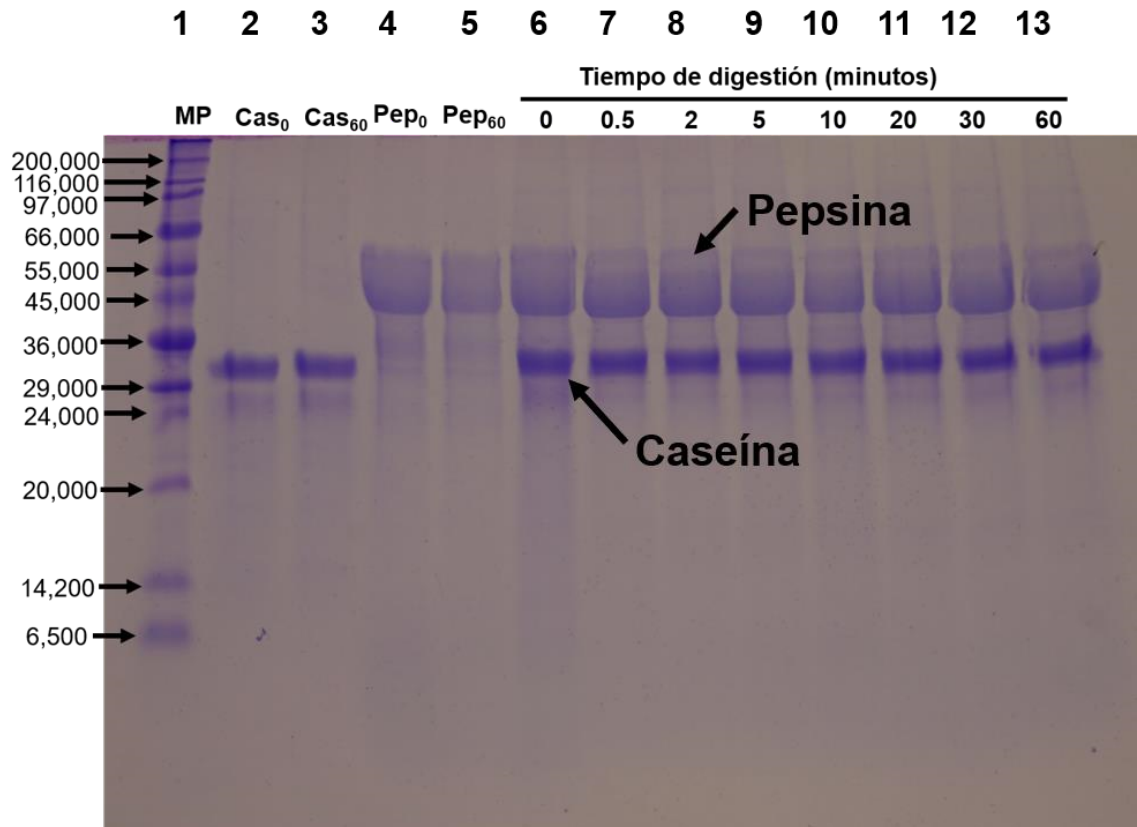


Figura 11. Gel de electroforesis al 15% con muestras de digestión de caseínas en fluido gástrico simulado en un pH alcalino ($\text{pH} \geq 8.0$) tomadas a diferentes puntos de tiempo. Carril 1: marcadores de peso molecular (6.5-200 kDa). Carriles 2 y 3: controles de estabilidad de la caseína. Carriles 4 y 5: controles de autodigestión de pepsina. Carriles del 6 al 13: digestión de caseína con pepsina a diferentes puntos de tiempo.

El perfil electroforético de las muestras de digestión revela que las caseínas son resistentes a la digestión en condiciones alcalinas ($\text{pH} \geq 8.0$), esto debido a que la banda correspondiente a la caseína se puede observar hasta el minuto 60 (carriles 6 al 13, Figura 11). Aunque en la presente investigación sólo se realizaron ensayos de digestión con pepsina de caseínas en FGS a valores de pH de 1.2 y de 8.0, otros investigadores han reportado que las caseínas son parcialmente resistentes a la digestión a pH de 3.0 y pueden permanecer parcialmente intactas a un pH de 5.0 (Untersmayr y col., 2005).

De igual manera, otros estudios han mostrado que la digestibilidad de los alérgenos puede ser afectada por variaciones en el pH. Por ejemplo, Lucas y col, (Lucas, Cochrane y col., 2008) mostraron que un aumento del pH de 1.5 a 2.5 puede reducir significativamente la proteólisis de alérgenos del kiwi y un aumento a un pH de 3.0 la puede bloquear por completo. Untersmayr y col (Untersmayr y col., 2005) observaron que las proteínas del bacalao son lábiles a la digestión en un rango de pH de 1.2 a 2.5, mientras que un ligero aumento del pH a valores de 2.75 es suficiente para bloquear por completo la digestión. Este efecto puede ser explicado debido a la actividad dependiente del pH de la pepsina y a que la desnaturalización dependiente de pH de las proteínas, ambas siendo afectadas por un aumento del pH del medio (Bøgh & Madsen, 2016).

Adicionalmente, otros estudios han mostrado que el deterioro del proceso de digestión gástrica puede conducir a una mayor alergenicidad de las proteínas alimentarias (Untersmayr y col., 2005; Untersmayr y col., 2007; Yoshino y col., 2004). Un ejemplo de esto es el estudio realizado por Untersmayr y col, (Untersmayr y col., 2003), al igual que el presente estudio, utilizó un medicamento antiácido para dificultar la digestión de las proteínas del caviar (una proteína normalmente degradable) al aumentar el pH estomacal, convirtiendo a estas proteínas en un alérgeno potencial, promoviendo su sensibilización en ratones. De manera similar, Scholl y col, (Schöll y col., 2005) mediante el mismo principio, promovieron la sensibilización a proteínas de avellana (proteínas degradables)

en ratones. De esta manera, el aumento del pH promovido por la solución de sales de Hank's y NaHCO_3 7.5%, se ve reflejado en el bloqueo de la digestión (Figura 11), ya que la banda correspondiente a la caseína permanece visible hasta los 60 minutos de reacción. Esto es de relevancia para el desarrollo del modelo murino de alergia alimentaria a caseínas bovinas, debido a que la resistencia a la digestión gástrica de la caseína inducida por el ambiente alcalino promueve que las caseínas permanezcan como proteínas intactas, lo cual al igual que lo observado por Untersmayr y col (2003) con las proteínas del caviar y Scholl y col. (2005) con las proteínas de avellana, el deterioro del proceso de digestión gástrica puede conducir a una mayor alergenicidad de las proteínas. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la asociación entre la resistencia a la digestión gástrica y la alergenicidad no siempre es absoluta, ya que se ha reportado que algunos alérgenos son susceptibles a la proteólisis con pepsina, mientras que otras proteínas no alergénicas son resistentes a la digestión con pepsina (Bøgh & Madsen, 2016; Foster y col., 2013).

Sensibilización Oral a Proteínas Alimentarias en Ratones BALB/c

Con base en los resultados obtenidos en los ensayos de cambios de pH, se tomó la decisión de realizar la sensibilización oral administrando una solución de sales de Hank's + NaHCO_3 7.5% de manera intragástrica. Después de cinco minutos, los ratones recibieron de manera intragástrica una dosis de 0.2 mg de caseína en 100 μL de PBS más 50 μL del antiácido sucralfato. Este procedimiento se repitió semanalmente durante 8 semanas, previo a la primera sensibilización y 3 días después de la última se tomaron muestra de sangre para la evaluación de anticuerpos IgE por medio de ensayos ELISA.

La figura 12 muestra los resultados de la detección de anticuerpos IgE específicos a caseínas en suero de ratones sometidos al protocolo de sensibilización oral. En general, se observó una ausencia de respuesta de anticuerpos IgE, dado que después de 8 sensibilizaciones intragástricas no se

observó una diferencia significativa en los niveles de anticuerpos IgE anti-caseína detectados entre el suero preinmune e inmune de los cuatro grupos de ratones sometidos al protocolo de sensibilización intragástrica ($p < 0.05$). Sólo uno de los 24 ratones sometidos al protocolo, produjo una respuesta de anticuerpos IgE anti-caseínas a niveles detectables mediante ensayos de ELISA. Debido a falta de respuesta observada al utilizar caseína como alérgeno, se optó por explorar el uso de la ovoalbúmina como alérgeno, la cual se ha reportado como una de las proteínas más alérgicas, para lo cual, se siguió el protocolo de sensibilización oral anteriormente descrito utilizando la ovoalbúmina como alérgeno.

En la figura 13 se observan los resultados de la detección de anticuerpos IgE específicos a ovoalbúmina en suero de ratones sometidos al protocolo de sensibilización oral a ovoalbúmina. Al igual que lo observado en el protocolo de sensibilización intragástrico a caseína, sólo una pequeña proporción de ratones produjeron una respuesta de anticuerpos IgE anti-ovoalbúmina después de recibir 8 sensibilizaciones intragástricas (2 de 18 ratones). De manera contraria, Brunner y col, (2009) utilizando el mismo protocolo de sensibilización intragástrico y el antiácido sucralfato para aumentar el pH estomacal, mostraron una completa sensibilización a ovoalbúmina en ratones BALB/c, presentando una producción de anticuerpos IgE anti-ovoalbúmina desde la segunda sensibilización y esta producción se incrementó conforme aumentó el número de sensibilizaciones (Brunner y col., 2009). Otros autores que utilizan un modelo murino de alergia alimentaria basado en el aumento del pH gástrico para inducir sensibilización han reportado la falta de respuesta de anticuerpos IgE en algunos de los ratones BALB/c sometidos al protocolo de sensibilización oral a ovoalbúmina (Diesner y col., 2016).

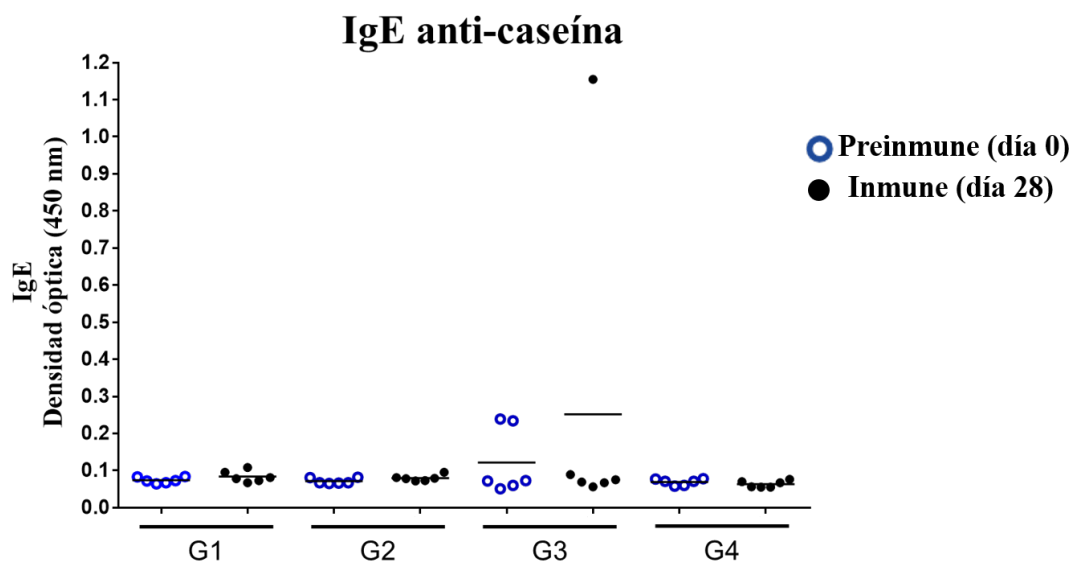


Figura 12. Sensibilización oral a caseínas bovinas en ratones BALB/c. Se detectaron anticuerpos IgE específicos a caseína en el suero de ratones sometidos a un protocolo de sensibilización oral a caseína. Las muestras de suero fueron tomadas previo a la primera sensibilización (día 0, círculos de color azul) y 3 días posteriores de la última sensibilización (día 52, puntos negros). Los ratones fueron sensibilizados con una dosis de 0.2 mg de caseína en 100 μ L de PBS más 50 μ L de sucralfato. Se muestran los resultados individuales de 6 ratones por grupo evaluados por duplicado.

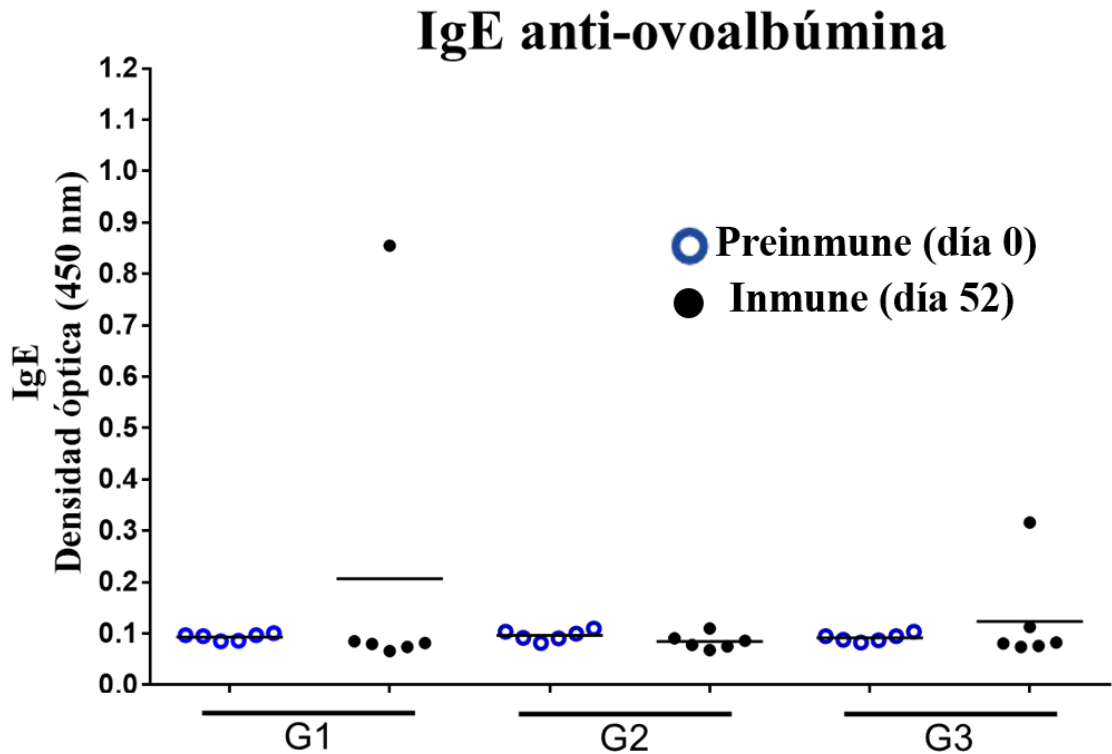


Figura 13. Sensibilización oral a ovoalbúmina en ratones BALB/c. Se detectó anticuerpos IgE específicos a ovoalbúmina en el suero de ratones sometidos a un protocolo de sensibilización oral a ovoalbúmina. Las muestras de suero fueron tomadas previo a la primera sensibilización (día 0, círculos de color azul) y 3 días posteriores de la última sensibilización (día 52, puntos negros). Los ratones fueron sensibilizados con una dosis de 0.2 mg de ovoalbúmina en 100 μ L de PBS más 50 μ L de sucralfato. Se muestran los resultados individuales de 6 ratones por grupo evaluados por duplicado.

La falta de respuesta en su modelo se ha asociado con diferencias en las poblaciones de bacterias intestinales de los ratones BALB/c sensibilizados y los no sensibilizados (Diesner y col., 2016). Desafortunadamente, la evaluación de las poblaciones bacterianas de la microbiota van más allá del objetivo de la presente investigación, sin embargo, este enfoque podría ser de gran relevancia y puede retomarse en futuras evaluaciones enfocadas en el desarrollo de un modelo murino de alergia alimentaria.

El protocolo de sensibilización oral del presente estudio se basó en el aumento del pH gástrico mediante la administración de un antiácido, para dificultar la digestión peptídica y aumentar la posibilidad de sensibilización. Trabajos de investigación que utilizan un principio diferente para generar sensibilización a proteínas alimentarias, como lo es la toxina colérica a modo de adyuvante, son otro ejemplo de las inconsistencias entre los resultados de protocolos de sensibilización oral en ratones BALB/c. Mientras que, algunos autores han reportado una ausencia de respuesta de anticuerpos IgE en ratones BALB/c sometidos a protocolos de sensibilización oral a proteínas de la leche de bovina usando la toxina colérica como adyuvante (Morafo y col., 2003; Thang y col., 2011), otros reportan una completa sensibilización a proteínas de leche bovina (entre ellas caseínas) en ratones BALB/c usando un protocolo distinto de sensibilización oral y la toxina colérica como adyuvante (Adel-Patient y col., 2005; Bailón y col., 2012). En estos protocolos con sensibilización positiva a las proteínas de leche bovina también fue posible evaluar la fase efectora después de un reto oral con el alérgeno mediante niveles séricos de histamina y la evaluación de síntomas de hipersensibilidad (Adel-Patient y col., 2005; Bailón y col., 2012). En nuestro modelo de sensibilización oral a caseínas u ovoalbúmina no se pudieron evaluar indicadores de la fase efectora debido a la falta de sensibilización en la mayoría de los ratones.

A pesar de que el mecanismo por el cual las proteínas alimentarias sensibilizan a un individuo actualmente permanece parcialmente sin resolver, se

creo que muchos alérgenos alimentarios promueven una sensibilización a través del tracto gastrointestinal (vía oral), la cual también es la ruta de entrada general de los alérgenos alimentarios que inducen una respuesta alérgica. Por lo cual, la vía oral parece ser la ruta más relevante cuando se intenta desarrollar un modelo murino de alergia alimentaria o para la evaluación del potencial alergénico de las proteínas alimentarias. No obstante, se debe tener en cuenta las posibles complicaciones o limitaciones al usar esta vía, ya que el sistema inmune asociado a mucosas es tolerogénico y tiende a desarrollar una ausencia de respuesta inmunológica a las proteínas consumidas por la vía oral (conocida como tolerancia oral). De esta manera, para lograr la sensibilización a las proteínas alimentarias que ingresan por vía oral, se debe de romper dicha tolerancia (Remington y col., 2017).

En la presente investigación se propuso desarrollar un modelo murino de alergia alimentaria inducido por vía oral para evaluar el efecto de la suplementación con probióticos sobre la respuesta alérgica a proteínas alimentarias. Dicho modelo se basó en el aumento del pH gástrico mediante la administración de un antiácido, para dificultar la digestión peptídica y aumentar la posibilidad de sensibilización. Partiendo de la hipótesis de que los alérgenos deben llegar a la mucosa intestinal en forma intacta o parcialmente digeridos, para inducir una sensibilización (Astwood y col., 1996). Este modelo utiliza el antiácido sucralfato, el cual es un complejo aluminio-sacarosa-sulfato utilizado en el tratamiento de úlceras gástricas (Untersmayr y col., 2003) y tiene la capacidad de elevar el pH gástrico (R Brunner y col., 2009). Además, el sucralfato puede funcionar como adyuvante debido a la presencia de aluminio en su formulación, el cual promueve respuestas de tipo Th2 y consecuente producción de anticuerpos IgE (Brunner y col, 2010; Brunner y col., 2009; Brunner y col., 2007). De este modo, el sucralfato en el modelo murino puede aumentar el riesgo de sensibilización tanto por el efecto de la inhibición de la digestión peptídica como la capacidad de actuar como adyuvante de tipo Th2 (Brunner y col., 2009). Sin

embargo, en el presente estudio el uso del sucralfato en las sensibilizaciones orales no fue suficiente para generar una respuesta de anticuerpos IgE específicos al alérgeno en la gran mayoría de los sometidos al protocolo de sensibilización oral (Figuras 12 y 13). Esta ausencia de respuesta también puede asociarse con inducción de tolerancia oral debido a la alta capacidad tolerogénica del sistema inmune asociado a mucosas, la cual pudo fomentarse si durante la administración intragástrica del alérgeno existieron complicaciones técnicas que promovieron el contacto del alérgeno en la cavidad oral. Esto debido a que se ha reportado que el contacto del alérgeno en la cavidad oral previo a una sensibilización es suficiente para generar una ausencia de respuesta a la proteína de estudio en un modelo murino (Brunner y col., 2009).

Ciertamente, una de las características que deben tomarse en cuenta cuando se intenta desarrollar un modelo murino de alergia alimentaria, es la carga genética de la cepa de ratón que se utilizará, ya que cada cepa de ratón tiene una asociación con el tipo e intensidad de respuesta que genera después de la exposición a un antígeno (Gonipeta y col., 2015; Liu y col., 2016). En este contexto, con base en lo reportado en otras investigaciones en las cuales se utiliza la cepa de ratones BALB/c, se muestra una inconsistencia entre las respuestas de anticuerpos IgE generadas al usar protocolos de sensibilización orales, igual a lo observado en la presente investigación. Por lo cual, el uso de ratones de la cepa BALB/c no parece adecuado para el desarrollo de un modelo murino de alergia alimentaria, si se tiene pensado utilizar como ruta de sensibilización la vía oral. Tomando esto en cuenta, se descartó el uso de la vía oral para el desarrollo del modelo murino de alergia alimentaria. No obstante, se optó por explorar la ruta intraperitoneal para establecer el modelo murino para ser utilizado en la evaluación de la suplementación con probióticos sobre la modulación de la respuesta inmune.

Sensibilización Intraperitoneal a Proteínas Alimentarias

Aunque la sensibilización a proteínas alimentarias por vía intraperitoneal tiene algunas limitaciones, esta ruta parece ser el método de elección en el modelo de ratón. Esto se debe principalmente a que la sensibilización intraperitoneal evita la inducción de tolerancia oral a la proteína administrada. En la presente investigación se utilizó este enfoque para inducir la sensibilización a proteínas alimentarias. Para lo cual, se siguió un protocolo de sensibilización intraperitoneal de 35 días, el cual consistió en administrar de manera intraperitoneal una dosis de 0.05 mg de alérgeno (caseína u ovoalbúmina) en 200 μ L de PBS. Este procedimiento se repitió en 3 ocasiones (día 0, 14 y 28) y se tomó una muestra de sangre previo a la primera sensibilización y siete días después de la última para la evaluación de anticuerpos IgE.

La figura 14 muestra los resultados de la evaluación de anticuerpos IgE específicos a caseínas bovinas en suero de ratones BALB/c sometidos a un protocolo de sensibilización intraperitoneal. En general, el protocolo de sensibilización intraperitoneal de 35 días falló en la inducción de una respuesta de anticuerpos IgE anti-caseínas en los ratones BALB/c. Sin embargo, otros esquemas de sensibilización que varían en el número y frecuencia de las sensibilizaciones intraperitoneales, así como en la dosis utilizada han mostrado ser capaces de inducir una respuesta de anticuerpos IgE anti-caseína (Arámburo-Galvez y col., 2018). Un protocolo de sensibilización intraperitoneal de 14 días con dos sensibilizaciones (día 0 y 14), produjo una leve respuesta de anticuerpos IgE anti-caseínas cuando se usó una dosis de 0.025 y 0.05 mg de caseína, mientras que al usar una dosis de 0.25 mg no generó una respuesta.

IgE anti-caseína

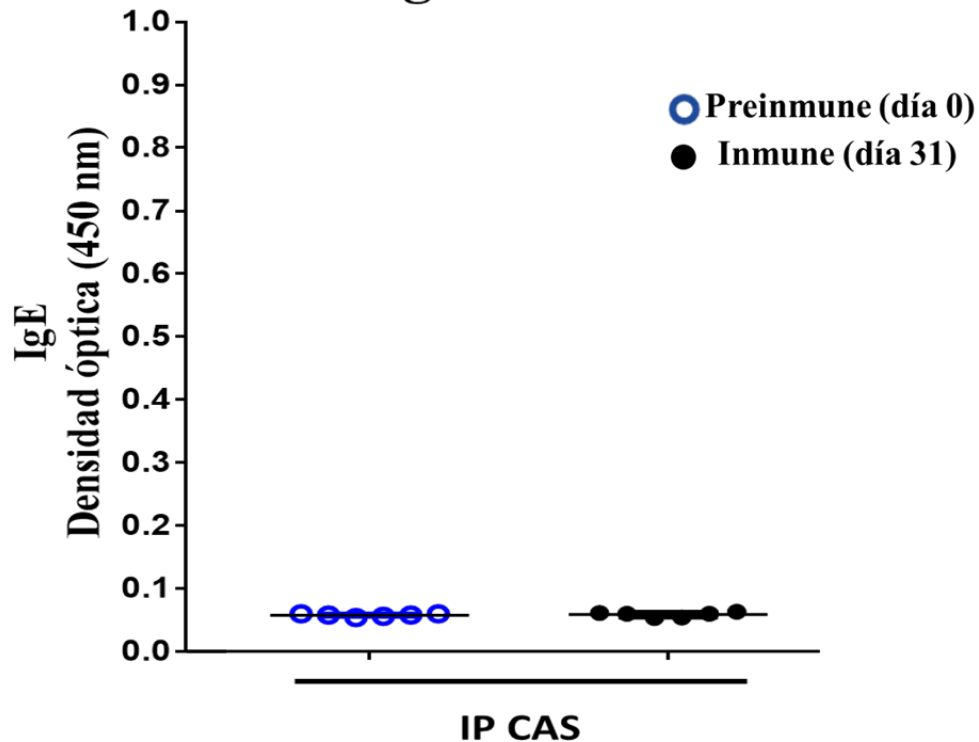


Figura 14. Evaluación de anticuerpos IgE específicos a caseínas bovinas en suero de ratones BALB/c sometidos a un protocolo de sensibilización intraperitoneal. Las muestras de suero fueron tomadas previo a la primera sensibilización (día 0, círculos de color azul) y 3 días posteriores de la última sensibilización (día 31, puntos negros). Los ratones fueron sensibilizados de manera intraperitoneal con una dosis de 0.05 mg de caseína en 200 μ L de PBS. Se muestran los resultados individuales de 6 ratones evaluados por duplicado. * diferencia estadística.

Adicionalmente, un protocolo de sensibilización intraperitoneal 28 días con 5 sensibilizaciones (día 0, 3, 6, 9 y 12) fue capaz de producir una alta respuesta de anticuerpos IgE anti-caseínas usando tanto una dosis de 0.05 y 0.025 mg de caseína y dicha respuesta fue menor al utilizar una dosis de 0.25 mg (Arámburo-Galvez y col., 2018). Estas observaciones destacan el rol crítico de la dosis del alérgeno, así como del número y frecuencia de las sensibilizaciones para lograr una sensibilización completa en ratones BALB/c. Otros autores, han mostrado que los ratones BALB/c pueden ser sensibilizados a las proteínas de la leche de vaca sin el uso de adyuvantes, utilizando un protocolo de sensibilización intraperitoneal (Morin y col., 2011). Sin embargo, este protocolo es difícil de llevar a cabo, debido a que involucra que los ratones nazcan y crezcan en un ambiente libre de gérmenes. Otros autores han mostrado que los ratones BALB/c pueden ser sensibilizados a proteínas de leche de vaca sin el uso de adyuvantes mediante un protocolo de sensibilización transdérmico de 6 semanas (Gonipeta y col., 2009). No obstante, el protocolo de sensibilización intraperitoneal a caseína de 28 días tiene la ventaja de ser más corto que el protocolo transdérmico de 6 semanas y que los ratones pueden ser sensibilizados sin la necesidad de crecer en un ambiente libre de gérmenes. Por lo cual, este modelo murino de alergia a las caseínas parece ser adecuado para ser usado para evaluar el efecto de la suplementación con probióticos sobre la modulación de la respuesta alérgica.

Por otro lado, los ratones que fueron sometidos al protocolo de sensibilización intraperitoneal de 35 días mostraron una moderada respuesta positiva de anticuerpos IgE anti-ovoalbúmina (Figura 15). De manera similar con lo observado en los protocolos de sensibilización intraperitoneal a caseína, otros esquemas de sensibilización (diferencia en dosis, frecuencia y número de inyecciones) han mostrado ser capaces de inducir una respuesta de anticuerpos IgE anti-ovoalbúmina (Arámburo-Galvez y col., 2018; Chen y col., 2013; Hilton y col., 1994; Hilton y col., 1997; Liu y col., 2016).

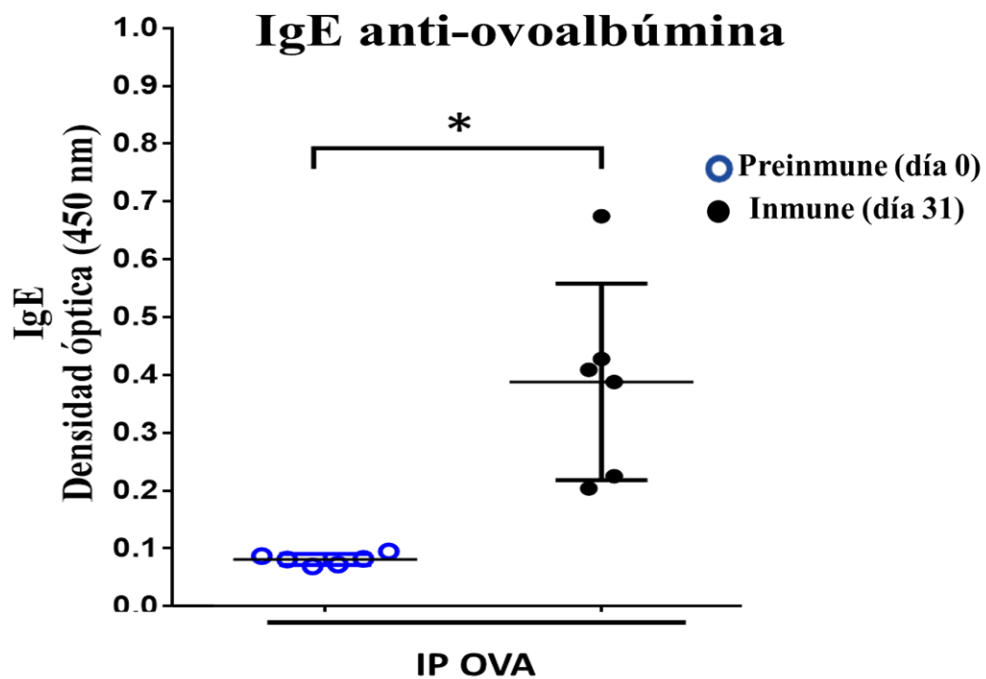


Figura 15. Evaluación de anticuerpos IgE específicos ovoalbúmina en suero de ratones BALB/c sometidos a un protocolo de sensibilización intraperitoneal. Las muestras de suero fueron tomadas previo a la primera sensibilización (día 0, círculos de color azul) y 3 días posteriores de la última sensibilización (día 31, puntos negros). Los ratones fueron sensibilizados de manera intraperitoneal con una dosis de 0.05 mg de ovoalbúmina en 200 μ L de PBS. Se muestran los resultados individuales de 6 ratones evaluados por duplicado.

En este sentido, con base en resultados obtenidos en nuestro grupo de investigación, se ha observado que a pesar de usar la misma dosis de alérgeno (0.05 mg de ovoalbúmina), la implementación de un protocolo de 28 días con 5 sensibilizaciones (día 0, 3, 6, 9 y 12), produce una mayor respuesta de anticuerpos IgE anti-ovoalbúmina, que las observadas en protocolos de sensibilización intraperitoneal de 14 días con dos inyecciones (día 0 y 14) y de 35 días con 3 inyecciones (0,14 y 28) (Arámburo-Galvez y col., 2018).

Con base en los parámetros que se evalúan, los modelos murinos de alergia alimentaria pueden ser divididos en dos tipos: modelos de respuesta inmune más resultados de enfermedad (enfocados tanto en la respuesta de anticuerpos IgE, así como los resultados de hipersensibilidad como temperatura corporal, pruebas de punción cutánea y marcadores de una reacción alérgica como histamina y mMCP-1) y modelos de respuesta inmune (solo enfocados en la producción de anticuerpos IgE) (Gonipeta y col., 2015). El uso de modelos murinos de respuesta inmune es utilizado por lo general para evaluar el potencial de sensibilización de nuevas proteínas alimentarias, ya que la presencia de anticuerpos IgE es un marcador de sensibilización y un prerrequisito para el desarrollo de una respuesta alérgica (Oettgen, 2016), pero, se ha reportado la presencia de anticuerpos IgE no garantiza el desencadenamiento de la fase efectora después de un reto con el alérgeno (Li y col., 1999). En este contexto, para poder evaluar el efecto de la suplementación con probióticos sobre la respuesta alérgica a las proteínas alimentarias, es necesario que el modelo murino de alergia alimentaria sea capaz de producir una respuesta alérgica. De esta manera, se realizó un reto oral con el alérgeno a los ratone sometidos al protocolo de sensibilización intraperitoneal de 35 días a ovoalbúmina, con el objetivo de evaluar la respuesta alérgica mediante niveles séricos de mMCP-1.

Evaluación de mMCP-1 en Suero de Ratones BALB/c Sensibilizados de Manera Intraperitoneal a Ovoalbúmina

En el presente estudio, con el fin de evaluar la fase efectora de los ratones que fueron sensibilizados mediante el protocolo de sensibilización intraperitoneal de 35 días a ovoalbúmina, se realizó un reto oral con ovoalbúmina y se evaluaron los niveles de mMCP-1 en el suero de los ratones. Por otro lado, la fase efectora no pudo evaluarse por medio de niveles de mMCP-1 en los ratones sometidos al protocolo de sensibilización intraperitoneal a caseínas, debido a una falta de respuesta de anticuerpos IgE anti-caseínas. La figura 16 muestra los resultados de la evaluación de los niveles de mMCP-1 en el suero de ratones sensibilizados a ovoalbúmina y sometidos a un reto oral. Después de 30 minutos del reto oral, los valores de mMCP-1 en suero fueron significativamente mayores en los ratones sometidos al protocolo de sensibilización intraperitoneal de 35 días, comparado a los valores de mMCP-1 de los ratones sensibilizados con PBS (grupo control) y retados con ovoalbúmina ($p < 0.05$). Niveles basales de mMCP-1 fueron detectados en los sueros preinmunes (día 0) tanto de los ratones sensibilizados a ovoalbúmina y como en los controles PBS. El mMCP-1 es predominantemente expresados por mastocitos de la mucosa intestinal y puede promover permeabilidad epitelial de la mucosa cuando es liberado en respuestas alérgicas (Wastling y col., 1998). De esta manera, la presencia de mMCP-1 en suero de ratones retados de manera oral es un indicador indirecto de la degranulación de los mastocitos, inducida por su encuentro con el alérgeno y ha sido propuesto como un marcador de inmunopatología intestinal en modelos de alergia alimentaria (Vaali y col., 2005). Los niveles séricos de mMCP-1 han sido utilizados en otras investigaciones como marcador de una respuesta efectora en modelos murinos de alergia (Diesner y col., 2016; Liu y col., 2013; Nieuwenhuizen y col., 2006; Yamaki & Yoshino, 2012). La presencia de mMCP-1 en el suero de ratones sensibilizados a ovoalbúmina después de un reto oral, indican que el modelo murino de sensibilización a ovoalbúmina bajo el protocolo intraperitoneal

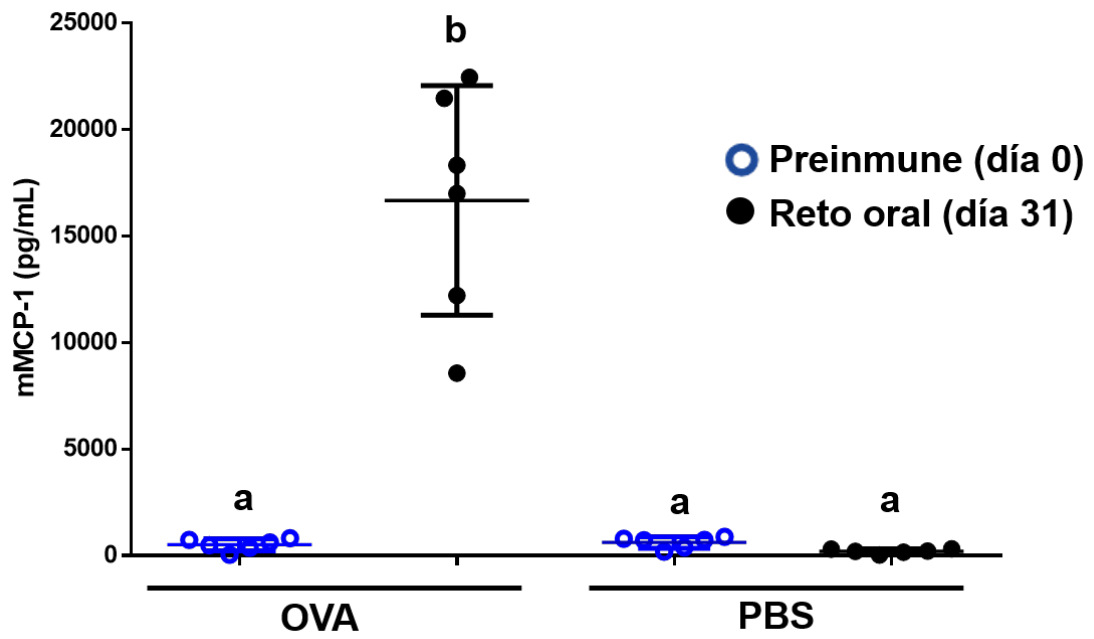


Figura 16. Evaluación de mMCP-1 en suero de ratones sensibilizados de manera intraperitoneal a ovoalbúmina sometidos a un reto intragástrico.

de 35 días parece representar un modelo factible ser utilizado para evaluar el efecto de la suplementación con probióticos sobre la modulación de la respuesta alérgica.

Hay dos fases involucradas en la patogénesis de la alergia alimentaria, la fase de sensibilización y la fase efectora. En la fase de sensibilización ocurre el primer encuentro del alérgeno con las células del sistema inmune y en último término conlleva a la formación de anticuerpos IgE específicos al alérgeno, los cuales pueden unirse a receptores de IgE de alta afinidad (FcεRI) en la superficie de mastocitos, generando así células sensibilizadas (Ontiveros y col., 2014). La fase efectora implica la reexposición al alérgeno, el cual se entrecruza con dos IgE adyacentes en la membrana de los mastocitos sensibilizados, conduciendo a la exocitosis de gránulos que contienen mediadores de hipersensibilidad como histamina, prostaglandinas, leucotrienos, factor activador de plaquetas y proteasas como el MCP-1, provocan un rango de respuestas fisiológicas tales como vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y la constricción del músculo liso (Williams & Sharma, 2015).

Evaluación de Viabilidad del Probiótico VSL#3 y Pruebas de Reto de Crecimiento con la Biota Intestinal del Ratón.

Los probióticos son definidos como “microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud en el hospedero” (FAO, 2001). En este sentido, la suplementación con el probiótico comercial VSL#3, el cual consta de una mezcla liofilizada de 8 microorganismos probióticos Gram positivos, ha mostrado en modelos murinos de alergia alimentaria la capacidad de modular la respuesta inmune alérgica, promoviendo una despolarización de una respuesta de tipo Th2 a Th1 (Barletta y col., 2013; Schiavi y col., 2011).

Se evaluó la viabilidad del probiótico VSL#3 y posteriormente se realizó una prueba de reto de crecimiento con la biota intestinal del ratón. La viabilidad

de los probióticos fue confirmada cultivándolos en agar MRS selectivo para lactobacilos (Figura 17a) y en medio de cultivo no selectivo como el agar tripticasa de soya (figura 17b), mostrando un crecimiento en ambos medios. En cuanto a la biota intestinal del ratón, se puede observar que es rica en lactobacilos (Figura 17c) y las pruebas de reto de crecimiento muestran que por lo menos *in vitro*, tanto los lactobacilos recuperados de las heces de los animales como la biota recuperada directamente de la parte apical del yeyuno no afectan el crecimiento de la mezcla de microorganismos probióticos contenidos en el VSL#3 (Figura 17d). Estos resultados muestran que la suplementación con el probiótico VSL#3 sería viable, debido a que su crecimiento no se ve afectado por la biota residente del intestino del ratón, por lo cual los microorganismos probióticos del VSL#3 pueden ejercer su efecto sobre la despolarización de la respuesta alérgica a las proteínas de los alimentos

En este contexto, los esquemas de suplementación con el probiótico VSL#3 que han mostrado ejercer una modulación de la respuesta alérgica a proteínas alimentarias, consta de la administración por vía oral de 7.5×10^8 microorganismos de manera diaria por al menos 20 días (Barletta y col., 2013; Schiavi y col., 2011). De esta manera, la suplementación con el probiótico VSL#3 con el esquema de 20 días podría ejercer un efecto modulador de la respuesta alérgica en ratones sensibilizados contra caseínas u ovoalbúmina. Sin embargo, en la presente investigación debido a las dificultades para inducir sensibilización a caseínas u ovoalbúmina exhibidas durante el desarrollo del modelo murino de alergia alimentaria inducido por vía oral, no se pudo evaluar el efecto de la suplementación del probiótico comercial VSL#3 en la modulación de la respuesta alérgica a caseínas bovinas o a ovoalbúmina. No obstante, debido a los resultados observados en el protocolo de sensibilización intraperitoneal a ovoalbúmina, se propone utilizar como modelo murino la cepa de ratones BALB/c junto con un adecuado protocolo de sensibilización intraperitoneal para inducir sensibilización a proteínas alimentarias y posteriormente evaluar el efecto de la

suplementación con probióticos sobre la respuesta alérgica a proteínas alimentarias.

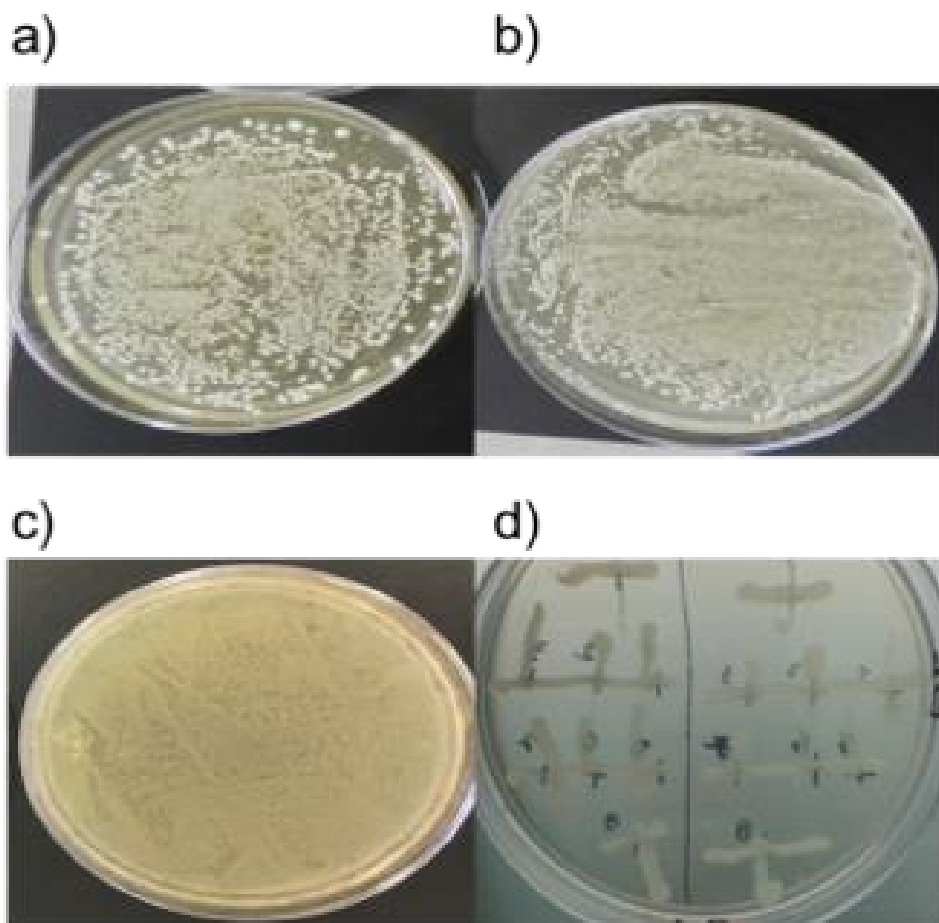


Figura 17. Evaluación de viabilidad del probiótico VSL#3 y retos de crecimiento con biota intestinal del ratón. a) Lactobacilos contenidos en el probiótico VSL#3 cultivados en medio selectivo MRS, b) microorganismos contenidos en el probiótico VSL#3 cultivados en agar TSA, c) lactobacilos de heces de ratones BALB/c cultivados en medio MRS, d) prueba de reto de crecimiento. Del lado izquierdo se muestra la prueba de crecimiento entre la microbiota intestinal del ratón (líneas horizontales) y los probióticos contenidos en el probiótico VSL#3 (líneas verticales). Del lado derecho se muestra la prueba de crecimiento entre solo los lactobacilos del ratón (líneas horizontales) y los probióticos contenidos en el probiótico VSL#3 (líneas verticales). MRS; agar para lactobacilos, TSA; agar tripticasa de soya.

CONCLUSIONES

La ruta de exposición al alérgeno influye sobre la capacidad de sensibilización en condiciones experimentales y debe tenerse en cuenta al desarrollar un modelo murino de alergia alimentaria. En nuestro estudio, la mayoría de los ratones BALB/c expuestos intragástricamente a caseínas bovinas u ovoalbúmina no se sensibilizaron. En las condiciones utilizadas en este trabajo, los ratones BALB/c no representaron un modelo apropiado para el desarrollo de un modelo murino de alergia alimentaria sensibilizado por la ruta oral. En contraste, cuando se empleó la ovoalbúmina como alérgeno, la ruta intraperitoneal mostró ser conveniente para desencadenar una respuesta inmune de anticuerpos IgE, así como una respuesta efectora cuantificable empleando los niveles séricos de mMCP-1 después de un reto oral con el alérgeno. En cambio, el protocolo de sensibilización intraperitoneal a caseínas bovinas aplicado en este trabajo no mostro una respuesta de anticuerpos IgE. Por lo cual, el modelo murino de sensibilización a ovoalbúmina bajo el protocolo intraperitoneal de 35 días parece ser un modelo adecuado para evaluar la despolarización de la respuesta alérgica mediada por la suplementación con probióticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Adel-Patient, K., Bernard, H., Ah-Leung, S., Creminon, C., & Wal, J. M. (2005). Peanut-and cow's milk-specific IgE, Th2 cells and local anaphylactic reaction are induced in Balb/c mice orally sensitized with cholera toxin. *Allergy*, *60*(5), 658-664.
- Ahn, K., Kim, J., Hahm, M.-I., Lee, S.-Y., Kim, W. K., Chae, Y., . . . Kim, J. K. (2012). *Prevalence of immediate-type food allergy in Korean schoolchildren: a population-based study*. Paper presented at the Allergy and asthma proceedings.
- Ahrens, B., Lopes de Oliveira, L., Grabenhenrich, L., Schulz, G., Niggemann, B., Wahn, U., & Beyer, K. (2012). Individual cow's milk allergens as prognostic markers for tolerance development? *Clinical & Experimental Allergy*, *42*(11), 1630-1637.
- Al-Hammadi, S., Al-Maskari, F., & Bernsen, R. (2010). Prevalence of food allergy among children in Al-Ain city, United Arab Emirates. *International archives of allergy and immunology*, *151*(4), 336-342.
- Al-Janabi, J., Hartsuck, J. A., & Tang, J. (1972). Kinetics and mechanism of pepsinogen activation. *Journal of Biological Chemistry*, *247*(14), 4628-4632.
- Aldemir, H., Bars, R., & Herouet-Guicheney, C. (2009). Murine models for evaluating the allergenicity of novel proteins and foods. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *54*(3), S52-S57.
- Alimentarius, C. (2009). Foods derived from modern biotechnology. Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Rome.
- Arámburo-Galvez, J., Sotelo-Cruz, N., Flores-Mendoza, L., Gracia-Valenzuela, M., Chiquete-Elizalde, F., Espinoza-Alderete, J., . . . Cabrera-Chávez, F. (2018). Assessment of the Sensitizing Potential of Proteins in BALB/c

- Mice: Comparison of Three Protocols of Intraperitoneal Sensitization. *Nutrients*, 10(7), 903.
- Artis, D. (2008). Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature reviews. Immunology*, 8(6), 411.
- Ashley, S., Dang, T., Koplin, J., Martino, D., & Prescott, S. (2015). Food for thought: progress in understanding the causes and mechanisms of food allergy. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 15(3), 237-242.
- Astwood, J. D., Leach, J. N., & Fuchs, R. L. (1996). Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature biotechnology*, 14(10), 1269.
- Aureli, P., Capurso, L., Castellazzi, A. M., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli, L., . . . Zuccotti, G. V. (2011). Probiotics and health: an evidence-based review. *Pharmacological research*, 63(5), 366-376.
- Bailón, E., Cueto-Sola, M., Utrilla, P., Rodríguez-Ruiz, J., Garrido-Mesa, N., Zarzuelo, A., . . . Comalada, M. (2012). A shorter and more specific oral sensitization-based experimental model of food allergy in mice. *Journal of immunological methods*, 381(1-2), 41-49.
- Bannon, G. A. (2004). What makes a food protein an allergen? *Current Allergy and Asthma Reports*, 4(1), 43-46.
- Barletta, B., Rossi, G., Schiavi, E., Butteroni, C., Corinti, S., Boirivant, M., & Di Felice, G. (2013). Probiotic VSL# 3-induced TGF- β ameliorates food allergy inflammation in a mouse model of peanut sensitization through the induction of regulatory T cells in the gut mucosa. *Molecular nutrition & food research*, 57(12), 2233-2244.
- Bernard, H., Ah-Leung, S., Drumare, M. F., Feraudet-Tarisse, C., Verhasselt, V., Wal, J. M., . . . Adel-Patient, K. (2014). Peanut allergens are rapidly transferred in human breast milk and can prevent sensitization in mice. *Allergy*, 69(7), 888-897.

- Biasucci, G., Benenati, B., Morelli, L., Bessi, E., & Boehm, G. (2008). Cesarean delivery may affect the early biodiversity of intestinal bacteria. *The Journal of nutrition*, 138(9), 1796S-1800S.
- Biorad. (2018). A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection. 2018, from http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf
- Bock, S. A., Muñoz-Furlong, A., & Sampson, H. A. (2001). Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(1), 191-193.
- Bode, L. (2012). Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*, 22(9), 1147-1162. doi: 10.1093/glycob/cws074
- Bode, L. (2015). The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early human development*, 91(11), 619-622.
- Bøgh, K. L., & Madsen, C. B. (2016). Food allergens: is there a correlation between stability to digestion and allergenicity? *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(9), 1545-1567.
- Braegger, C., Chmielewska, A., Decsi, T., Kolacek, S., Mihatsch, W., Moreno, L., . . . Szajewska, H. (2011). Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 52(2), 238-250.
- Brough, H. A., Liu, A. H., Sicherer, S., Makinson, K., Douiri, A., Brown, S. J., . . . Wood, R. A. (2015). Atopic dermatitis increases the effect of exposure to peanut antigen in dust on peanut sensitization and likely peanut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(1), 164-170. e164.
- Brugman, E., Meulmeester, J., Spee-Van der Wekke, A., Beuker, R., Radder, J., & Verloove-Vanhorick, S. (1998). Prevalence of self-reported food hypersensitivity among school children in The Netherlands. *European journal of clinical nutrition*, 52(8), 577.

- Brunner, R., Jensen-Jarolim, E., & Pali-Schöll, I. (2010). The ABC of clinical and experimental adjuvants—a brief overview. *Immunology letters*, *128*(1), 29-35.
- Brunner, R., Wallmann, J., Szalai, K., Karagiannis, P., Altmeppen, H., Riemer, A., . . . Pali-Schöll, I. (2009). Aluminium per se and in the anti-acid drug sucralfate promotes sensitization via the oral route. *Allergy*, *64*(6), 890-897.
- Brunner, R., Wallmann, J., Szalai, K., Karagiannis, P., Kopp, T., Scheiner, O., . . . Pali-Schöll, I. (2007). The impact of aluminium in acid-suppressing drugs on the immune response of BALB/c mice. *Clinical & Experimental Allergy*, *37*(10), 1566-1573.
- Burney, P., Potts, J., Kummeling, I., Mills, E., Clausen, M., Dubakiene, R., . . . Le, T. M. (2014). The prevalence and distribution of food sensitization in European adults. *Allergy*, *69*(3), 365-371.
- Canani, R. B., Nocerino, R., Terrin, G., Coruzzo, A., Cosenza, L., Leone, L., & Troncone, R. (2012). Effect of Lactobacillus GG on tolerance acquisition in infants with cow's milk allergy: a randomized trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *129*(2), 580-582. e585.
- Carrard, A., Rizzuti, D., & Sokollik, C. (2015). Update on food allergy. *Allergy*, *70*(12), 1511-1520.
- Cerovic, V., Bain, C. C., Mowat, A. M., & Milling, S. W. (2014). Intestinal macrophages and dendritic cells: what's the difference? *Trends in immunology*, *35*(6), 270-277.
- Chen, C., Sun, N., Li, Y., & Jia, X. (2013). A BALB/c mouse model for assessing the potential allergenicity of proteins: comparison of allergen dose, sensitization frequency, timepoint and sex. *Food and Chemical Toxicology*, *62*, 41-47.

- Chen, J., Hu, Y., Allen, K. J., Ho, M. H., & Li, H. (2011). The prevalence of food allergy in infants in Chongqing, China. *Pediatric Allergy and Immunology*, 22(4), 356-360.
- Chen, J., Liao, Y., Zhang, H., Zhao, H., & Li, H. (2012). Prevalence of food allergy in children under 2 years of age in three cities in China. *Zhonghua er ke za zhi= Chinese journal of pediatrics*, 50(1), 5-9.
- Chinthrajah, R. S., Hernandez, J. D., Boyd, S. D., Galli, S. J., & Nadeau, K. C. (2016). Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(4), 984-997.
- De Kivit, S., Tobin, M. C., Forsyth, C. B., Keshavarzian, A., & Landay, A. L. (2014). Regulation of intestinal immune responses through TLR activation: implications for pro-and prebiotics. *Frontiers in immunology*, 5.
- Diesner, S. C., Bergmayr, C., Pfitzner, B., Assmann, V., Krishnamurthy, D., Starkl, P., . . . Rattei, T. (2016). A distinct microbiota composition is associated with protection from food allergy in an oral mouse immunization model. *Clinical Immunology*, 173, 10-18.
- Dunkin, D., Berin, M. C., & Mayer, L. (2011). Allergic sensitization can be induced via multiple physiologic routes in an adjuvant-dependent manner. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128(6), 1251-1258. e1252.
- Eggesbø, M., Botten, G., Halvorsen, R., & Magnus, P. (2001). The prevalence of allergy to egg: a population-based study in young children. *Allergy*, 56(5), 403-411.
- Enomoto, T., Sowa, M., Nishimori, K., Shimazu, S., Yoshida, A., Yamada, K., . . . Iwabuchi, N. (2014). Effects of bifidobacterial supplementation to pregnant women and infants in the prevention of allergy development in infants and on fecal microbiota. *Allergology International*, 63(4), 575-585.
- FAO (2001). WHO Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Prevention*, 5(1).

- Fiocchi, A., Pawankar, R., Cuello-Garcia, C., Ahn, K., Al-Hammadi, S., Agarwal, A., . . . Schünemann, H. J. (2015). World Allergy Organization-McMaster University Guidelines for Allergic Disease Prevention (GLAD-P): Probiotics. *World Allergy Organization Journal*, 8(1), 1-13. doi: 10.1186/s40413-015-0055-2
- Food, U., & Administration, D. (2009). Food allergies: What you need to know. Retrieved May, 27, 2010.
- Foster, E. S., Kimber, I., & Dearman, R. J. (2013). Relationship between protein digestibility and allergenicity: comparisons of pepsin and cathepsin. *Toxicology*, 309, 30-38.
- Fu, T.-J., Abbott, U. R., & Hatzos, C. (2002). Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(24), 7154-7160.
- Galand, C., Leyva-Castillo, J. M., Yoon, J., Han, A., Lee, M. S., McKenzie, A. N., . . . Geha, R. S. (2016). IL-33 promotes food anaphylaxis in epicutaneously sensitized mice by targeting mast cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(5), 1356-1366.
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*, 125(6), 1401.
- Gonçalves, L., Guimarães, T., Silva, R., Cheik, M., de Ramos Napolis, A., e Silva, G. B., & Segundo, G. (2016). Prevalence of food allergy in infants and pre-schoolers in Brazil. *Allergologia et immunopathologia*, 44(6), 497-503.
- Gonipeta, B., Kim, E., & Gangur, V. (2015). Mouse models of food allergy: how well do they simulate the human disorder? *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(3), 437-452.

- Gonipeta, B., Parvataneni, S., Tempelman, R., & Gangur, V. (2009). An adjuvant-free mouse model to evaluate the allergenicity of milk whey protein. *Journal of dairy science*, 92(10), 4738-4744.
- Graif, Y., German, L., Livne, I., & Shohat, T. (2012). Association of food allergy with asthma severity and atopic diseases in Jewish and Arab adolescents. *Acta Paediatrica*, 101(10), 1083-1088.
- Grönlund, M. M., Gueimonde, M., Laitinen, K., Kociubinski, G., Grönroos, T., Salminen, S., & Isolauri, E. (2007). Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the Bifidobacterium microbiota in infants at risk of allergic disease. *Clinical & Experimental Allergy*, 37(12), 1764-1772.
- Gueimonde, M., Laitinen, K., Salminen, S., & Isolauri, E. (2007). Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology*, 92(1), 64-66.
- Gupta, R. S., Springston, E. E., Warrier, M. R., Smith, B., Kumar, R., Pongracic, J., & Holl, J. L. (2011). The prevalence, severity, and distribution of childhood food allergy in the United States. *Pediatrics*, peds. 2011-0204.
- Haley, P. J. (2003). Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology*, 188(1), 49-71.
- Helm, R. M., Ermel, R. W., & Frick, O. L. (2003). Nonmurine animal models of food allergy. *Environmental health perspectives*, 111(2), 239.
- Heritage, J., & Licht, T. R. (2005). *Qualified Presumption of Safety of Microorganisms in Food and Feed*: European Food Safety Authority.
- Hilton, J., Dearman, R., Basketter, D., & Kimber, I. (1994). Serological responses induced in mice by immunogenic proteins and by protein respiratory allergens. *Toxicology letters*, 73(1), 43-53.
- Hilton, J., Dearman, R., Sattar, N., Basketter, D., & Kimber, I. (1997). Characteristics of antibody responses induced in mice by protein allergens. *Food and Chemical Toxicology*, 35(12), 1209-1218.

- Ho, M. H., Lee, S. L., Wong, W. H., Patrick, I., & Lau, Y. L. (2012). Prevalence of self-reported food allergy in Hong Kong children and teens-a population survey. *Asian Pacific journal of allergy and immunology*, 30(4), 275.
- Hol, J., van Leer, E. H., Schuurman, B. E. E., de Ruiter, L. F., Samsom, J. N., Hop, W., . . . Nieuwenhuis, E. E. (2008). The acquisition of tolerance toward cow's milk through probiotic supplementation: a randomized, controlled trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(6), 1448-1454.
- Hoyos-Bachiloglou, R., Ivanovic-Zuvic, D., Alvarez, J., Linn, K., Thöne, N., de Los Ángeles Paul, M., & Borzutzky, A. (2014). Prevalence of parent-reported immediate hypersensitivity food allergy in Chilean school-aged children. *Allergologia et immunopathologia*, 42(6), 527-532.
- Järvinen, K. M., Beyer, K., Vila, L., Bardina, L., Mishoe, M., & Sampson, H. (2007). Specificity of IgE antibodies to sequential epitopes of hen's egg ovomucoid as a marker for persistence of egg allergy. *Allergy*, 62(7), 758-765.
- Jensen-Jarolim, E., & Untersmayr, E. (2006). Food safety: in vitro digestion tests are non-predictive for allergenic potential of food in stomach insufficiency. *Immunology letters*, 102(1), 118-119.
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C. P., & Chassard, C. (2012). New insights in gut microbiota establishment in healthy breast fed neonates. *PloS one*, 7(8), e44595.
- Justin-Temu, M., Risha, P., Abla, O., & Massawe, A. (2008). Incidence, Knowledge And Health Seeking Behaviour For Perceived Allergies At Household Level: A Case Study In Ilala District Dar Es Salaam Tanzania.
- Kanny, G., Moneret-Vautrin, D.-A., Flabbee, J., Beaudouin, E., Morisset, M., & Thevenin, F. (2001). Population study of food allergy in France. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108(1), 133-140.
- Keet, C. A., Savage, J. H., Seopaul, S., Peng, R. D., Wood, R. A., & Matsui, E. C. (2014). Temporal trends and racial/ethnic disparity in self-reported

- pediatric food allergy in the United States. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 112(3), 222-229. e223.
- Kim, J. S., Nowak-Węgrzyn, A., Sicherer, S. H., Noone, S., Moshier, E. L., & Sampson, H. A. (2011). Dietary baked milk accelerates the resolution of cow's milk allergy in children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128(1), 125-131. e122.
- Kim, K. S., Hong, S.-W., Han, D., Yi, J., Jung, J., Yang, B.-G., . . . Surh, C. D. (2016). Dietary antigens limit mucosal immunity by inducing regulatory T cells in the small intestine. *Science*, 351(6275), 858-863.
- Kim, M., Lee, J. Y., Jeon, H.-y., Yang, H.-k., Lee, K.-J., Han, Y., . . . Ahn, K. (2017). Prevalence of immediate-type food allergy in Korean schoolchildren in 2015: a nationwide, population-based study. *Allergy, asthma & immunology research*, 9(5), 410-416.
- Knippels, L. M., Penninks, A. H., & Houben, G. F. (1998). Continued expression of anti-soy protein antibodies in rats bred on a soy protein-free diet for one generation: The importance of dietary control in oral sensitization research. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 101(6), 815-820.
- Kulig, M., Bergmann, R., Klettke, U., Wahn, V., Tacke, U., Wahn, U., & Group, M. A. S. (1999). Natural course of sensitization to food and inhalant allergens during the first 6 years of life. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103(6), 1173-1179.
- Kusunoki, T., Morimoto, T., Sakuma, M., Mukaida, K., Yasumi, T., Nishikomori, R., & Heike, T. (2013). Effect of eczema on the association between season of birth and food allergy in Japanese children. *Pediatrics International*, 55(1), 7-10.
- Kvenshagen, B., Halvorsen, R., & Jacobsen, M. (2009). Is there an increased frequency of food allergy in children delivered by caesarean section compared to those delivered vaginally? *Acta Pædiatrica*, 98(2), 324-327.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680.
- Lao-araya, M., & Trakultivakorn, M. (2012). Prevalence of food allergy among preschool children in northern Thailand. *Pediatrics International*, 54(2), 238-243.
- Lee, J., Seto, D., & Bielory, L. (2008). Meta-analysis of clinical trials of probiotics for prevention and treatment of pediatric atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(1), 116-121. e111.
- Lehrer, S. B., Ayuso, R., & Reese, G. (2002). Current understanding of food allergens. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 964(1), 69-85.
- Lehrer, S. B., & McClain, S. (2009). Utility of animal models for predicting human allergenicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 54(3), S46-S51.
- Lemon-Mulé, H., Sampson, H. A., Sicherer, S. H., Shreffler, W. G., Noone, S., & Nowak-Węgrzyn, A. (2008). Immunologic changes in children with egg allergy ingesting extensively heated egg. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122(5), 977-983. e971.
- Leonard, S. A., Sampson, H. A., Sicherer, S. H., Noone, S., Moshier, E. L., Godbold, J., & Nowak-Węgrzyn, A. (2012). Dietary baked egg accelerates resolution of egg allergy in children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(2), 473-480. e471.
- Lepski, S., & Brockmeyer, J. (2013). Impact of dietary factors and food processing on food allergy. *Molecular nutrition & food research*, 57(1), 145-152.
- Li, X.-m., Huang, C.-K., Schofield, B. H., Burks, A. W., Bannon, G. A., Kim, K.-H., . . . Sampson, H. A. (1999). Strain-dependent induction of allergic sensitization caused by peanut allergen DNA immunization in mice. *The Journal of Immunology*, 162(5), 3045-3052.
- Lin, J. H. (2014). Supplementation With Probiotics in the First 6 Months of Life Did Not Protect Against Eczema and Allergy in At-Risk Asian Infants: A 5-Year Follow-up. *Pediatrics*, 134(Supplement 3), S142-S142.

- Liu, A. H., Jaramillo, R., Sicherer, S. H., Wood, R. A., Bock, S. A., Burks, A. W., . . . Zeldin, D. C. (2010). National prevalence and risk factors for food allergy and relationship to asthma: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *126*(4), 798-806. e714.
- Liu, T., Navarro, S., & Lopata, A. L. (2016). Current advances of murine models for food allergy. *Molecular immunology*, *70*, 104-117.
- Liu, Z. Q., Wu, Y., Song, J. P., Liu, X., Liu, Z., Zheng, P. Y., & Yang, P. C. (2013). Tolerogenic CX3CR1+ B cells suppress food allergy-induced intestinal inflammation in mice. *Allergy*, *68*(10), 1241-1248.
- Lopez-Gallardo, J. A., Rodríguez-Bellegarrigue, C. I., Arámburo-Gálvez, J. G., Figueroa-Salcido, O. G., Vergara-Jiménez, M. d. J., Sotelo-Cruz, N., . . . Cabrera-Chávez, F. (2018). *Food allergy prevalence in Salvadoran schoolchildren estimated by Parent-fulfilled questionnaire*.
- Lucas, J. S., Cochrane, S. A., Warner, J. O., & Hourihane, J. O. B. (2008). The effect of digestion and pH on the allergenicity of kiwifruit proteins. *Pediatric Allergy and Immunology*, *19*(5), 392-398.
- Lunet, N., Falcao, H., Sousa, M., Bay, N., & Barros, H. (2005). Self-reported food and drug allergy in Maputo, Mozambique. *Public Health-London-Society of Public Health then Royal Institute of Public Health-*.
- Marrugo, J., Hernández, L., & Villalba, V. (2008). Prevalence of self-reported food allergy in Cartagena (Colombia) population. *Allergologia et immunopathologia*, *36*(6), 320-324.
- Martín, R., Heilig, H. G., Zoetendal, E. G., Jiménez, E., Fernández, L., Smidt, H., & Rodríguez, J. M. (2007). Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Research in microbiology*, *158*(1), 31-37.
- Martorell-Aragonés, A., Echeverría-Zudaire, L., Alonso-Lebrero, E., Boné-Calvo, J., Martín-Muñoz, M., Nevot-Falcó, S., . . . allergy committee of SEICAP,

- F. (2015). Position document: IgE-mediated cow's milk allergy. *Allergologia et immunopathologia*, 43(5), 507-526.
- McBride, D., Keil, T., Grabenhenrich, L., Dubakiene, R., Drasutiene, G., Fiocchi, A., . . . Roberts, G. (2012). The EuroPrevall birth cohort study on food allergy: baseline characteristics of 12,000 newborns and their families from nine European countries. *Pediatric Allergy and Immunology*, 23(3), 230-239.
- McClain, S., & Bannon, G. A. (2006). Animal models of food allergy: opportunities and barriers. *Current Allergy and Asthma Reports*, 6(2), 141-144.
- McGowan, E. C., & Keet, C. A. (2013). Prevalence of self-reported food allergy in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007-2010. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(5), 1216-1219. e1215.
- McPhie, P. (1972). A spectrophotometric investigation of the pepsinogen-pepsin conversion. *Journal of Biological Chemistry*, 247(13), 4277-4281.
- Meeusen, E. N., Snibson, K. J., Hirst, S. J., & Bischof, R. J. (2009). Sheep as a model species for the study and treatment of human asthma and other respiratory diseases. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 6(4), 101-106.
- Mills, E. C., Jenkins, J. A., Alcocer, M. J., & Shewry, P. R. (2004). Structural, biological, and evolutionary relationships of plant food allergens sensitizing via the gastrointestinal tract. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(5), 379-407.
- Mine, Y., & Yang, M. (2008). Recent advances in the understanding of egg allergens: basic, industrial, and clinical perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13), 4874-4900.
- Moradi, M., Smillie, F., Murray, C., Murray, C., Burnie, J., & Custovic, A. W. A. (2002). Clostridium difficile, atopy and wheeze during the first year of life. *Pediatric Allergy and Immunology*.

- Morafo, V., Srivastava, K., Huang, C.-K., Kleiner, G., Lee, S.-Y., Sampson, H. A., & Li, X.-M. (2003). Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential TH2-TH1 responses in C3H/HeJ and BALB/c mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *111*(5), 1122-1128.
- Morin, S., Bernard, H., Przybylski-Nicaise, L., Corthier, G., Rabot, S., Wal, J. M., & Hazebrouck, S. (2011). Allergenic and immunogenic potential of cow's milk β -lactoglobulin and caseins evidenced without adjuvant in germ-free mice. *Molecular nutrition & food research*, *55*(11), 1700-1707.
- Muraro, A., Halken, S., Arshad, S., Beyer, K., Dubois, A., Du Toit, G., . . . Lack, G. (2014). EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines. Primary prevention of food allergy. *Allergy*, *69*(5), 590-601.
- Mustafayev, R., Civelek, E., Orhan, F., Yüksel, H., Boz, A., & Şekerel, B. (2013). Similar prevalence, different spectrum: IgE-mediated food allergy among Turkish adolescents. *Allergologia et immunopathologia*, *41*(6), 387-396.
- Natale, M., Bisson, C., Monti, G., Peltran, A., Perono Garoffo, L., Valentini, S., . . . Conti, A. (2004). Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry. *Molecular nutrition & food research*, *48*(5), 363-369.
- Nieuwenhuizen, N., Lopata, A. L., Jeebhay, M. F., De'Broski, R. H., Robins, T. G., & Brombacher, F. (2006). Exposure to the fish parasite *Anisakis* causes allergic airway hyperreactivity and dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *117*(5), 1098-1105.
- Nowak-Wegrzyn, A., Bloom, K. A., Sicherer, S. H., Shreffler, W. G., Noone, S., Wanich, N., & Sampson, H. A. (2008). Tolerance to extensively heated milk in children with cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *122*(2), 342-347. e342.
- Obeng, B. B., Amoah, A. S., Larbi, I. A., Yazdanbakhsh, M., Van Ree, R., Boakye, D. A., & Hartgers, F. C. (2011). Food allergy in Ghanaian schoolchildren:

- data on sensitization and reported food allergy. *International archives of allergy and immunology*, 155(1), 63-73.
- Oettgen, H. C. (2016). Fifty years later: emerging functions of IgE antibodies in host defense, immune regulation, and allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(6), 1631-1645.
- Ohnmacht, C., Park, J.-H., Cording, S., Wing, J. B., Atarashi, K., Obata, Y., . . . Fedoseeva, M. (2015). The microbiota regulates type 2 immunity through ROR γ t+ T cells. *Science*, 349(6251), 989-993.
- Ontiveros, N., Flores-Mendoza, L., Canizalez-Román, V., & Cabrera-Chavez, F. (2014). Food allergy: prevalence and food technology approaches for the control of IgE-mediated food allergy. *Austin Journal of Nutrition and Food Sciences*, 2(5).
- Ontiveros, N., Valdez-Meza, E., Vergara-Jiménez, M., Canizalez-Román, A., Borzutzky, A., & Cabrera-Chávez, F. (2016). Parent-reported prevalence of food allergy in Mexican schoolchildren: A population-based study. *Allergologia et immunopathologia*, 44(6), 563-570.
- Orhan, F., Karakas, T., Cakir, M., Aksoy, A., Baki, A., & Gedik, Y. (2009). Prevalence of immunoglobulin E-mediated food allergy in 6–9-year-old urban schoolchildren in the eastern Black Sea region of Turkey. *Clinical & Experimental Allergy*, 39(7), 1027-1035.
- Osborne, N. J., Koplin, J. J., Martin, P. E., Gurrin, L. C., Lowe, A. J., Matheson, M. C., . . . Dharmage, S. C. (2011). Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), 668-676. e662.
- Östblom, E., Lilja, G., Pershagen, G., Van Hage, M., & Wickman, M. (2008). Phenotypes of food hypersensitivity and development of allergic diseases during the first 8 years of life. *Clinical & Experimental Allergy*, 38(8), 1325-1332.

- Park, M., Kim, D., Ahn, K., Kim, J., & Han, Y. (2014). Prevalence of immediate-type food allergy in early childhood in seoul. *Allergy, asthma & immunology research, 6*(2), 131-136.
- Paterson, S. (1995). Food hypersensitivity in 20 dogs with skin and gastrointestinal signs. *Journal of Small Animal Practice, 36*(12), 529-534.
- Pohjavuori, E., Viljanen, M., Korpela, R., Kuitunen, M., Tiittanen, M., Vaarala, O., & Savilahti, E. (2004). Lactobacillus GG effect in increasing IFN- γ production in infants with cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, 114*(1), 131-136.
- Polovic, N., Blanusa, M., Gavrovic-Jankulovic, M., Atanaskovic-Markovic, M., Burazer, L., Jankov, R., & Velickovic, T. C. (2007). A matrix effect in pectin-rich fruits hampers digestion of allergen by pepsin in vivo and in vitro. *Clinical & Experimental Allergy, 37*(5), 764-771.
- Prescott, S. L., Pawankar, R., Allen, K. J., Campbell, D. E., Sinn, J. K., Fiocchi, A., . . . Lee, B.-W. (2013). A global survey of changing patterns of food allergy burden in children. *World Allergy Organization Journal, 6*(1), 1.
- Remington, B., Broekman, H., Blom, W., Capt, A., Crevel, R. W., Dimitrov, I., . . . Houben, G. (2017). Approaches to assess IgE mediated allergy risks (sensitization and cross-reactivity) from new or modified dietary proteins. *Food and Chemical Toxicology*.
- Renz, H., Allen, K. J., Sicherer, S. H., Sampson, H. A., Lack, G., Beyer, K., & Oettgen, H. C. (2018). Food allergy. *Nature Reviews Disease Primers, 4*, 17098.
- Rivas, M. F. (2009). Food allergy in Alergologica-2005. *J Investig Allergol Clin Immunol, 19*(2), 37-44.
- Rivas, M. N., Burton, O. T., Wise, P., Zhang, Y.-q., Hobson, S. A., Lloret, M. G., . . . Warrington, J. (2013). A microbiota signature associated with experimental food allergy promotes allergic sensitization and anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, 131*(1), 201-212.

- Roehr, C., Edenharter, G., Reimann, S., Ehlers, I., Worm, M., Zuberbier, T., & Niggemann, B. (2004). Food allergy and non-allergic food hypersensitivity in children and adolescents. *Clinical & Experimental Allergy*, 34(10), 1534-1541.
- Rona, R. J., Keil, T., Summers, C., Gislason, D., Zuidmeer, L., Sodergren, E., . . . Dahlstrom, J. (2007). The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(3), 638-646.
- Savage, J., Sicherer, S., & Wood, R. (2016). The natural history of food allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 4(2), 196-203.
- Savage, J. H., Matsui, E. C., Skripak, J. M., & Wood, R. A. (2007). The natural history of egg allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(6), 1413-1417.
- Scientific, T. (2013). Pierce BCA protein assay kit. *Pierce BCA 449 Protein Assay Kit*.
- Schiavi, E., Barletta, B., Butteroni, C., Corinti, S., Boirivant, M., & Di Felice, G. (2011). Oral therapeutic administration of a probiotic mixture suppresses established Th2 responses and systemic anaphylaxis in a murine model of food allergy. *Allergy*, 66(4), 499-508.
- Schöll, I., Untersmayr, E., Bakos, N., Roth-Walter, F., Gleiss, A., Boltz-Nitulescu, G., . . . Jensen-Jarolim, E. (2005). Antiulcer drugs promote oral sensitization and hypersensitivity to hazelnut allergens in BALB/c mice and humans—. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 154-160.
- Sicherer, S. H. (2011). Epidemiology of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), 594-602.
- Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2014). Food allergy: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(2), 291-307. e295.

- Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2018). Food allergy: a review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(1), 41-58.
- Sinkiewicz, G., & Nordström, E. A. (2005). 353 occurrence of lactobacillus reuteri, lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk. *Pediatric Research*, 58(2), 415-415.
- Skripak, J. M., Matsui, E. C., Mudd, K., & Wood, R. A. (2007). The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(5), 1172-1177.
- Šmehilová, M., Vlková, E., Nevorál, J., Flajšmanová, K., Killer, J., & Rada, V. (2008). Comparison of intestinal microflora in healthy infants and infants with allergic colitis. *Folia microbiologica*, 53(3), 255-258.
- Smit, J. J., Noti, M., & O'Mahony, L. (2015). The use of animal models to discover immunological mechanisms underpinning sensitization to food allergens. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 17, 63-69.
- Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-y, M., . . . Garrett, W. S. (2013). The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*, 341(6145), 569-573.
- Snydman, D. R. (2008). The safety of probiotics. *Clinical infectious diseases*, 46(Supplement_2), S104-S111.
- Soh, S.-E., & Shek, L. P.-C. (2016). Chapter 65 - Prebiotics and Probiotics for the Prevention and Treatment of Food Allergy A2 - Watson, Ronald Ross. In V. R. Preedy (Ed.), *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics* (pp. 839-848): Academic Press.
- Soller, L., Ben-Shoshan, M., Harrington, D. W., Fracapane, J., Joseph, L., Pierre, Y. S., . . . Clarke, A. E. (2012). Overall prevalence of self-reported food allergy in Canada. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(4), 986-988.

- Soybel, D. I. (2005). Anatomy and physiology of the stomach. *Surgical Clinics*, 85(5), 875-894.
- Stefka, A. T., Feehley, T., Tripathi, P., Qiu, J., McCoy, K., Mazmanian, S. K., . . . Theriault, B. R. (2014). Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(36), 13145-13150.
- Steinke, M., Fiocchi, A., Kirchlechner, V., Ballmer-Weber, B., Brockow, K., Hischenhuber, C., . . . Terracciano, L. (2007). Perceived food allergy in children in 10 European nations. *International archives of allergy and immunology*, 143(4), 290-295.
- Suzuki, K., Maruya, M., Kawamoto, S., Sitnik, K., Kitamura, H., Agace, W. W., & Fagarasan, S. (2010). The sensing of environmental stimuli by follicular dendritic cells promotes immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity*, 33(1), 71-83.
- Tamburini, S., Shen, N., Wu, H. C., & Clemente, J. C. (2016). The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nature medicine*, 22(7), 713-722.
- Tao, R., De Zoeten, E. F., Özkaynak, E., Chen, C., Wang, L., Porrett, P. M., . . . Greene, M. I. (2007). Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells. *Nature medicine*, 13(11), 1299.
- Thang, C. L., Baurhoo, B., Boye, J. I., Simpson, B. K., & Zhao, X. (2011). Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation on cow's milk allergy in a mouse model. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 7(1), 20.
- Thomas, K., Aalbers, M., Bannon, G., Bartels, M., Dearman, R., Esdaile, D., . . . Hatzos, C. (2004). A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39(2), 87-98.
- Tordesillas, L., Berin, M. C., & Sampson, H. A. (2017). Immunology of food allergy. *Immunity*, 47(1), 32-50.

- Troost, F. J., Steijns, J., Saris, W. H., & Brummer, R.-J. M. (2001). Gastric digestion of bovine lactoferrin in vivo in adults. *The Journal of nutrition*, 131(8), 2101-2104.
- Untersmayr, E., Bakos, N., Schöll, I., Kundi, M., Roth-Walter, F., Szalai, K., . . . Boltz-Nitulescu, G. (2005). Anti-ulcer drugs promote IgE formation toward dietary antigens in adult patients. *The FASEB journal*, 19(6), 656-658.
- Untersmayr, E., Poulsen, L. K., Platzer, M. H., Pedersen, M. H., Boltz-Nitulescu, G., Skov, P. S., & Jensen-Jarolim, E. (2005). The effects of gastric digestion on codfish allergenicity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(2), 377-382.
- Untersmayr, E., Schöll, I., Swoboda, I., Beil, W. J., Förster-Waldl, E., Walter, F., . . . Spitzauer, S. (2003). Antacid medication inhibits digestion of dietary proteins and causes food allergy: a fish allergy model in BALB/c mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(3), 616-623.
- Untersmayr, E., Vestergaard, H., Malling, H.-J., Jensen, L. B., Platzer, M. H., Boltz-Nitulescu, G., . . . Poulsen, L. K. (2007). Incomplete digestion of codfish represents a risk factor for anaphylaxis in patients with allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(3), 711-717.
- Vaali, K., Puumalainen, T., Wolff, H., Alenius, H., & Palosuo, T. (2005). Mucosal mast cell protease-1 (MMCP-1) as a marker of intestinal immunopathology in food allergy model. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(2), S240.
- Van Gramberg, J. L., de Veer, M. J., O'Hehir, R. E., Meeusen, E. N., & Bischof, R. J. (2013). Use of animal models to investigate major allergens associated with food allergy. *Journal of allergy*, 2013.
- Veličković, T. Ć., & Gavrović-Jankulović, M. (2014). *Food Allergens: Biochemistry and Molecular Nutrition*: Springer.
- Venter, C., Pereira, B., Grundy, J., Clayton, C. B., Roberts, G., Higgins, B., & Dean, T. (2006). Incidence of parentally reported and clinically diagnosed

- food hypersensitivity in the first year of life. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(5), 1118-1124.
- Verrill, L., Bruns, R., & Luccioli, S. (2015). *Prevalence of self-reported food allergy in US adults: 2001, 2006, and 2010*. Paper presented at the Allergy and asthma proceedings.
- Walker, W. A. (2017). Bacterial Colonization of the Newborn Gut, Immune Development, and Prevention of Disease *Intestinal Microbiome: Functional Aspects in Health and Disease* (Vol. 88, pp. 23-34): Karger Publishers.
- Wastling, J. M., Knight, P., Ure, J., Wright, S., Thornton, E. M., Scudamore, C. L., . . . Miller, H. R. (1998). Histochemical and ultrastructural modification of mucosal mast cell granules in parasitized mice lacking the β -chymase, mouse mast cell protease-1. *The American journal of pathology*, 153(2), 491-504.
- Weng, M., & Walker, W. (2013). The role of gut microbiota in programming the immune phenotype. *Journal of developmental origins of health and disease*, 4(3), 203-214.
- Wickham, M., Faulks, R., & Mills, C. (2009). In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. *Molecular nutrition & food research*, 53(8), 952-958.
- Williams, K. W., & Sharma, H. P. (2015). Anaphylaxis and urticaria. *Immunology and Allergy Clinics*, 35(1), 199-219.
- Wood, R. A., Sicherer, S. H., Vickery, B. P., Jones, S. M., Liu, A. H., Fleischer, D. M., . . . Grishin, A. (2013). The natural history of milk allergy in an observational cohort. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(3), 805-812. e804.
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.-Y., Keilbaugh, S. A., . . . Knight, R. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 334(6052), 105-108.

- Wu, T. C., Tsai, T. C., Huang, C. F., Chang, F. Y., Lin, C. C., Huang, I. F., . . . Peng, H. J. (2012). Prevalence of food allergy in Taiwan: a questionnaire-based survey. *Internal medicine journal*, 42(12), 1310-1315.
- Yamaki, K., & Yoshino, S. (2012). Preventive and therapeutic effects of rapamycin, a mammalian target of rapamycin inhibitor, on food allergy in mice. *Allergy*, 67(10), 1259-1270.
- Yatsunenکو, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., . . . Anokhin, A. P. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *nature*, 486(7402), 222.
- Yoshino, K., Sakai, K., Mizuha, Y., Shimizuike, A., & Yamamoto, S. (2004). Peptic digestibility of raw and heat-coagulated hen's egg white proteins at acidic pH range. *International journal of food sciences and nutrition*, 55(8), 635-640.
- Zhang, G.-Q., Hu, H.-J., Liu, C.-Y., Zhang, Q., Shakya, S., & Li, Z.-Y. (2016). Probiotics for prevention of atopy and food hypersensitivity in early childhood: a PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine*, 95(8).
- Zhang, Y., Chen, Y., Zhao, A., Li, H., Mu, Z., & Wang, P. (2015). Prevalence of self-reported food allergy and food intolerance and their associated factors in 3-12 year-old children in 9 areas in China. *Wei sheng yan jiu= Journal of hygiene research*, 44(2), 226-231.

ANEXOS

Anexo I

Dictamen del Comité Ético de Investigación de la Unidad Académica de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa para realizar ensayos con animales en marco del estudio: “Efecto de las caseínas alfa bovinas tratadas térmicamente y la suplementación con probióticos sobre la respuesta alérgica en un modelo murino de alergia alimentaria”.

Anexo II

Artículo: “Assessment of the Sensitizing Potential of Proteins in BALB/c Mice: Comparison of Three Protocols of Intraperitoneal Sensitization”

Arámburo-Gálvez, J., Sotelo-Cruz, N., Flores-Mendoza, L., Gracia-Valenzuela, M., Chiquete-Elizalde, F., Espinoza-Alderete, J., ... & Cabrera-Chávez, F. (2018). Assessment of the Sensitizing Potential of Proteins in BALB/c Mice: Comparison of Three Protocols of Intraperitoneal Sensitization. *Nutrients*, 10(7), 903.

Anexo III

Manuscrito enviado: “Food allergy prevalence in Salvadoran schoolchildren estimated by Parent-fulfilled questionnaire”.

Cabrera-Chávez, F., Rodríguez-Bellegarrigue C. I., Figueroa-Salcido, O. G., López-Gallardo, J. A., **Arámburo-Gálvez, J. G.**, Vergara-Jiménez, M. D. J., Sotelo-Cruz, N., Gracia-Valenzuela, M. H., Ontiveros, N. (2018). Food allergy prevalence in Salvadoran schoolchildren estimated by parent-fulfilled questionnaire. *International journal of environmental research and public health*.