



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Programa Regional de Posgrado en Biotecnología
Doctorado en Biotecnología

Prevalencia de Alergia Persistente a la Leche Bovina y Evaluación de Una Estrategia para su Control Basada en el Tratamiento Térmico de α -caseínas y Suplementación con Probióticos en un Modelo Murino de Alergia.

TESIS

Que presenta

Noé Ontiveros Apodaca

Como requisito para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en Biotecnología de Salud

Director de Tesis

Dr. Vicente Adrian Canizalez Román

Dr. Francisco Cabrera Chávez

Culiacán de Rosales, Sinaloa, México

Febrero 2017

PRESENTACIÓN

La presente investigación, titulada *Prevalencia de Alergia Persistente a la Leche Bovina y Evaluación de Una Estrategia Para su Control Basada en el Tratamiento Térmico de α -caseínas y la Suplementación con Probióticos en un Modelo Murino de Alergia*, se llevó a cabo en la Universidad Autónoma de Sinaloa, en el Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR-IMSS), en la Pontificia Universidad Católica de Chile, y en la Universidad de Sonora en las Unidades Hermosillo y Regional Sur Navjoa. Como Asesores Académicos participaron: Dr. Jorge Adalberto Velazquez Román, Dr. Hector Manuel Flores Villaseñor, Dra. Hedith Cuevas Rodriguez, Dr. Francisco Cabrera Chávez (Director de Tesis), Dr. Vicente Adrian Canizalez Román (Director de Tesis). Este trabajo de investigación forma parte de los proyectos *Cambios Estructurales en Caseína de Leche Bovina para Reducir la Respuesta Alérgica en un Modelo Animal de Alergia Alimentaria* (Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación, PROFAPI) y Estudio del efecto de las caseínas α -bovinas tratadas térmicamente y la suplementación con probióticos sobre la respuesta inmune alérgica en un modelo murino de alergia alimentaria (CB-2014-01240300). Además, para la realización de la presente propuesta de tesis se recibió financiamiento de la iniciativa privada a través del proyecto en vinculación UAS-Sigma Alimentos “*Desarrollo de Alimentos Portables de Línea Saludable a Base de Mezclas de Harinas de Diferentes Granos*” (Programa de Estímulos a la Innovación [PEI-CONACyT]).

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis los doctores Adrian Canizales y Francisco Cabrera por brindar las facilidades necesarias para la realización de la presente tesis, el tiempo invertido en la revisión de esta, y permitir el desarrollo de ideas.

A mis asesores académicos Dra. Edith Oliva Cuevas, Dr. Jorge Adalberto Velazquez, y Dr. Hector Manuel Flores por la revisión de esta tesis y sus opiniones acertadas para mejorarla.

Al Dr. Arturo Borzutzky por su apoyo en la interpretación de resultados epidemiológicos y revisión de una parte de esta tesis.

A la Dra. Lilian K. Flores por su apoyo en el desarrollo de gran parte de los experimentos que forman pieza clave de la presente tesis.

A la Dra. Ofelia Rousseau por su apoyo en análisis e interpretación de los resultados calorimétricos.

Al M.V.Z. Humberto Trejo por su gran apoyo en el cuidado y manejo de los animales de estudio y compartir sus habilidades técnicas al respecto.

A mis compañeros de laboratorio Francisco Iván R. Chiquete, Eduardo E. Valdez y Jesús Espinoza por su valioso apoyo para lograr la generación de datos que forman parte fundamental de la presente tesis.

INDICE GENERAL

INDICE DE CUADROS	VII
INDICE DE FIGURAS	VIII
I RESUMEN	1
II INTRODUCCIÓN	7
III REVISIÓN DE LITERATURA	10
A ALERGIA A LOS ALIMENTOS	10
B ALERGIA A LA LECHE BOVINA	10
C PREVALENCIA DE ALERGIA ALIMENTARIA	12
D PATOGÉNESIS DE LA ALERGIA ALIMENTARIA	16
E CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE EPÍTOPES	18
F MODIFICACIÓN DE ALÉRGENOS	19
1 Modificación térmica	20
2 Hidrólisis	21
3 Tratamiento a altas presiones	23
4 Irradiación de alérgenos alimentarios	23
5 Modificación química de residuos de aminoácidos	24
G LA CEPA BALB/c COMO MODELO DE ALERGIA ALIMENTARIA	24
H PROBIÓTICOS Y ALERGIA A LA LECHE BOVINA	27
IV JUSTIFICACIÓN	30
V HIPÓTESIS	31
VI OBJETIVOS	32
VII MATERIALES Y MÉTODOS	33
A ASPECTOS ÉTICOS Y ANIMALES	33
1 Prevalencia de alergia alimentaria	33
2 Ensayos en ratones BALB/c	33
B PREVALENCIA DE ALERGIA PERSISTENTE A LA LECHE BOVINA	33
1 Encuesta poblacional	33

2	Cuestionario	34
3	Definiciones	34
C	PROTEÍNAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO	36
D	CALORIMETRÍA DE BARRIDO	36
E	TRATAMIENTO TÉRMICO DE α -CASEÍNAS	36
F	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA	37
G	ELECTROFORESIS SDS-PAGE DE PROTEÍNAS TRATADAS TÉRMICAMENTE	38
H	FIJACIÓN, TINCIÓN Y DESTIÑIDO DE GELES SDS-PAGE	39
I	ANÁLISIS DE DIGESTIBILIDAD DE CASEÍNAS CON PEPSINA EN FLUIDO GÁSTRICO SIMULADO	40
J	SENSIBILIZACIÓN ORAL CON α -CASEÍNAS	41
K	TOMA DE MUESTRA DE SANGRE, SACRIFICIO DE ANIMALES Y MUESTREO DE TEJIDO	41
L	EVALUACIÓN DE FUENTES DE PROTEÍNA PARA REALIZAR LOS ENSAYOS INMUNOADSORBENTE LIGADO A ENZIMAS (ELISA)	41
M	EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS IgE e IgG POR ELISA	42
N	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL DE LA DIETA PARA ROEDORES LABDIET® 5013	43
Ñ	SENSIBILIZACIÓN IP CON α -CASEÍNAS	44
O	RETO INTRADÉRMICO	46
P	RETO ORAL	46
Q	EVALUACIÓN DE mMCP-1 EN SUERO	47
R	OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SUERO REDUCIDAS EN IgG	47
S	PROBIÓTICO VSL#3	48
T	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE BIOTA INTESTINAL	48
U	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	49
1	Prevalencia de alergia alimentaria	49
2	Ensayos de sensibilización a α -caseínas	49

VIII	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
A	PREVALENCIA DE ALERGIA PERSISTENTE A LA LECHE BOVINA	50
B	TRATAMIENTO TÉRMICO DE α -CASEÍNAS BOVINAS	52
C	SENSIBILIZACIÓN DE RATONES BALB/c A α -CASEÍNAS BOVINAS	55
1	Evaluación de la fuente de proteína para desarrollar las reacciones de ELISA	55
2	Sensibilización de ratones por la vía oral con el uso de sucralfato	57
3	Sensibilización intraperitoneal a α -caseínas libre de adyuvantes	61
D	EVALUACIÓN DE LOS POTENCIALES DE SENSIBILIZACIÓN Y DE SENSIBILIZACIÓN RESIDUAL DE α -CASEÍNAS TRATADAS TÉRMICAMENTE	67
E	EVALUACIÓN DE LA SUPLEMENTACIÓN CON PROBIÓTICOS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE ALÉRGICA A CASEÍNAS CON POTENCIAL DE SENSIBILIZACIÓN REDUCIDO EN RATONES BALB/c SENSIBILIZADOS CON α -CASEÍNAS NATIVAS.	72
IX	CONCLUSIONES	73
X	REFERENCIAS	74
XI	ANEXOS	92

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Modelos de alergia alimentaria que utilizan el ratón BALB/c y las vías intraperitoneal o intragástrica para sensibilizar Modelos de alergia alimentaria que utilizan el ratón BALB/c y las vías intraperitoneal o intragástrica para sensibilizar	13
2	Dilucones para la preparación de la curva estándar para cuantificar proteína con el método del ácido bicinconinico	38
3	Reactivos y volúmenes para preparar el gel separador en condiciones desnaturalizantes (2 geles de 0.75 mm).	39
4	Reactivos y volúmenes para preparar el gel concentrador en condiciones desnaturalizantes Reactivos y volúmenes para preparar el gel concentrador en condiciones desnaturalizantes	39
5	Características clínicas y demográficas de la población estudiada	51

INDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Ensayos clínicos registrados en https://clinicaltrials.gov dirigidos a desarrollar tolerancia inmunológica a las proteínas de la leche bovina en pacientes alérgicos a este alimento	13
2	Fases de sensibilización y efectora involucradas en el desarrollo de la alergia alimentaria mediada por IgE	17
3	Algoritmo utilizado para definir las reacciones adversas a los alimentos y alergia a la leche bovina . ALB; Alergia a la leche bovina	35
4	Protocolo de 35 días para sensibilizar a α -caseínas bovinas de forma intragástrica y con sucralfato ratones BALB/c	42
5	Protocolo de 14 días para sensibilizar a α -caseínas bovinas de forma intraperitoneal	45
6	Protocolo de 28 días para sensibilizar a α -caseínas bovinas de forma intraperitoneal	45
7	Calorimetría diferencial de barrido de α -caseínas bovinas	53
8	Electroforesis de ovoalbúmina, proteína de papa, y α -caseínas	54
9	Caseínas digeridas con pepsina a diferentes tiempos	55
10	Evaluación de la fuente de proteína para detectar por ELISA anticuerpos anti- α -caseínas bovinas	57
11	Sensibilización de ratones BALB/c a α -caseínas bovinas por la vía oral y con sucralfato	60
12	Evaluación de dos protocolos para sensibilizar ip y sin adyuvantes a α -caseínas ratones BALB/c	62

13	Evaluación de la disminución de la IgG total sobre la respuesta de anticuerpos IgE anti- α -caseínas en muestras de suero obtenidas de ratones inmunizados ip	63
14	Evaluación de anticuerpos IgG anti- α -caseínas recuperados de muestras de suero tratadas para disminuir la IgG total	64
15	Reto intradérmico con α -caseínas u ovoalbúmina y evaluación de anticuerpos IgE anti-ovoalbúmina	66
16	Inmunoreactividad de anticuerpos IgG obtenidos de ratones inmunizados con α -caseínas contra las proteínas de la dieta de los animales que no respondieron a la sensibilización oral con sicrafato	67
17	Evaluación de los potenciales de sensibilización de α -caseínas tratadas térmicamente	69
18	Evaluación de los potenciales de sensibilización residual de α -caseínas tratadas térmicamente	71
19	Cultivo de probióticos	72

I RESUMEN

Se carece de estrategias eficaces para generar tolerancia oral a las proteínas de la leche en los casos de alergia y evitar la leche bovina en la dieta sigue siendo el manejo primario de este trastorno. Esto afecta la calidad de vida de las personas alérgicas a la leche ya que deben vivir con el temor de las exposiciones accidentales al alérgeno, las cuales son comunes, y llevar una dieta socialmente restrictiva. A nivel global se estima que la alergia a la leche bovina afecta alrededor del 2% de la población pediátrica y que entre 5% y 10% de estos casos seguirán siendo alérgicos hasta la edad adulta. Sin embargo, antes de que se realizara el presente estudio, no había datos publicados sobre la prevalencia de alergia a la leche bovina u otros alimentos en **población abierta Mexicana**. Ciertamente, los estudios realizados en **población alérgica Mexicana** destacan que las proteínas de la leche son las causantes de la mayoría de los casos de alergia alimentaria (28%), pero se debe tener en cuenta que las tasas de prevalencia de alergia a la leche bovina pueden variar según la edad de la población estudiada. Aunque los casos de alergia a la leche bovina son de buen pronóstico clínico, aquellos casos que no se resuelven para la edad de 4 años (alergia persistente) suelen presentar reacciones alérgicas severas (anafilaxis) sobre la exposición a las proteínas de la leche, sobre todo tras la exposición a α -caseínas. Notablemente, el tratamiento térmico de la leche (calentado excesivo u horneado) disminuye su capacidad para desencadenar síntomas en algunos casos de alergia y su consumo podría acelerar la adquisición de tolerancia inmunológica, pero la mayoría de los casos de alergia persistente a la leche bovina dejan el tratamiento debido a la recaída sintomática. De este modo, el desarrollo de alternativas terapéuticas efectivas para tratar los casos de alergia persistente a la leche bovina mejoraría la calidad de vida de las personas afectadas.

El presente proyecto de tesis estuvo dirigido a evaluar por primera vez en población abierta Mexicana la prevalencia reportada por los padres de alergia persistente a la leche bovina en escolares. Además, considerando que el tratamiento térmico de proteínas podría disminuir su alergenidad, se planteó evaluar el potencial de sensibilización de las α -caseínas bovinas tratadas térmicamente en un modelo murino. Finalmente, los ratones sensibilizados a caseínas recibirían de forma intragástrica una mezcla de probióticos, la cual ha mostrado capacidad para modular la respuesta inmune, y serían retados de forma intragástrica con caseínas tratadas térmicamente y con un potencial de sensibilización o alérgico reducido. En este contexto, se plantearon dos hipótesis. Primeramente, se hipotetizó que

la prevalencia a la alergia persistente a la leche bovina era similar a la reportada globalmente (alrededor del 0.2%) entre los escolares de Culiacán, Sinaloa. Segundo, se hipotetizó que es posible que un principio combinado basado en la administración oral de probióticos y el tratamiento térmico de proteínas es una alternativa efectiva para controlar o prevenir la respuesta inmune alérgica a caseínas debido a un potencial de sensibilización o alergénico reducido de las caseínas tratadas térmicamente y a una despolarización de la respuesta alérgica e inducción de células T reguladoras. El objetivo general de esta propuesta fue estimar la prevalencia de alergia persistente a la leche bovina reportada por los padres en escolares de Culiacán, Sinaloa y desarrollar un método (probado en un modelo murino) basado en el tratamiento térmico de proteínas y la administración oral de probióticos para controlar o prevenir la respuesta alérgica a caseínas. Para cumplir con dicho objetivo se contemplaron 5 fases: 1) se estimó la prevalencia reportada por los padres de alergia persistente a la leche bovina en escolares de Culiacán, Sinaloa; 2) se evaluaron por calorimetría de barrido los cambios estructurales irreversibles inducidos por tratamiento térmico a las α -caseínas; 3) se establecieron las condiciones para sensibilizar a α -caseínas de forma oral e intraperitoneal ratones BALB/c; 4) se evaluaron los potenciales de sensibilización y de sensibilización residual de las α -caseínas nativas y tratadas térmicamente; y 5) ratones BALB/c serían sensibilizados de forma oral o intraperitoneal a caseínas, suplementados con probióticos y posteriormente retados de forma oral con α -caseínas tratadas térmicamente y con potencial de sensibilización o alergénico reducido.

Los resultados muestran que la prevalencia de alergia persistente a la leche bovina en escolares de Culiacán, Sinaloa es de 0.29%. De los tres casos identificados, dos reportaron síntomas de anafilaxis y ninguno de estos contaba con algún tratamiento de emergencia. Otros resultados muestran que el tratamiento térmico en seco de α -caseínas bovinas no afecta su digestibilidad *in vitro* con pepsina. Consecuentemente, se descartaba la posibilidad de que las α -caseínas tratadas térmicamente incrementaran su potencial de sensibilización debido a la resistencia a la digestión. Para evaluar dicho potencial *in vivo*, ratones BALB/c fueron sensibilizados con α -caseínas nativas de acuerdo a protocolos de sensibilización oral e intraperitoneal. Desafortunadamente, el protocolo de sensibilización oral propuesto no fue reproducible siendo sensibilizados solo cuatro de treinta y cinco ratones. Así, se evaluaron dos protocolos de sensibilización intraperitoneal sin adyuvantes. Un protocolo de 14 días con dos inmunizaciones y otro de 28 días con 5 inmunizaciones. Los resultados

muestran que el protocolo de 28 días desencadena una respuesta de anticuerpos IgE mas intensa y reproducible que el protocolo de 14 días ($P < 0.05$). Una vez establecido el modelo de sensibilización, se evaluaron los potenciales de sensibilización y de sensibilización residual de las α -caseínas tratadas térmicamente. Sin embargo, las caseínas tratadas térmicamente mostraron potenciales de sensibilización y de sensibilización residual mas altos que las α -caseínas nativas ($P < 0.05$). En conjunto, las evaluaciones in vivo muestran que el uso de α -caseínas tratadas térmicamente en un principio combinado dirigido a inducir tolerancia inmunológica a estas proteínas en individuos alérgicos a la leche bovina no es conveniente.

ABSTRACT

There is a lack of efficient strategies to achieve oral tolerance to milk proteins in allergic patients and dietary avoidance of cow's milk is still the mainstay of management in this condition. This affects the quality of life of milk allergic patients since they have to live afraid of accidental exposures to milk proteins, which are common, and to follow a socially restricted diet. It has been estimated that cow's milk allergy affects around 2% of the pediatric population globally and that between 5% and 10% of the cases will remain being allergic to milk until the adult age. However, before the present study was undertaken, there were no published data about the prevalence of cow's milk allergy or any other food in Mexican open population. Certainly, studies conducted in Mexican allergic population highlight that milk proteins are the triggers of most of the food allergy cases (28%), but it should be taken in to account that milk allergy prevalence rates are influenced by the age of the studied population. Although the prognosis of cow's milk allergy is good, some milk allergic patients are unable to outgrow the condition by the age of 4 years (persistent allergy) and these cases usually develop severe allergic reactions under milk proteins exposure, predominantly under the exposure to α -caseins. Notably, the thermal treatment of milk (extensively heated or baked) decreases its ability to trigger symptoms in some milk allergic patients and its intake could accelerate immunological tolerance acquisition, but most of the persistent cow's milk allergic cases quit the interventions due to symptomatic relapse. Therefore, the development of efficient therapeutic approaches to treat persistent cow's milk allergy would improve the quality of life of the affected individuals.

The present thesis project was conducted to evaluate for the first time in an open Mexican population the parent-reported prevalence of persistent cow's milk allergy in schoolchildren. Furthermore, taking into account that the thermal treatment of proteins could decrease its allergenicity, it was proposed to evaluate the sensitizing potential of thermally treated α -caseins in a murine model. Finally, the mice sensitized to α -caseins would be supplemented per orally with a mix of probiotics, which has shown potential to modulate the immune response, and would be challenged per orally with thermally treated caseins with decreased sensitizing or allergenic potential. In this context, two hypothesis were drafted. Firstly, it was hypothesized that the prevalence of persistent cow's milk allergy among the schoolchildren from Culiacán, Sinaloa was comparable to the prevalence rate reported globally (around 2%). Secondly, it was hypothesized that a combined approach based on the oral administration of

probiotics and the thermal treatment of proteins is an effective approach to control or prevent the allergic response to α -caseins due to a decreased sensitizing or allergenic potential of thermally treated α -caseins and to a depolarization of the allergic response and development of regulatory T cells.

The main objective of the present thesis was to estimate the parent-reported prevalence of persistent cow's milk allergy in schoolchildren from Culiacán, Sinaloa and to develop an approach (tested in a murine model) based on the thermal treatment of proteins and the per oral administration of probiotics to control or prevent the allergic response to α -caseins. To meet the objectives, five phases were planned: 1) it was estimated the parent-reported prevalence of persistent cow's milk allergy in schoolchildren from Culiacán, Sinaloa; 2) There were evaluated by Differential Scanning Calorimetry the irreversible structural changes induced by the thermal treatment of α -caseins; 3) there were established the conditions to sensitize orally and intraperitoneally to α -caseins BALB/c mice; 4) there were evaluated the sensitizing and residual sensitizing potentials of native and thermally treated α -caseins; and 5) BALB/c mice would be sensitized orally or intraperitoneally to caseins, supplemented with probiotics and later orally challenged with thermally treated α -caseins with reduced sensitizing or allergenic potential.

The results shown that the prevalence rate of persistent cow's milk allergy in schoolchildren from Culiacán, Sinaloa is 0.29%. Among the three cases identified, two reported symptoms of anaphylaxis, but none was advised to acquire rescue medication to treat anaphylaxis. Other results show that the dry heating of α -caseins does not affect its in vitro digestibility with pepsin. Consequently, it was discarded the possibility that the thermal treatment increased the sensitizing potential of α -caseins due to digestion resistance. Unfortunately, the proposed approach to sensitize orally BALB/c mice was not reproducible being sensitized only four out of thirty five mice. Thus, there were evaluated two adjuvant-free protocols of intraperitoneal sensitization. One of these was a fourteen days protocol, which include two immunizations, and the other one was a twenty eight days protocol, which include five immunizations. The results show that the twenty eight days protocol triggers a more vigorous and reproducible IgE response than the fourteen days protocol ($P < 0.05$). Once the sensitization model was established, there were evaluated the sensitizing and residual sensitizing potentials of thermally treated α -caseins. However, the thermally treated α -caseins showed higher sensitizing and residual

sensitizing potentials than the native α -caseins ($P < 0.05$). Taken together, the in vivo assessments show that the incorporation of thermally treated α -caseins in a combined approach focused to promote immunological tolerance to these proteins in milk allergic patients is not convenient.

II INTRODUCCIÓN

La alergia a los alimentos se define como una reacción inmune adversa y reproducibe a estos la cual es mediada por mecanismos inmunológicos (Ontiveros y cols, 2014). Se estima que 1-2% de la población adulta presenta reacciones alérgicas alimentarias principalmente al cacahuete, mariscos, y nueces (Sicherer y col. 1999; Ontiveros y col, 2014). En cuanto a niños de 0-4 años de edad, se estima que alrededor del 3% presentan algún tipo de alergia alimentaria sobre todo a la leche, huevo y cacahuete (Rona y col, 2007). Particularmente, la alergia a la leche bovina mediada por IgE es desarrollada en los primeros años de vida y puede persistir hasta la edad adulta (Lam y col, 2008). A nivel global se estima que la alergia a la leche bovina afecta alrededor del 2% de la población pediátrica y que entre 5-10% de estos casos desarrollarán alergia persistente (Skripak y col, 2007; Sackesen y col, 2011). En México, se han realizado estudios en población alérgica los cuales muestran que las proteínas de la leche son las causantes de la mayoría de los casos (28%) de alergia alimentaria diagnosticada (Rodríguez-ortíz y col, 2009). Sin embargo, no había datos publicados sobre la prevalencia de alergia alimentaria en población abierta mexicana al momento de iniciar el presente estudio.

Aunque se ha logrado avanzar en el conocimiento sobre la respuesta alérgica a los alimentos mediada por IgE, los mecanismos que subyacen a esta no han sido elucidados en detalle (Berin, 2016). Esencialmente hay dos fases involucradas en la respuesta alérgica mediada por IgE. La primera fase o fase de sensibilización ocurre con la primera exposición al alérgeno alimentario, sin desencadenar síntomas característicos del padecimiento. Aquí, la interacción entre células inmunes llamadas presentadoras de antígeno, células T cooperadoras y células B, conduce a la producción de anticuerpos del isotipo IgE. Estos anticuerpos pueden ligarse a un receptor específico presente en la superficie de células mastocitos dando lugar a la sensibilización (Oettgen y Burton, 2015). El cambio de isotipo de anticuerpo de IgM a IgE se induce por una serie de señales químicas (citocinas) entre las células T y las células B (que eventualmente liberan el anticuerpo IgE) e involucra principalmente a las citocinas interleucina (IL) -4 e IL-13 (Waserman y Watson, 2011).

La segunda fase de la respuesta alérgica o fase efectora ocurre cuando existe una reexposición al alérgeno dietario. El alérgeno es reconocido por los anticuerpos IgE ligados a los mastocitos causando su degranulación y desencadenando los síntomas típicos de las alergias alimentarias (Shao y col,

2013). Adicionalmente, tanto las células T cooperadoras como los mastocitos liberan IL-5 que a su vez promueve la activación y acumulación de células basófilos y eosinófilos que potencian la respuesta alérgica aguda (Fulkerson y col, 2010).

Actualmente no hay una terapia definida para tratar de forma universal los casos de alergia a los alimentos y su manejo primario consiste en evitar la exposición al alérgeno relevante. En el caso de las alergias alimentarias mediadas por anticuerpos IgE, los epítopes que son reconocidos por estos anticuerpos puede ser lineales (secuencia peptídica continua) o conformacionales (secuencia que debido a su arreglo espacial tiene sitios de unión a la IgE alejados unos de otros) (Pomes 2010). De esta forma, los epítopes lineales solo pueden dejar de desencadenar la respuesta inmune cuando son degradados con métodos drásticos (e. g. por medio de hidrolisis). Contrariamente, los epítopes conformacionales pueden desaparecer si la proteína que los contiene cambia su arreglo espacial de forma irreversible (Golias y col, 2012). Así, el tratamiento térmico de proteínas podría reducir su potencial alérgico debido a los cambios conformacionales irreversibles inducidos por calor, lo cual podría ocasionar la pérdida de epítopes conformacionales (Bu y col, 2013). Por otro lado, existe el riesgo de incrementar el potencial alérgico de la proteína al quedar expuestos epítopes enterrados en la molécula nativa debido al desdoblamiento de la estructura conformacional durante la desnaturalización por calor (Bu y col, 2013).

De las proteínas de la leche bovina las α -caseínas s1 y s2 suman alrededor del 70% de la proteína total y son consideradas los alérgenos principales (Natale y col, 2004). De hecho, los pacientes con alergia persistente a la leche bovina desarrollan anticuerpos principalmente contra epítopes lineales y conformacionales de estas proteínas (Chatchatee y col, 2001). A pesar de la relevancia de los epítopes lineales, se ha demostrado que el tratamiento térmico de la leche reduce la respuesta alérgica en algunos pacientes (Nowak y col, 2008; Kim y col, 2011) y esto podría asociarse a un potencial alérgico reducido de las caseínas tratadas térmicamente. Estos estudios solo han considerado las condiciones térmicas convencionalmente usadas para elaborar alimentos que contienen leche, pero no se han evaluado las características calorimétricas de las proteínas involucradas en la respuesta alérgica a la leche, es decir, la cantidad de calor que estas requieren para que cambien de forma irreversible su conformación espacial. Sin embargo, cuando se tratan térmicamente proteínas

alergénicas aisladas, es necesario evaluar en modelos *in vivo* los potenciales de sensibilización y/o alérgico debido a la posibilidad de incrementar dichos potenciales (Bu y col, 2013).

De manera alterna al tratamiento térmico de proteínas, los probióticos podrían modular la respuesta alérgica a los alimentos y promover el desarrollo de tolerancia inmunológica. Aunque no se cuenta con información precisa acerca de los mediadores inmunológicos (células y citocinas) involucrados en este evento, se ha demostrado que la adición del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) a una fórmula de caseína exhaustivamente hidrolizada puede reducir la respuesta alérgica y acelerar la adquisición de tolerancia en niños afectados con alergia a la leche bovina (Berni y col, 2012; Berni y col, 2013; Berni y col, 2016). Otros probióticos comercialmente disponibles como el VSL#3 han mostrado en estudios clínicos efectividad para tratar trastornos relacionados al intestino tales como síndrome de intestino irritable (Kim y col, 2003; Kim y col, 2005) y colitis ulcerativa (Venturi y col, 1999; Tursi y col, 2004; Bibiloni y col, 2005). Otros estudios en modelos murinos de alergia alimentaria a camarón y cacahuate han evaluado el potencial del VSL#3 para controlar la respuesta alérgica. Basado en estos modelos murinos de alergia, se puede inferir que la reducción de la respuesta alérgica a las proteínas de los alimentos mediante el uso de probióticos se da a través de mecanismos que promueven una respuesta inmune reguladora la cual podría ser dependiente del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y de una respuesta inflamatoria mediada por el interferón gamma (IFN- γ) (Schiavi y col, 2011; Barletta y col, 2013).

En el presente estudio se planteó estimar en población abierta de Culiacán, Sinaloa la prevalencia reportada por los padres de alergia persistente a la leche bovina en escolares. También se planteó estudiar el efecto del tratamiento térmico de α -caseínas sobre su potencial de sensibilización y de sensibilización residual, así como el efecto de la suplementación con probióticos aunada a la administración oral de α -caseínas tratadas térmicamente y con potencial de sensibilización reducido sobre el desarrollo de células T reguladoras en un modelo murino de alergia a α -caseínas bovinas .

III REVISIÓN DE LITERATURA

A. ALERGIA A LOS ALIMENTOS

Las reacciones adversas a los alimentos son definidas como cualquier respuesta anormal observada tras la ingestión del alimento (Untersmayr y Jensen-Jarolim, 2006; Ontiveros y col, 2015). Dichas reacciones pueden dividirse en tóxicas y no tóxicas. Estas últimas dependen de la susceptibilidad individual y se basan en mecanismos inmunes mediados o no por anticuerpos IgE (alergia o hipersensibilidad) o mecanismos no inmunes (intolerancia) (Untersmayr y Jensen-Jarolim, 2006). Particularmente, la alergia a los alimentos se define como una reacción adversa a los estos la cual es reproducible y mediada por mecanismos inmunológicos y abarca trastornos como la anafilaxis mediada por IgE así como enterocolitis y trastornos eosinofílicos inducidos por proteínas de los alimentos (Berin y Sicherer, 2011).

B. ALERGIA A LA LECHE BOVINA

La leche es un fluido biológico que contiene todos los requerimientos nutricionales del recién nacido. Conforme el niño se desarrolla sus necesidades de alimento incrementan y por lo general la leche bovina se utiliza como un sustituto de la leche humana. Esta sustitución puede acompañarse de padecimientos de orden inmunológico, como la alergia a las proteínas de la leche bovina mediada por IgE. De hecho, la leche bovina contiene más de 25 proteínas diferentes de las cuales algunas proteínas del suero de leche así como las caseínas han sido identificadas como alérgenos (Wal y col, 1998, Natale y col, 2004). En general, la alergia a la leche 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). Este trastorno es de buen pronóstico clínico ya que entre el 80-90% de los casos se resuelven naturalmente para la edad de 5 años (Wood y col, 2003; Wood y col, 2013). Si el desorden perdura, entonces es considerado como una alergia persistente a la leche bovina (Chatchatee y col, 2001). En particular, la fracción de caseína de la leche bovina está compuesta por las subunidades alfa S1 y S2, beta y Kappa caseínas. De estas, la caseína alfa S1 es considerada uno de los alérgenos principales de la leche y su reconocimiento por los anticuerpos IgE de pacientes alérgicos se asocia a los casos de alergia persistente a la leche bovina (Cocco y col, 2003).

Las fórmulas hipoalérgicas usadas para reemplazar la leche bovina se basan principalmente en fórmulas con aminoácidos o aislados de proteína de soya así como caseína o proteína de suero de leche extensivamente hidrolizadas (Giovannini y cols, 2014). Aunque las fórmulas basadas en

aminoácidos no son alergénicas (Hill y col, 2007), su uso es limitado por el alto costo y el mal sabor. En cuanto a los aislados de proteína de soya, estos provocan reacciones alérgicas más frecuentemente en niños menores de 6 meses que las fórmulas de caseína o suero de leche extensivamente hidrolizadas (Klemola y col, 2002). En general, no hay diferencia clínica marcada en la eficiencia entre la proteína extensivamente hidrolizada de suero de leche o caseína aunque en algunos casos los niños que no toleran el hidrolizado de suero de leche podrían tolerar el hidrolizado de caseína y viceversa (Kneepkens y Meijer, 2009). La fórmula basada en aminoácidos es apropiada para niños con alergia a la leche bovina que no toleran ninguno de los hidrolizados de proteína de leche (suero de leche o caseína) y debe ser limitada a este subgrupo de pacientes (Kneepkens y Meijer, 2009). Lo anterior es de relevancia clínica ya que la proporción de niños que adquieren tolerancia oral a la leche bovina es significativamente mayor en aquellos que consumen fórmula basada en caseína (43.6%) en lugar de fórmula de aminoácidos (18.2%) (Berni y col, 2013). Además, el desarrollo de tolerancia a las caseínas minimiza la posibilidad de desarrollar alergia persistente a la leche bovina (Cocco y col, 2003).

Se estima que la alergia a leche bovina mediada por IgE afecta alrededor del 2% de la población pediátrica (Sackesen y col, 2011) aunque esta cifra podría alcanzar hasta 7.5% si nos restringimos solamente al primer año de vida y no solamente a la alergia a la leche mediada por IgE (Mousan y Kamat, 2016). Aunque las fórmulas hipoalérgicas comerciales para sustituir la leche bovina son de ayuda sobre todo en el primer año de vida, hasta el momento no se encuentra disponible un tratamiento para la alergia a la leche bovina y su manejo primario consiste en evitar el alérgeno relevante. Esto es de particular interés ya que las exposiciones accidentales a proteínas de leche son comunes en niños (Boyano-Martínez y col, 2009; Fleischer y col, 2012) y adultos y las reacciones alérgicas suelen ser severas (Störger y Wuthrich, 1993; Lam y cols, 2008; Fleischer y col, 2012; Turner 2012). De esta forma, existe interés en desarrollar tratamientos efectivos para inducir tolerancia inmunológica a las proteínas de la leche bovina en pacientes con alergia a estas proteínas.

Hasta el momento, entre los ensayos clínicos registrados en el sitio web clinicaltrials.gov hay 18 ensayos que tienen como objetivo desarrollar tolerancia inmunológica a las proteínas de la leche bovina en pacientes alérgicos a estas proteínas (consultado el 05/Feb/2017; palabras clave “milk” AND “allergy”; un total de 200 estudios fueron encontrados, pero solo 18 tuvieron como objetivo inducir

tolerancia inmunológica). Los principios propuestos incluyen la inmunoterapia oral (sublingual o epicutánea), el uso de leche extensivamente calentada, el uso de anticuerpos anti-IgE, así como el uso de probióticos. De los 18 ensayos clínicos, ocho han sido completados, principalmente en Estados Unidos, y el resto se encuentran en diferentes fases (figura 1). Notablemente, solo uno de estos ensayos clínicos fue basado en un principio combinado (ID del estudio NCT01157117). Dicho principio incluyó el uso de un anticuerpo anti-IgE (Omalizumab) en combinación con la inmunoterapia oral. Este ensayo clínico terminó recientemente y los resultados muestran una mejora en las evaluaciones de seguridad de la intervención oral, pero no en la eficacia de los resultados, es decir, no se logró desensibilizar por completo a los sujetos de estudio (Wood y col, 2016). Resultados similares han sido reportados en otros estudios enfocados en la inmunoterapia oral (Nurmatov y col, 2017). De esta forma, el manejo primario de la alergia a la leche bovina sigue siendo evitar el contacto con las proteínas de este alimento, como se mencionó anteriormente.

C. PREVALENCIA DE ALERGIA ALIMENTARIA

Exceptuando aquellos casos donde la causa de una reacción severa a los alimentos puede ser claramente identificada, el diagnóstico de alergia alimentaria debe ser confirmado con la prueba del reto con el alimento, “el estándar de oro”, idealmente realizado como una prueba de reto con el alimento en condiciones de doble ciego. Sin embargo, solo unos pocos estudios han basado sus datos de prevalencia en esta práctica clínica que es laboriosa y tardada. Como una alternativa, algunos estudios de prevalencia de alergia alimentaria se basan en cuestionarios/entrevistas (prevalencia autopercebida) o en menor proporción en pruebas serológicas de anticuerpos IgE específicos al alérgeno y/o pruebas de punción cutánea.

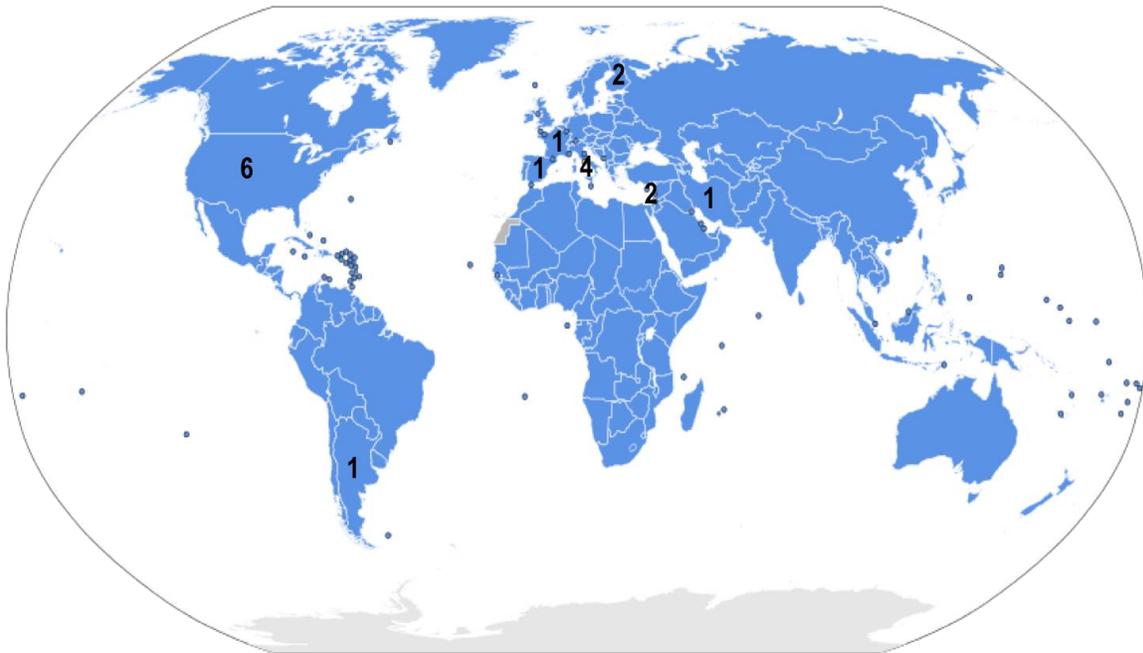


Figura 1. Ensayos clínicos registrados en <https://clinicaltrials.gov> dirigidos a desarrollar tolerancia inmunológica a las proteínas de la leche bovina en pacientes alérgicos a este alimento. Los países de América que han registrado ensayos clínicos son: Estados Unidos (4 completados, 1 en fase 2 y 1 en fase 1) y Brazil (1 completado). Los países Europeos y Asiáticos son: Italia (1 completado y 3 en fase 1), Finlandia (2 en fase 2), España (1 completado), Francia (1 en fase 1), Israel (1 completado y 1 en fase 1) e Irán (1 en fase 2), respectivamente. El sitio web fue accesado el 05/feb/2017.

Debe tenerse en cuenta que los estudios de prevalencia de alergia alimentaria estimada con encuestas pueden ser influenciados por otras enfermedades relacionadas y esto podría impactar en las estimaciones de prevalencia de alergia alimentaria (Nakamura y col, 2008). Aunque la evaluación de síntomas convincentes de hipersensibilidad inmediata (estornudos, problemas para respirar, ronchas en la piel, y diarrea) podrían mejorar el rendimiento de estos estudios, (Sicherer y col, 1998, Sicherer y col, 2010, Silva y col, 2016) el principal valor de los estudios de alergia basados en encuestas es servir de base para investigaciones posteriores basadas en criterios diagnósticos objetivos (IgE específica, prueba de punción cutánea, y prueba de reto con el alimento). Con respecto a los valores de IgE en sangre, estudios clínicos han demostrado que los niveles altos de IgE específica indican una probabilidad alta de alergia alimentaria clínica (Sampson y Ho, 1997, Sampson, 2001) y esto puede ser de ayuda para estimar de mejor forma la prevalencia de alergia alimentaria (Liu y col, 2010).

En Europa, bajo los criterios de alergia autopercebida de alergia alimentaria, combinación de síntomas más sensibilización, y alergia alimentaria demostrada con reto con alimento, las estimaciones de prevalencia de alergia a alimentos específicos fueron como sigue, respectivamente: alergia a la leche (3.5%, 0.6%, 0.9%), huevo de gallina (1%, 0.9%, 0.3%), cacahuete (0.75%, 0.75%, no disponible), pescado (0.6%, 0.2%, 0.3%), y mariscos (1.1%, 0.6%, no disponible) (Rona y col, 2007). La prevalencia de alergia alimentaria autopercebida varió ampliamente (de 3% a 35%) mostrando heterogeneidad entre los estudios (Rona y col, 2007). En cuanto a la prevalencia de alergia a plantas comestibles, las estimaciones de prevalencia de alergia alimentaria autopercebida, prueba de punción cutánea, y alergia alimentaria probada con reto con alimento fueron como sigue, respectivamente: frutas (0.03% a 11.5%, 0.03% a 4.2%, 0.1% a 4.3%), vegetales/legumbres (0.01% a 13.7%, 0.01% a 2.7%, 0.1% a 1.4%), nueces (0% a 7.3%, 0.025 a 4.5%, 0.15 a 4.35), trigo (0.25 a 1.3%, 0.03% a 0.2%, 0% a 0.5%), soya (0.03% a 1.3%, 0.03% a 0.2%, 0% a 0.7%), y otros alimentos (<1.3%, <1%, <0.1% solo un estudio) (Zuidmeer y col, 2008). Estimados de sensibilización (anticuerpos IgE) al trigo y soya fueron <3.7% y <3% respectivamente (Zuidmeer y col, 2008).

Un meta-análisis reciente que incluyó 30 estudios publicados en el periodo de enero del 2000 a septiembre del 2012 también evaluó la prevalencia de alergia alimentaria en Europa (Nwaru y col, 2014). Se encontró una prevalencia de alergia alimentaria autopercebida a cualquier alimento de 6.8% en niños y 5% en adultos. La prevalencia de sensibilización fue de 10% y 2.7% basado en niveles de IgE en sangre y prueba de punción cutánea respectivamente. Cuando este análisis se realizó incluyendo síntomas (alergia alimentaria clínica), la prevalencia de sensibilización fue de 2.7% (5 estudios) y 1.5% (4 estudios) respectivamente. Con respecto a la alergia alimentaria probada con reto con el alimento (12 estudios), su prevalencia fue de 0.99% en niños y 0.89% en adultos.

En una revisión sistemática publicada en 2010 se determinó que la alergia alimentaria afecta a más del 1% o 2% pero menos del 10% de la población de los Estados Unidos (Chafen y col, 2010). En línea con estos datos, la encuesta nacional de salud evaluación nutricional (National Health and Nutrition Examination Survey) reportó que la prevalencia de alergia alimentaria autopercebida en los Estados Unidos era de 6.5% en niños y 9.7% en adultos (McGowan y Keet, 2013). Los principales

alérgenos reportados en este estudio fueron la leche, cacahuete y mariscos. Alternativamente, basado en el estudio de Liu y col. (2010), la prevalencia de sensibilización a los alimentos o alergia alimentaria clínica (considerando niveles séricos de IgE y criterios basados en la edad) fue de 16.8% y 2.5% respectivamente. En este estudio representativo de la población estadounidense se midieron los niveles séricos de IgE específicos a cacahuete, leche bovina, huevo de gallina, y camarón. Otros estudios han reportado tasas de prevalencia autopercebida de 13% y 14.9% en población adulta de los estados unidos (Verrill y cols, 2015).

Las tasas de prevalencia de alergia alimentaria en Canadá, Australia, Asia, y América Latina han sido estimadas en menor medida. Una encuesta telefónica a nivel nacional reportó que la prevalencia de alergia alimentaria autopercebida en la población canadiense era de 7.1% en niños y 8.3% en adultos (Soller y col, 2012; Soller y cols, 2015). Los alérgenos más reportados fueron la leche, los mariscos, las frutas/vegetales, las nueces de árbol, y el cacahuete. Por otro lado, en un estudio que usó el reto con el alimento en una población representativa de Melbourne (Australia), Osborne y col (2011) reportaron que la prevalencia de alergia al cacahuete, al huevo crudo, y al ajonjolí era de 3%, 8.9%, y 0.8% respectivamente. En el mismo estudio, las estimaciones de sensibilización a la leche de vaca y mariscos evaluadas por pruebas de punción cutánea fueron de 5.6% y 0.9% respectivamente.

En Asia, algunos estudios han reportado tasas de prevalencia de alergia alimentaria basada en encuestas o provada con reto. Los resultados varían entre 4.8% a 16.7% (autopercebida) y de 1.1% a 3.8% (provada con reto) (Hu y col, 2009; Chen y col, 2011; Ho y col, 2012; Lao-Araya y Trakultivakorn, 2012; Wu y col, 2012; Zhang y col, 2015). A diferencia de otras localizaciones geográficas, el pescado fue uno de los alérgenos más reportados en la población asiática y esto se ha atribuido a la abundancia de alimentos marinos en esta región (Lee y col, 2013, Zhang y col, 2015). Con respecto a América Latina, Marrugo y col (2008) encontraron una prevalencia de alergia alimentaria basada en encuesta de 14.9% en una cohorte de 3099 individuos de Cartagena, Colombia con edades entre 1 y 83 años. Los alérgenos más reportados fueron las Frutas/vegetales, los alimentos marinos, y las carnes. En otro estudio de prevalencia alimentaria basada en encuestas, Hoyos-Bachilloglu y col. (2014) encontraron una prevalencia de 5.5% en una cohorte de 455 niños Chilenos de edad escolar. En este estudio, los síntomas típicos de hipersensibilidad inmediata relacionados a la alergia alimentaria fueron

evaluados en un segundo cuestionario. De esta forma, los alérgenos más reportados fueron las nueces, el cacahuete, el huevo, el chocolate, el aguacate, y el plátano. En México, a finales del año 2016 se publicaron los primeros datos de prevalencia de alergia alimentaria en población abierta (Ontiveros y cols, 2016). Este estudio forma parte de la presente tesis (anexo I). La tasa de prevalencia de alergia alimentaria autopercebida en escolares fue de 3.5% y de anafilaxis de 1.2%. Los principales alérgenos fueron camarón, otros mariscos, fresa, chocolate, y huevo (Ontiveros y cols, 2016).

Tomando en cuenta los antecedentes presentados anteriormente, se puede considerar que las tasas de prevalencia de alergia alimentaria son ampliamente variables e influenciadas por varios factores tales como la exposición dietaria, diferencias entre poblaciones (edad, raza/etnicidad), diseño de los estudios o metodologías, entre otros. Esto hace difícil estimar con precisión la alergia alimentaria. Por lo tanto, una tasa de prevalencia general de alergia alimentaria probada con reto con alimento menor del 5% puede considerarse un estimado apropiado [Ontiveros y col, 2014 (anexo II)].

D. PATOGÉNESIS DE LA ALERGIA ALIMENTARIA

Sobrepasar la tolerancia oral y generar anticuerpos IgE específicos al alérgeno con la subsecuente sensibilización de células mastocitos o basófilos son eventos centrales para desencadenar la respuesta inmune alérgica. Estos eventos básicos son típicamente llamados fase de sensibilización y fase efectora (He y col, 2012; He y col, 2013; Berin, 2015). La primera involucra células presentadoras de antígeno, células T, citocinas tipo Th2 como las IL-4, IL-5 e IL-13, entrecruzamiento de alérgenos con receptores de células B, y producción de IgE. La sensibilización ocurre después de que células presentadoras de antígeno como las células dendríticas o células B reconocen segmentos alérgicos o “epítopes” en el componente protéico de los alimentos o en los ingredientes que contienen. Posterior a su reconocimiento por las células presentadoras de antígeno, los alérgenos son cargados en moléculas del antígeno leucocitario humano de clase II y presentados a células T. Esta interacción activa células T específicas al alérgeno las cuales producen citocinas Th2 y promueven la producción de anticuerpos IgE por células B específicas (He y col, 2013). Los anticuerpos IgE pueden unirse al receptor FcεRI en la membrana de células mastocitos y basófilos generándose células sensibilizadas (Oettgen y Burton, 2015) (figura 2).

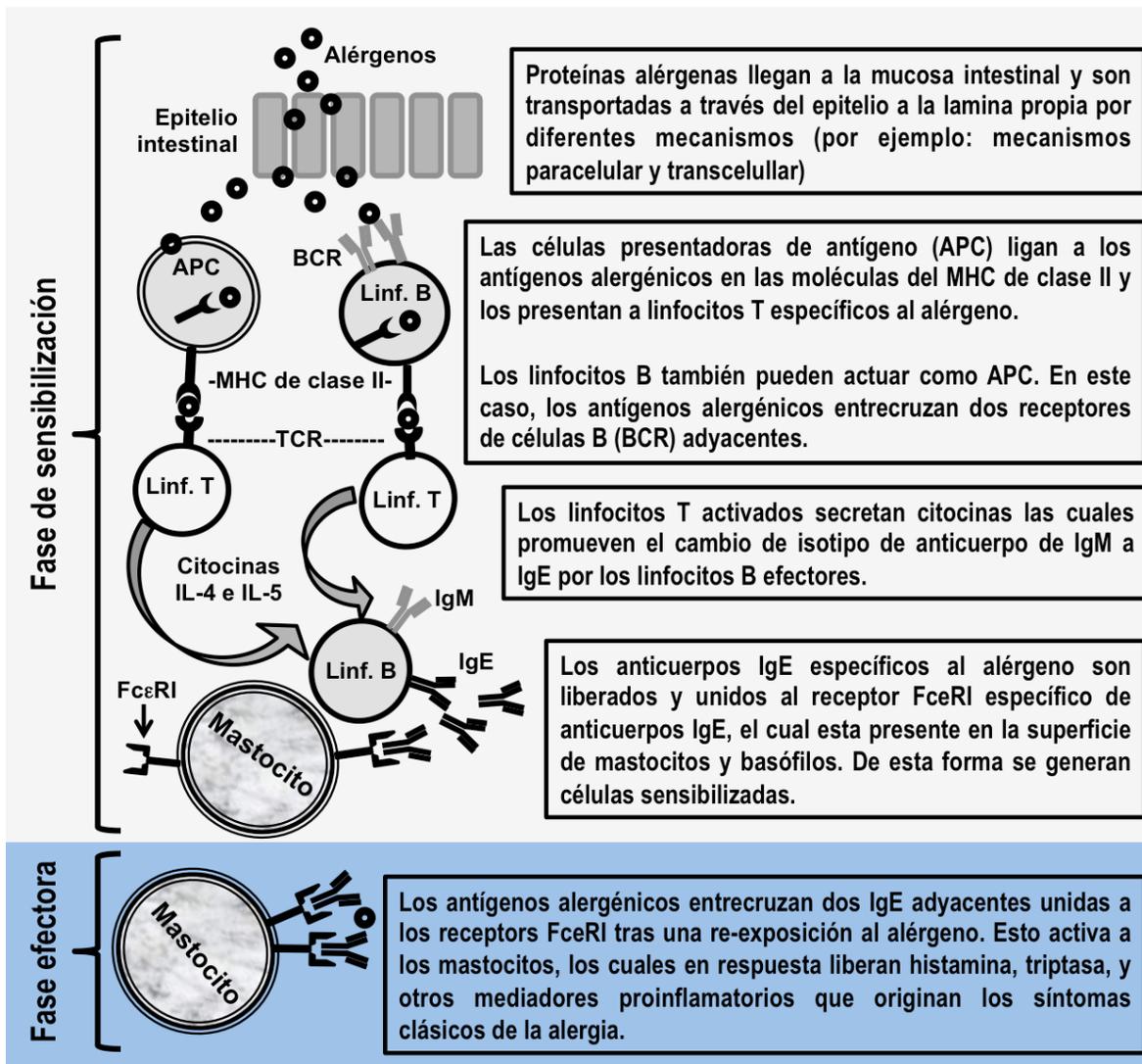


Figura 2. Fases de sensibilización y efectora involucradas en el desarrollo de la alergia alimentaria mediada por IgE.

Además de la ruta oral, la cual es naturalmente tolerogénica, la sensibilización alérgica podría tomar lugar por otras vías. En este contexto, de acuerdo a estudios realizados en modelos murinos, la piel puede ser una ruta importante de sensibilización (Brown y col, 2011; Oyoshi y col, 2009; Izadi y col, 2015). No obstante, la tolerancia puede inducirse a través de la piel (Mondoulet y col, 2011) y algunos alérgenos no generan sensibilización a través de la piel sin un adyuvante (Dunkin y col, 2011). En estos casos, las propiedades intrínsecas de los alérgenos de los alimentos podrían jugar un papel

importante al promover la actividad del sistema inmune innato y en consecuencia inducir sensibilización independiente de adyuvante a través de la piel (Berin y Sicherer, 2011).

Por otro lado, a diferencia de las proteínas resistentes a la digestión, las cuales son asociadas con la producción de IgE y sensibilización (Untersmayr y Jensen-Jarolim, 2006), se ha sugerido que las proteínas que son fácilmente digeridas no tienen la capacidad de sensibilizar y pueden promover tolerancia (Vila y col, 2001; Untersmayr y col, 2003; Schöll y col, 2005; Barone y col, 2000). Así, se ha hipotetizado que el transporte de las proteínas de los alimentos y péptidos a través de la barrera gastrointestinal es necesario para inducir sensibilización o iniciar una respuesta alérgica (Reitsma y col, 2014). En conjunto, los estudios mencionados anteriormente ponen de manifiesto que la sensibilización puede ocurrir por diferentes rutas y la naturaleza del alérgeno es determinante para establecerla. Con respecto a la fase efectora, esta inicia cuando el mismo alérgeno que dio lugar a la sensibilización entrecruza dos IgE adyacentes en la membrana de células mastocitos o basófilos sensibilizados (figura 2). Estas células activadas liberan mediadores proinflamatorios o citocinas ocasionando las manifestaciones clínicas de la alergia (He y col, 2013).

E. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE EPÍTOPES

El conocimiento actual no es suficiente para categorizar a alguna proteína de los alimentos como absolutamente no alérgica. Por ejemplo, Las proteínas de amaranto (*Amaranthus spp.*) han sido ampliamente aceptadas como componentes no alérgicos de los alimentos, pero recientemente Kasera y col, (2013) presentaron el primer caso de alergia inducida por *Amaranthus paniculatus*. Así, la caracterización molecular de epítipes de alérgenos de los alimentos primeramente involucra la identificación de la molécula proteica en la cual son contenidos. Sin embargo, ya que los alimentos alérgicos generalmente contienen más de un epítipe alérgico, es necesario conocer los componentes de la proteína completa y discriminar sus componentes alérgicos y no alérgicos (Ciardello y col, 2013). Los pasos comunes para alcanzar este objetivo han sido descritos como sigue:

- 1) Observación de los individuos que exhiben síntomas de alergia después del consumo de ciertos alimentos;
- 2) Colección de suero de individuos con alergia desencadenada por el mismo alimento;
- 3) identificación de las proteínas reconocidas por los anticuerpos IgE en las muestras de suero de los

pacientes alérgicos. Este último punto es crucial para identificar los epítopes que entrecruzan con los receptores de células B o las IgE acopladas a mastocitos.

Entre las herramientas para el análisis de alérgenos, la inmuno-informática (una subdivisión de la bioinformática) es un instrumento útil para encontrar epítopes de proteínas y modelar sus características. Los primeros intentos para predecir las características de epítopes fueron basados en el desarrollo de escalas de hidrofobicidad relacionadas al perfil antigénico (Hopp y Wood, 1981; Parker y col, 1986). Así, otras características moleculares (estructura secundaria, propensidades de aminoácidos) han sido consideradas en varios algoritmos utilizados en métodos de análisis computacionales. La excelente revisión de Salimi y col, (2010) muestra el creciente número de instrumentos inmuno-informáticos los cuales hacen predicciones de epítopes de forma fácil y eficiente. En el caso particular del análisis del porcentaje de identidad de aminoácidos para predecir el riesgo de reactividad cruzada alérgica de nuevas proteínas es conveniente que las herramientas bioinformáticas sean utilizadas en conjunto con mediciones estadísticas de similaridad (Herman y col, 2015). Finalmente, las herramientas inmuno-informáticas son también útiles para predecir las implicaciones de las modificaciones de alérgenos sobre la respuesta inmune alérgica (Somkuti y Smeller, 2013).

F. MODIFICACIÓN DE ALÉRGENOS

Las proteínas alérgicas pueden ser modificadas a nivel molecular durante el procesamiento de alimentos y de esta forma su capacidad para interactuar con células inmune específicas al alérgeno puede ser alterada. Estas modificaciones (principalmente cambios fisicoquímicos) pueden alterar la digestibilidad de proteínas y también cambiar los mecanismos por los cuales las proteínas alérgicas son transportadas de lado a lado en la mucosa intestinal. Con respecto a la interacción con mediadores inmune, los puntos comunes son el evitar la presentación de los epítopes alérgicos por células presentadoras de antígeno y/o evitar las interacciones entre los epítopes alérgicos y los anticuerpos IgE específicos unidos a los receptores FcεRI en la superficie de mastocitos. Sin embargo, los alérgenos modificados deben ser probados para determinar su potencial de sensibilización y/o alérgico ya que el procesamiento de alimentos puede modificar directamente las proteínas

alergénicas ya sea enmascarando o desenmascarando epítopes específicos (Davis y Williams, 1998; Davis y col, 2001).

1. Modificación Térmica

Varios estudios han descrito los efectos del tratamiento térmico de alérgenos sobre la respuesta inmune alérgica. El trabajo de Martos y col, (2011) concluye que el tratamiento térmico de ovoalbúmina y ovomucoide puede reducir la alergenicidad de estas proteínas, en parte debido a la alteración de sus propiedades digestivas. También Golias y col, (2012) encontraron una reducción de la respuesta inmune alérgica a ovoalbúmina en un modelo murino. Los autores concluyen que el tratamiento térmico de ovoalbúmina ocasionó cambios irreversibles menores en su estructura secundaria modificando su digestibilidad y afectando la formación de epítopes. En ambos estudios un efecto de polarización Th1 inducido por el tratamiento térmico fue observado.

En otros estudios, ratones sensibilizados a ovoalbúmina fueron alimentados con ovoalbúmina calentada observándose una disminución de la proliferación de células T en las placas de Peyer o nódulos linfoides mesentéricos (en relación a animales que consumieron ovoalbúmina nativa) (Martos y col, 2011). Esto sugiere que la absorción de ovoalbúmina calentada a nivel intestinal puede ser afectada ya que estas proteínas en su estado nativo son normalmente capaces de generar células efectoras. Además, el tratamiento térmico de alérgenos se ha utilizado para la desensibilización en modelos murinos. Por ejemplo, animales sensibilizados y tratados oralmente con ovomucoide calentado no fueron capaces de desarrollar síntomas anafilácticos (Leonard y col, 2012). Además, los niveles séricos de IL-13, IL-10, e IFN- γ fueron reducidos, permaneciendo este efecto durante dos semanas posteriores al tratamiento. Este resultado fue atribuido a una reducción del IFN- γ aunque en general se observó una supresión de la respuesta Th1/Th2.

El estudio de Nowak-Wegrzyn y col (2008) revela que la leche extensivamente calentada es tolerada por algunos pacientes con alergia a la leche bovina mediada por IgE. Hay dos tipos de pacientes afectados con alergia a la leche bovina: aquellos con alergia transitoria que producen anticuerpos IgE principalmente dirigidos a epítopes conformacionales y aquellos individuos con alergia persistente que además producen anticuerpos contra epítopes lineales principalmente de caseínas (los cuales no

desaparecen con tratamiento térmico) (Oyoshi y col, 2009; Järvinen y col, 2001). Así, una afinidad incrementada de anticuerpos IgE y una diversidad de epítopes han sido relacionadas a la severidad de la alergia a la leche bovina (Wang y col, 2010). Al momento, no solo la leche bovina calentada (Kim y col, 2011, Nowak-Wegrzyn y col, 2008) sino también el huevo (Kim y col, 2011, Konstantinou y col, 2008; Eigenmann, 2000) pueden ser tolerados por pacientes con alergia a estos alimentos. Además, su inclusión en la dieta parece ser favorable para el desarrollo de tolerancia. Ciertamente, la prescripción de productos calentados requiere de un estudio clínico individual el cual debe ser realizado por personal altamente capacitado.

Por otro lado, la reducción del potencial de sensibilización o alergénico de proteínas tratadas térmicamente es atribuida principalmente a la modificación estructural de alérgenos. Esto a quedado plenamente demostrado al menos para proteínas alergénicas del cacahuete (Zhang y col, 2016). Así, es necesario caracterizar primeramente las propiedades térmicas del alérgeno, es decir, determinar el calor requerido para lograr cambios estructurales irreversibles en la proteína alergénica.

2. Hidrólisis

La hidrólisis exhaustiva o parcial de proteínas reduce su potencial alergénico, pero no necesariamente lo elimina. Esto ha sido especialmente estudiado en fórmulas lácteas hipoalergénicas para infantes (surrogados de leche bovina). Para considerar una fórmula láctea como hipoalergénica esta debe ser tolerada por más del 90% de la población con la alergia específica (Koletzko y col, 2012). En este contexto, las fórmulas lácteas basadas en hidrolizados exhaustivos son toleradas por aproximadamente el 95% de los pacientes alérgicos. Las fórmulas lácteas de hidrolizados parciales de proteínas de suero de leche pueden desencadenar la reacción alérgica en 33% a 50% de los casos y por lo tanto no son consideradas hipoalergénicas (Bahna, 2008). La reducción del potencial alergénico de proteínas hidrolizadas se atribuye al rompimiento de epítopes lineales y/o conformacionales. Para alcanzar esto, el tipo de hidrólisis es decisiva ya que algunas proteínas son resistentes a la digestión dependiendo de la enzima utilizada. También las condiciones de hidrólisis son relevantes. Por ejemplo, se ha demostrado que la hidrólisis de β -lactoglobulina con tripsina/quimiotripsina y pepsina reduce su alergenicidad y cuando la reacción enzimática involucra además tratamiento con calor esta reducción es más pronunciada (Micisnki y col, 2012).

La fermentación es otro principio de procesamiento de alimentos que involucra indirectamente la hidrólisis de proteínas. Dependiendo de la cepa bacteriana utilizada para la fermentación la alergenicidad de diferentes proteínas puede reducirse. Por ejemplo, *Lactobacillus delbrueckii. Bulgaris* CRL 659 son capaces de degradar β -lactoglobulina y sus epítopes (Pescuma y col, 2011) evitando la interacción con anticuerpos IgE específicos de niños afectados con alergia a la leche bovina. Similarmente, la proteólisis hecha durante la fermentación de leche bovina con *Lactobacillus fermentus* IFO3956 y *Lactobacillus helveticus* A75 reduce la inmuno reactividad de anticuerpos IgE específicos a α -caseínas (El-Gaish y col, 2011; Ahmadova y col, 2013).

Más allá de la hidrólisis para la destrucción de epítopes, esta reacción puede generar péptidos con propiedades inmunomoduladoras. De acuerdo a Pan y col. (2013) los hidrolizados de proteína de leche bovina tienen la capacidad de reducir la respuesta inmune alérgica a ovoalbúmina en ratones sensibilizados. Bajos niveles séricos de anticuerpos IgE específicos e IL-4, así bien como altos niveles de factor de crecimiento transformante- β (una citocina inhibidora producida y secretada por células reguladoras) fueron encontrados en ratones tratados con hidrolizados de leche. Se cree que algunos de los componentes proteicos bioactivos en extractos de diferentes fuentes pueden tener potencial para aplicaciones en inmunoterapias.

Aunque los principios de procesamiento de alimentos basados en la hidrólisis de proteínas pueden ser utilizados para obtener proteínas hipoalergénicas, su aplicación en alimentos es limitada en algunas ocasiones. Desde el punto de vista de la ciencia y tecnología de los alimentos, el uso de hidrolizados hipoalergénicos en varios productos alimenticios no es viable debido a que la proteólisis afecta la funcionalidad de las proteínas. Por ejemplo, durante el procesamiento de quesos los resultados en la destabilización de las micelas proteicas y la cantidad incrementada de pequeños péptidos solubles y aminoácidos libres compromete el rendimiento convencional del queso (Chromik y col, 2010). Del mismo modo, los procesos de fermentación son limitados a productos alimenticios que requieren acción microbiana (como el pan fermentado) (El-Gaish y col, 2011).

3. Tratamiento a altas presiones

El tratamiento de alimentos a altas presiones puede promover cambios estructurales en las proteínas tales como la desnaturalización o agregados (Iametti y col, 1997). Así, este principio puede alterar el potencial alergénico de proteínas. Cuando la presión es relativamente alta (200 MPa), la estructura terciaria de las proteínas es desestabilizada (Somuti y Smeller, 2013). Un estudio reciente muestra que la estructura terciaria, pero no la primaria o secundaria, de la β -lactoglobulina cambia significativamente después del tratamiento a alta presión hidrostática y estos cambios conformacionales contribuyen a alterar su alergenicidad (Meng y col, 2017). López-Expósito y col, (2012) evaluaron la alergenicidad de β -lactoglobulina enzimáticamente hidrolizada bajo dos condiciones de presión. La β -lactoglobulina obtenida bajo alta presión mostró un potencial alergénico reducido cuando fue probada en ratones sensibilizados. La ausencia de síntomas anafilácticos se atribuyó a la formación de hidrolizados de β -lactoglobulina los cuales son inmunológicamente inertes. Otros estudios han reportado que la hidrólisis enzimática bajo alta presión puede reducir el potencial antigénico de proteínas de suero de leche (Chicon y col, 2008a; Chicón y col, 2008). Ciertamente, las proteínas pueden desdoblarse bajo condiciones de alta presión (Silva y col, 2001; Winter y col, 2007) y en consecuencia las regiones hidrofóbicas inmunogénicas de las proteínas (inaccesibles en la forma nativa) son expuestas quedando más susceptibles a la hidrólisis enzimática (Bonomi y col, 2003).

4. Irradiación de alérgenos alimentarios

De acuerdo a Lee y col. (2001, 2005), la irradiación gamma es recomendada para la producción de alimentos procesados de huevo con potencial alergénico reducido. La irradiación gamma causa la desnaturalización de proteínas ya que la radiolisis genera radicales hidroxil, hidrógeno, e hidroperoxil. Además, la irradiación gamma de proteínas altera las interacciones intermoleculares ocasionando la fragmentación o agregación y la formación de puentes disulfuro. En un modelo murino Seo y col (2007) encontraron que la ovoalbúmina irradiada disminuyó la producción de citocinas (IL-4 e IL-5) e indujo la producción de citocinas Th1 (IL-12 e IFN- γ). Este tipo de modificación también ha sido aplicada a otros alimentos alérgenos obteniendo diferentes resultados (Lee y col, 2001; Lee y col, 2005; Kadouri y col, 2008). Incluso, se ha reportado que bajas dosis de irradiación gamma podrían incrementar la alergenicidad de proteínas (Vaz y col. 2013). Otro punto a considerar es que el uso de esta tecnología de alimentos puede alterar la funcionalidad de proteínas en las matrices alimentarias (reducción de su solubilidad) (Kadouri y col 2008).

5. Modificación química de residuos de aminoácidos

Otro tipo de modificación de alérgenos es la derivatización o modificación de residuos de aminoácidos en los epítopes. Este principio ha sido utilizado para evadir la respuesta inmune en la enfermedad celiaca (Gianfrani y col, 2007). Aunque esta enfermedad no es una alergia alimentaria mediada por IgE, involucra el procesamiento y presentación de antígenos de los alimentos. Así, la enzima transglutaminasa fue utilizada para unir aminoácidos libres en las secuencias inmunogénicas para bloquear la respuesta inmune. Alternativamente, la conjugación con azúcares reductores (glicación) u oligosacáridos es otra alternativa para enmascarar alérgenos en los alimentos (Nakamura y col, 2008; Hatori y col, 2004; van de Lagemaat y col, 2007). Independientemente del tipo de reactivos químicos o reacción enzimática, todas estas modificaciones deben generar un impedimento estérico para así bloquear los epítopes alérgicos.

G. LA CEPA BALB/c COMO MODELO DE ALERGIA ALIMENTARIA

Los modelos animales de alergia alimentaria son una herramienta invaluable para estudiar los mecanismos que subyacen la respuesta alérgica e investigar la seguridad y eficacia de nuevos principios terapéuticos o preventivos para la alergia a los alimentos. Además, podrían ser de utilidad para evaluar la alergenidad de proteínas. De hecho, La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) en conjunto con la Organización Mundial de la Salud (OMS) han desarrollado directrices para evaluar la alergenidad de proteínas derivadas de procesos biotecnológicos (Codex Alimentarius, 2009). Estas directrices consideran evaluar en modelos animales la alergenidad potencial de dichas proteínas, por lo que existe interés en desarrollar y validar modelos animales para tal propósito (Thomas y col, 2008). Las evaluaciones de alergenidad son de mayor interés cuando se trata de proteínas derivadas de fuentes de alérgenos ampliamente conocidos, como es el caso de las α -caseínas de la leche bovina. Entre los modelos de ratón de alergia alimentaria la cepa BALB/c se destaca por favorecer el desarrollo de una respuesta inmune tipo Th2 y la producción de anticuerpos IgE (Kimber y col, 2003; Ladics y col, 2014). Utilizando esta cepa es posible evaluar la calidad y vigor de la respuesta inmune a proteínas que son administradas de forma oral o sistémica así como definir si estas proteínas presentan un potencial de sensibilización

o inmunogénico con base en la respuesta de anticuerpos IgE o IgG específicos, respectivamente (Kimber y col, 2003, Dearman y col, 2013). La evaluación del potencial de sensibilización de proteínas se basa principalmente en la medición de anticuerpos IgE específicos y para corroborar la alergenicidad generalmente se realizan evaluaciones de síntomas de alergia y mediadores inmunológicos tras un reto intradérmico u oral con el alérgeno de interés. Hasta el momento, diferentes modelos de alergia alimentaria han sido implementados con la ayuda de la cepa de ratón BALB/c (tabla 1).

A pesar de que se cuenta con múltiples modelos de alergia alimentaria, ninguno de los modelos propuestos contempla un protocolo de sensibilización a las caseínas bovinas en un formato libre de adyuvantes (Liu y col, 2016). De hecho, incluso con la ayuda de adyuvantes como la toxina colérica la cepa de ratón BALB/c se ha reportado como resistente a la inducción del desarrollo de hipersensibilidad a las proteínas de la leche, al menos cuando se pretende realizar la sensibilización por la vía oral (Morafo y col, 2003). Sin embargo, estudios posteriores mostraron que ratones BALB/c pueden ser sensibilizados a proteína de suero de leche por la vía oral y con la ayuda de la toxina colérica (Adel-Patient y col, 2005). Por otro lado, debido a que el tracto digestivo es tolerogénico por naturaleza, la vía sistémica representa una alternativa de sensibilización libre de adyuvantes la cual podría generar resultados reproducibles cuando se quiere sensibilizar a las proteínas de la leche bovina sobre todo a las caseínas. Estudios en ratones BALB/c muestran que es posible la sensibilización libre de adyuvantes a proteínas del suero de leche ya sea mediante la administración intraperitoneal o transdérmica del alérgeno (Morin y col, 2011; Gonipeta y col, 2009). La sensibilización a las caseínas bovinas en una forma libre de adyuvantes no ha sido posible incluso en ratones libres de gérmenes (los cuales se suponen son más predispuestos a desarrollar la respuesta alérgica) (Morin y col, 2011). Esto fue atribuido a la ausencia de componentes de la leche bovina los cuales podrían favorecer el desarrollo de la respuesta alérgica a las caseínas (van Wijk y col, 2005) o a la necesidad de un protocolo de sensibilización diferente ya que la frecuencia de exposición al alérgeno es fundamental para lograr la sensibilización (Ladics y col, 2010). Así, el

Tabla 1. Modelos de alergia alimentaria que utilizan el ratón BALB/c y las vías intraperitoneal o intragástrica para sensibilizar.

Genero	Edad (semanas)	Esquema de inmunizaciones (días)	Alérgeno (dosis)	Adyuvante o solvente	Ref.
Hembra	8-12	0	OVA 10µg	Alum	Hsieh y col, 2003
		16	OVA 20µg	PBS	
Hembra	8-12	0	OVA 2µg	Alum	van Halterena y col, 1997
		14	OVA 1µg	PBS	
Hembra	6-10	0, 14	OVA 50µg	Alum	Bohnen y col, 2013
Macho	----	0, 14	OVA 50µg	Alum	Yamaki y Yoshino, 2012
Hembra	8-12	0, 14	OVA 60µg	Alum	Golias y col, 2012
Hembra y Macho	6-8	0, 3, 6, 9, 12	OVA 50µg	----	Chen y col. 2013
Hembra	6-7	0, 14	OVA 10µg	Alum	Tanabe y col, 2015
Hembra	6-8	0, 14	Caseína 100µg	Alum	Krishnamurthy y col, 2012
Hembra	7-8	0, 18	β-lactoglobulina 5µg	----	Morin y col, 2011
Hembra	6	0, 25	Cacahuete 100µg	Alum	Adel-Patient y col, 2005
Hembra	8	0, 56	Extracto de caviar 2mg	Alum	Untersmayr y col, 2003
Hembra	5-6	0, 7, 14	Sardina cruda o cocida 50µg	Alum	van der Ventel y col, 2011
Hembra	6-8	0, 21	Extracto de larva de <i>Anisakis</i>	----	Kirstein y col, 2010
Hembra	8-12	0, 7	Actinidina de kiwi	----	Dearman y col, 2013
Macho	6-8	0, 7, 14, 21, 28	OVA 0.2mg	Toxina colérica	Liu y col, 2013
Hembra	4-8	0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49	OVA 100µg	Toxina colérica	Ganeshan y col, 2009
Hembra	6-8	0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49	OVA 0.2mg	Sucrafato	Brunner y col, 2009
Hembra	6-8	Dos a la semana por 4 semanas	Ovomucoide 1mg	Toxina colérica	Rupa y Mine, 2012
Hembra	3	0, 7, 14, 21, 28	Proteína de leche 1mg	Toxina colérica	Morafo y col, 2003
Hembra	3	0, 6, 12, 18, 24, 30	Proteína de leche 5mg	Toxina colérica	Adel-Patient y col, 2005
Hembra	3	0, 6, 12, 18, 24, 30	Cacahuete 5mg	Toxina colérica	Adel-Patient y col, 2005
Hembra	8	0, 56	Extracto de caviar 6mg	Sucrafato	Untersmayr y col, 2003

En gris o azul se muestran los modelos sensibilizados por las vías intraperitoneal o intragástrica respectivamente. OVA: ovoalbúmina; Alum: es el nombre comercial de una solución acuosa que contiene hidróxido de aluminio (40mg/mL) e hidróxido de magnesio (40mg/mL) además de estabilizadores inactivos.

modelo de ratón BALB/c no ha sido explotado para evaluar la respuesta inmune alérgica a las caseínas bovinas, ni en su forma nativa ni modificadas estructuralmente, y menos aún para evaluar el efecto de la administración de compuestos u organismos inmunomoduladores sobre la respuesta inmune alérgica a estas proteínas.

Sin duda, los modelos de alergia basados en adyuvantes son muy útiles para estudiar la respuesta inmune a las proteínas de la leche. Sin embargo, debido al riesgo incrementado de obtener resultados falsos positivos, se debe tener en cuenta que el uso de adyuvantes puede interferir con las evaluaciones de los potenciales de sensibilización y/o alergénico de proteínas nuevas o modificadas por procesos biotecnológicos (Buehler y col, 1996). De esta forma, los modelos de alergia alimentaria libres de adyuvantes son los más indicados para evaluar los potenciales de sensibilización y/o alergénico de proteínas y la cepa de ratón BALB/c, por su capacidad para desarrollar una respuesta de anticuerpos IgE, es un modelo animal apropiado para evaluar dichos potenciales.

H. PROBIÓTICOS Y ALERGIA A LA LECHE BOVINA

Los probióticos se han definido como microorganismos vivos que consumidos en cantidades adecuadas como parte del alimento o como suplemento oral confieren un beneficio a la salud del hospedero. Los mecanismos por los cuales los probióticos confieren beneficios a la salud del hospedero son diversos. Entre ellos podemos contar la hidrólisis de péptidos antigénicos, la modulación de la permeabilidad intestinal y la reducción de la penetración sistémica de antígenos, el incremento en la producción local de IgA, modulación de la inflamación local, así como la estimulación del crecimiento y diferenciación de células epiteliales (Sutas y col, 1996; Fukushima y col, 1998; Rosenfeldt y col, 2004; Ozdemir, 2010). En la respuesta inmune alérgica se ha observado que los probióticos promueven el desvío de la respuesta Th2 hacia Th1 así como la activación de células dendríticas tolerantes y producción de células reguladoras (Rousseaux y col, 2007; Yan y col, 2007; Kim y col, 2013).

Los efectos de los probióticos podrían depender tanto de la especie y cepa del microorganismo utilizado (Klaenhammer, 2012) así como de las diferentes preparaciones de la misma cepa (Van Baarlen y col, 2009) o mezclas de cepas. Estudios *in vitro* han mostrado que los probióticos *L reuteri*

and *L casei*, pero no *L plantarum* pueden interactuar con células dendríticas a través de la molécula de adhesión intercelular lectina tipo C (DC-SIGN) (Smits y col, 2005). Este reconocimiento activa a las células dendríticas las cuales dirigen el desarrollo de células reguladoras productoras de IL-10. Por otro lado, la respuesta molecular a nivel de mucosa duodenal en humanos tras la suplementación con probióticos *Lactobacillus spp* varía con la especie lo que supone una especificidad de la respuesta del hospedero a cepas o especies de bacterias probióticas (Van Baarlen y col, 2011).

Uno de los probióticos más estudiado en formulas hipoalergénicas basadas en caseína o suero de leche extensivamente hidrolizadas y en general como una estrategia para prevenir o tratar la alergia alimentaria en niños es *L rhamnosus* (LGG) (Cosenza y col, 2015; Berni y col, 2016). LGG se ha utilizado por casi 25 años y se ha demostrado que las fórmulas de caseína extensivamente hidrolizadas permanecen hipoalergénicas después de la adición de LGG (Muraro y col, 2012; Berni y col, 2016). La adición de LGG a hidrolizados de caseína mejora significativamente la inflamación de la mucosa en niños en comparación con los que consumen caseína hidrolizada sin LGG (Baldassarre y col, 2010). Otros estudios han demostrado que las fórmulas de caseína hidrolizada que contienen LGG son capaces de acelerar el desarrollo de la tolerancia adquirida en niños afectados con alergia a la leche bovina (Canani y col, 2012, Canani, 2013). Por el contrario, la suplementación de una fórmula extensivamente hidrolizada con una combinación de *L casei* CRL431 y *B lactis* Bb-12 falló para inducir o acelerar la tolerancia a la leche bovina en un grupo de niños con las mismas características (Hol y col, 2008).

Un problema a considerar es que algunos probióticos comercialmente disponibles pueden contener alérgenos de leche bovina (Lee y col, 2007). Algunos estudios han reportado reacciones adversas en pacientes con alergia a la leche bovina tras la suplementación oral con probióticos (Moneret-Vautrin y col, 2006; Martin-Muñoz y col, 2012) o al realizar pruebas cutáneas con el producto (Bruni y col, 2009). En este contexto, recientemente se ha sugerido un nivel de acción de 1 ppm como un punto de referencia para el etiquetado de alérgeno alimentario, ya que límites inferiores difícilmente reaccionarían con personas afectadas con alergia a la leche bovina (Allen y col, 2013). Sin embargo, este nivel de alérgeno está por debajo del límite de detección de la mayoría de los ensayos comerciales para evaluar la contaminación cruzada con proteínas de leche, por lo que puede ser técnicamente no

viable. De esta forma, las pruebas cutáneas con el producto terminado son una alternativa viable para evaluar la seguridad de los probióticos en personas afectadas con alergia a la leche bovina (Bruni y col, 2009).

IV JUSTIFICACIÓN

Se estima que la alergia a la leche bovina afecta alrededor del 2% de la población mundial. Sin embargo, hay una marcada heterogeneidad en las tasas de prevalencia entre diferentes poblaciones. En México, no se contaba con datos epidemiológicos publicados sobre la prevalencia de alergia a la leche bovina u otros alimentos en población abierta. Consecuentemente, no se tenía un precedente para establecer la magnitud y distribución de este problema de salud potencial. Aunque la alergia a la leche bovina es de buen pronóstico clínico, se estima que entre 10 y 20% de los casos desarrollan alergia persistente a la leche bovina. Estos casos desarrollan anticuerpos IgE dirigidos principalmente a las α -caseínas de la leche bovina y tienden a desarrollar reacciones alérgicas severas como la anafilaxis inducida por alimentos. Esta última condición atenta contra la vida si no se cuenta con el tratamiento médico de emergencia adecuado. Actualmente, no hay una terapia disponible para tratar la alergia persistente a la leche bovina y su manejo primario consiste en evitar el contacto con las proteínas de la leche. Esto afecta la calidad de vida de las personas afectadas ya que deben llevar una dieta restrictiva y vivir con el temor de las exposiciones accidentales al alérgeno. Así, en la presente tesis se planteó estimar en población abierta de Culiacán, Sinaloa la prevalencia reportada por los padres de alergia persistente a la leche bovina en escolares. También se planteó establecer un modelo murino adecuado de sensibilización alérgica a α -caseínas bovinas para después probar un principio combinado dirigido a promover la tolerancia inmunológica a las α -caseínas bovinas.

V HIPÓTESIS

a) La alergia persistente a la leche bovina es similar a la reportada globalmente (alrededor del 0.2%) entre los escolares de Culiacán, Sinaloa.

b) Un principio combinado basado en la administración oral de probióticos y el tratamiento térmico de proteínas es una alternativa efectiva para controlar o prevenir la respuesta inmune alérgica a α -caseínas debido a un potencial de sensibilización o alergénico reducido de las caseínas tratadas térmicamente y a una despolarización de la respuesta alérgica e inducción de células T reguladoras.

VI OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Estimar la prevalencia reportada por los padres de alergia persistente a leche bovina en escolares de Culiacán, Sinaloa y evaluar el efecto de la suplementación con probióticos sobre la respuesta inmune alérgica en ratones BALB/c sensibilizados con caseína bovina tras un reto con esta proteína en su estado nativo y tratada térmicamente.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estimar la prevalencia reportada por los padres de alergia persistente a la leche bovina en escolares de la ciudad de Culiacán, Sinaloa.
2. Determinar las condiciones de tiempo/temperatura para inducir cambios estructurales irreversibles a α -caseínas bovinas.
3. Establecer las condiciones para sensibilizar a α -caseínas de forma oral o intraperitoneal y sin adjuvantes ratones BALB/c.
4. Evaluar en ratones BALB/c los potenciales de sensibilización y de sensibilización residual de α -caseínas bovinas tratadas térmicamente.
5. Evaluar los efectos de la suplementación con probióticos sobre la respuesta inmune alérgica a α -caseínas nativas y α -caseínas con potencial de sensibilización reducido por calor en ratones BALB/c sensibilizados con caseínas nativas.

VII MATERIALES Y MÉTODOS

A. ASPECTOS ÉTICOS Y ANIMALES DE ESTUDIO

1. Prevalencia de alergia persistente a la leche bovina

El comité de ética de la Facultad de Medicina así como el de la Unidad Académica de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa aprobaron este estudio. Todos los padres que participaron en el estudio dieron su consentimiento informado.

2. Ensayos en ratones BALB/c

Todos los experimentos en animales fueron aprobados por el comité de ética de la Unidad Académica de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa. A menos que se especifique, se utilizaron ratones hembra BALB/c libres de patógenos de 6 a 8 semanas de edad, criadas y alimentadas con una dieta libre de proteína de leche bovina por al menos dos generaciones. Agua y alimento estuvieron disponibles *ad libitum*. La temperatura ambiente se mantuvo entre 24°C y 27°C con una humedad relativa entre 45 y 55% con un ciclo de 12 horas luz/oscuridad.

B. PREVALENCIA DE ALERGIA PERSISTENTE A LA LECHE BOVINA

1. Encuesta poblacional

Se realizó una encuesta poblacional transversal en Culiacán, Sinaloa. Los datos fueron colectados en el periodo de Septiembre del 2014 a Agosto del 2015. El muestreo fue por conveniencia en 10 primarias (escuelas públicas y privadas) que geográficamente cubren cinco zonas de de la ciudad de Culiacán, Sinaloa (dos escuelas en cada una de las siguientes áreas: Norte, Sur, Este, Sudeste, y centro). Al menos 20 escolares por grado se incluyeron en el estudio excepto en dos escuelas privadas que reportaron un número reducido de estudiantes (< 100), pero estuvieron de acuerdo en participar. El cuestionario y los consentimientos informados fueron entregados a los maestros quienes a su vez los adjuntaron a las libretas de tareas de los estudiantes. Este proceso se realizó en una sola ocasión. Si el cuestionario o el consentimiento informado no fueron regresados después de tres días laborables, esto se consideró como una respuesta negativa por los padres.

2. Cuestionario

La version en español de un cuestionario estructurado y validado diseñado para estimar la prevalencia de alergia alimentaria reportada por los padres en escolares fue adaptado para este estudio (Hoyos-

Bachiloglu y col, 2014), pero los parámetros para medir las variables de interés no fueron modificados. Al final, el instrumento utilizado (anexo III) estuvo compuesto de preguntas tomadas de un cuestionario validado en español, el cual fue adaptado para propósitos de crivado (Marrugo y col, 2008), y preguntas de un cuestionario a profundidad, el cual fue validado en Inglés (Sheck y col, 2010) y en Español (Hoyos-Bachiloglu y col, 2014).

Los encuestados contestaron primeramente preguntas sobre características demográficas básicas e información clínica sobre los niños. Todos aquellos que reportaron síntomas recurrentes relacionados al consumo de alimentos completaron la segunda parte del cuestionario. Esta sección incluyó preguntas estandarizadas sobre síntomas sugestivos de alergia alimentaria mediada por IgE, tiempo en el que aparecen los síntomas tras la ingestión del alimento, los alimentos involucrados en las reacciones adversas, y el tratamiento recetado durante la reacción alérgica.

3. Definiciones

Las reacciones adversas a los alimentos y la alergia persistente a la leche bovina se definieron de acuerdo al algoritmo mostrado en la figura 3. Un niño fue categorizado con “alergia auto-percibida, alguna vez” si los padres declararon que el niño había tenido reacciones alérgicas a la leche bovina (Park y col, 2014). Las reacciones adversas a los alimentos se definieron como cualquier reacción adversa recurrente a un alimento específico potencialmente mediada o no por mecanismos inmunológicos (Ontiveros y col, 2015). La “alergia a la leche bovina de tipo inmediato, alguna vez” se definió como los casos que presentaron reacciones adversas sintomáticas recurrentes a la leche bovina, las cuales eran convincentes de reacciones alérgicas de hipersensibilidad de tipo inmediato y que ocurrían dentro de dos horas posteriores a la ingesta del alimento (Sicherer y col, 1998; Sicherer y col 2010; Shek y col, 2010; Hoyos-Bachiloglu y col, 2014). Esto incluye piel con ronchas, angioedema, problemas para respirar, estornudos o garganta cerrada, entre otros síntomas típicos de las reacciones de hipersensibilidad inmediata. La “alergia a la leche bovina de tipo inmediato, actual” se definió como aquellos casos que reunieron los criterios para “alergia a la leche bovina de

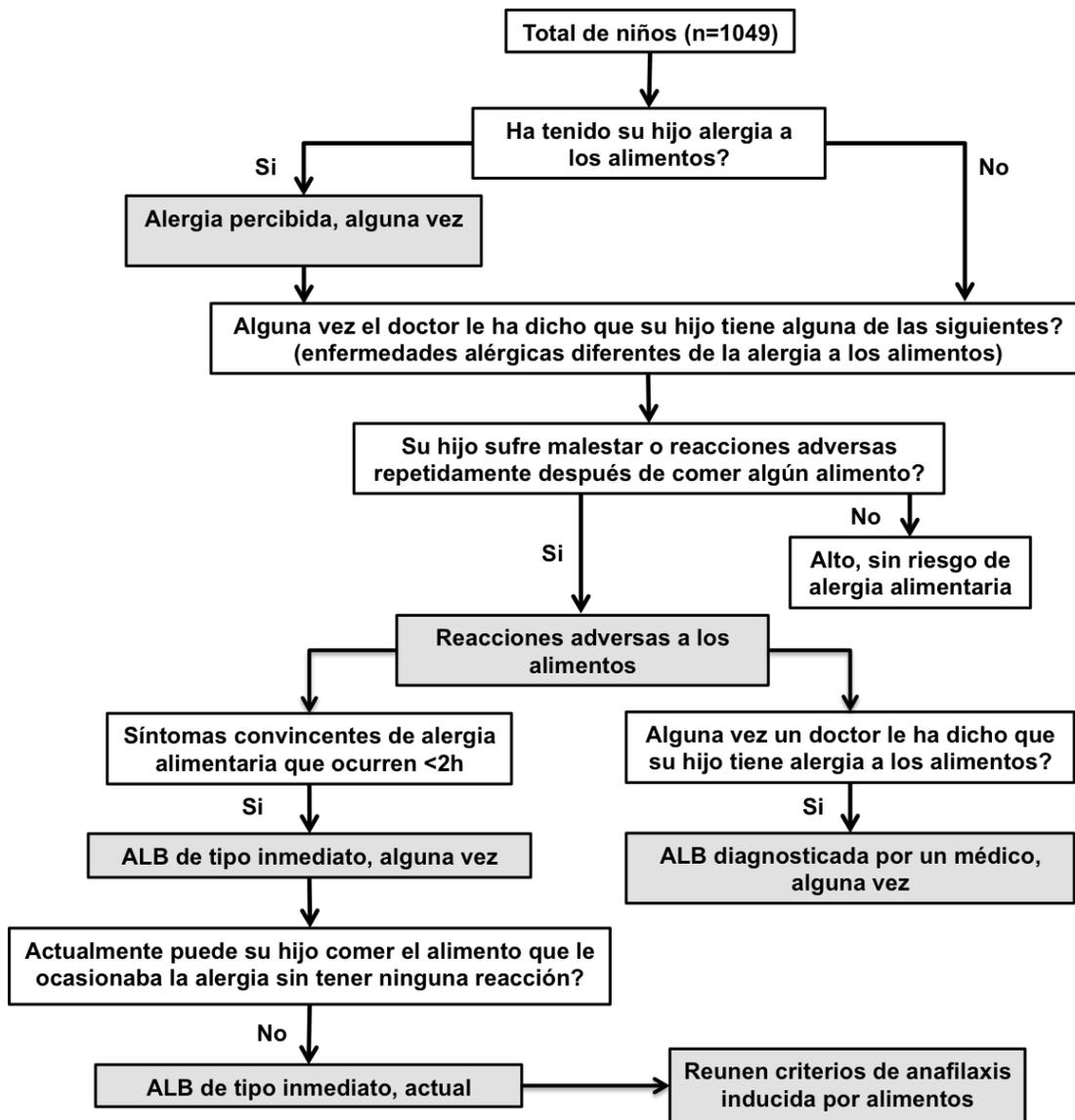


Figura 3. Algoritmo utilizado para definir las reacciones adversas a los alimentos y alergia a la leche bovina. ALB; Alergia a la leche bovina.

tipo inmediato, alguna vez”, pero que contestaron de forma negativa a la pregunta “ya puede su hijo consumir el alimento que le daba alergia sin que presente reacciones?” (Shek y col, 2010). Adicionalmente, la “alergia a la leche bovina diagnosticada por un médico, alguna vez” se definió como

aquellos casos que presentaron reacciones adversas recurrentes al leche bovina y que contestaron positivamente a la pregunta “le ha dicho un doctor alguna vez que su hijo tiene alergia alimentaria?”.

La anafilaxis inducida por alimentos se definió como aquellos casos que reunieron los criterios para “alergia a la leche de tipo inmediato, actual” y de acuerdo a los siguientes criterios: 1) inicio agudo de la enfermedad involucrando la piel, tejido de mucosas o ambos y respiración comprometida o presión sanguínea reducida; 2) dos a más de los siguientes que ocurren rápidamente después de consumir el alimento: a) involucramiento de la piel o mucosa, b) respiración comprometida, c) presión sanguínea reducida, d) síntomas gastrointestinales persistentes; y 3) presión sanguínea reducida después de la exposición al alérgeno (Simons y col, 2011; Simons y col, 2012) .

C. PROTEÍNAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO

Se utilizaron α -caseínas bovinas comercialmente disponibles con un grado de pureza reportado por el fabricante $\geq 98\%$ (MP Biomedicals; cat. 0219509605-5). Adicional a las caseínas, se utilizó ovoalbúmina (OVA) $\geq 98\%$ (SIGMA, Cat. A5503-10G) y proteína de papa (SIGMA, Cat. P3752-1G) como controles positivo y negativo de sensibilización intraperitoneal a proteínas de los alimentos (Dearman y Kimber, 2007).

D. CALORIMETRÍA DE BARRIDO

El tratamiento térmico de proteínas puede inducir cambios estructurales irreversibles. Estos cambios podrían asociarse a un incremento en la susceptibilidad a la digestión y/o a una disminución del potencial alérgico de los alimentos tratados térmicamente. Muestras de 2mg de α -caseínas bovinas comerciales se sometieron a análisis por calorimetría de barrido diferencial (DSC 200 F3 Maia®) para determinar la temperatura de desnaturalización con cambios irreversibles (caseína tratada). Para verificar esto último las muestras de α -caseína fueron reanalizadas por esta misma técnica esperándose cambios menores o imperceptibles en el pico de calor previamente registrado.

E. TRATAMIENTO TÉRMICO DE α -CASEÍNAS BOVINAS

Las caseínas bovinas utilizadas en el presente estudio fueron maceradas finamente y muestras individuales de 25 mg aproximadamente fueron esparcidas en el fondo de recipientes de aluminio

hasta lograr una capa muy fina. Posteriormente las muestras fueron tratadas térmicamente en seco a 140°C por 30 y 60 min en una estufa con recirculación de aire. La temperatura en el interior de la estufa fue monitoreada constantemente con la ayuda de un termómetro de mercurio calibrado.

F. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

Las cuantificaciones de proteína se hicieron con el método del ácido bicinconinico (BCA) utilizando un kit comercial (Pierce™ BCA, Cat. 23227). Este método colorimétrico es utilizado para la cuantificación de proteína total en muestras con proteína solubilizada. El método se basa en la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} por la proteína en un medio alcalino (la reacción de biuret) con la selectividad y sensibilidad de la detección colorimétrica del catión Cu^{+1} utilizando el BCA (Smith et al 1985 Anal Biochem). El desarrollo del color es influenciado por la estructura molecular de la proteína, el número de enlaces peptídicos y la presencia de cuatro aminoácido (cisteína, cistina, triptófano, y tirosina) (Wiechelman y col, 1988 Anal Biochem). El método del BCA no es un método de punto final, pero después de la incubación a 37 °C el color púrpura se desarrolla lentamente y esto permite la cuantificación de múltiples muestras a la vez.

En todos los casos se siguió el protocolo descrito por el fabricante, el cual se describe a continuación: se prepararon curvas estándar de albúmina sérica bovina (stock a 2 mg/ml, suministrado con el kit) como se muestra en la tabla 2. Todos los puntos de la curva así como las muestras a analizar fueron evaluados por duplicado en microplaca. El rango de trabajo cuando se utiliza microplaca es de 5-250 $\mu\text{g/ml}$. Las proteínas de prueba fueron disueltas en PBS pH 7.4 (SIGMA; Cat. P-5368) y se prepararon diluciones seriadas de dichas proteínas para asegurar que las concentraciones evaluadas cayeran en el rango de trabajo. La preparación del reactivo de trabajo del BCA se hizo mezclando 50:1 los reactivos A:B suministrados por el fabricante. Esto genera un reactivo verde claro que al interactuar con la proteína vira a un color púrpura. Una vez preparada la solución de trabajo de BCA así como los estándares y las muestras a analizar, se transfirieron 25 μl de los estándares y las muestras a pozos de una microplaca. La solución utilizada para solubilizar las caseínas y los estándares (PBS pH 7.4) se consideró el blanco de la reacción. Posteriormente, se agregaron 200 μl de solución de trabajo de BCA y se mezcló por 30 seg. La microplaca se cubrió con papel aluminio y se incubó a 37 °C por 30 min en una estufa. Transcurrido este tiempo, la microplaca se dejó a temperatura ambiente por 5 min

y después se midió la absorbancia a 560 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific. Cat. 51119000).

Tabla 2. Diluciones para la preparación de la curva estándar para cuantificar proteína con el método del ácido bicinconinico (Pierce™ BCA, Cat. 23227)

Vial	Volumen del diluyente (µL)	Volumen de BSA (µL)	Concentración final de BSA (µg/mL)
1	700	100 del stock a 2 mg/ml	250
2	400	400 del vial 1	125
3	450	300 del vial 2	50
4	400	400 del vial 3	25
5	400	100 del vial 4	5
6	400	No requerido	0 (blanco)

Las concentraciones fueron determinadas utilizando la ecuación de la curva generada tras sustraer la absorbancia del blanco y posteriormente graficando las unidades de absorbancia (eje de las X) versus la concentración de los estándares utilizados (eje de las Y).

G. ELECTROFORESIS SDS-PAGE DE PROTEÍNAS TRATADAS TÉRMICAMENTE

Se utilizaron geles SDS-PAGE comerciales de gradiente (10-20%) de 15 pozos y 0.75 mm de espesor (BIO-RAD, Cat. 456-3116) y geles SDS-PAGE al 12% preparados en nuestro laboratorio de acuerdo a lo descrito en las tablas 3 y 4. En todos los casos las muestras fueron tratadas con buffer Laemmli (BIO-RAD, Cat. 161-0747) y se calentaron a 95 °C por 5 min. Diferentes concentraciones de proteína fueron cargadas a través de todos los experimentos, pero los volúmenes de carga siempre fueron ajustados a 15 o 20 µl por pozo con buffer Laemmli 1X. En estos ensayos se utilizaron marcadores de peso molecular de amplio (SIGMA, Cat. S8445-1VL) y muy bajo (SIGMA, Cat. M3546) rango los cuales contienen 12 proteínas con un rango de pesos moleculares de 200 a 6.5 kDa y (1,062 a 26,600 Da) respectivamente. La electroforesis se corrió a un voltaje constante de 100 Volts por 180 min en el

caso de los geles con gradiente y por 120 min en el caso de los geles al 12%. Se utilizó un buffer de corrida comercial (BIO-RAD, Cat. 161-0732).

Tabla 3. Reactivos y volúmenes para preparar el gel separador en condiciones desnaturizantes (2 geles de 0.75 mm).

Reactivo*	% de acrilamida				
	10	12	15	18	20
H ₂ O (ml)	4	3.3	2.3	1.3	0.7
Acrilamida/Bisacrilamida 30% w/v (ml)	3.3	4	5	6	6.6
Buffer separador pH 8.8 (1.5 M tris-HCl) (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
10% SDS (μl)	100	100	100	100	100
10% APS (μl)	100	100	100	100	100
TEMED (μl)	4	4	4	4	4

Tabla 4. Reactivos y volúmenes para preparar el gel concentrador en condiciones desnaturizantes.

Reactivo	Volumen de reactivos para	
	1 gel	2 geles
H ₂ O desionizada (ml)	1.823	3.646
Acrilamida/Bisacrilamida 30% w/v (ml)	415	830
Buffer concentrador pH 6.87 (tris-HCl 0.5 M) (ml)	210	420
10% SDS (μl)	25	50
10% APS (μl)	25	50
TEMED (μl)	2.5	5

H. FIJACIÓN, TINCIÓN Y DESTENIDO DE GELES SDS-PAGE

Los geles fueron primeramente lavados con H₂O destilada por 30-60 seg y posteriormente fijados por 30 min o toda la noche en un solución de metanol (50%) / ácido acético (10%) / agua desionizada (40%) con agitación suave. La tinción se realizó con coomassie utilizando una solución comercial la cual contiene ácido fosfórico < 5% (BIO-RAD, Bio-Safe™ Coomassie G-250 Stain, Cat. 161-0786). El ácido es necesario para que el coomassie se una mejor a los residuos básicos e hidrofóbicos de las proteínas. Como regla general, el coomassie detecta bandas de proteína de 25 ng o más. Los geles

fueron teñidos por un periodo de 3-4 h o toda la noche con agitación suave. El desteñido de los geles se realizó con una solución de metanol (30%) / ácido acético (5%) / agua desionizada (65%).

I. ANÁLISIS DE DIGESTIBILIDAD DE CASEÍNAS CON PEPSINA EN FLUIDO GÁSTRICO SIMULADO

Este ensayo se basó en una metodología previamente evaluada en múltiples laboratorios (Thomas y col, 2004). Debido a la baja solubilidad de las caseínas tratadas térmicamente, se debieron realizar algunas modificaciones a dicha metodología. Muestras de aproximadamente 1.0 mg de caseínas nativas y tratadas térmicamente por 30 min fueron disueltas en 1.0 ml de fluido gástrico simulado sin pepsina (0.084 N HCl, 35 mM NaCl, pH 1.2). Posteriormente, las muestras fueron calentadas a 55°C por 2 h con agitación constante. Esto con el propósito de mejorar la solubilidad de las caseínas tratadas térmicamente por 30 min. Después de este tratamiento, las muestras fueron centrifugadas por 5 min a 13'000 RPM y se colectaron los sobrenadantes. La cuantificación de proteína se hizo como descrito anteriormente. Con base en la concentración de proteína determinada en cada una de las muestras, se realizaron los cálculos para tener un volumen final de 0.8 ml de fluido gástrico simulado con 2000 U de pepsina (SIGMA, Cat. P7000 con actividad ≥ 250 U/mg) y una concentración de proteína de 0.25 mg/ml. Para esto se preparó una solución de pepsina en fluido gástrico simulado a una concentración de 6,410.2 U/mL. Un volumen de 0.312 mL de esta solución (2,000 U) fue agregada a cada uno de los viales que contenían 0.25 mg de caseínas en un volumen de 0.488 mL de fluido gástrico simulado (volumen final de 0.8mL). Todas las soluciones fueron precalentadas a 37 °C antes de mezclar las soluciones de caseínas con la enzima. Posteriormente, los tubos fueron mezclados e inmediatamente colocados en un bloque térmico a 37 °C. Se colectaron muestras de 100 μ L de hidrolizado a los 0.5, 2, 5, 10, 20, 30, y 60 min después de iniciada la incubación. La reacción en las muestras de 100 μ L se detuvo agregando 35 μ L de una solución tampón que contenía 200 mM de NaHCO₃, pH 11, y 35 μ L de buffer Laemmli 5X (40% glicerol, 5% β -mercaptoetanol, 10% SDS, 0.33 M Tris, 0.05% azul de bromofenol, pH 6.8) (Laemmli, 1970). Las muestras con buffer Laemmli fueron inmediatamente calentadas a 95°C por 10 min y almacenadas a -20 °C hasta su análisis en SDS-PAGE comerciales con gradiente de 10-20%.

Las muestras de digestión a tiempo cero fueron preparadas inactivando la enzima pepsina con la solución tampón a pH 11 y buffer Laemmli 5X antes de añadir la proteína de prueba. Las muestras control de autodigestión (pepsina sin proteína de prueba) y control de estabilidad proteica (solución de reacción con la proteína de prueba pero sin pepsina) fueron incluidas en los análisis. Estas reacciones control fueron tratadas exactamente igual que las reacciones de prueba, pero las muestras fueron preparadas solo para los tiempos 0 y 60 min.

J. SENSIBILIZACIÓN ORAL CON α -CASEÍNAS

Para establecer la concentración adecuada de α -caseína capaz de inducir una sensibilización reproducible en ratones BALB/c, grupos de 6 animales fueron sensibilizados de forma intragástrica con diferentes concentraciones de α -caseínas disueltas en 0.3 mL de una solución que contenía 2 mg del antiácido sucralfato en PBS (figura 4). Como fuente de sucralfato se utilizó el antiácido comercial Unival® (Exea®/Senosian®, Sucralfato 1mg/5mL). La administración intragástrica de esta solución se realizó los días 0, 4, 14, 21 y 28 (Bruner y col, 2009). Se utilizaron sondas intragástricas comerciales de caucho. Los animales no sensibilizados (controles) recibieron solamente PBS o PBS más sucralfato. Se colectaron muestras de sangre al inicio de los experimentos (muestras preimmune), 16 días posteriores al inicio de los tratamientos y una semana posterior a la última administración de los tratamientos.

K. TOMA DE MUESTRA DE SANGRE, SACRIFICIO DE ANIMALES Y MUESTREO DE TEJIDO

Un volumen de sangre de 100-150 μ L fueron obtenidos de la vena de la cola de los animales. Las muestras se dejaron coagular toda la noche a 4°C y posteriormente fueron centrifugadas a 1500 g por 10 min a 4°C. Las muestras de suero fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso. El sacrificio de animales fue por dislocación cervical. Se extirpo el intestino completo y se obtuvieron muestras de yeyuno de 1 cm aproximadamente.

L. EVALUACIÓN DE FUENTES DE PROTEÍNA PARA REALIZAR LOS ENSAYOS INMUNOADSORBENTE LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

Para desarrollar las reacciones de ELISA se probaron como fuentes de proteína suero fetal bovino (Gibco, Cat. 10100147) y gelatina de pescado (BIO-RAD, Cat. 170-6537). Se evaluó la

inmunoreactividad de anticuerpos IgG del suero de ratones inmunizados ip con caseínas a las proteínas del suero fetal bovino o la gelatina de pescado. Para este propósito los ratones fueron inmunizados ip en 2 ocasiones (días 0 y 14) con 0.05mg de caseínas nativas adsorvidas a 2mg de hidróxido de aluminio (100 μ L; Imject[®] Alum, Thermo Scientific). Los sueros preimmune se utilizaron como control negativo. Para estas evaluaciones se utilizó OVA (SIGMA, Cat. A5503-10G) al 1% como la fuente de proteína para desarrollar las reacciones de ELISA. Para estos ensayos se agregaron 40 μ g de proteína por pozo disueltos en buffer de cubierta pH 9.5 (BioLegend, Cat. 421701). Las muestras de suero se diluyeron 1-500 con OVA al 1%. A excepción de la concentración de antígeno y la dilución del suero antes mencionadas, las reacciones de ELISA se desarrollaron como se describe a continuación.

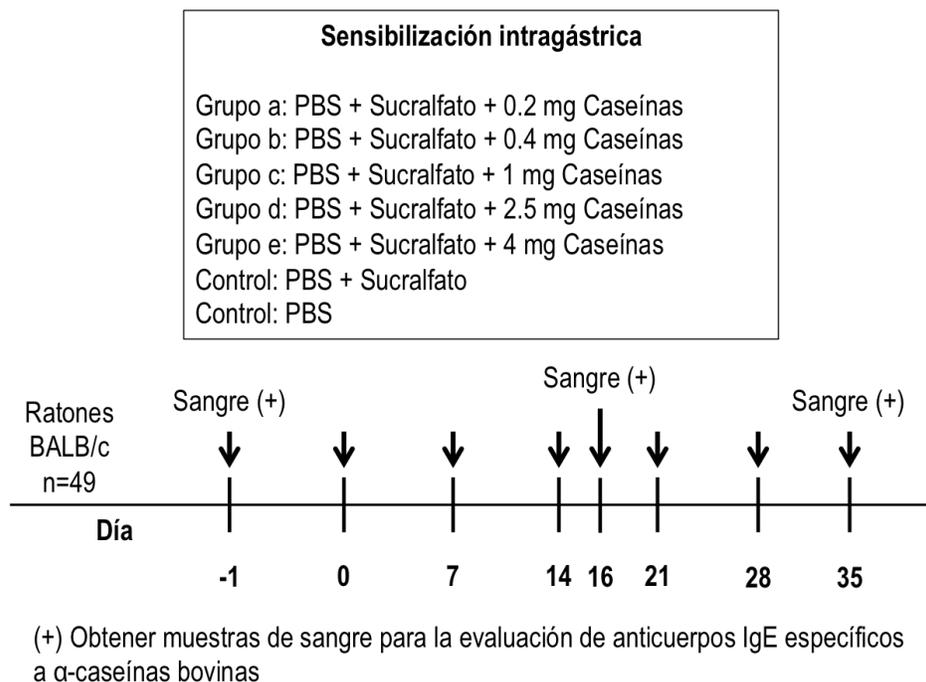


Figura 4. Protocolo de 35 días para sensibilizar a α -caseínas bovinas de forma intragástrica y con sucralfato ratones BALB/c.

M. EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS IgE e IgG POR ELISA

Los anticuerpos IgE fueron determinados por ELISA apeandose al protocolo que se describe a continuación: microplacas de 96 pozos (Nuck Maxisorb) fueron cubiertas con 20 μ g de caseínas en

100 μ L de buffer de cubierta pH 9.5 (BioLegend. Cat. 421701) e incubadas por 18 h a 4°C. Las placas fueron lavadas (200 μ /pozo) con una solución de PBS pH 7.4 (SIGMA. Cat. P-5368) / 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 fueron diluidas 1:10 con solución diluyente de ELISA (BioLegend. Cat. 421203) o solución de bloqueo (suero fetal bovino al 10% en PBS pH 7.4). Volúmenes de 100 μ l de las muestras diluidas 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 (3 veces) y se agregaron 100 μ l de anticuerpo anti IgE^a de ratón acoplado a biotina (BioLegend. Cat. 408804) diluido 1:250 en solución de bloqueo (concentración final de 2 μ g/mL). Las placas fueron incubadas por una hora a temperatura ambiente y posteriormente lavadas (3 veces). Después de esto, se agregaron 100 μ l por pozo de un conjugado estreptavidina/peroxidasa de rabano (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 μ l de sustrato TMB (Thermo Scientific, Cat. 34028). El color se dejó desarrollar por 30 min y la reacción se detuvo agregando 50 μ L de H₂SO₄ 2M. La densidad óptica se midió a 450 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific. Cat. 51119000). Los anticuerpos IgG fueron determinados como se describió anteriormente solo que las muestras de suero fueron diluidas 1-1000 o 1:100, se utilizó un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a biotina [BioLegend. Cat. 405303; dilución 1:250 (2.0 μ g/ml)], y la reacción con el sustrato TMB (Thermo Scientific, Cat. 34028) se detuvo a los 5 min de iniciada la reacción. Todos los sueros fueron analizados en triplicado.

N. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL DE LA DIETA PARA ROEDORES LABDIET® 5013

Para este propósito se utilizó un kit comercial de extracción de proteína total de fuentes de origen vegetal (SIGMA-ALDRICH, Cat. PE0230) previo desgrasado de las muestras. El desgrasado se llevó a cabo a 4 °C por 16 h con agitación constante. Para esto, una muestra de 10 gramos de dieta fue macerada hasta lograr un polvo muy fino y posteriormente mezclada con acetona en relación 1:10 (p/vol). Después de la incubación a 4 °C se retiró la acetona y la muestra se dejó secar toda la noche a temperatura ambiente. La extracción de proteína con el kit antes mencionado se hizo según las indicaciones del fabricante. Todos los procedimientos se realizaron manteniendo todos los reactivos en hielo molido a menos que se indique lo contrario. Esto es importante para evitar precipitados. 100

mg de muestra desgrasada se transfirieron a un vial previamente pesado y se agregaron 1.5 mL de metanol. Las muestras fueron agitadas e incubadas por 5 min a -20°C para después ser centrifugadas a 16'000 g por 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se repitió el paso anterior, pero utilizando 1.5 ml de acetona en lugar de metanol. Se retiró el sobrenadante y el vial se dejó secar por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se peso el vial y se calculó la masa de la muestra tomando en cuenta el peso del vial previamente registrado. Por cada mg de muestra recuperada se agregaron 4 μ L de reactivo 4 (suministrado con el kit), el cual es un reactivo caotrópico que incrementa la solubilidad de la muestra y mejora el rendimiento. Las muestras se dejaron en agitación constante por 15 min a temperatura ambiente y después fueron centrifugadas a 16'000g por 30 min. Se colectaron los sobrenadantes, los cuales contienen la proteína total, y la cuantificación de proteína se realizó con el método del ácido bicinconinico (BCA) como se describió previamente.

Ñ. SENSIBILIZACIÓN IP CON α -CASEÍNAS

Para este propósito se desarrollaron dos protocolos. Protocolo de 14 días: tres grupos de 6 ratones cada uno recibieron ip 0.25, 0.05 o 0.025 mg de caseínas nativas en 250 μ L de PBS pH 7.4. Siete días después el tratamiento fue repetido (Hilton y col, 1997). Previo a la exposición al alérgeno y catorce días después de la exposición inicial a este se obtuvieron muestras de sangre de la vena de la cola de los animales (Hilton y col, 1997). Un cuarto grupo de 6 ratones recibió solamente la solución vehículo (PBS pH 7.4) (figura 5).

Protocolo de 28 días: tres grupos de 6 ratones cada uno recibieron ip 0.25, 0.05 o 0.025 mg de caseínas nativas en 250 μ l de PBS pH 7.4 (Chen y col, 2013). El tratamiento fue repetido los días 3, 6, 9, y 12 posteriores a la primera exposición al alérgeno. Previo a la exposición al alérgeno y 28 días después de la exposición inicial a este se obtuvieron muestras de sangre de la vena de cola de los animales (Chen y col, 2013). Un cuarto grupo de 6 ratones recibió solamente la solución vehículo (PBS pH 7.4) (figura 6).

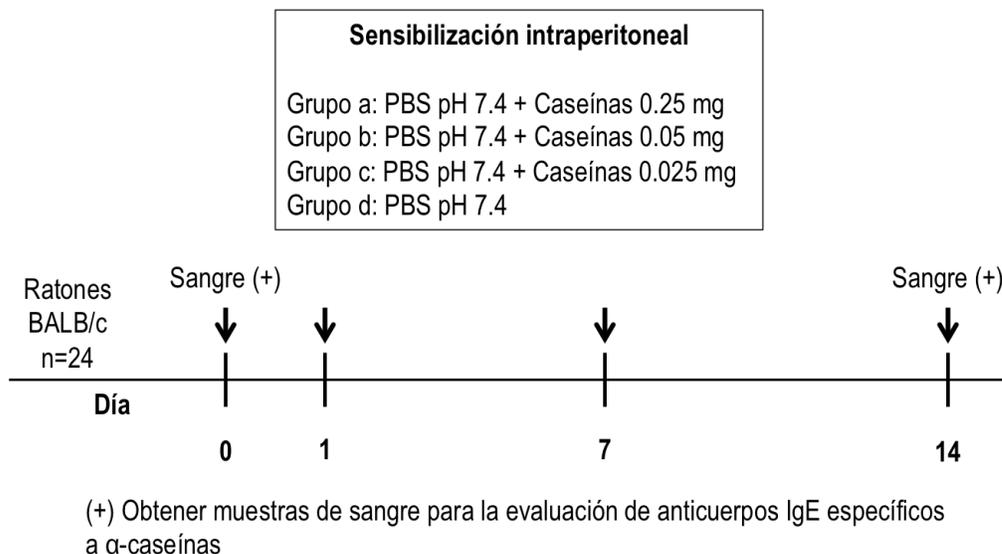


Figura 5. Protocolo de 14 días para sensibilizar a α -caseínas bovinas de forma intraperitoneal.

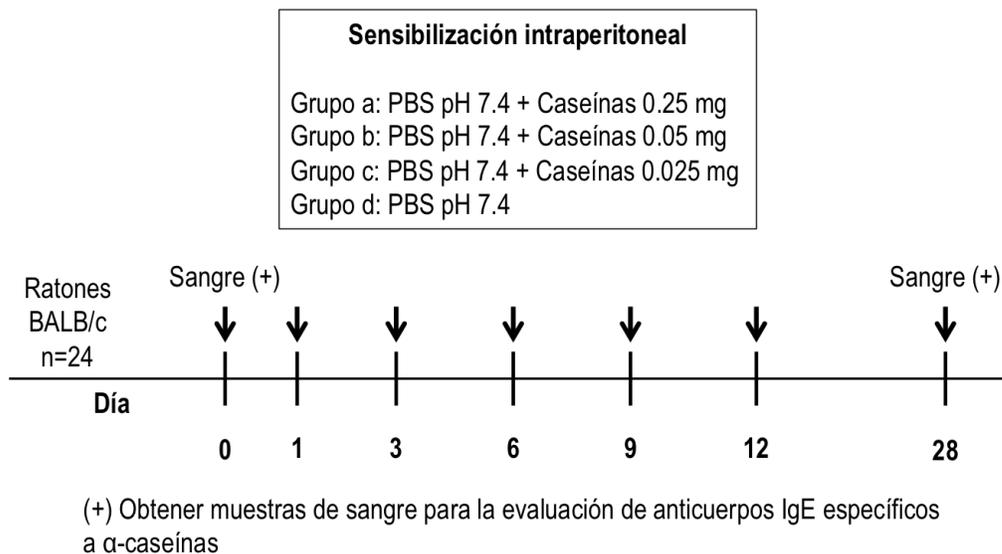


Figura 6. Protocolo de 28 días para sensibilizar a α -caseínas bovinas de forma intraperitoneal.

Una vez establecida la dosis y el mejor protocolo para sensibilizar de forma ip a α -caseínas bovinas, se procedió a evaluar los potenciales de sensibilización y sensibilización residual de α -caseínas tratadas térmicamente. En esta ocasión 3 grupos de 6 ratones cada uno fueron sensibilizados con la

dosis de α -caseínas establecida. La sensibilización fue como sigue: un primer grupo recibió caseínas nativas y un segundo y tercer grupo recibieron caseínas tratadas térmicamente por 30 min o 60 min respectivamente. Como controles positivo y negativo dos grupos adicionales de ratones de 6 animales cada uno fueron inmunizados con OVA 0.05mg (p/vol) en volumen final de 250 μ L de PBS (Chen y col, 2013) y proteína de papa respectivamente (Dearman y col 2001a; Dearman y col, 2001b; Dearman y col, 2002). Para propósitos de nuestro estudio, se inmunizó con 0.5 mg de proteína de papa (p/vol) en 250 μ L de PBS. Un sexto grupo de 6 ratones recibió la solución vehículo solamente (PBS pH 7.4).

O. RETO INTRADÉRMICO

El área del peritonéo de los animales sensibilizados con caseínas fué razurada 24-48 h antes de realizar el reto intradérmico. Los animales fueron retados en el lado izquierdo del peritonéo con 10 μ g de caseínas disueltas en 10 μ L de PBS utilizando una jeringa para insulina de 0.3 mL. Como control negativo, en el lado izquierdo se administraron 10 μ L de la solución vehículo (PBS pH 7.4). Una hora posterior al reto intradérmico se evaluó la respuesta alérgica aguda en la piel. Como control positivo, un grupo de 6 ratones fue sensibilizado ip con OVA (0.05 mg en 250 μ L de PBS) de acuerdo al protocolo de 28 días descrito previamente y retados en el área del peritonéo con 10 μ g de OVA disueltas en 10 μ L de PBS. Como control negativo, un segundo grupo de 6 ratones no sensibilizados fueron retados con 10 μ g de OVA disueltas en 10 μ L de PBS.

P. RETO ORAL

El reto oral se realizó seis días posteriores a la finalización del protocolo de sensibilización, es decir, posterior a la toma de muestra de sangre para evaluar la presencia de anticuerpos IgE anticaseínas. El reto consistió en la administración intragástrica de 2.5 mg de caseínas disueltas en 250 μ L de PBS. Basado en estudios previos (van Esch y col, 2013), las muestras de sangre se colectaron 30 min después de realizado en reto. Las muestras se procesaron como descrito previamente. El análisis de proteasa 1 de mastocitos (mMCP-1) en suero se realizó como se describe a continuación.

Q. EVALUACIÓN DE mMCP-1 EN SUERO

La concentración sérica de mMCP-1 fué determinada con un kit de ELISA comercialmente disponible (BioLegend, Cat. 432702) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El anticuerpo de captura (incluido en el kit) se diluyó 1-200 con buffer de cubierta. Volúmenes de 100 μ L fueron agregados a microplacas de ELISA y se incubó toda la noche a 4°C. Después de 4 lavados con PBS/Tween 20 0.05% los pozos fueron bloqueados con suero fetal bovino al 10% por 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron los pozos en 4 ocasiones y se agregaron en duplicado los estándares de mMCP-1 (de 62.5 a 4'000 pg/mL) y las muestras a analizar (diferentes diluciones). Se incubó por 2 h a temperatura ambiente y se hicieron 4 lavados. Se agregaron 100 μ L de anticuerpo de detección 1X acoplado a biotina (proporcionado con el kit) y se incubó de nuevo 1 h a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente en 4 ocasiones y se agregaron 100 μ L del complejo Avidina-HRP 1X. Se incubó a temperatura ambiente por 30 min y se realizaron 5 lavados en esta ocasión. Se agregaron 100 μ L de sustrato TMB y se incubó en la oscuridad por 30 min. La reacción se detuvo agregando 100 μ L de H₂SO₄ 2N. La absorbancia se leyó a 450 nm después de 5 min de detenida la reacción.

R. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SUERO REDUCIDAS EN IgG.

Para este propósito se utilizó un kit de perlas magnéticas tradicionalmente utilizado para inmunoprecipitación (BIO-RAD, SureBeads™. Cat. 161-4823). Las muestras de suero fueron diluidas 1:10 con suero fetal bovino al 10% antes de ser procesadas. Se siguió el protocolo sugerido por el fabricante: Las perlas fueron resuspendidas y se agregaron 100 μ L de estas a tubos cónicos de 1.5 mL. Se centrifugó por un minuto y se magnetizó para descartar el sobrenadante. Posteriormente se hicieron 3 lavados con 1 mL de PBS/Tween 0.1%. Posteriormente se agregaron 350 μ L de muestras de suero diluidas 1:10 con suero fetal bovino al 10% y se dejó incubar por 10 min a temperatura ambiente con rotación constante. Tras la incubación las perlas fueron magnetizadas y se recuperó el suero el cual ya se encontraba reducido en IgG. En algunos ensayos las perlas fueron lavadas con PBS-Tween en 3 ocasiones para para posteriormente eluir la IgG total unida a las perlas magnéticas. Para la elución se agregaron 20 μ L de glicina 20 mM pH 2.0 y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Las perlas se magnetizaron y se recuperó el sobrenadante (aproximadamente 20 μ L) el cual se llevó a un volumen de 350 μ L con suero fetal bovino al 10% en PBS.

S. PROBIÓTICO VSL#3

Se utilizó la mezcla de probióticos comercialmente disponible. Esta mezcla contiene 112.5 billones de 8 diferentes microorganismos Gram positivos por capsula (*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. La viabilidad de los microorganismos, la ausencia de microorganismos Gram negativos en la muestra, la presencia de lactobacilos en las muestras de heces de los ratones, así como las pruebas de reto de crecimiento se realizaron por medios microbiológicos como se describe abajo.

T. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE BIOTA INTESTINAL.

Se realizaron análisis microbiológicos para evaluar la viabilidad de los probióticos y para realizar una evaluación general de la biota intestinal del modelo animal usado. Los análisis microbiológicos se realizaron con los siguientes medios: Agar Lactobacilli MRS (Difco™, Cat. 288210), agar azul de metileno eosina (EMB) (Merck, Cat. 101347), agar tripticasa de soya (Merck, Cat. 105458). El agar MRS es específico para lactobacilos y el EMB es utilizado para el aislamiento y detección de enterobacterias patógenas. El agar tripticasa de soya es un medio que permite el crecimiento abundante de microorganismos.

Para realizar la siembra de microorganismos primeramente se disolvió el contenido de una capsula del probiótico VSL#3 en 10 mL de solución salina esteril. Posteriormente, se realizaron 6 diluciones seriadas 1:10 y de la última dilución (1:1E6) se sembraron 20 µL en agar MRS. Adicionalmente, 20 µL de la dilución 4 (1:1E4) fueron sembrados en medio EMB. En otros ensayos, un grupo de 3 animales 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 agar tripticasa de soya. 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.

U. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

1. Prevalencia de alergia alimentaria

Las variables categóricas fueron resumidas por estadística descriptiva incluyendo los números totales y porcentajes. Las asociaciones fueron analizadas con la prueba exacta de Fisher. Las variables continuas fueron resumidas en media y rango. Para lo anterior se utilizó el programa estadístico PASW 18.0 (SPSS Inc., IL, USA). Las tasas de prevalencia fueron calculadas con el programa OpenEpi software versión 3.02 (www.OpenEpi.com, actualizado 04/05/2015, y accesado 28/08/2015). Las tasas de prevalencia fueron reportadas como la tasa (95% Intervalo de confianza) por 100 habitantes. Basado en la prevalencia de alergia alimentaria esperada en escolares (5.5%), un nivel de confianza del 95%, y una precisión del 2%, el total de cuestionarios colectados fue representativo de los 160'038 niños que acuden a las primarias en Culiacán, Sinaloa.

2. Ensayos de sensibilización a α -caseínas

Grupos de 5 o 6 ratones por tratamiento fueron evaluados durante todo el estudio. Los datos se presentaron como la media de las mediciones con desviación estándar. Los datos fueron analizados usando el paquete estadístico GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). La prueba de Kruskal-Wallis en conjunto con la prueba de comparación múltiple de Dunn fue utilizada para calcular las diferencias entre mas de dos grupos. La prueba de Mann-Whitney fue utilizada para comparaciones entre dos grupos. Un valor de $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. PREVALENCIA DE ALERGIA PERSISTENTE A LA LECHE BOVINA

Se enviaron cuestionarios a 1248 padres de familia. De estos, 1049 fueron regresados con respuestas válidas (tasa de respuesta del 84.0%). Las características demográficas de los participantes se muestran en la tabla 5. La proporción de niñas y niños que participaron en el estudio no difirió significativamente ($p > 0.05$). Las enfermedades alérgicas fueron reportadas por el 17.1% de los participantes y 4.6% reportó más de una enfermedad alérgica. Se observó una asociación significativa de la alergia alimentaria con dermatitis atópica y rinitis alérgica, pero no con asma, la cual es comúnmente asociada con la alergia alimentaria. Esta falta de asociación puede explicarse por la baja tasa de prevalencia de asma reportada por los padres en nuestro estudio (2.7%), la cual es mucho más baja que las tasas de prevalencia reportadas en otras regiones de México (tasas entre 5.8-12%) utilizando la metodología del Estudio Internacional de Asma y Alergias en Infantes (ISAAC, por sus siglas en Inglés) (Tatto-Cano y col, 1997, Río-Navarro y col, 2009).

En cuanto a las reacciones alérgicas recurrentes a los alimentos, las más reportadas fueron las desencadenadas por el consumo de leche y sus derivados (21 casos; 2.0%). De estos casos, 14 (1.33%; 95% CI:7.9-2.2) y 5 (0.47%; 95% CI:0.2-1.1) cumplieron con los criterios de “alergia a la leche bovina de tipo inmediato, alguna vez” o “diagnosticada por un médico, alguna vez”, respectivamente. La prevalencia de “alergia a la leche bovina de tipo inmediato, actual”, la cual refleja la tasa de prevalencia de alergia persistente a la leche bovina, fue de 0.29% (n=3; 95% CI: 0.09-0.83). Nuestros datos de prevalencia de “alergia a la leche bovina de tipo inmediato, alguna vez” (1.33%) están en línea con varios estudios previos, en los cuales se estima que la alergia a la leche bovina afecta alrededor del 2% de la población pediátrica (Host y col, 1990; Saarinen y col, 1999; García-Ara y col, 2003, Sackesen y col, 2011). El hecho de que solo un 0.29% (n=3) de la población estudiada reunió los criterios de alergia persistente a la leche bovina, puede explicarse por el curso transitorio de la enfermedad, la cual se resuelve naturalmente (entre 80-90% de los casos) en los primeros 4 años de vida (Wood y col, 2003; Skripak y col, 2007; Wood y col, 2013) y nuestra población comprendió escolares con un rango de edad de 5-13 años (tabla 5).

Tabla 5. Características clínicas y demográficas de la población estudiada.

Variable	
Media de edad en años (rango)	8.6 (5-13)

Genero	n (%)
Mujer	541 (51.6)
Hombre	508 (48.4)
Enfermedades alérgicas conocidas	
Alergia alimentaria	58 (5.5)
Rinitis alérgica	75 (7.1)
Dermatitis atópica	33 (3.1)
Alergia a la picadura de insectos	32 (3.0)
Asma	28 (2.7)
Urticaria	12 (1.1)
Alergia a los medicamentos	10 (1.0)
Conjuntivitis	8 (0.8)
Anafilaxis	2 (0.2)

De los 3 casos que presentaron alergia persistente a la leche bovina en el presente estudio, 2 reunieron los criterios de anafilaxis inducida por alimentos. Ambos casos reportaron dificultad para respirar y otros síntomas como garganta apretada y angioedema, entre otros. Sin embargo, en ninguno de estos casos de anafilaxis se recomendó el uso de un autoinyector de epinefrina, el tratamiento de emergencia preferido para tratar la anafilaxis (Simons, 2009). Como reportado por otros (Störger y Wuthrich, 1993; Lam y col, 2008), nuestros datos en población escolar de Sinaloa, México destacan que las reacciones alérgicas suelen ser severas en los casos de alergia persistente a la leche bovina y como en otras regiones del mundo (Shek y col. 2010; Hoyos-Bachiloglu y col, 2014), los autoinyectores de epinefrina no son recomendados por el personal de salud o no están disponibles. Aunado a esto, está el riesgo de las exposiciones accidentales a las proteínas de la leche (Lam y cols, 2008; Boyano-Martínez y col, 2009; Fleischer y col, 2012, Turner 2012) y que no se encuentra disponible un tratamiento para generar tolerancia inmunológica a dichas proteínas. En general, lo anterior pone de manifiesto que hay necesidad de desarrollar estrategias que eviten de forma efectiva la respuesta alérgica a las proteínas de la leche bovina, sobre todo en los casos de alergia persistente ya que las reacciones anafilácticas potenciales pueden no ser tratadas adecuadamente.

B. TRATAMIENTO TÉRMICO DE α -CASEÍNAS BOVINAS

A diferencia de otros métodos físicos como la hidrólisis exhaustiva de proteínas, la cual es comúnmente utilizada para desarrollar fórmulas lácteas hipoalérgicas, con el tratamiento térmico las proteínas siguen siendo reconocidas por el sistema inmune si se mantienen las temperaturas adecuadas. Esto parece ser efectivo para reducir el potencial alérgico de las proteínas de la leche ya que algunos alérgicos a este alimento pueden tolerar la leche extensivamente calentada u horneada (Konstantinou y Kim, 2012; Feldmann y Bird, 2014). Nuestros resultados de calorimetría diferencial de barrido de α -caseínas bovinas mostraron un pico endotérmico a los 186.9 °C con una entalpía (ΔH) de -108.7 J/g (figura 7). Este pico inició a los 155.5 °C y terminó a los 214 °C. En estudios posteriores las α -caseínas fueron calentadas de 30 a 220 °C y el reanálisis de la muestra mostró que los cambios registrados eran irreversibles, es decir, no se observó el pico de calor. Sin embargo, las muestras calentadas a dichas temperaturas no pudieron ser solubilizadas en PBS pH7.4 o en buffer de cubierta para las reacciones de ELISA (pH 9.5) por lo que no fue posible evaluar la respuesta inmune a estas proteínas.

Alternativamente, la α -caseína fue calentada a 140 °C por 30 o 60 min ya que estas condiciones pueden no tener un efecto drástico sobre la digestibilidad de caseínas cuando estas son calentadas en seco (Eldred y Rodney, 1946; Pader y col, 1948). Con dichas condiciones es posible la formación de enlaces péptidos entre el grupo ϵ -amino del aminoácido Lisina y los grupos carboxilo libres de los ácidos dicarboxílicos de las caseínas (Eldred y Rodney, 1946; Pader y col, 1948), lo cual podría asociarse a un cambio conformacional de la proteína. Además, a dichas temperaturas la caseína permanece estable en atmósfera de aire con solo pequeñas pérdidas de mono y dióxido de carbono y ácido isocianico (Mocanu y col, 2012). Adicionalmente, bajo los tratamientos descritos, las α -caseínas matuvieron suficiente solubilidad en PBS pH 7.4 para los propósitos de sensibilización del presente estudio. Así, este material fue utilizado en experimentos posteriores como fuente de caseínas tratadas térmicamente.

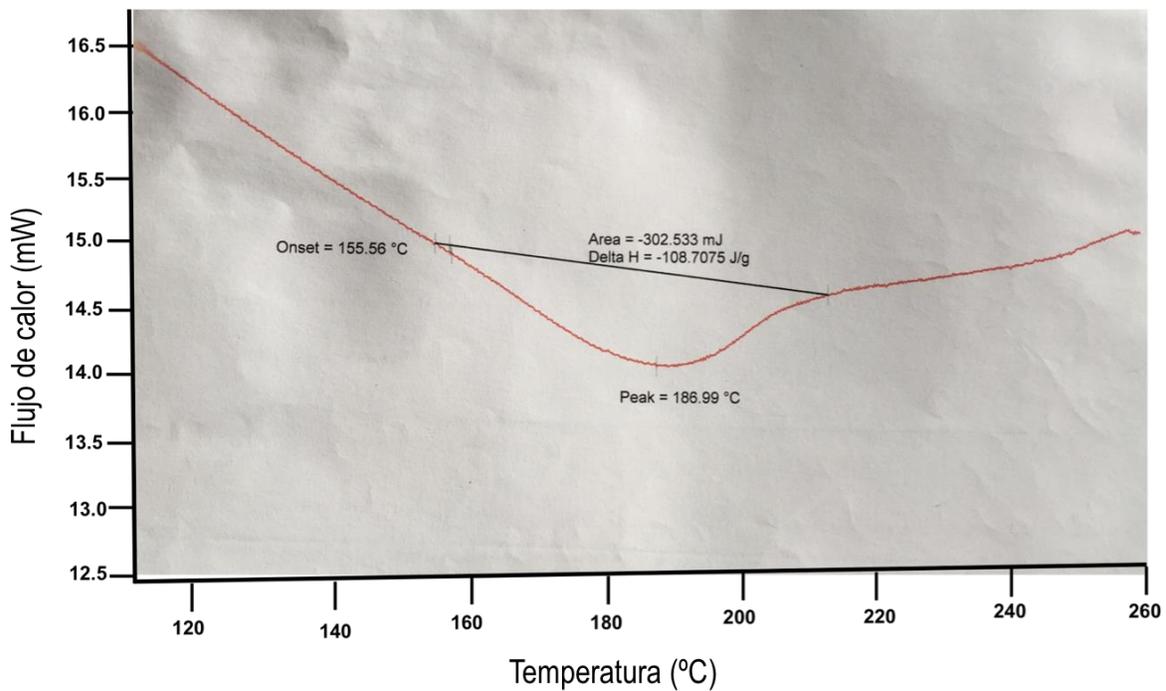


Figura 7. Calorimetría diferencial de barrido de α -caseínas bovinas. La corrida fue de 30 a 290 °C con una velocidad de 5 °C/min. La muestra fue de 2.873 mg de α -caseínas.

La resistencia a la digestión gástrica se asocia a la capacidad alergénica de las proteínas de los alimentos aunque dicha asociación es inconsistente encontrándose alérgenos muy susceptibles a la acción de la pepsina y proteínas no alergénicas que son resistentes a esta (Foster y col, 2013). No obstante, el análisis de digestibilidad con pepsina es uno de los parámetros a evaluar cuando se estudia la alergenicidad de proteínas derivadas de procesos biotecnológicos (Codex Alimentarius, 2009). Para corroborar que el tratamiento térmico no afectó la digestibilidad de las α -caseínas, se realizaron ensayos de digestión con pepsina en fluido gástrico simulado. Para esto, las muestras de α -caseína debieron ser disueltas directamente en el fluido gástrico simulado y posteriormente calentadas a 55 °C por 2 h con agitación constante. Como se muestra en la figura 8, este proceso no afectó el patrón electroforético de las α -caseínas.

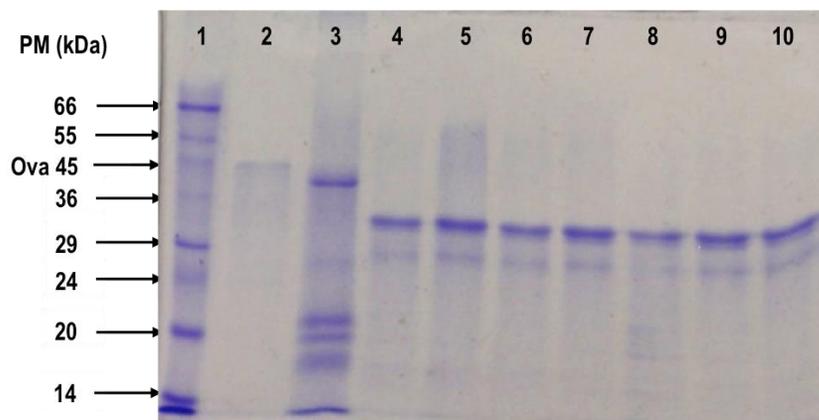


Figura 8. Perfil electroforético de ovoalbúmina, proteína de papa y α -caseínas. Ovoalbúmina (5 μ g; carril 2), Proteína de papa (15 μ g; carril 3), Caseínas nativas (10 μ g) en PBS (carriles 4 y 5), caseínas nativas en FGS (carriles 6 y 7), TT30 en PBS (carriles 8 y 9), TT30 en FGS (carril 9). FGS; fluido gástrico simulado, TT30; caseínas tratadas térmicamente por 30 min a 140 °C. SDS-PAGE 12%.

Posteriormente, las α -caseínas nativas y calentadas a 140 °C por 30 min fueron digeridas con pepsina. La digestión de las α -caseínas tratadas térmicamente a 140 °C por 60 min no pudo realizarse debido a la baja solubilidad de estas proteínas. Los resultados muestran que las α -caseínas son totalmente digeridas después de 0.5 min de digestión con pepsina y esto fue independiente del tratamiento térmico a 140 °C por 30 min (figura 9). Sin embargo, se debe tener en cuenta que los geles utilizados alcanzaron a resolver marcadores con un peso molecular mínimo de 6.5 kDa y es posible que fragmentos proteicos de 3.5 kDa tengan la capacidad de entrecruzar las IgE presentes en la superficie de mastocitos y desencadenar la respuesta alérgica o en su caso generar sensibilización (FAO/WHO, 2001; Bannon y col, 2002; Thomas y col, 2004).

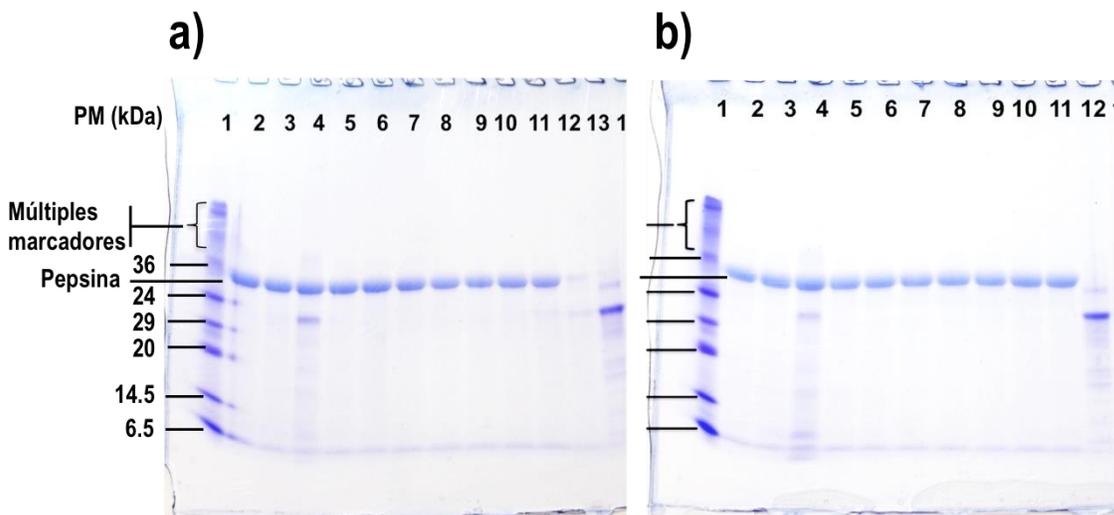


Figura 9. Caseínas digeridas con pepsina a diferentes tiempos. a) caseínas nativas, b) caseínas tratadas térmicamente por 30 min. Carriles 4 al 11; caseínas digeridas a diferentes tiempos (0-60 min). Carril 1; marcadores de peso molecular, carriles 2 y 3; pepsina, en a) carril 13; caseína nativa, en b) carril 12 caseína tratada térmicamente por 30 min. SDS-PAGE (gradiente de poliacrilamida de 10-20%)

C. SENSIBILIZACIÓN DE RATONES BALB/c A α -CASEÍNAS BOVINAS

1. Evaluación de la fuente de proteína para desarrollar las reacciones de ELISA

La sensibilización es dependiente de la producción de anticuerpos IgE específicos al alérgeno. Así, es necesaria la detección de estos anticuerpos para establecer formalmente que un organismo está sensibilizado aunque esto no implique el desarrollo de los síntomas de alergia. En este estudio los anticuerpos IgE anti- α -caseínas bovinas fueron detectados por ELISA ya que este tipo de ensayo es útil para evaluar el potencial de sensibilización de proteínas y permite la comparación de alimentos antes y después de un procesamiento (Thomas y col, 2007). Además, se evaluó la respuesta de anticuerpos IgG anti- α -caseínas para demostrar la inmunogenicidad de las proteínas estudiadas. Para esto, fue necesario evaluar que la fuente de proteína utilizada para realizar las reacciones de ELISA no fuera reconocida por los anticuerpos presentes en el suero de los animales inmunizados con α -caseínas.

La albúmina sérica bovina y las caseínas bovinas son fuentes de proteína comúnmente utilizadas para desarrollar inmunoensayos en fase sólida, pero estas no podían utilizarse en el presente estudio. Otras fuentes de proteína utilizadas en inmunoensayos en fase sólida son el suero fetal bovino y la gelatina de pescado. Así, estas proteínas fueron evaluadas para propósitos de nuestro estudio. En esta evaluación se utilizó OVA al 1% como la fuente de proteína para desarrollar las reacciones de ELISA. Esto ya que las dietas para roedores comercialmente disponibles carecen de esta proteína y la sensibilización de roedores a OVA raramente resulta negativa debido a la falta de exposición a este alérgeno por generaciones. Como se observa en la figura 10, la señal de fondo obtenida utilizando gelatina de pescado como antígeno fue más alta que obtenida utilizando suero fetal bovino o caseína, aunque esto fue significativo ($P > 0.05$). En cuanto a la inmunoreactividad de IgG utilizando sueros inmune, la gelatina de pescado mostró una mayor inmunoreactividad que el suero fetal bovino (figura 10; $P > 0.05$), incluso, esta fue significativa comparada a la inmunoreactividad al suero fetal bovino utilizando muestras preinmune ($P < 0.01$). Notablemente, utilizando el suero fetal bovino como antígeno la señal de fondo fue similar a la obtenida en los pozos donde se utilizó caseína como antígeno y suero preinmune para la detección (figura 10). Esto indica que a pesar de que las fuentes proteicas de origen bovino no son la primera elección para desarrollar reacciones de ELISA cuando se evalúan proteínas de leche bovina, el suero fetal bovino parece ser apropiado al menos en los casos del estudio de las α -caseínas bovinas. De este modo, se utilizó suero fetal bovino como fuente de proteína para desarrollar las reacciones de ELISA en estudios posteriores.

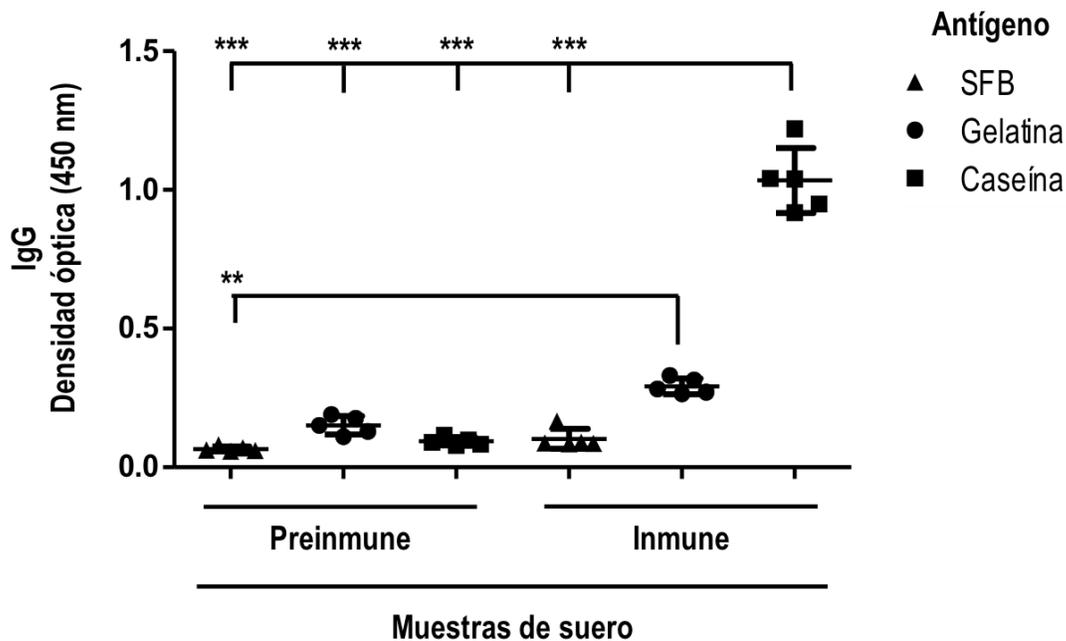


Figura 10. Evaluación de la fuente de proteína para detectar por ELISA anticuerpos anti- α -caseínas bovinas. Se detectaron anticuerpos IgG anti-caseínas. Se pegaron 40 μ g de antígeno por pozo. Las muestras de suero de ratones inmunizados ip en dos ocasiones con Alum (2 mg) fueron diluidas 1:10 con OVA al 1% (solución de bloqueo). Cada punto representa un animal y el promedio de evaluaciones por triplicado. SFB; suero fetal bovino, Gelatina; gelatina de pescado, Caseína; α -caseínas bovinas. ** P < 0.01, *** P < 0.001 por la prueba de Kruskal-Wallis.

2. Sensibilización de ratones por la vía oral con el uso de sucralfato

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, las rutas oral o intragástrica parecen ser las más relevantes para evaluar la alergenicidad de proteínas. Sin embargo, el sistema inmune de mucosas es tolerogénico por naturaleza y se debe romper dicha tolerancia para lograr la sensibilización a las proteínas que ingresan por la vía oral. Además, como requisito, los alérgenos deben llegar a la mucosa intestinal en forma intacta o parcialmente digeridos, lo cual implica que deben resistir la digestión gástrica (Astwood y col, 1996). Notablemente, algunos antiácidos como el sucralfato podrían lograr tales efectos. El sucralfato es un complejo aluminio-sacarosa-sulfato utilizado para el tratamiento de úlcera gástrica (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). Así, la administración oral de sucralfato puede influenciar una digestión lenta de proteínas e incrementar la posibilidad de que algunas de ellas lleguen parcialmente digeridas a la mucosa intestinal. Adicionalmente, el sucralfato también es una fuente de aluminio, el cual es un adyuvante que promueve una respuesta inmune tipo Th2 y la producción de anticuerpos IgE (Brunner y col, 2007; Bruner y col, 2009; Bruner y col, 2010).

Ciertamente, los modelos de alergia a los alimentos libres de adyuvantes son los más recomendados ya que se reduce la posibilidad de obtener resultados falsos positivos (Pilegaard y Madsen, 2004; Ladics y col, 2010). Debido a la presencia de aluminio, el modelo de alergia alimentaria basado en la administración oral de sucralfato no puede ser considerado estrictamente libre de adyuvantes. Sin embargo, se ha demostrado que el consumo de sucralfato no solo promueve la sensibilización e hipersensibilidad a las proteínas de los alimentos en ratones, si no también 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, el uso de sucralfato para sensibilizar de forma oral ratones BALB/c es una opción viable que permitiría evaluar los potenciales de sensibilización y alergénico de proteínas de los alimentos en un modelo murino de alergia alimentaria con características similares a la respuesta alérgica humana.

En nuestro estudio primeramente fueron evaluadas diferentes concentraciones del alérgeno (α -caseínas; dosis: 0.2, 0.4, 1.0, 2.5, y 4.0 mg) utilizando 2 mg de sucralfato, como reportado previamente (Schöl y col, 2005; Pali-Schöl y col, 2008; Bruner y col, 2007; Bruner y col, 2009). Los resultados muestran que en el modelo de sensibilización oral con sucralfato 3 de 6 ratones a los que se les administraron 0.2 mg de α -caseínas fueron sensibilizados (figura 11a). De estos tres ratones solo uno desarrolló una respuesta alta de anticuerpos IgE específicos a α -caseínas, la cual fue fácilmente detectada incluso después de solo 3 de 5 dosis administradas (figura 11a). Otro ratón al cual se le administraron 2.5 mg de caseínas también fue sensibilizado (figura 11b) y al igual que los otros animales sensibilizados (figura 11a) la respuesta de anticuerpos IgE específicos a α -caseínas tendió a incrementarse conforme incrementó el número de dosis administradas (figura 11). El resto

de los grupos de estudio, los cuales incluyen aquellos que recibieron 0.4, 1.0, y 4.0 mg de caseínas, no mostrarán niveles detectables de anticuerpos IgE anti- α -caseínas por ELISA. Lo mismo ocurrió para aquellos que solo recibieron PBS más sucralfato o solo PBS.

En general, solo 4 de 30 ratones a los cuales se les administraron α -caseínas más sucralfato fueron sensibilizados. Nosotros asociamos la falta de sensibilización a la alta capacidad tolerogénica del sistema inmune de mucosas, la cual podría fomentarse si existen complicaciones técnicas durante la administración intragástrica del alérgeno. Es posible que el contacto del alérgeno en estudio con la cavidad bucal del animal fomentada por una inapropiada administración intragástrica de la proteína alergénica incremente el riesgo de generar tolerancia. Otros (Morafo y col, 2003) han atribuido la ausencia de sensibilización oral a las proteínas de la leche en ratones BALB/c a una falta de susceptibilidad genética ligada a la producción de IFN- γ , incluso, no se logró sensibilizar a los animales en la presencia de toxina colérica. Nosotros diferimos de ese punto de vista ya que en el presente estudio observamos respuestas de anticuerpos IgE anti- α -caseínas fácilmente detectables por ELISA después de la administración oral de estas proteínas con sucralfato (figura 11).

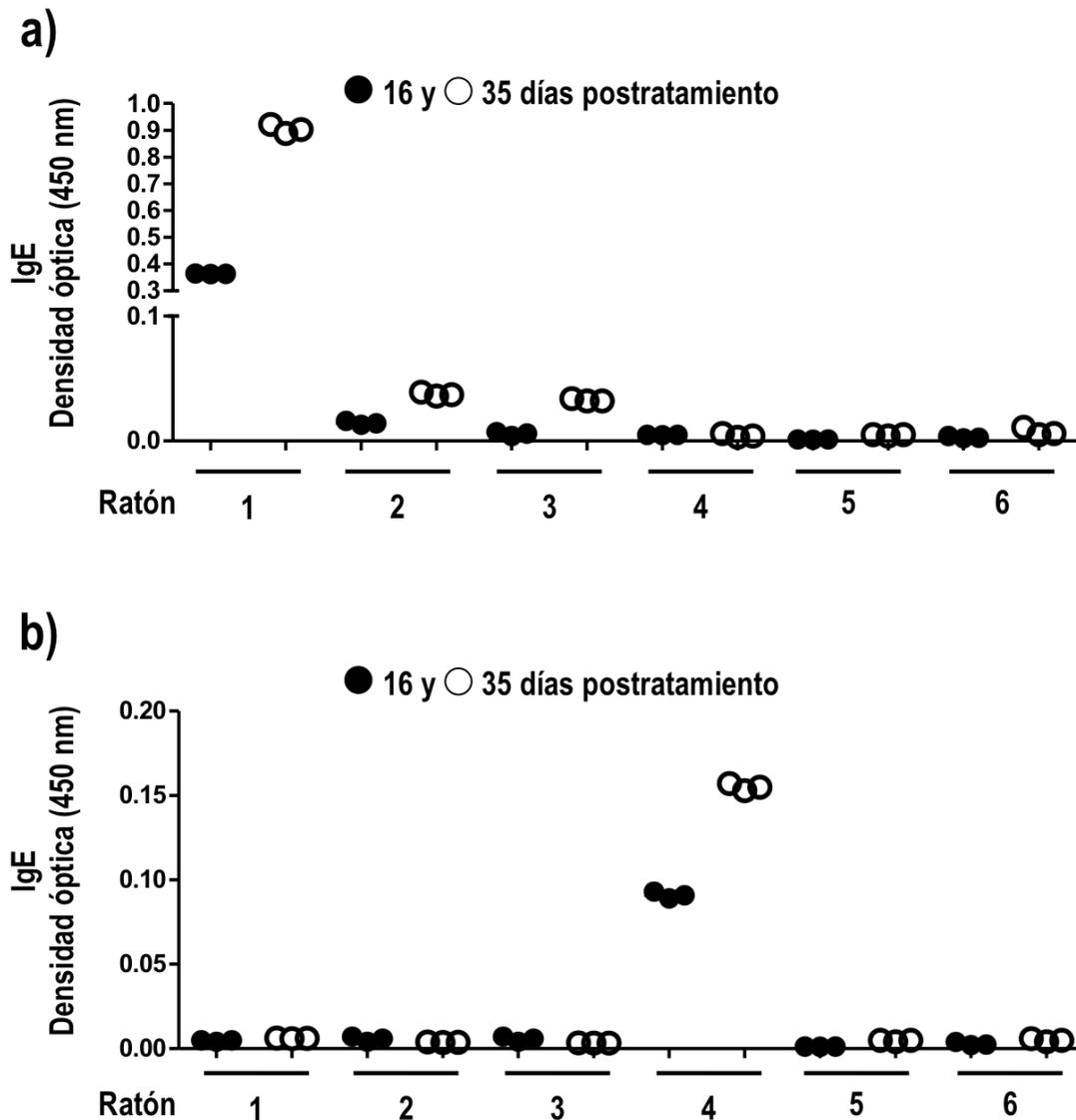


Figura 11. Sensibilización de ratones BALB/c a α -caseínas bovinas por la vía oral y con sucralfato. a) Ratones sensibilizados con 0.2 mg de α -caseínas; b) ratones sensibilizados con 2.5 mg de α -caseínas. Se detectaron en suero los anticuerpos IgE anti- α -caseínas. Se pegaron 20 μ g de antígeno por pozo en la microplaca. Las muestras de suero de los ratones en estudio se obtuvieron después de tres (círculos cerrados) y cinco (círculos abiertos) administraciones de α -caseínas con sucralfato (2 mg). Las muestras fueron diluidas 1:10 con suero fetal bovino al 10% para su análisis. Se muestran los resultados individuales de 6 ratones por grupo evaluados por triplicado después de sustraer el fondo de reacción. Se consideró como fondo de reacción la absorbancia obtenida del análisis de las muestras preinmune. No se detectaron respuestas positivas en los animales que recibieron PBS + sucralfato o solamente PBS.

3. Sensibilización ip a α -caseínas libre de adyuvantes

A diferencia de la ruta oral, la sensibilización ip no presenta los inconvenientes de la capacidad tolerogénica del sistema inmune de mucosas. Su desventaja es que los animales de estudio no son sensibilizados por la vía típica de sensibilización y no es posible evaluar el efecto de las matrices alimentarias, las cuales podrían jugar un papel importante en la sensibilización y respuesta alérgica a los alimentos (van Wijk y col, 2005; Wavrin y col, 2015). Sin embargo, no se contaba con un modelo de sensibilización ip a caseínas bovinas que fuera libre de adyuvantes, sin importar la vía de administración del antígeno (Liu y col, 2016). Así, se evaluaron dos protocolos de sensibilización los cuales difieren en el número de inmunizaciones, pero que han mostrado ser efectivos al menos para sensibilizar a OVA (Dearman y col, 2013; Chen y col, 2013). Los resultados muestran que un protocolo de 28 días con 5 inmunizaciones es apropiado para sensibilizar a caseínas y sin la ayuda de adyuvantes ratones de la cepa BALB/c (figura 12). De las 3 concentraciones evaluadas, dos de ellas (0.05 y 0.025 mg) fueron óptimas para inducir respuestas reproducibles de anticuerpos utilizando el protocolo de 28 días (figura 12). Estas respuestas fueron significativas comparadas a cualquiera de las respuestas de IgE anti- α -caseínas desencadenadas utilizando el protocolo de 14 días ($P < 0.01$ y $P < 0.001$) (figura 12). Aunque no se observaron respuestas de anticuerpos IgE anti- α -caseínas en 4 (0.05 mg) y 3 (0.025 mg) de los animales inmunizados con el protocolo de 14 días (figura 12), estas respuestas no pueden descartarse por completo ya que la competencia con la IgG por los epítopes podría enmascarar la respuesta de anticuerpos IgE (Birmingham y col, 2003; Adel-Patient y col, 2005). Además, solo si se presenta una respuesta negativa de anticuerpos IgE en la presencia de una buena respuesta de anticuerpos IgG se podría considerar una verdadera falta de anticuerpos IgE (Dearman y col, 2007; Dearman y col, 2009). Lo anterior significaría que el sistema inmune del animal es capaz de reconocer como extraña a la proteína de prueba y que la exposición a esta ha sido lo suficientemente efectiva para desencadenar una respuesta inmune (presencia de anticuerpos IgG).

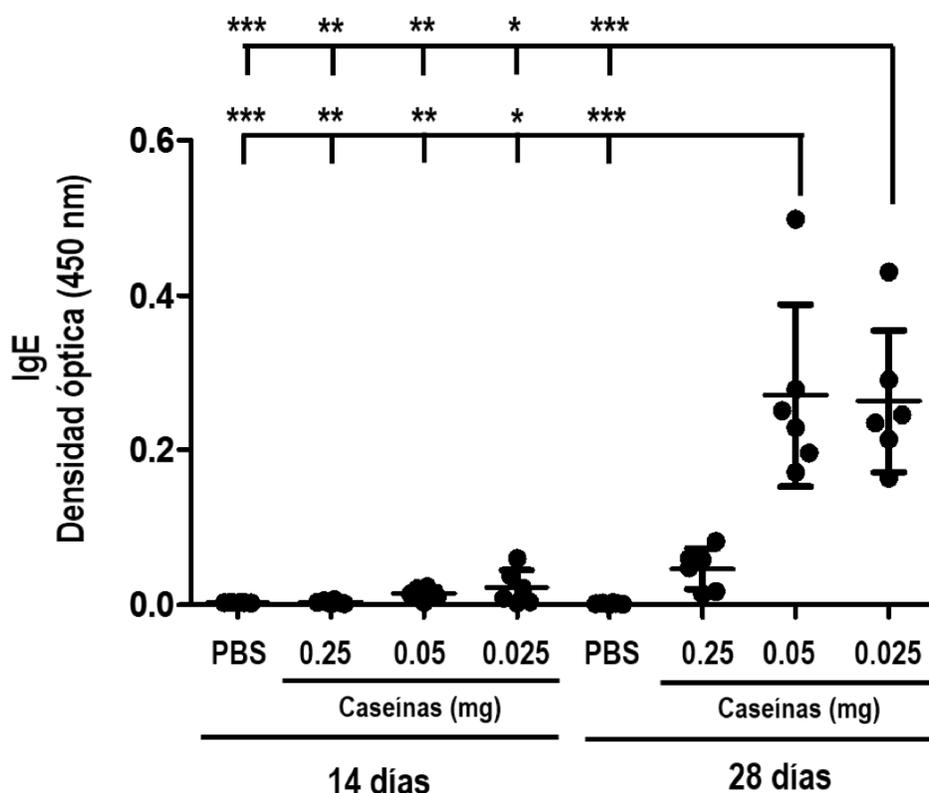


Figura 12. Evaluación de dos protocolos para sensibilizar ip y sin adyuvantes a α -caseínas ratones BALB/c. Los ratones fueron inmunizados en dos (protocolo de 14 días) y cinco ocasiones (protocolo de 28 días) con las concentraciones indicadas de α -caseínas. Se detectaron en suero los anticuerpos IgE anti- α -caseínas. Se pegaron 20 μ g de antígeno por pozo en la microplaca. Las muestras de suero de los ratones en estudio fueron diluidas 1:10 con suero fetal bovino al 10%. Se incluyeron 6 ratones por grupo. Cada punto representa un animal y el promedio de evaluaciones por triplicado después de sustraer el fondo de reacción. Se consideró como fondo de reacción la absorbancia obtenida del análisis de las muestras preinmune. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ por la prueba de Kruskal-Wallis.

Tomando en cuenta lo anterior, las muestras de suero de los ratones inmunizados en dos ocasiones (protocolo de 14 días) fueron tratadas para reducirles la IgG total y posteriormente evaluarlas por ELISA para la detección de anticuerpos IgE anti- α -caseínas. Para mostrar el posible enmascaramiento de IgE anti- α -caseínas por la IgG, se evaluaron las muestras de suero de los ratones inmunizados en 5 ocasiones con 0.05 mg de α -caseínas. Además, se recuperó la IgG total que fue retirada de las muestras de suero y de estas muestras se detectó por ELISA la IgG anti- α -

caseínas. Como se observa en la figura 13, la inmunoreactividad de la IgE anti- α -caseínas fue incrementada después de reducir la cantidad de IgG total lo cual pone de manifiesto el enmascaramiento de la respuesta de anticuerpos IgE por competencia de epítopes con la IgG. También se observa que al menos dos de los sueros de los ratones inmunizados con 0.05 o 0.025 mg de α -caseínas permanecieron con niveles indetectables de IgE anti- α -caseínas después de reducir la IgG total. Esto último pone de manifiesto que es muy poco probable que la falta de inmunoreactividad de anticuerpos IgE anti- α -caseínas en el suero de algunos ratones inmunizados se deba a resultados falsos negativos.

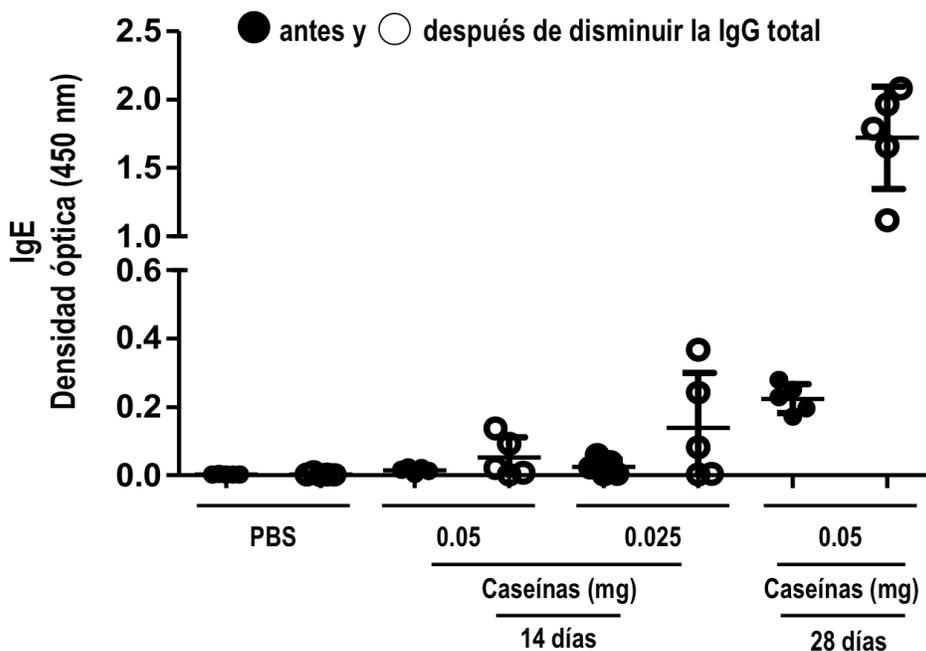


Figura 13. Evaluación de la disminución de la IgG total sobre la respuesta de anticuerpos IgE anti- α -caseínas en muestras de suero obtenidas de ratones inmunizados ip. Los ratones fueron inmunizados en dos (protocolo de 14 días) y cinco ocasiones (protocolo de 28 días) con las concentraciones indicadas de α -caseínas. Se detectaron en suero los anticuerpos IgE anti- α -caseínas. Se pegaron 20 μ g de antígeno por pozo en la microplaca. Las muestras de suero de los ratones en estudio fueron diluidas 1:10 con suero fetal bovino al 10%. Se incluyeron 5 ratones por grupo. Cada punto representa un animal y el promedio de evaluaciones por triplicado después de sustraer el fondo de reacción. Se consideró como fondo de reacción la absorbancia obtenida del análisis de una muestra preinmune. Para fines demostrativos, los datos mostrados en círculos cerrados (antes) se retomaron de la figura 12.

La figura 14 muestra la inmunoreactividad de anticuerpos IgG anti- α -caseínas presentes en la IgG total que fue retirada de las muestras de suero de los ratones sensibilizados con 0.05 mg de α -caseínas de acuerdo al protocolo de 28 días. Como ha sido comentado por otros autores (Ladics y col, 2010), los resultados muestran que el número y frecuencia de las aplicaciones ip del alérgeno son críticas para lograr la sensibilización reproducible a proteínas. Así, se mostró que es posible sensibilizar de forma reproducible y sin adyuvantes ratones de la cepa BALB/c y que para esto es requerido un esquema de inmunización que preferencialmente involucre la administración del antígeno en mas de dos ocasiones.

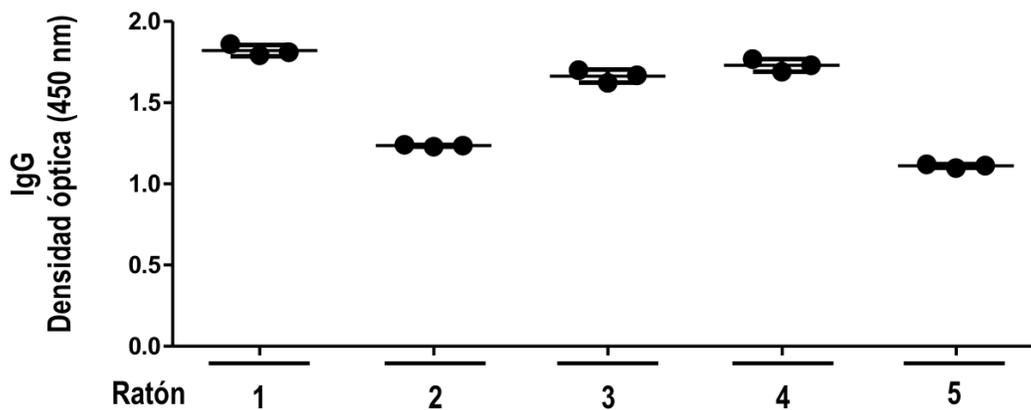


Figura 14. Evaluación de anticuerpos IgG anti- α -caseínas recuperados de muestras de suero tratadas para disminuir la IgG total. Las muestras fueron obtenidas de ratones inmunizados ip en cinco ocasiones (protocolo de 28 días) con 0.05 mg de α -caseínas. Se pegaron 20 μ g de antígeno por pozo en la microplaca. Las muestras de suero de los ratones en estudio fueron diluidas 1:100 con suero fetal bovino al 10%. Se reportan los resultados de evaluaciones individuales por triplicado después de sustraer el fondo de reacción. Se consideró como fondo de reacción la absorbancia obtenida del análisis de una muestra preinmune.

Para mostrar la actividad biológica de la IgE anti-caseínas producida tras la sensibilización ip, se realizó un reto intradérmico y un reto oral a los animales. Como se muestra en la figura 15, los animales sensibilizados a caseínas no desarrollaron una respuesta cutánea alérgica aguda (figura 15a) mientras que animales sensibilizados con OVA (control positivo) si lo hicieron (figura 15b, 15c y 15d). Alternativamente, se practicó un reto oral con 2.5 mg de caseínas y 30 min después se tomaron

muestras de sangre para medir mMCP-1 en suero como un indicador de la degranulación de mastocitos. Sin embargo, solo se detectaron niveles basales de mMCP en los animales retados con α -caseínas (comparado con los controles no sensibilizados). Los mecanismos precisos que subyacen a este fenómeno (falta de respuesta alérgica cuando existe sensibilización) no son conocidos y están fuera del alcance de la presente tesis, pero se ha reportado que la presencia de IgE evaluada *in vitro* no presenta una correlación absoluta con los síntomas de alergia (Poulsen y col, 2006; McClain y Bannon, 2006). De hecho, en estudios poblacionales de prevalencia de alergia alimentaria es común encontrar un mayor número de sujetos sensibilizados que de sujetos con alergia alimentaria clínica (Nwaru y col, 2013). A pesar de la falta de respuesta alérgica, el modelo murino de sensibilización ip a α -caseínas libre de adyuvantes aquí mostrado nos permite evaluar los potenciales de sensibilización y sensibilización residual de las caseínas tratadas térmicamente.

Motivados por la posibilidad de desarrollar un modelo de alergia oral a caseínas se desarrolló un segundo protocolo, pero esta vez se utilizó una sola concentración de caseínas (0.2 mg) y tres diferentes dosis de sucralfato (2.0, 4.0, y 6.0 mg). Sin embargo, no se observaron respuestas de anticuerpos IgE anti- α -caseínas. Esta falta de respuesta puede atribuirse a que el proveedor de la dieta de los animales cambió la formulación de esta e incluyó proteína de suero de leche como ingrediente. Aunque las caseínas no forman parte de las proteínas del suero de leche, no se descarta que el suero de leche contenga caseínas. De hecho, utilizando anticuerpos policlonales obtenidos tras la inmunización ip de ratones BALB/c con α -caseínas adsorbidas a 2 mg de Alum se mostró que la fracción proteica de la dieta utilizada era reconocida por los anticuerpos presentes en el suero de los ratones inmunizados y esto fue significativo comparado con las muestras preinmune utilizando ya sea 20 μ g ($P < 0.01$) o 40 μ g ($P < 0.05$) de proteína de la dieta como antígeno (figuras 16a y 16b).

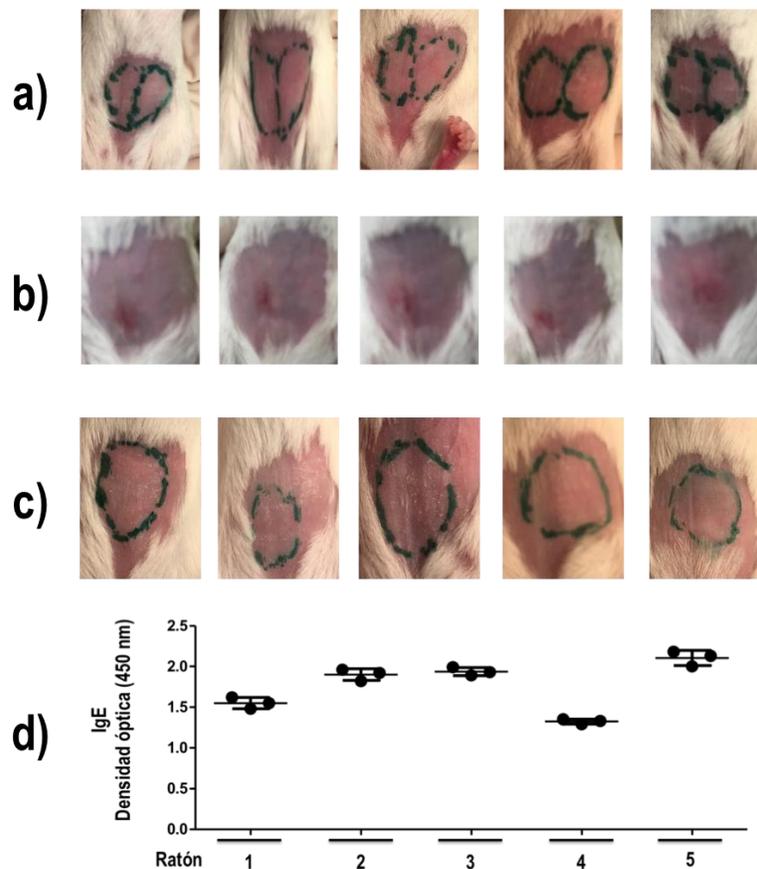


Figura 15. Reto intradérmico con α -caseínas u OVA y evaluación de anticuerpos IgE anti-OVA. **a)** Ratones inmunizados ip en 5 ocasiones con 0.05 mg de α -caseínas (protocolo de 28 días) y retados intradérmicamente en la zona del peritoneo con 10 μ g de α -caseínas en 10 μ L de PBS (lado izquierdo de la fotografía). El lado derecho se utilizó como control negativo y solo se administraron 10 μ L de PBS. **b)** Ratones inmunizados ip en 5 ocasiones con 0.05 mg de OVA (protocolo de 28 días) y retados en el peritoneo con 10 μ g de OVA en 10 μ L de PBS. **c)** Ratones no inmunizados retados en el peritoneo con 10 μ g de OVA en 10 μ L de PBS. **d)** Evaluación de anticuerpos IgE anti-OVA. Las muestras fueron obtenidas de los ratones que se muestran en la sección **b)** de esta figura. Se pegaron 20 μ g de antígeno por pozo en la microplaca. Las muestras de suero de los ratones en estudio fueron diluidas 1:10 con suero fetal bovino al 10%. Se reportan los resultados de ratones individuales evaluados por triplicado después de sustraer el fondo de reacción. Se consideró como fondo de reacción la absorbancia obtenida del análisis de las muestras preimmune.

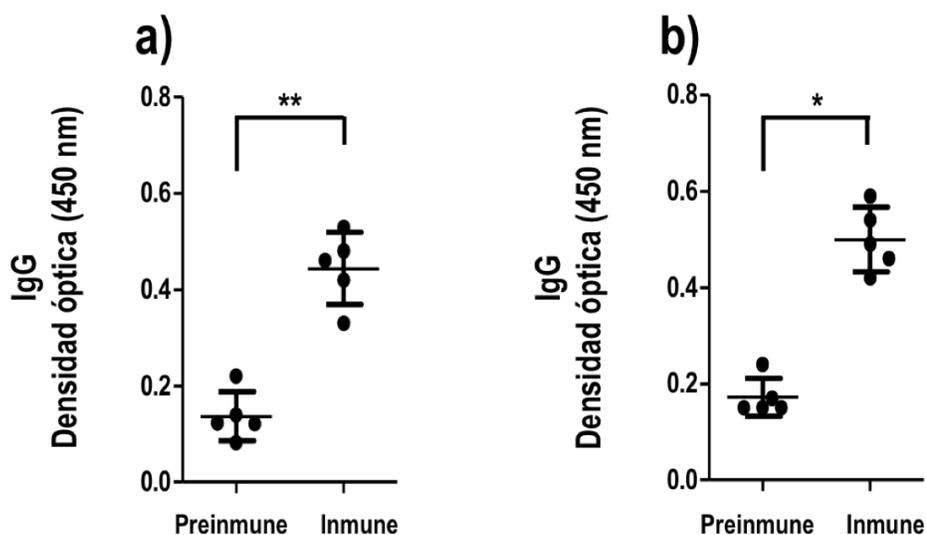


Figura 16. Inmunoreactividad de anticuerpos IgG obtenidos de ratones inmunizados con α -caseínas contra las proteínas de la dieta de los animales que no respondieron a la sensibilización oral con sucralfato. a) y b); reacción de ELISA desarrollada utilizando como antígeno 20 μ g y 40 μ g de proteína respectivamente. Las muestras de suero inmune fueron obtenidas de ratones inmunizados ip en dos ocasiones con 25 μ g de α -caseínas adsorbidas a 2 mg de Alum. Las muestras de suero de los ratones en estudio fueron diluidas 1:500 con suero fetal bovino al 10%. La reacción se detuvo a los 5 min. Cada punto representa el resultado de un animal evaluado por triplicado. * P < 0.05, ** P < 0.01 por la prueba de Mann Whitney.

D. EVALUACIÓN DE LOS POTENCIALES DE SENSIBILIZACIÓN Y DE SENSIBILIZACIÓN RESIDUAL DE α -CASEÍNAS TRATADAS TÉRMICAMENTE

El potencial de sensibilización se puede definir como la capacidad de un material para sensibilizar y si se demuestra que la IgE producida es biológicamente activa, es decir, se confirman las reacciones alérgicas, entonces se define como potencial alérgico (Verhoeckx y col, 2015). La evaluación de estos potenciales puede realizarse mediante la administración ip del alérgeno (Dearman y col, 2014) y es conveniente sobre todo cuando no es posible sensibilizar sin adyuvantes por la vía oral. Actualmente este modelo no es utilizado para predecir el riesgo de que una persona sensibilizada vaya a desencadenar la respuesta alérgica, si no que está diseñado para comparar la capacidad de sensibilización de proteínas alérgicas en diferentes condiciones (Ladics y col, 2014).

Como se muestra en la figura 17, las α -caseínas tratadas térmicamente a 140 °C por 30 min incrementaron significativamente su potencial de sensibilización con respecto a las α -caseínas nativas ($P < 0.05$). En cuanto a las α -caseínas tratadas térmicamente por 60 min, estas mostraron una tendencia a incrementar su potencial de sensibilización, pero tal incremento en la inmunoreactividad no fue significativo con respecto a las α -caseínas nativas ($P > 0.05$) (figura 17). Como se esperaba, la inmunización con proteína de papa no desencadenó una respuesta medible por ELISA de anticuerpos IgE, pero la respuesta de anticuerpos IgG fue fácilmente medible. De hecho, la inmunoreactividad de los anticuerpos IgG anti-proteína de papa desarrollaron densidades ópticas a 450 nm entre 2.0 y 3.2 unidades por ELISA. La OVA es un alérgeno potente bien reconocido y mostró un potencial de sensibilización mayor al de todas las proteínas probadas, aunque este potencial no mostró una diferencia significativa con respecto al potencial de sensibilización desarrollado por las α -caseínas tratadas térmicamente por 30 min a 140 °C ($P < 0.05$) (figura 17). Esto último destaca la magnitud del incremento del potencial de sensibilización que puede alcanzarse con el tratamiento térmico en seco de las α -caseínas.

Los mecanismos precisos que conducen a un incremento en el potencial de sensibilización cuando las α -caseínas son tratadas térmicamente por 30 min a 140 °C y luego este se reduce casi a niveles del potencial de sensibilización de las α -caseínas nativas tras un calentamiento mas prolongado están fuera del alcance de la presente tesis. Debido a la alta pérdida de solubilidad de las α -caseínas tratadas térmicamente, la agregación podría ser un evento que ocurrió durante el calentamiento térmico en seco de las α -caseínas. Este evento, el cual es inducido por la formación de puentes disulfuro intermoleculares, ha mostrado ser efectivo para reducir el potencial alérgico de la β -lactoglobulina (Thomas y col, 2007), pero nuestros resultados indican que esto no ocurre para las α -caseínas. En cuanto al hecho de algunos pacientes alérgicos pueden tolerar la leche extensivamente calentada (Nowak y col, 2008; Kim y col, 2011), esto puede atribuirse a las interacciones de las proteínas alérgicas de la leche con otros componentes de la matriz alimentaria tales como interacciones aminoácidos/azúcares (reacciones de Maillard) o interacciones de las caseínas con otras proteínas, por mencionar algunos.

En base a los resultados presentados anteriormente, podría plantearse la siguiente pregunta ¿es posible que el calentamiento de las α -caseínas a mayores temperaturas o por mas de 60 min reduzca su potencial de sensibilización? Por ahora es difícil abordar experimentalmente esta pregunta basandose en la respuesta inmune de anticuerpos evaluada mediante ensayos *in vivo* debido en gran parte a la perdida excesiva de la solubilidad de la proteína, lo cual compromete sustancialmente la administración del antígeno. Alternativamente, la evaluación del potencial de sensibilización y/o alergenicidad residual es un parámetro que refleja la inmunoreactividad (*in vitro* o *in vivo*) de un organismo sensibilizado a un alérgeno modificado, cuando dicho alérgeno dio origen a la sensibilización en su estado nativo (van Esch y col, 2011; van Esch y col, 2013). A diferencia del potencial de sensibilización, este parámetro indica la capacidad de los anticuerpos IgE producidos por los ratones sensibilizados con α -caseínas nativas para reconocer las α -caseínas tratadas térmicamente.

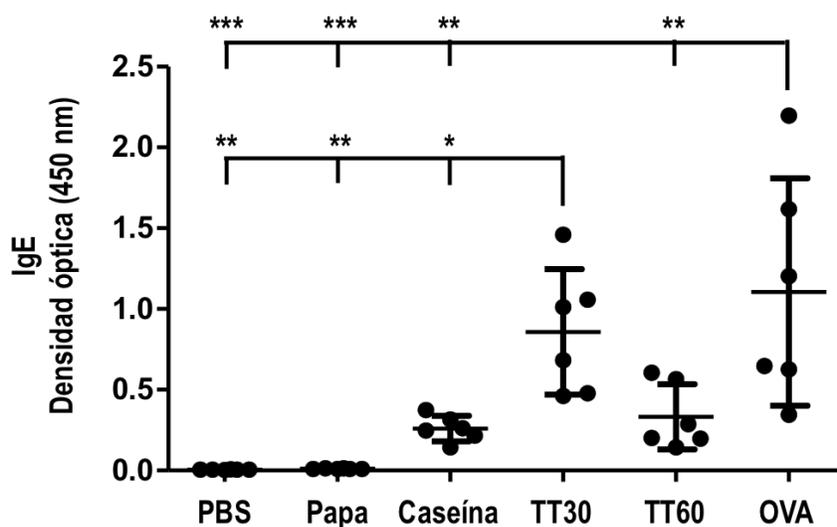


Figura 17. Evaluación de los potenciales de sensibilización de α -caseínas tratadas térmicamente. Las muestras fueron obtenidas de ratones inmunizados ip en cinco ocasiones (protocolo de 28 días) con 0.05 mg de α -caseínas. Se pegaron 20 μ g de antígeno por pozo en la microplaca. Las muestras de suero de los ratones en estudio fueron diluidas 1:10 con suero fetal bovino al 10%. Cada punto representa el resultado de un animal evaluado por triplicado después de sustraer el fondo de reacción. Se consideró como fondo de reacción la absorbancia obtenida del análisis de las muestras preinmune. Caseína; α -caseínas nativas, TT30 y TT60; α -caseínas tratadas térmicamente por 30 y 60 min respectivamente. * $P < 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ por la prueba de Kruskal-Wallis.

Como se muestra en la figura 18a, los anticuerpos IgE en el suero de los ratones sensibilizados con α -caseínas nativas reconocieron con mayor inmunoreactividad a la α -caseína tratada térmicamente por 30 min que a la α -caseína en su estado nativo ($P < 0.05$). De igual forma, aunque las α -caseínas tratadas térmicamente por 60 min no incrementaron significativamente su potencial de sensibilización comparado a las α -caseínas nativas ($P > 0.05$) (figura 17), el suero de los ratones sensibilizados con α -caseínas nativas mostró mayor inmunoreactividad a las α -caseínas tratadas térmicamente por 60 min que a las α -caseínas en condiciones nativas ($P < 0.05$) (figura 18b). Así, debido a la afinidad incrementada de los anticuerpos IgE anti- α -caseína nativa por las α -caseínas tratadas térmicamente, la administración de estas últimas a organismos previamente sensibilizados a α -caseínas nativas no es conveniente.

Ciertamente, en este punto de la presente tesis quedaba rechazada la segunda hipótesis planteada “es posible que un principio combinado basado en la administración oral de probióticos y el tratamiento térmico de proteínas es una alternativa efectiva para **controlar o prevenir la respuesta inmune alérgica a caseínas debido a un potencial de sensibilización reducido de las caseínas tratadas térmicamente** y a una despolarización de la respuesta alérgica e inducción de células T reguladoras”. Sin embargo, los resultados obtenidos representan un avance considerable en la carrera por desarrollar un modelo murino de alergia apto para evaluar la alergenicidad de las proteínas de la leche bovina en diferentes condiciones, lo cual permitiría evaluar estrategias dirigidas a prevenir o tratar la alergia a este alimento.

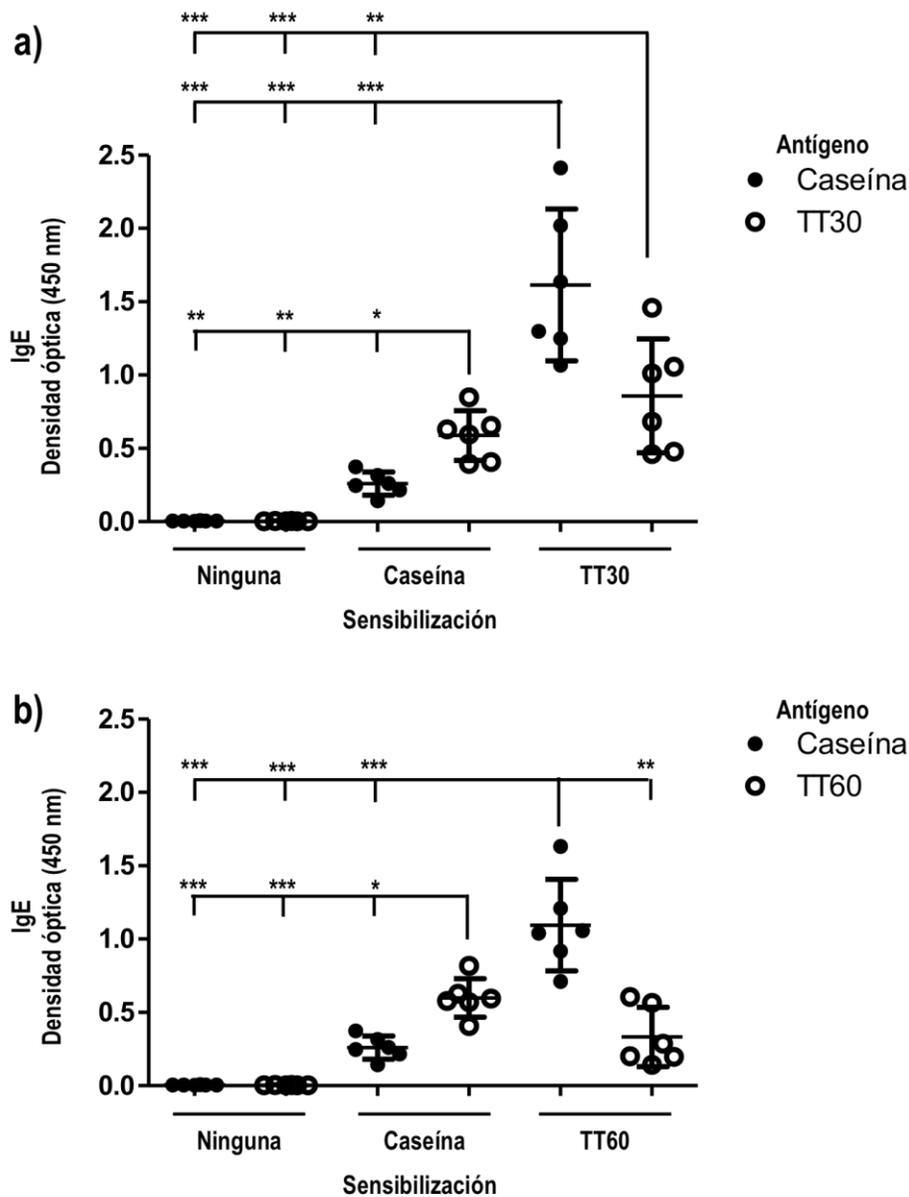
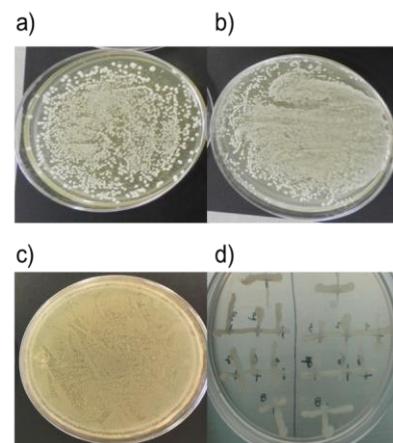


Figura 18. Evaluación de los potenciales de sensibilización residual de α -caseínas tratadas térmicamente. a) y b) potenciales de sensibilización de α -caseínas tratadas térmicamente por 30 o 60 min a 140 °C respectivamente. Las muestras fueron obtenidas de ratones inmunizados ip en cinco ocasiones (protocolo de 28 días) con 0.05 mg de α -caseínas. Se pegaron 20 μ g de antígeno por pozo en la microplaca. Las muestras de suero de los ratones en estudio fueron diluidas 1:10 con suero fetal bovino al 10%. Cada punto representa el resultado de un animal evaluado por triplicado después de sustraer el fondo de reacción. Se consideró como fondo de reacción la absorbancia obtenida del análisis de las muestras preinmune. Ninguno; grupos a los que solo se les administró PBS, caseína; α -caseínas nativas, TT30 y TT60; α -caseínas tratadas térmicamente por 30 o TT60 min respectivamente. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ por la prueba de Kruskal-Wallis.

E. EVALUACIÓN DE LA SUPLEMENTACIÓN CON PROBIÓTICOS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE ALÉRGICA A CASEÍNAS CON POTENCIAL DE SENSIBILIZACIÓN REDUCIDO EN RATONES BALB/c SENSIBILIZADOS CON α -CASEÍNAS NATIVAS.

El tratamiento térmico de α -caseínas incremento su potencial de sensibilización y de sensibilización residual terminando así con la posibilidad de promover tolerancia inmunológica adquirida en organismos previamente sensibilizados con α -caseínas nativas y suplementados con probióticos. Para fines de la presente tesis se adquirió el probiótico VSL#3 comercialmente disponible, el cual consta de una mezcla de microorganismos Gram positivos. La viabilidad de los probióticos adquiridos se confirmó cultivandolos en agar MRS selectivo para lactobacilos (figura 19a) y en medio de cultivo no selectivo como el agar tripticasa de soya (figura 19b). Para propósitos de despolarizar la respuesta alérgica en ratones, usualmente 7.5×10^8 microorganismos son administrados por la vía oral a los animales de estudio y se deben realizar suplementaciones diarias por periodos de al menos 20 días (Schiavi y col, 2010; Barletta y col, 2013). Otros esquemas de suplementación menos exhaustivos no han sido evaluados en el modelo del ratón. Como se muestra en las figuras 19c y 19d, la biota normal del ratón es rica en lactobacilos y al 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 desarrollo de la mezcla de microorganismos probióticos contenidos en el VSL#3. Así, es probable que esquemas de suplementación con VSL#3 menos exhaustivos puedan tener un efecto sobre la despolarización de la respuesta alérgica a las proteínas de los alimentos.

Figura 19. Cultivo de probióticos. a) Lactobacilos contenidos en el probiótico VSL#3 cultivados en el medio selectivo MRS, b) microorganismos contenidos en el probiótico VSL#3 cultivados en agar TSA, c) lactobacilos de muestras de heces de ratones BALB/c cultivados en medio MRS (1 mg de heces se homogenizaron en 1 mL de solución salina), d) prueba de reto de cremiento entre la microbiota duodenal general y solo los lactobacilos de los ratones (lado izquierdo y derecho de la imagen respectivamente) vs los probióticos contenidos en el VSL#3 (diferentes diluciones) en medio TSA. Se tomaron colonias de la biota duodenal de los ratones cultivadas en medio MRS o TSA por 24 h (líneas horizontales) y se retaron con diferentes diluciones de los probióticos contenidos en el VSL#3. En a) y b), para el cultivo se tomaron 20 μ L de una suspensión de microorganismos diluida 1:10,000 partiendo de una solución madre de una capsula de VSL#3 en 10 mL de solución salina fisiológica. En c), para el cultivo se tomaron 20 μ L de la parte superior de la suspensión de heces. MRS; Agar para lactobacilos, TSA; agar tripticasa de soya.



IX CONCLUSIONES

El presente estudio muestra que la tasa de prevalencia de alergia persistente a la leche bovina reportada por los padres en la población escolar de Culiacán, Sinaloa es de 0.29%. Los resultados también muestran que este trastorno inmunológico desencadena reacciones alérgicas severas en la población estudiada y que los individuos afectados no cuentan con el tratamiento de emergencia adecuado para evitar el choque anafiláctico. Esto pone de manifiesto la necesidad de desarrollar estrategias dirigidas a promover la adquisición de tolerancia inmunológica a las proteínas de la leche bovina en los individuos alérgicos a este alimento. En este contexto, se implementó un modelo murino de sensibilización libre de adyuvantes a α -caseínas bovinas. Este modelo es apto para comparar la capacidad de sensibilización de las proteínas alérgicas de la leche en diferentes condiciones. Utilizando este modelo fue posible evaluar el potencial de sensibilización de α -caseínas bovinas tratadas térmicamente. Desafortunadamente, el potencial de sensibilización de las α -caseínas tratadas no solo no disminuyó, sino que se vio incrementado con respecto a las caseínas nativas. En general, el presente trabajo sienta las bases para evaluar diferentes estrategias dirigidas a disminuir el potencial de sensibilización de las proteínas de la leche bovina o para evaluar el impacto de procesos biotecnológicos que involucren este tipo de proteínas.

X REFERENCIAS

- Adel-Patient K, Bernard H, Ah-Leung S, Creminon C, Wal JM. 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*. 60:658-664.
- Ahmadova A, El-Ghaish S, Choiset Y, Rabesona H, Drouet M, Chobert E, Kuliev A y Haertle T. 2013. Modification of IgE binding to β - and α S1-Caseins by Proteolytic Activity of *Lactobacillus Helveticus* A75. *J Food Biochem*. 37:491-500.
- Astwood JD, Leach JN, Fuchs RL, 1996. Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat Biotechnol*. 14:1269-1273.
- Avery NJ, King RM, Knight S y Hourihane JO. 2003. Assessment of quality of life in children with peanut allergy. *Pediatr Allergy Immunol*. 14:378-382.
- Bahna SL. 2008. Hypoallergenic formulas: optimal choices for treatment versus prevention. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 101: 453-459.
- Banon GA, Goodman RE, Leach JN, Rice E, Fuchs RL, Astwood JD. 2002. Digestive stability in the context of assessing the potential allergenicity of food proteins. *Comments on Toxicol*. 8:271-285.
- 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. *Mol Nutr Food Res*. 57:2233-2244.
- Barone KS, Reilly MR, Flanagan MP y Michael JG. 2000. Abrogation of oral tolerance by feeding encapsulated antigen. *Cell Immunol*. 199: 65-72.
- Bégin P, Winterroth LC, Dominguez T, Wilson SP, Bacal L, Mehrotra A, Kausch B, Trela A, Hoyte E, O'Riordan G, Seki S, Blakemore A, Woch M, Hamilton RG y Nadeau KC. 2014. Safety and feasibility of oral immunotherapy to multiple allergens for food allergy. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 10:1.
- Ben-Shoshan M, Harrington DW, Soller L, Fragapane J, Joseph L, St Pierre Y, Godefroy SB, Elliott SJ y Clarke AE. 2010. A population-based study on peanut, tree nut, fish, shellfish, and sesame allergy prevalence in Canada. *J Allergy Clin Immunol*. 125: 1327-1335.

- Berin MC. 2015. Pathogenesis of IgE-mediated food allergy. *Clin Exp Allergy*. 45: 1483-1496.
- Berin MC y Sicherer S. 2011. Food allergy: mechanisms and therapeutics. *Cur Opin Immunol*. 23:794-800.
- Berni CR, Di Costanzo M, Bedogni G, Amoroso A, Cosenza L, Di Scala C, Granata V, Nocerino R. 2016. Extensively hydrolyzed casein formula containing *Lactobacillus rhamnosus* GG reduces the occurrence of other allergic manifestations in children with cow's milk allergy: 3-year randomized controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*. doi: 10.1016/j.jaci.2016.10.050.
- Berni CR, Nocerino R, Terrin G, Coruzzo A, Cosenza L, Leone L y Troncone R. 2012. Effect of *Lactobacillus* GG on tolerance acquisition in infants with cow's milk allergy: a randomized trial. *J Allergy Clin Immunol*. 129: 580-582.
- Berni CR, Nocerino R, Terrin G, Frediani T, Lucarelli S, Cosenza L, Passariello A, Leone L, Granata V, Di Costanzo M, Pezzella V y Troncone R. 2013. Formula selection for management of children with cow's milk allergy influences the rate of acquisition of tolerance: a prospective multicenter study. *J Pediatrics*. 163:771-777.
- Berni CR, Nocerino R, Terrin G, Leone L y Troncone R. 2012. Hospital admissions for food-induced anaphylaxis in Italian children. *Clin Exp Allergy*. 42:1813-1814.
- Bibiloni R, Fedorak RN, Tannock GW, Madsen KL, Gionchetti P, Campieri M, De Simone C, Sartor RB. 2005. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 100:1539-1546.
- Birmingham N, Payankulam S, Thanavorakul S, Stefura B, HayGlass K, Gangur V. 2003. An ELISA-based method for measurement of food-specific IgE antibody in mouse serum: an alternative to the passive cutaneous anaphylaxis assay. *J Immunol Methods*. 275:89-98.
- Bohnen C, Wangorsch A, Schulke S, Nakajima-Adachi H, Hachimura S, Burggraf M, Suzer Y, Schwantes A, Sutter G, Waibler Z. 2013. Vaccination with recombinant modified vaccinia virus Ankara prevents the onset of intestinal allergy in mice. *Allergy*. 68:1021-1028.
- Bonomi F, Fiocchi A, Frøkiaer H, Gaiaschi A, Iametti S, Poiesi C, Rasmussen P, Restani P y Rovere P. 2003. Reduction of immunoreactivity of bovine beta-lactoglobulin upon combined physical and proteolytic treatment. *J Dairy Res*. 70:51-59.
- Boyano-Martínez T, García-Ara C, Pedrosa M, Díaz-Pena JM, Quirce S. 2009. Accidental allergic reactions in children allergic to cow's milk proteins. *J Allergy Clin Immunol*. 123:883-888.

- Brown SJ, Asai Y, Cordell HJ, Campbell LE, Zhao Y, Liao H, Northstone K, Henderson J, Alizadehfar R, Ben-Shoshan M, Morgan K, Roberts G, Masthoff LJ, Pasmans SG, van den Akker PC, Wijmenga C, Hourihane JO, Palmer CN, Lack G, Clarke A, Hull PR, Irvine AD y McLean WH.. 2011. Loss-of-function variants in the filaggrin gene are a significant risk factor for peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 127:661-667.
- Brunner R, Jensen-Jarolim E, Pali-Schöll I. 2010. The ABC of clinical and experimental adjuvants-A brief overview. *Immunol Lett.* 128:29-35.
- Brunner R, Wallmann J, Szalai K, Karagiannis P, Altmepfen H, Riemer AB, Jensen-Jarolim E, Pali-Schöll I. 2009. Aluminum *per se* and in the anti-acid drug sucralfate promotes sensitization via the oral route. *Allergy.* 64:890-897.
- Brunner R, Wallmann J, Szalai K, Karagiannis P, Kopp T, Scheiner O, Jensen-Jarolim E, Pali-Schöll I. 2007. The impact of aluminium in acid-suppressing drugs on the immune response of BALB/c mice. *Clin Exp Allergy.* 37:1566-1573.
- Buehler EV. 1996. Nonspecific hypersensitivity: False-positive responses with the use of Freund's complete adjuvant. *Contact Dermatitis.* 34:111-114.
- Chafen JJ, Newberry SJ, Riedl MA, Bravata DM, Maglione M, Suttrop MJ, Sundaram V, Paige NM, Towfigh A, Hulley BJ y Shekelle PG. 2010. Diagnosing and managing common food allergies: a systematic review. *JAMA.* 303:1848-1856.
- Chatchatee P, Järvinen KM, Bardina L, Beyer K y Sampson HA. 2001. Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on alpha(s1)-casein: differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol,* 107:379-383.
- Chen C, Sun N, Li Y 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 Chem Toxicol.* 62:41-47.
- Chen J, Hu Y, Allen KJ, Ho MH y Li H. 2011. The prevalence of food allergy in infants in Chongqing, China. *Pediatr Allergy Immunol.* 22: 356-360.
- Chicón R, Belloque J, Alonso E y López-Fandiño R. 2008. Immunoreactivity and digestibility of high-pressure-treated whey proteins. *Int Dairy J.* 18:367-376.

- Chicón R, López-Fandiño R, Alonso E y Belloque J. 2008. Proteolytic Pattern, Antigenicity, and Serum Immunoglobulin E Binding of β -Lactoglobulin Hydrolysates Obtained by Pepsin and High-Pressure Treatments. *J Dairy Sci.* 91:928-938.
- Chromik C, Partschefeld C, Jaros D, Henle T y Rohm H. 2010. Adjustment of vat milk treatment to optimize whey protein transfer into semi-hard cheese: A case study. *J Food Eng.* 100:496-503.
- Ciardello MA, Tamburrini M, Liso M, Crescenzo R, Rafaianni C y Mari A. 2013. Food allergen profiling: A big challenge. *Food Res Int.* 54:1033-1041.
- Cocco RR, Järvinen KM, Sampson HA y Beyer K. 2003. Mutational analysis of major, sequential IgE-binding epitopes in alpha s1-casein, a major cow's milk allergen. *J Allergy Clin Immunol.* 112:433-447.
- Codex Alimentarius, 2009. Foods derived from modern biotechnology. Codex Alimentarius Commission, joint FAO/WHO Food Standards Program, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Cosenza L, Nocerino R, Di Scala C, di Constanzo M, Amoroso A, Leone L, Paparo L, Pezzella C, Aitoro R, Berni Canani R. 2015. Bugs for atopy: the lactobacillus rhamnosus GG strategy for food allergy prevention and treatment in children. *Benef Microbes.* 6:225-232.
- Davis PJ y Williams SC. 1998. Protein modification by thermal processing. *Allergy.* 53(46 Suppl):102-105.
- Davis PJ, Smales CM y James DC. 2001. How can thermal processing modify the antigenicity of proteins? *Allergy.* 56 Suppl 67: 56-60.
- Dearman RJ, Beresford L, Foster ES, McClain S y Kimber I. 2014. Characterization of the allergenic potential of proteins: an assessment of the kiwifruit allergen actinidin. *J Appl Toxicol.* 34: 489-497.
- Dearman RJ, Caddick H, Stone S, Basketter DA, Kimber I. 2001 (a). Characterization of antibody responses induced in rodents by exposure to food proteins: influence of route of exposure. *Toxicology.* 167:217-231.
- Dearman RJ, Kimber I. 2001 (b). Determination of protein allergenicity: studies in mice. *Toxicol Letters.* 120:181-186.
- Dearman RJ, Kimber I. 2007. A mouse model for food allergy using intraperitoneal sensitization. *Methods.* 41:91-98.

- Dunkin D, Berin MC y Mayer L. 2011. Allergic sensitization can be induced via multiple physiologic routes in an adjuvant-dependent manner. *J Allergy Clin Immunol.* 128: 1251-1258.
- Eigenmann PA. 2000. Anaphylactic reactions to raw eggs after negative challenges with cooked eggs. *J Allergy Clin Immunol.* 105:587-588.
- Eldred NR, Rodney G. 1946. The effect of proteolytic enzymes on raw and heated casein. *J Biol Chem.* 162:261-265.
- El-Ghaish S, Ahmadova A, Hadji-Sfaxi I, El Mecherfi KE, Bazukyan I, Et al. 2011. Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends Food Sci Technol.* 22:509-516.
- El-Ghaish S, Rabesona H, Choiset Y, Sitohy M, Haertlé T, et al. 2011. Proteolysis by *Lactobacillus fermentum* IFO3956 isolated from Egyptian milk products decreases immuno-reactivity of α S1-casein. *J Dairy Res.* 9:1-8.
- FAO (Food and Agriculture Organization)/WHO (World Health Organization). 2001. Evaluation of the allergenicity of genetically modified foods. Report of joint FAO/WHO expert consultation, Rome, Italy.
- Feldman MF, Bird JA. 2014. Oral immunotherapy for food allergy, ready to prime? Heated egg and milk. *Curr Allergy Asthma Rep.* 14:436.
- Fleischer DM, Perry TT, Atkins D, Wood RA, Burks AW, Et al. 2012. Allergic reactions to foods in preschool-aged children in a prospective observational food allergy study. *Pediatrics.* 130:e25-32.
- Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO). 2001. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (Rome, Italy).
- Foster ES, Kimber I, Dearman RJ. 2013. Relationship between protein digestibility and allergenicity: Comparisons of pepsin and cathapsin. *Toxicology.* 309:30-38.
- Ganeshan K, Neilsen CV, Hadsaitong A, Schleimer RP, Luo X, Bryce PJ. 2009. Impairing oral tolerance promotes allergy and anaphylaxis: a new murine food allergy model. *J Allergy Clin Immunol.* 123:231-238.

- García-Ara MC, Boyano-Martínes MT, Díaz-Pena JM, Martín-Muñoz F, Pascual-Marcos C, García-Sánchez G, Martín-Estaban M. 2003. Incidencia de alergia a proteínas de leche de vaca en el primer año de vida y su repercusión en el consumo de hidrolizados. *An Pediatr (Barc)*. 58:00-105.
- Garnett WR. 1982. Sucralfate-alrnative therapy for peptic-ulcer disease. *Clin Pharm*. 1:307-314.
- Gianfrani C, Siciliano RA, Facchiano AM, Camarca A, Mazzeo MF, et al. 2007. Transamidation of wheat flour inhibits the response to gliadin of intestinal T cells in celiac disease. *Gastroenterology*. 133: 780-789.
- Giovannini M, D'Auria E, Caffareli C, Verduci E, Barberi S, Indinnimeo L, Dello Iacono I, Martelli A, Riva E, Bernardini R. 2014. Nutritional management and follow up of infants and children with food allergy: Italian society of pediatric nutrition/Italian society of pediatric allergy and immunology task force position statement. *Ital J Pediatr*. doi: 10.1186/1824-7288-40-1
- Golias J, Schwarzer M, Wallner M, Kverka M y Kozakova H. 2012. Heat-induced structural changes affect OVA-antigen processing and reduce allergic response in mouse model of food allergy. *PLoS One*. 7:e37156.
- Gonipeta B, Parvataneni S, Tempelman RJ, Gangur V. 2009. An adjuvant-free mouse model to evaluate the allergenicity of milk whey protein. *J Dairy Sci*. 92:4738-4744.
- Gupta RS, Springston EE, Warriar MR, Smith B, Kumar R, Et al. 2011. The prevalence, severity, and distribution of childhood food allergy in the United States. *Pediatrics*. 128:e9-e17
- Hattori M, Miyakawa S, Ohama Y, Kawamura H, Yoshida T, et al. 2004. Reduced immunogenicity of beta-lactoglobulin by conjugation with acidic oligosaccharides. *J Agric Food Chem*. 52:4546-4553.
- He S, Zhang H, Zeng X y Yang P. 2012. Self-amplification mechanisms of mast cell activation: a new look in allergy. *Curr Mol Med*. 12:1329-1339.
- He SH, Zhang HY, Zeng XN, Chen D, Yang PC. 2013. Mast cells and basophils are essential for allergies: mechanisms of allergic inflammation and a proposed procedure for diagnosis. *Acta Pharmacol Sin*. 34:1270-1283.
- Herman RA, Song P, Kumpatia S. 2015. Percent amino-acid identity thresholds are not necessarily conservative for predicting allergenic cross-reactivity. *Food Chem Toxicol*. 81:141-142.

- Hilton J, Dearman RJ, Sattar N, Basketter DA y Kimber I. 1997. Characteristics of antibody responses induced in mice by protein allergens. *Food Chem Toxicol.* 35:1209-1218.
- Ho MH, Lee SL, Wong WH, Ip P y Lau YL. 2012. Prevalence of self-reported food allergy in Hong Kong children and teens--a population survey. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 30:275-284.
- Hopp TP y Woods KR. 1981 Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Nat Acad of Sci U S A.* 78:3824-3828.
- Host A, Halcken S. 1990. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first 3 years of life. Clinical course in relation to clinical and immunological type of hypersensitivity reaction. *Allergy.* 45:587-596.
- Hoyos-Bachilloglu R, Ivanovic-Zivic D, Alvarez J, Linn K, Thöne N, Et al. 2014. Prevalence of parent-reported immediate hypersensitivity food allergy in Chilean school-aged children. *Allergol Immunopathol (Madr).* 42:527-532..
- Hsieh KY, Hsu CI, Lin JY, Tsai CC, Lin RH. 2003. Oral administration of an edible-mushroom-derived protein inhibits the development of food-allergic reactions in mice. *Clin Exp Allergy.* 33:1595-1602.
- Hu Y, Chen J y Li H. 2009. Comparison of food allergy prevalence among Chinese infants in Chongqing, 2009 versus 1999. *Pediatr Int.* 52:820-824.
- Iametti S, Transidico P, Bonomi F, Vecchio G, Pittia P, Et al. 1997. Molecular modifications of β -lactoglobulin upon exposure to high pressure. *J Agric Food Chem.* 45:23-29.
- Izadi N, Luu M, Ong PY, Tam JS. 2015. The role of skin barrier in the pathogenesis of food allergy. *Children (Basel).* 2:382-402.
- Järvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Beyer K y Sampson HA. 2001. IgE and IgG binding epitopes on alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin in cow's milk allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 126:111-118.
- Kaddouri H, Mimoun S, El-Mecherfi KE, Chekroun A, Kheroua O, Et al. 2008. Impact of gamma-radiation on antigenic properties of cow's milk beta-lactoglobulin. *J Food Prot.* 71: 1270-2.
- Kasera R, Niphadkar PV, Saran A, Mathur C y Singh AB. 2013. First case report of anaphylaxis caused by Rajgira seed flour (*Amaranthus paniculatus*) from India: a clinico- immunologic evaluation. *Asia Pac J Allergy Immunol.* 31:79-83.

- Kim HJ, Camilleri M, McKinzie S, Lempke MB, Burton DD, Thomforde GM, Zinsmeister AR. 2003. A randomized controlled trial of a probiotic, VSL#3, on gut transit and symptoms in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Alimen Pharmacol Ther.* 17:895-904.
- Kim HJ, Kim HY, Lee SY, Seo JH, Lee E, Hong SJ. 2013. Clinical efficacy and mechanism of probiotics in allergic diseases. *Korean J Pediatr.* 56:369-376.
- Kim HJ, Vazquez-Roque MI, Camilleri M, Stephens D, Burton DD, Baxter K, Thomforde G, Zinsmeister AR. A randomized controlled trial of a probiotic combination VSL#3 and placebo in irritable bowel syndrome with bloating. *Neurogastroenterol Motil.* 17:687-696.
- Kim JS, Nowak-Węgrzyn A, Sicherer SH, Noone S, Moshier EL, Et al. 2011. Dietary baked milk accelerates the resolution of cow's milk allergy in children. *J Allergy Clin Immunol.* 128:125-131.
- Kimber I, Dearman RJ, Penninks AH, Knippels LM, Buchanan RB, Hammerberg B, Jackson HA y Helm RM. 2003. Assessment of protein allergenicity on the basis of immune reactivity: animal models. *Environ Health Perspec,* 111:1125-1130.
- Kimber I, Stone S, Dearman RJ. 2003. Assessment of the inherent allergenic potential of proteins in mice. *Environmental Health Perspectives.* 111:227:231.
- Kirstein F, Horsnell WG, Nieuwenhuizen N, Ryffel B, Lopata AL, Brombacher F. 2010. Anisakis pegreffii-induced airway hyperresponsiveness is mediated by gamma interferon in the absence of interleukin-4 receptor alpha responsiveness. *Infect Immunol.* 78:4077-4086.
- Koletzko S, Niggemann B, Arato A, Dias JA, Heuschkel R, et al. 2012. Diagnostic approach and management of cow's-milk protein allergy in infants and children: ESPGHAN GI Committee practical guidelines. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 55:221-229.
- Konstantinou GN, Giavi S, Kalobatsou A, Vassilopoulou E, Douladiris N, Et al. 2008. Consumption of heat-treated egg by children allergic or sensitized to egg can affect the natural course of egg allergy: hypothesis-generating observations. *J Allergy Clin Immunol.* 122:414-415.
- Konstantinou GN, Kim JS. 2012. Paradigm shift in the management of milk and egg allergy: baked milk and egg diet. *Immunol Allergy Clin North Am.* 32:151-164.
- Kotz D, Simpson CR y Sheikh A. 2011. Incidence, prevalence, and trends of general practitioner-recorded diagnosis of peanut allergy in England, 2001 to 2005. *J Allergy Clin Immunol.* 127:623-630.

- Krishnamurthy D, Starkl P, Szalai K, Roth-Walter F, Diesner SC, Mittlboeck M, Mannhalter C, Untersmayr E, Jensen-Jarolim E. 2012. Monitoring neutrophils and platelets during casein-induced anaphylaxis in an experimental BALB/c mouse model. *Clin Exp Allergy*. 42:1119-1128.
- Ladics GS, Fry J, Goodman R, Herouet-Guichenev C, Hoffmann-Sommergruber K, Madsen CB, Penninks A, Pómes A, Roggen EL, Smit J, Wal JM. 2014. Allergic sensitization: screening methods. *Clin Transnational Allergy*. 4:13.
- Ladics GS, Knippels LM, Penninks AH, Bannon GA, y col. 2010. Review of animal models designed to predict the potential allergenicity of novel proteins in genetically modified crops. *Reg Toxicol Pharmacol*. 56:212-224.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 15, 227:680-685.
- Lam HY, van Hoffen E, Michelsen A, Guikers K, van der Tas CHW, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Knulst AC. 2008. Cow's milk allergy in adults is rare but severe: both casein and whey proteins are involved. *Clin Exp Allergy*. 38:995-1002.
- Lao-araya M y Trakultivakorn M. 2012. Prevalence of food allergy among preschool children in northern Thailand. *Pediatr Int*. 54:238-243.
- Lee AJ, Thalayasingam M y Lee BW. 2013. Food allergy in Asia: how does it compare? *Asia Pacific Allergy*. 3: 3-14.
- Lee JW, Kim JH, Yook HS, Kang KO, Lee SY, Et al. 2001. Effects of gamma radiation on the allergenic and antigenic properties of milk proteins. *J Food Prot*. 64:272-276.
- Lee JW, Seo JH, Kim JH, Lee SY, Kim KS, Et al. 2005. Changes of the antigenic and allergenic properties of a hen's egg albumin in a cake with gamma-irradiated egg white. *Radiat Phys Chem*. 72:645-650.
- Leonard SA, Martos G, Wang W, Nowak-Węgrzyn A y Berin MC. 2012. Oral immunotherapy induces local protective mechanisms in the gastrointestinal mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 129:1579-1587.
- Liu AH, Jaramillo R, Sicherer SH, Wood RA, Bock SA, Et al. 2010. National prevalence and risk factors for food allergy and relationship to asthma: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *J Allergy Clin Immunol*. 126:798-806.

- Liu T, Navarro S, Lopata AL. 2016. Current advances of murine models for food allergy. *Mol Immunol.* 70:104-117.
- Liu ZQ, Yang X, Wang R, Hu X, Chen F. 2013. Tolerogenic CX3CR1+ B cells suppress food allergy-induced intestinal inflammation in mice. *Allergy.* 68:1241-1248.
- López-Expósito I, Chicón R, Belloque J, López-Fandiño R y Berin MC. 2012. In vivo methods for testing allergenicity show that high hydrostatic pressure hydrolysates of β -lactoglobulin are immunologically inert. *J Dairy Sci.* 95:541-548.
- Marrugo J, Hernández L y Villalba V. 2008. Prevalence of self-reported food allergy in Cartagena (Colombia) population. *Allergol Immunopathol (Madr).* 36:320-324.
- Martos G, Lopez-Exposito I, Bencharitiwong R, Berin MC y Nowak-Węgrzyn A. 2011. Mechanisms underlying differential food allergy response to heated egg. *J Allergy Clin Immunol.* 127:990–997.
- Martos G1, Lopez-Exposito I, Bencharitiwong R, Berin MC y Nowak-Węgrzyn. 2011 A. Mechanisms underlying differential food allergy response to heated egg. *J Allergy Clin Immunol.* 127:990-997.
- McClain S, Bannon GA. 2006. Animal models of food allergy: opportunities and barriers. *Curr Allergy Asthma Rep.* 6:141-144.
- McGowan EC y Keet CA. 2013. Prevalence of self-reported food allergy in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007-2010. *J Allergy Clin Immunol.* 132:1216-1219.
- Meng X, Bai Y, Gao J, Li X, Chen H. 2017. Effects of high hydrostatic pressure on the structure and potential allergenicity of the major allergen bovine β -lactoglobulin. *Food Chem.* 219:290-296.
- Micinski J, Kowalski IM, Zwierzchowski G, Szarek J, Pierozynski B, Et al. 2012. Characteristics of cow's milk proteins including allergenic properties and methods for its reduction. *Pol Ann Med.* 20:69–76.
- Mocanu AM, Moldoveanu C, Odochian L, Paius CM, Apostolescu N, Neculau R. 2012. Study on the thermal behavior of casein under nitrogen and air atmosphere by means of the TG-FTIR technique. *Thermochim Acta.* 546:120-126.
- Mondoulet L, Dioszeghy V, Vanoirbeek JA, Nemery B, Dupont C, Et al. 2011. Epicutaneous immunotherapy using a new epicutaneous delivery system in mice sensitized to peanuts. *Int Arch Allergy Immunol.* 154:299-309.

- Morafo V, Srivastava K, Huang CK, Cleiner G, Lee SY, Sampson HA, Li XM. 2003. Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential Tn2-Th1 responses in C3H/HeJ and BALB/c mice. *J Allergy Clin Immunol.* 111: 1122-1128.
- Morin S, Bernard H, Przybylski-Nicaise L, Corthier G, Rabot S, Wal JM, Hazebrouck S. 2011. Allergenic and immunogenic potential of cow's milk –lactoglobulin and caseins evidenced without adjuvant in germ-free mice. *Mol Nutr Food Res.* 55:1700-1707.
- Mousan G, Kamat D. 2016. Cow's milk protein allergy. *Clin Pediatr (Phila).* 55:1054-1063.
- Nakamura S, Suzuki Y, Ishikawa E, Yakushi T, Jing H, et al. 2008. Reduction of in vitro allergenicity of buckwheat Fag e 1 through the Maillard-type glycosylation with polysaccharides. *Food Chem.* 109:538–545.
- NIAID-Sponsored Expert Panel¹, Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *J Allergy Clin Immunol.* 126:51-58.
- Nowak-Wegrzyn A, Bloom KA, Sicherer SH, Shreffler WG y Noone S. 2008. Tolerance to extensively heated milk in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 122:342-347.
- Nowak-Wegrzyn A, Bloom KA, Sicherer SH, Shreffler WG, Noone S, Et al. 2008. Tolerance to extensively heated milk in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 122:342-347.
- Nurmatov U, Dhimi S, Arasi S, Pajno GB, Fernandez-Rivas M, Muraro A, Roberts G, Akdis C, Alvaro-Lozano M, Beyer K, Blindslev-Jensen C, Burks W, du Toit G, Ebisawa M, Eigenmann P, Knol E, Makela M, Nadeau KC, O'Mahony L, Papadopoulos N, Poulsen LK, Sackesen C, Sampson H, Santos A, van Ree R, Timmermans F, Sheikh A. 2017. Allergen immunotherapy for IgE-mediated food allergy: a systematic review and meta-analysis. *Allergy.* doi: 10.1111/all.13124.
- Nwaru BI, Hickstein L, Panesar SS, Muraro A, Werfel T, Et al. 2013. The epidemiology of food allergy in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy.* 69:62-75..
- Oettgen HC, Burton OT. 2015. IgE receptor signaling in food allergy pathogenesis. *Curr Opin Immunol.* 36: 109-114.
- Ontiveros N, Flores-Mendoza LK, Canizalez-Román VA y Cabrera-Chavez F. 2014. Food Allergy: Prevalence and Food Technology Approaches for the Control of IgE-mediated Food Allergy. *Austin J Nutr Food Sci.* 2:7.

- Ontiveros N, López-Gallardo JA, Vergara-Jiménez MJ, Cabrera-Chávez F. 2015. Self-reported prevalence of symptomatic adverse reactions to gluten and adherence to gluten-free diet in an adult Mexican population. *Nutrients*. 7:6000-6015.
- Ontiveros N, Valdez-Meza EE, Vergara-Jiménez MJ, Canizalez-Román A, Borzutzky A, Cabrera-Chávez F. 2016. Parent-reported prevalence of food allergy in Mexican schoolchildren: A population-based study. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 44:563-570.
- Osborne NJ, Koplin JJ, Martin PE, Gurrin LC, Lowe AJ, Et al. 2011. Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants. *J Allergy Clin Immunol*. 127:668-676.
- Oyoshi MK, Murphy GF y Geha RS. 2009. Filaggrin-deficient mice exhibit TH17-dominated skin inflammation and permissiveness to epicutaneous sensitization with protein antigen. *J Allergy Clin Immunol*. 124:485-493.
- Pader M, Melnick D, Oser BL. 1948. Factors affecting the availability of Lysine in heat-processed casein. *J Biol Chem*. 172:763-769.
- Pali-Schöll I, Yildirim AÖ, Ackermann U, Knauer T, Becker C, Garn H, Renz H, Jensen-Jarolim E, Fehrenbach H. 2008. Anti-acids lead to immunological and histological changes in the intestine of BALB/c mice similar to human food allergy. *Exp Toxicol Pathol*. 60:337-345.
- Pan DD, Wu Z, Liu J, Cao XY y Zeng XQ. 2013. Immunomodulatory and hypoallergenic properties of milk protein hydrolysates in ICR mice. *J Dairy Sci*. 96:4958-4964.
- Park M, Kim D, Ahn K, Kim J, Han Y. 2014. Prevalence of immediate-type food allergy in early childhood in Seoul. *Allergy Asthma Immunol Res*. 6:131-136.
- Parker JM, Guo D y Hodges RS. 1986. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry*. 25: 5425-5432.
- Pescuma M, Hébert EM, Rabesona H, Drouet M, Choiset Y, et al. 2011. Proteolytic action of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 656 reduces antigenic response to bovine β -lactoglobulin. *Food Chem*. 127: 487-492.
- Pilegaard K, Madsen C. 2004. An oral brown Norway rat model for food allergy: comparison of age, sex, dosing volume, and allergen preparation. *Toxicology*. 196:247:257.

- Poulsen LK, Vieths S, van Ree R. 2006. Allergen specific IgE testing in the diagnosis of food allergy and the event of a positive match in the bioinformatics search. *Mol Nutr Food Res.* 50:645-654.
- Reitsma M, Westerhout J, Wichers HJ, Wortelboer HM y Verhoeckx KC. 2014. Protein transport across the small intestine in food allergy. *Mol Nutr Food Res.* 58:194-205.
- Río-Navarro BE, Hidalgo-Castro EM, Sienra-Monge JL. 2009. Asma. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 66:3-33
- Rodríguez-ortiz PG, Muñoz-Mendoza D, Arias-Cruz A, Gonzalez-Diaz SN, Herrera-Castro D y Vidaurri-Ojeda AC. 2009. Características epidemiológicas de pacientes con alergia a alimentos atendidos en el centro regional de alergias e inmunología clínica de Monterrey. *Rev Aler Mex.* 56:189-191.
- Rona RJ, Keil T, Summers C, Gislason D, Zuidmeer L, Et al. 2007. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 120:638-646.
- Rupa P, Mine Y. 2006. Engineered recombinant ovomucoid third domain can desensitize Balb/c mice of egg allergy. *Allergy.* 61:836-842.
- Saarinen KM, Juntunen-Backman K, Järvenpää AL, Kuitunen P, Lope L, Renlund M, Siivola M, Savilahti E. 1999. Supplementary feeding in maternity hospitals and the risk of cow's milk allergy: A prospective study of 6209 infants. *J Allergy Clin Immunol.* 104:457-461.
- Sackesen C, Assa'ad A, Baena-Cagnani C, Ebisawa M, Fiocchi A, Heine RG, Von Berg A y Kalayci O. 2011. Cow's milk allergy as a global challenge. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 11:243-8.
- Salimi N, Fleri W, Peters B y Sette A. 2010. Design and utilization of epitope-based databases and predictive tools. *Immunogenetics.* 62: 185-196.
- Sampson HA y Ho DG. 1997. Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. *J Allergy Clin Immunol.* 100: 444-451.
- Sampson HA. 2001. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 107:891-896.
- 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.* 66:499-508.

- Schöll I, Untersmayr E, Bakos N, Roth-Walter F, Gleiss A, Et al. 2005. Antiulcer drugs promote oral sensitization and hypersensitivity to hazelnut allergens in BALB/c mice and humans. *Ame J Clin Nutr.* 81:154-160.
- Seo JH, Lee JW, Kim JH, Byun EB, Lee SY, Et al. 2007. Reduction of allergenicity of irradiated ovalbumin in ovalbumin-allergic mice. *Rad Phys Chem.* 76: 1855–1857.
- Shek LP, Cabrera-Morales EA, Soh SE, Gerez I, Ng PZ, Yi FC, Ma S, Lee BW. 2010. A population-based questionnaire survey on the prevalence of peanut, tree nut, and shellfish allergy in 2 Asian populations. *J Allergy Clin Immunol.* 126:324-331.
- Sicherer SH, Burks AW y Sampson HA. 1998. Clinical features of acute allergic reactions to peanut and tree nuts in children. *Pediatrics.* 102: e6.
- Sicherer SH, Muñoz-Furlong A, Godbold JH y Sampson HA. 2010. US prevalence of self-reported peanut, tree nut, and sesame allergy: 11-year follow-up. *J Allergy Clin Immunol.* 125:1322-1326.
- Silva JL, Foguel D y Royer CA. 2001. Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. *Trends Biochem Sci.* 26:612–618.
- Silva LA, Silva AF, Ribeiro AC, Silva AO, Vieira FA, Segundo GR. 2016. Adult food allergy prevalence: reducing questionnaire bias. *Int Arch Allergy Immunol.* 171:261-264.
- Simons FE. 2009. Anaphylaxis: recent advances in assessment and treatment. *J Allergy Clin Immunol.* 124:625-636.
- Simons FE, Arduzzo LR, Bilò MB, Dimov V, Eibasawa M, El-Gamal YM, Ledford DK, Lockey RF, Ring J, Sanchez-Borges M, Senna GE, Sheikh A, Thong BY, Worm M. 2012. 2012 update: World allergy organization guidelines for the assessment and management of anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 12:389-399.
- Simons FE, Arduzzo LR, Bilò MB, El-Gamal YM, Ledford DK, Ring J, Sanchez-Borges M, Senna GE, Sheikh A, Thong BY. 2011. World allergy organization anaphylaxis guidelines: summary. *J Allergy Clin Immunol.* 127:587-593.
- Skripak JM, Matsui EC, Mudd K, Wood RA. 2007. The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 120:1172-1177.
- Soller L, Ben-Shoshan M, Harrington DW, Fragapane J, Joseph L, Et al. 2012. Overall prevalence of self-reported food allergy in Canada. *J Allergy Clin Immunol.* 130:986-988.

- Soller L, Ben-Shoshan M, Harrington DW, Knoll M, Fragapane J, Joseph L, St Pierre Y, La Vieille S, Wilson K, Elliott SJ, Clarke AE. 2015. Prevalence and predictors of food allergy in Canada: a focus on vulnerable populations. *J Allergy Clin Immunol.* 3:42-49.
- Somkuti J y Smeller L. 2013. High pressure effects on allergen food proteins. *Biophys Chem.* 183: 19–29.
- Störger P, Wuthrich B. 1993. Type I allergy to cow milk proteins in adults. A retrospective study of 34 adult milk- and cheese-allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol.* 102:399-407.
- Tanabe K, Kitagawa E, Wada M, Haraguchi A, Orihara K, Tahara Y, Nakao A, Shibata S. 2015. Antigen exposure in the late light period induces severe symptoms of food allergy in an OVA-allergic mouse model. *Sci Rep.* 30:14424.
- Tatto-Cano MI, Sanín-Aguirre LH, González V, Ruíz-Velazco S, Romieu I. 1997. Prevalence of asthma, rhinitis, and eczema in schoolchildren from Cuernavaca, Morelos, Mexico. *Salud Pública Mex.* 39:497-506.
- Thomas K, Aalbers M, Bannon GA, Bartels M, Dearman RJ, Esdaile DJ, Fu TJ, Glatt CM, Hadfield N, Hatzos C, Hefle SL, Heylings JR, Goodman RE, Henry B, Herouet T, Holsapple M, Ladics GS, Landry TD, MacIntosh SC, Rice EA, Privalle LS, Steiner HY, Teshima R, van Ree R, Woolhiser M, Zawodny J. 2004. A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Reg Toxicol Pharmacol.* 39:87-98.
- Thomas K, Herouet-Guicheney C, Ladics G, Bannon G, Cockburn A, Crevel R, Fitzpatrick J, Milss C, Privalle L, Vieths S. 2007. Evaluating the effect of food processing on the potential human allergenicity of novel proteins: International Workshop report. *Food Chem Toxicol.* 45:1116-1122.
- Thomas K, Herouet-Guicheney C, Ladics G, McClain S, MacIntosh S, Privalle L, Woolhiser M. 2008. Current and future methods for evaluating the allergenic potential of proteins: international workshop report 23-25 October 2007. *Food Chem Toxicol.* 46:3219-3225.
- Turner PJ. 2013. Persistent allergy to cow's milk: of greater a clinical concern than other food allergies. *Pediatric Allergy Immunology.* 24: 624-626.
- Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti GM, Forti G, Modeo ME, Gigliobianco A. 2004. Low-dose balsalazide plus a high-potency probiotic preparation is more effective than balsalazide alone or

- mesalazine in the treatment of acute mild-to-moderate ulcerative colitis. *Med Sci Monit.* 10:126-131.
- Untersmayr E y Jensen-Jarolim E. 2006. Mechanisms of type I food allergy. *Pharmacol Ther.* 112: 787-798.
- Untersmayr E, Jensen-Jarolim E. 2006. Mechanisms of type I food allergy. *Pharmacol Ther.* 112: 787-798.
- Untersmayr E, Schöll I, Swoboda I, Beil WJ, Förster-Waldl E, Et al. 2003. Antacid medication inhibits digestion of dietary proteins and causes food allergy: a fish allergy model in BALB/c mice. *J Allergy Clin Immunol.* 112: 616-623.
- van de Lagemaat J, Silván JM, Moreno FJ, Olano A y del Castillo MD. 2007. In vitro glycation and antigenicity of soy proteins. *Food Res Int.* 40:153-160.
- van der Ventel ML, Nieuwenhuizen NE, Kirstein F, Hikuam C, Jeebhay MF, Swoboda I, Brombacher F, Lopata AL. 2011. Differential response to natural and recombinant allergens in a murin model of fish allergy. *Mol Immunol.* 48:637-646.
- van Esch BCAM, Hest MG, Westerbeek H, Garssen J. 2013. Sensitizing capacity and allergenicity of enzymatically cross-linked sodium caseinate in a mouse model for cow's milk allergy. *Toxicol Letters.* 216:50-55.
- van Esch BCAM, Knipping K, Jeurink P, van der Heide S, Dubois AEJ, Willemsen LEM, Garssen J, Knippels LMJ. 2011. In vivo and in vitro evaluation of the residual allergenicity of partially hydrolysed infant formulas. *Toxicol Letters.* 201:264-269.
- van Halterena AG, van der Cammena MJ, Biewenga J, Savelkoul HJ, Kraal G. 1997. IgE and mast cell responses on intestinal allergen exposure: a murine model to study the onset of food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 99:94-99.
- van Wijk F, Nierkens S, Hassing I, Feijen M, et al. 2005. The effect of the food matrix on in vivo immune responses to purified peanut allergens. *Toxicol Sci.* 86:333-341.
- Vaz AF, Souza MP, Medeiros PL, Melo AM, Silva-Lucca RA, Santana LA, Oliva ML, Perez KR, Cuccovia IM, Correia MT. 2013. Low-dose gamma irradiation of food protein increases its allergenicity in a chronic oral challenge. *Food Chem Toxicol.* 51:46-52.
- Venturi A, Gionchetti P, Rizzello F, Johansson R, Zucconi E, Brigidi P, Matteuzzi D, Campieri M. 1999. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data

- on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 13:1103-1108.
- Verril L, Bruns R, Luccioli S. 2015. Prevalence of self-reported food allergy in U.S. adults: 2001, 2006, and 2010. *Allergy Asthma Proc.* 36:458-467.
- Vila L, Beyer K, Järvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Et al. 2001. Role of conformational and linear epitopes in the achievement of tolerance in cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy.* 31: 1599-1606.
- Wal JM. 1998. Cow's milk allergens. *Allergy.* 53: 1013-1022.
- Wang J, Lin J, Bardina L, Goldis M, Nowak-Wegrzyn A, et al. 2010. Correlation of IgE/IgG4 milk epitopes and affinity of milk-specific IgE antibodies with different phenotypes of clinical milk allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 125:695–702.
- Wavrin S, Bernard H, Wal JM, Adel-Patient K. 2015. Influence of the route of exposure and the matrix on the sensitization potency of a major cow's milk allergy. *Clin Transl Allergy.* 5:3.
- Wiechelmann KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. 1988. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem.* 175:231-237.
- Winter R, Lopes D, Grudzielanek S y Vogtt K. 2007. Towards an Understanding of the Temperature/Pressure Configurational and Free-Energy Landscape of Biomolecules. *J Non-Equili Thermodyn.* 32:41–97.
- Wood RA. 2003. The natural history of food allergy. *Pediatrics.* 111: 1631-1637.
- Wood RA, Kim JS, Lindblad R, Nadeau K, Henning AK, Dawson P, Plaut M, Sampson HA. 2016. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of omalizumab combined with oral immunotherapy for the treatment of cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 137:1103-1110.
- Wood RA, Sicherer SH, Vickery BP, Jones SM, Liu AH, Fleisher DM, Henning AK, Mayer L, Burks AW, Grishin A, Stablein D, Sampson HA. 2013. The natural history of milk allergy in an observational cohort. *J Allergy Clin Immunol.* 131:805-812.
- Woods RK, Stoney RM, Raven J, Walters EH, Abramson M, Et al. 2002. Reported adverse food reactions overestimate true food allergy in the community. *Eur J Clin Nutr.* 56:31-36.
- Wu TC, Tsai TC, Huang CF, Chang FY, Lin CC, Et al. 2012. Prevalence of food allergy in Taiwan: a questionnaire-based survey. *International Medical Journal.* 42: 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.* 67:1259-1270.

- Zhang W, Zhu Q, Zhang T, Cai Q, Chen Q. 2016. Thermal processing effects on peanut allergen Ara h 2 allergenicity in mice and its antigenic epitope structure. *Food Chem.* 212:557-662.
- Zhang Y, Chen Y, Zhao A, Li H, Mu Z, Zhang Y, 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.* 44:226-231.
- Zuidmeer L, Goldhahn K, Rona RJ, Gislason D, Madsen C, Et al. 2008. The prevalence of plant food allergies: a systematic review. *J Allergy Clin Immunol.* 121:1210-1218.