

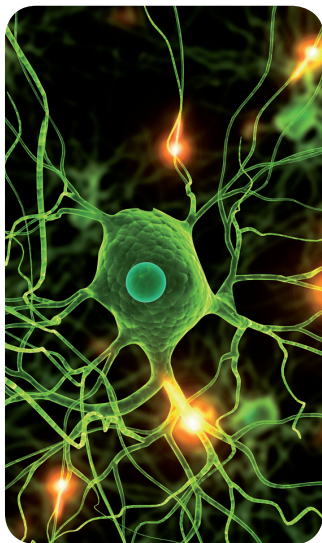
MÁSTERES de la UAM

Facultad de Ciencias
/ 15-16

Química Agrícola
y Nuevos Alimentos



excelencia Campus Internacional
UAM
CSIC+



**Optimización
de sistemas
de RT-qPCR para
el estudio de la
alergia al huevo**

*Leticia Pérez
Rodríguez*

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias



OPTIMIZACIÓN DE SISTEMAS DE RT-qPCR PARA EL ESTUDIO DE LA ALERGIA AL HUEVO



CSIC

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, CSIC-UAM)

Memoria del Trabajo Fin de Máster en Química Agrícola y Nuevos Alimentos

Leticia Pérez Rodríguez

Madrid, 2016

Leticia Pérez Rodríguez

OPTIMIZACIÓN DE SISTEMAS DE RT-qPCR PARA EL ESTUDIO DE LA ALERGIA AL HUEVO

**Directoras: Dra. Rosina López-Fandiño
Dra. Elena Molina Hernández**

Tutora académica: Dra. Mónica Rodríguez García-Risco



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Máster en Química Agrícola y Nuevos Alimentos



Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación
(CIAL, CSIC-UAM)

ROSINA LÓPEZ-FANDIÑO, PROFESORA DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN,

INFORMA:

Que el presente trabajo titulado “OPTIMIZACIÓN DE SISTEMAS DE RT-qPCR PARA EL ESTUDIO DE LA ALERGIA AL HUEVO”, que constituye el trabajo fin de Máster que presenta Leticia Pérez Rodríguez, se ha realizado bajo mi dirección y la de Elena Molina Hernández, en el Departamento de Bioactividad y Análisis de Alimentos del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL. CSIC-UAM). Además, tanto la parte experimental como la redacción de esta memoria se realizaron bajo la atenta supervisión de Daniel Lozano Ojalvo, quien además, participó activamente en la planificación de los experimentos y la interpretación de los resultados.

Y para que conste firmo el presente informe a 12 de Septiembre de 2016.



Agradecimientos

En primer lugar, dar gracias a las Dras. Rosina López-Fandiño, Elena Molina y a Daniel Lozano, por su constante apoyo y dedicación, por permitirme realizar el presente trabajo dándome su confianza, preocupándose por mi aprendizaje y ayudándome siempre a mejorar.

También quiero agradecer a la Dra. Mónica Rodríguez García-Risco, su papel como tutora académica de este trabajo y a todos los profesores que nos han impartido las asignaturas en el Máster de Química Agrícola y Nuevos Alimentos, por su profesionalidad y por los conocimientos que me han transmitido.

Gracias a todo el CIAL, equipo directivo y personal de Administración, por las facilidades ofrecidas para realizar este trabajo y al proyecto AGL2014-59771-R del Plan Nacional, donde se incluye.

GRACIAS a Daniel, la persona que más emociones me ha hecho sentir en todos estos meses, dentro y fuera del laboratorio, día y noche. Ojalá pueda seguir aprendiendo de ti, incluso cuando tengas los cascos puestos. P.D. será que es un ataque cerebral.

Muchas gracias a mis compañeros del máster, a mis amigos charros y a los no tan charros, por haber tenido siempre un consejo bajo la manga.

Gracias a todo el grupo BIOPEP, pero en especial a los que han sido víctimas de mis chistes malos (Alba, Samu, Laura, Silvia, Javi, Marsela y col., 2015/2016). Este punto y seguido es proporcional al número de horas que he pasado contigo, así que, Moni, gracias por esos cafés nocturnos, consejos y abrazos tan necesarios, no se me olvida que te debo una cena.

Gracias a Sara Lara, por haber tenido en todo momento la llave que abría todas las puertas de mis preocupaciones e ilusiones, pero sobre todo, gracias por acompañarme desde los últimos seis años con tu rima consonante.

Y en último lugar dar gracias a mi familia, pero sobre todo a mis padres y mi hermano, por *aguantarme*, por confiar siempre en mí, por los ánimos y cariño que siempre me dais.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 ALERGIAS ALIMENTARIAS	1
1.1.1 Alergias alimentarias mediadas por IgE y principales alérgenos alimentarios	1
1.1.2 Mecanismos de la alergia alimentaria	1
1.1.2.1 <i>Mucosa intestinal: organización y transporte de antígenos</i>	2
1.1.2.2 <i>Fase de sensibilización</i>	4
1.1.2.3 <i>Fase de elicitación</i>	6
1.2 INMUNOTERAPIA ORAL EN LA ALERGIA AL HUEVO; INDUCCIÓN A LA TOLERANCIA ORAL	6
1.2.1 Hidrolizados y péptidos con capacidad inmunomodulante	7
1.2.2 Hidrolizados y péptidos en la inmunoterapia oral	8
1.2.3 Mecanismos de inducción a la tolerancia oral	9
1.3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	11
1.3.1 Extracción del ARN celular y síntesis del ADNc	11
1.3.2 qPCR	13
1.3.2.1 <i>Diseño de cebadores</i>	13
1.3.2.2 <i>Sistemas de detección de la fluorescencia en la qPCR</i>	14
OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	16
2. MATERIAL Y MÉTODOS	17
2.1 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ARN	17
2.1.1 Obtención de las muestras biológicas	17

2.1.2 Aislamiento de las muestras de ARN y ADN	17
2.1.3 Caracterización del ARN aislado	18
2.1.3.1 <i>Evaluación de la concentración y pureza del ARN</i>	18
2.1.3.2 <i>Evaluación de la integridad del ARN</i>	19
2.2 OPTIMIZACIÓN DE LOS SISTEMAS DE RT-qPCR	19
2.2.1 Selección y diseño de los cebadores utilizados	19
2.2.2 Desarrollo de la técnica de RT-qPCR	21
2.2.2.1 <i>Optimización de las condiciones de los sistemas de RT-qPCR</i>	21
2.2.2.2 <i>Estudio de la sensibilidad y la eficiencia de los sistemas de RT-qPCR optimizados</i>	22
2.3 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA INDUCCIÓN A LA TOLERANCIA ORAL MEDIANTE RT-qPCR	22
2.3.1 Síntesis del ADNc	23
2.3.2 Cuantificación de la expresión relativa de los genes objeto de estudio	23
2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
3.1. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS DE ARN	25
3.1.1 Determinación de la pureza y concentración del ARN extraído	25
3.1.2 Determinación de la integridad del ARN	27
3.2. OPTIMIZACIÓN DE LOS SISTEMAS RT-qPCR.	30
3.2.1 Selección y diseño de las parejas de cebadores	31
3.2.2 Optimización de las condiciones de la reacción	33

3.2.3 Estudio de la expresión de los genes implicados en la inducción a la tolerancia oral mediante RT-qPCR	36
4. CONCLUSIONES	44
5. BIBLIOGRAFÍA	45

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN complementario.

ADNg: ADN genómico.

ADNsas: Enzimas desoxirribonucleasas

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

ARNsas: Enzimas ribonucleasas.

bp: Pares de bases.

CT: Toxina de cólera.

Ct: Ciclo umbral.

DCs: Células dendríticas.

DEPC: Dietilpirocarbonato.

EW: Clara de huevo.

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleuquina.

LYS: Lisozima.

MLNs: Nódulos linfáticos mesentéricos.

OA: Hidrolizado de OVA con alcalasa.

OIT: Inmunoterapia Oral.

Oligo dT: Oligonucleótidos sintéticos de polideoxitimidina.

OM: Ovomucoide.

OP: Hidrolizado de OVA con pepsina.

OT: Ovotransferrina.

OVA: Ovoalbúmina.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PP: Placas de Peyer.

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de transcripción inversa

Tm: Temperatura *melting* o de fusión

Treg: Células/Linfocitos T reguladores.

UNG: Enzima Uracil-N-glicosidasa.

RESUMEN

La prevalencia de la alergia alimentaria a las proteínas del huevo ha aumentado considerablemente en los últimos años suponiendo un problema desde el punto de vista de la salud pública. Actualmente no existe un tratamiento aceptado para la alergia al huevo más allá de la evitación absoluta de este alimento. Estudios recientes, han demostrado que la inmunoterapia oral (OIT) utilizando alérgenos intactos tiene un efecto terapéutico exitoso, sin embargo, este tipo de OIT supone un elevado riesgo ya que puede inducir efectos secundarios sistémicos graves. Por esta razón, el uso de hidrolizados hipoalergénicos con actividad inmunomodulante se presenta como una de las mejores alternativas para su uso en la OIT.

El presente trabajo, tiene como finalidad el estudio de la expresión de los genes involucrados en los mecanismos de inducción a la tolerancia oral mediante RT-qPCR. Con este objetivo, se llevó a cabo la optimización de sistemas de RT-qPCR que permitiesen el adecuado análisis de la expresión génica de FoxP 3, GATA3, IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17, IL-22, IL-25, IL-33, T-bet, TGF- β y TSLP en muestras de duodeno, nódulos linfáticos mesentéricos y placas de Peyer obtenidas de un ensayo *in vivo* en el que se investigó el efecto curativo de hidrolizados de ovalbúmina (OVA) con alcalasa y pepsina en un modelo murino de alergia al huevo. Tras la obtención de muestras de ARN puro e íntegro y la puesta a punto de las condiciones de RT-qPCR que permitiesen la correcta amplificación de los genes objeto de estudio, así como la evaluación de la eficiencia y sensibilidad de los sistemas desarrollados, se llevó a cabo el estudio de la expresión relativa de los genes objeto de interés.

Los resultados mostraron que el tratamiento con OVA reducía la expresión de genes relacionados con la respuesta alérgica (IL-33, IL-4 y GATA 3) a través de la compensación con una respuesta del tipo Th1, incrementándose la expresión de T-bet e IFN- γ . Por su parte, el hidrolizado de OVA con pepsina mostró la disminución significativa de la expresión de los genes del tipo Th2 (IL-33, IL-4 y GATA 3) lo cual se relaciona con un posible efecto terapéutico *in vivo*. El estudio de los mecanismos de acción involucrados en la inducción a la tolerancia oral por parte del hidrolizado de OVA con pepsina, mostró que existía un aumento de la población de células T reguladoras tolerogénicas observado mediante el incremento de la expresión de los genes FoxP 3, IL-10 y TGF- β .

ABSTRACT

The prevalence of food allergy to egg proteins has considerably increased in recent years, leading to a problem from the point of view of public health. There is currently no accepted treatment for egg allergy beyond the avoidance of this food. Recent studies have shown that oral immunotherapy (OIT) using intact allergens has a successful therapeutic effect. However, this type of OIT can induce serious systemic side effects. For this reason, the use of hypoallergenic hydrolysates with immunomodulating activity, is presented as one of the best alternatives in OIT.

The present work aims to study the expression of main genes involved in oral tolerance induction by RT-qPCR. In order to optimize the gene expression of FoxP 3, GATA3, IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17, IL-22, IL-25, IL-33, T-bet, TGF- β and TSLP in samples of duodenum, mesenteric lymph nodes and Peyer's patches obtained from an *in vivo* experiment, studying the curative effect of ovalbumin (OVA) hydrolysed with alcalase and pepsin in a murine model of egg allergy. Once optimized RT-qPCR conditions led to the correct amplification of the adequate product, pure and intact RNA samples were used for the evaluation of the relative expression of the studied genes.

The results showed that OVA treatment reduced the expression of genes involved in Th2 response (IL-33, IL-4 and GATA 3) through Th1 type response compensation, showed by increased expression levels of T-bet and IFN- γ . On the other hand, the hydrolysate with pepsine showed a significant decrease in the expression of the Th2 type genes (IL-33, IL-4 and GATA 3), which is related to a potential therapeutic effect *in vivo*. The study of the action mechanisms involved in oral tolerance induction by the hydrolysate of OVA with pepsin, showed that there was an increase in the tolerogenic regulatory T cell subset observed by enhanced expression levels of FoxP 3, IL-10 and TGF- β .

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ALERGIAS ALIMENTARIAS

1.1.1 Alergias alimentarias mediadas por IgE y principales alérgenos alimentarios

La alergia a alimentos se define como una reacción adversa exacerbada con un mecanismo inmunológico específico subyacente, que ocurre de manera reproducible tras la exposición a un determinado alimento (Boyce y col., 2010). Dentro de las respuestas inmunitarias que se engloban en la alergia alimentaria, existen reacciones de hipersensibilidad retardada e inmediata (López-Fandiño, 2006). En el primer caso, los síntomas clínicos no aparecen hasta más de 24 horas tras la ingesta del alimento. Estas reacciones son menos conocidas, caracterizándose por una respuesta celular no mediada por la inmunoglobulina E (IgE), el ejemplo más conocido de este tipo de hipersensibilidad es la enfermedad celíaca (Ho y col., 2014). En las reacciones de hipersensibilidad inmediata, los síntomas aparecen tras unos pocos minutos y dos horas después del consumo del alimento, teniendo lugar una respuesta humoral anormal que conlleva la producción masiva de anticuerpos del tipo IgE específicos para el alérgeno. En la actualidad, la alergia alimentaria es considerada un problema de gran relevancia en el ámbito de la salud pública. Estudios recientes indican que la población alérgica a alimentos en el mundo ha crecido de forma evidente en los últimos diez años, llegando a verse afectados hasta un 5% de las personas adultas y hasta un 8% de los niños en edad escolar (Gray y col., 2015; Sicherer y Sampson, 2013). En Europa, se estima que del 1 al 4 % de los adultos y del 6 al 8 % de los niños menores de 3 años padecen algún tipo de reacción alérgica tras el consumo de alimentos potencialmente alérgicos (Nwaru y col., 2014).

Las posibles causas que explicarían el aumento de la prevalencia y persistencia de las alergias alimentarias serían la excesiva profilaxis frente a microorganismos, cambios en los componentes de la dieta (incluyendo antioxidantes, grasas y nutrientes como la vitamina D), el uso de antiácidos (que provocan una mayor absorción de proteína intacta), el procesado de alimentos o la exposición a alérgenos alimentarios por otra vía que no sea la oral (Lack y col., 2003).

Potencialmente, cualquier proteína alimentaria puede desencadenar una respuesta alérgica, habiéndose descrito más de 170 alimentos con capacidad de causar reacciones mediadas por IgE (Boyce y col., 2010). En términos generales, los alérgenos alimentarios son proteínas solubles en agua, resistentes al calor, pH ácido y a la acción de enzimas digestivas; con masas moleculares comprendidas entre los 10 y 70 kDa, presentando normalmente modificaciones postraduccionales como glicosilaciones y fosforilaciones (Berin y Sampson, 2013; Mills y col., 2004).

El 90% de las alergias alimentarias son provocadas por ocho alimentos: cacahuets, frutos secos, huevos, leche, pescado, crustáceos, trigo y soja (Boyce y col., 2010; Bush y Heffle, 1996). Otros alimentos causantes de alergias en Europa son el apio, la mostaza, el sésamo, los altramuces y los moluscos. La dosis umbral de alimento, necesaria para desencadenar reacciones adversas, puede ser extremadamente baja variando de unos individuos a otros (Boyce y col., 2010).

En España, el huevo es el cuarto alimento en importancia implicado en la alergia alimentaria de la población general y el primero en niños menores de 5 años (Fernández-Rivas, 2012). La enorme importancia del huevo en la industria alimentaria, debido al gran valor biológico, nutricional y funcional que presenta, implica una gran ubicuidad en numerosos alimentos, suponiendo un gran inconveniente para el alto número de individuos que padecen alergia a alguno de sus componentes, provocando una disminución en su calidad de vida. Aunque se pueden encontrar proteínas alergénicas tanto en la yema como en la clara, el potencial alergénico del huevo se centra principalmente en esta última. Las principales proteínas alergénicas de la yema son las apovitelinas, fosvitinas y livetinas (Mine y Yang, 2009). Entre los principales alérgenos de la clara de huevo (EW) destacan el ovomucoide (OM o Gal d1, 11%), la ovoalbúmina (OVA o Gal d2, 54%), la ovotransferrina (OT o Gal d3, 12%) y la lisozima (LYS o Gal d4, 3,5%) (Caubet y Wang, 2011; Mine y Zhang, 2002).

1.1.2 Mecanismos de la alergia alimentaria

Se entiende por alergia alimentaria, la no adquisición o ruptura de la tolerancia oral a una o varias proteínas alimentarias. La patogenia de las alergias alimentarias mediadas por IgE consta de dos fases primordiales, una primera fase de sensibilización, exposición o afectora, sin sintomatología, y una segunda fase de elicitación, provocación o efectora caracterizada por un cuadro clínico anafiláctico. Para que ambas fases tengan lugar, es necesaria la exposición del antígeno al sistema inmunitario a través de diferentes rutas, entre las cuales destaca principalmente la vía gastrointestinal, aunque existen otras tales como la vía respiratoria o la cutánea.

1.1.2.1 Mucosa intestinal: organización y transporte de antígenos

El epitelio intestinal está compuesto por una monocapa de células epiteliales especializadas y polarizadas, donde alrededor del 80% de las células que la conforman son enterocitos, aunque existen otras células epiteliales especializadas en la secreción de mucus y glicocálix (células de Goblet), defensinas (células de Paneth) y, hormonas y neuropéptidos (células enterocromafines) (Booth y Potten, 2000; Flier y col., 2009). Las células epiteliales que constituyen la barrera intestinal se encuentran conectadas entre sí a través de su membrana

basal, mediante complejos proteicos que proporcionan al epitelio la integridad estructural y la actividad celular necesarias para llevar a cabo sus funciones específicas (Schulzke y col., 2009). La primera línea de defensa del tracto gastrointestinal se encuentra en la propia luz intestinal, donde los componentes alimentarios son degradados de manera inespecífica durante el proceso digestivo por las secreciones gástricas, pancreáticas y biliares, el pH y el efecto de las enzimas digestivas, destacando la acción de proteasas, lipasas, amilasas y nucleasas. Por otro lado, recubriendo el epitelio intestinal, se encuentra una barrera de mucus y glicocálix, secretado fundamentalmente por las células de Goblet con propiedades hidrófobas y tensoactivas, que facilita la absorción de nutrientes y participa en el mantenimiento de la tolerancia oral, limitando la inmunogenicidad de los antígenos intestinales mediante la producción de señales tolerogénicas (Shan y col., 2013). Los enterocitos son elementos clave del revestimiento epitelial, adaptados en desarrollar la función digestiva, metabólica y el mantenimiento de la integridad física de la barrera intestinal. Además, participan activamente en desarrollo de las respuestas inmunológicas mediante la expresión de receptores implicados en la inmunidad innata, actuando como células presentadoras de antígenos no profesionales y liberando citoquinas, como la linfopoyetina estromal tímica (TSLP), interleuquina (IL)-25, e IL-33 (Pott y Hornef, 2012; Turner, 2009).

A lo largo del epitelio intestinal existen estructuras linfoides denominadas Placas de Peyer (PP), donde se localizan las células M, un tipo de célula epitelial especializada que desempeña un papel en la monitorización de la luz intestinal y en el mantenimiento de la función de la barrera intestinal. Su reducida capa de mucus, facilita la captura de antígenos y microorganismos lumbinales con la consecuente presentación a las células dendríticas (DCs) subyacentes (Miller y col., 2007).

En la región subepitelial se localizan los diferentes plexos del sistema nervioso entérico y la lámina propia, ésta última es la primera barrera inmunológica de defensa frente a los antígenos alimentarios, y alberga a la mayoría de células del sistema inmunitario, caracterizándose por ser rica en DCs, linfocitos T efectores, macrófagos y mastocitos (Berin y Sampson, 2013; Rühl, 2005).

Existen cuatro rutas por las cuales los alérgenos alimentarios pueden atravesar la barrera intestinal epitelial (figura 1) y alcanzar la lámina propia, para finalmente desencadenar la respuesta alérgica (Chehade y Mayer, 2005):

a) Alterando las diferentes uniones intercelulares entre las células epiteliales. La identificación de un antígeno mediante la unión de éste a los receptores de reconocimiento de patrones de las células epiteliales, produce la activación de las zonulinas, estas enzimas

serin-proteasas digieren las uniones entre las células epiteliales, produciendo un aumento de la permeabilidad y, en consecuencia la entrada de antígenos en la lámina propia (Jayashree y col., 2013).

b) Los enterocitos son capaces de captar antígenos mediante un proceso de transcitosis, donde los antígenos que son internalizados mediante endocitosis o fagocitosis son transportados a través de vesículas hacia la membrana basolateral, donde podrán ser captados por las DCs (Hersberg y Mayer, 2000).

c) A través de las células M que transportan antígenos lumbinales a la lámina propia, donde los antígenos son capturados por las células presentadoras de antígenos (APCs), entre las que destacan las DCs, las cuales los procesarán para su posterior presentación a las células T (Berin y Sampson, 2013).

d) Además, existe una subpoblación de DCs presentes en la lámina propia que son capaces de extender sus dendritas a través de las células epiteliales captando antígenos directamente desde la luz intestinal (Chu y col., 2013).

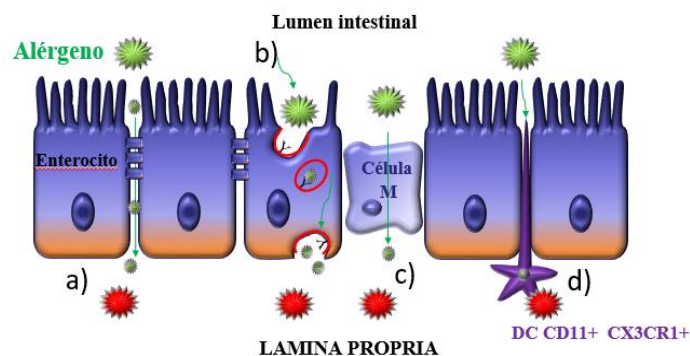


Figura 1. Transporte de los alérgenos alimentarios a través de la barrera intestinal, mediante: a) uniones entre células epiteliales, b) transcitosis, c) células M y d) células dendríticas (DC).

1.1.2.2 Fase de sensibilización

Tras la primera exposición al alérgeno, y una vez que éste ha atravesado la barrera intestinal mediante alguno de los mecanismos anteriormente descritos, se inicia un proceso que incluye una compleja sucesión de reacciones, donde se va a desencadenar la producción de anticuerpos IgE específicos frente a los alérgenos alimentarios.

Como consecuencia de la alteración que sufre la barrera intestinal epitelial tras la captación de los antígenos, se promueve la producción y liberación de las citoquinas epiteliales IL-25, IL-33 y TSLP que inducen el aumento de la expresión del marcador de superficie celular OX40L en las DCs. De esta manera, los alérgenos capturados son procesados para dar lugar a péptidos

que son presentados a los linfocitos T naïves (Th0) mediante la unión a los receptores de superficie (TCRs) que se complementa con la unión de la molécula coestimuladora CD40 (Chinthrajah y col., 2016). Además, el perfil de citoquinas del medio va a ser fundamental para que los linfocitos Th0 se diferencien a Th2, fenotipo característico de la respuesta alérgica, principalmente caracterizado por la producción de las citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13. De las 3 citoquinas características de una respuesta Th2 alérgica, la IL-4 es la más importante, pues estimula la diferenciación de los linfocitos Th0 en Th2 y de los linfocitos B en células plasmáticas productoras de anticuerpos IgE (figura 2). También son clave las otras dos, IL-5 induce la producción de mucus y estimula la proliferación de eosinófilos y de linfocitos B, mientras que IL-13 promueve la producción de IgE (Islam y Luster, 2012). Además, la respuesta celular Th2 mantiene un balance armonizado con la respuesta celular Th1, de tal manera, que esta respuesta también tendrá citoquinas propias como el IFN- γ , que estimula la diferenciación de linfocitos Th0 a Th1, compensando la diferenciación hacia el fenotipo Th2 (Cohn y col., 1999).

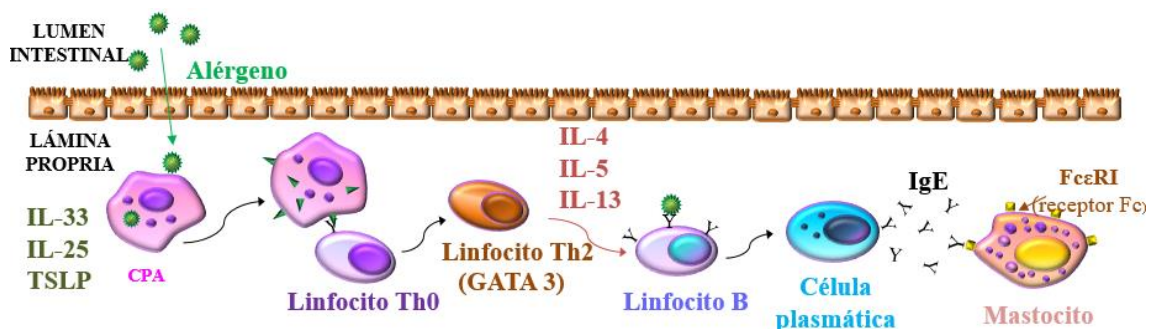


Figura 2. Fase de exposición, sensibilización o afectora: los alérgenos traspasan la barrera intestinal, las células presentadoras de antígeno (CPA), los ponen en contacto con los linfocitos Th0 que se diferencian a linfocitos Th2 con la consecuente producción de citoquinas que activan a los linfocitos B, diferenciándose a células plasmáticas productoras de IgE que se unen al receptor de superficie de los mastocitos.

Las IgE específicas del alérgeno generadas por las células plasmáticas, se unen al receptor de alta afinidad Fc ϵ RI que se encuentra en la superficie de los mastocitos tisulares y de los basófilos sanguíneos, dando lugar a una célula armada que presenta en su superficie IgE específicas para ese alérgeno.

1.1.2.3 Fase de elicitación

Una vez que ha tenido lugar la fase de sensibilización, cuando el alérgeno alcanza nuevamente la barrera epitelial y la traspasa a través de alguno de los mecanismos descritos, éste es conducido hasta las IgE presentes en la superficie de mastocitos y basófilos armados (figura 3). En esta segunda exposición, los epítomos del alérgeno se unen a las IgE específicas presentes en la superficie celular de mastocitos y basófilos, entrecruzando dos moléculas de IgE

y generando la agregación de los receptores de alta afinidad. Esta circunstancia inicia una cascada de señales intracitoplasmáticas que culmina con la liberación de mediadores inflamatorios y vasoactivos. Los mastocitos activados secretan citoquinas propias de la respuesta Th2, (IL-4, IL-5 e IL-13), que induce de nuevo la producción de IgE específicas del alérgeno por parte de las células plasmáticas. Por otro lado, los mastocitos inician la producción de altos niveles de TNF- α , que promueve la generación de un ambiente inflamatorio y la producción de quimioquinas como las CCLs, que atraen a monocitos, macrófagos y neutrófilos (Luther y Cyster, 2001).



Figura 3. Fase de elicitación, provocación o efectora. Los alérgenos entrecruzan dos moléculas de IgE en la superficie de los mastocitos, produciéndose la agregación de los receptores de superficie desarrollándose la cascada de señalización que da lugar a la liberación de mediadores de la inflamación.

1.2. INMUNOTERAPIA ORAL EN LA ALERGIA AL HUEVO; INDUCCIÓN A LA TOLERANCIA ORAL

Actualmente no existe un tratamiento aceptado para la alergia al huevo más allá de la evitación absoluta de este alimento y el tratamiento de emergencia en caso de ingestión accidental (Muraro y col., 2014). Ello supone una selección minuciosa de los alimentos, sin poder evitar el riesgo constante dada la ubicuidad de este alimento, siendo un problema en la vida diaria de los pacientes alérgicos y sus familias.

La inmunoterapia oral (OIT) utilizando la EW intacta se presenta como una de las estrategias terapéuticas más prometedoras para el tratamiento de la alergia al huevo (Martorell y col., 2014). La OIT comienza con la administración de EW a bajas dosis, aumentándose progresivamente hasta alcanzar la dosis de ingesta normalizada con la edad del niño, o hasta la máxima cantidad que éste pueda tolerar (Muraro y col., 2014). Lograda la desensibilización al alimento, el siguiente paso es mantener ininterrumpidamente la dosis establecida durante un periodo de tiempo constante, hasta conseguir su objetivo final, la tolerancia oral completa al alimento (Perezábad y col., 2016). La OIT utilizando el alérgeno intacto ha sido documentada para el tratamiento de la alergia al cacahuete (Clark y col., 2009), la leche (Perezábad y col., 2016) y el huevo (Perezábad y col., 2016), obteniéndose un éxito del 70 al 80 % (Varshney y

col., 2011). Estudios previos han observado que el éxito está relacionado con el descenso de IL-4 e IgE (Rupa y Mine, 2012; Yang y col., 2010), y un aumento de IL-10 e inmunoglobulina A (IgA) (Rupa y Mine, 2012; Yang y col., 2010), sugiriendo que en función de la dosis de antígeno administradas en cada OIT, el mecanismo que subyace a la desensibilización será diferente (Bedoret y col., 2012).

Sin embargo, la OIT utilizando las proteínas alérgicas intactas supone un elevado riesgo en los pacientes alérgicos, ya que éstas pueden inducir efectos secundarios sistémicos graves, representados en su extremo más agudo por el *shock* anafiláctico. Con el fin de evitar estos riesgos, estudios recientes en modelos animales han propuesto el uso de hidrolizados y péptidos sintéticos generados a partir de los propios alérgenos, como una de las mejores alternativas para su uso en la OIT (Rupa y Mine, 2012; Thang y Zhao, 2015; Wai y col., 2016).

1.2.1 Hidrolizados y péptidos con capacidad inmunomodulante.

La inmunomodulación hace referencia a cualquier concepto que modifique la actividad del sistema inmunitario, ya sean fenómenos de inmunopotenciación, inmunosupresión o la tolerancia inmunológica (O'Toole, 2003). En el contexto de la alergia alimentaria, se entiende por hidrolizados y péptidos inmunomodulantes, aquellas secuencias peptídicas capaces de inducir cambios inmunológicos que concluyan con una disminución de la respuesta tipo Th2 mediante el balance con la respuesta Th1 o a través de un aumento de las células Treg (Lozano-Ojalvo y col., 2016a y b). Así, los hidrolizados y péptidos hipoalérgicos presentan una menor capacidad de unión a la IgE específica del alérgeno y, por tanto evaden el entrecruzamiento de las IgE unidas a los receptores de alta afinidad FcεRI de la superficie de mastocitos y basófilos, evitándose la agregación de los mismos y el inicio de la cascada inflamatoria (Jiménez-Saiz y col., 2011; Sellge y col., 2005).

Uno de los procedimientos más ampliamente utilizados en la industria alimentaria para la producción de alimentos hipoalérgicos se basa en la hidrólisis enzimática de las proteínas alérgicas. La hidrólisis de los alérgenos utilizando enzimas con actividad proteolítica permite alterar y destruir los epítomos presentes en estos alérgenos alimentarios, reduciendo de este modo su alergenidad y generando nuevas secuencias peptídicas que sean capaces de modular la respuesta inmunológica (Kasera y col., 2015; Lozano-Ojalvo y col., 2016). Dado que la síntesis de péptidos inmunomodulantes a nivel industrial supone un elevado coste, la generación de hidrolizados enzimáticos que contengan péptidos capaces de modular la respuesta inmunológica de las células T se presenta como la alternativa más rentable para su uso en la OIT de las alergias alimentarias.

Para estudiar la capacidad de estos hidrolizados en la modulación de la respuesta Th1, se han descrito: modelos *in vitro*, como macrófagos de ratón RAW 264-7 estimulados con lipopolisacárido bacteriano (Wong y col., 1998); *ex vivo*, mediante cultivos celulares de esplenocitos (Jacquot y col., 2010) y células de los MLNs y las PP de ratones sensibilizados a clara de huevo, o mediante células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humanas para la cuantificación de citoquinas tras la incubación con el hidrolizado en cuestión (Lozano-Ojalvo y col., 2016a); e *in vivo*, donde se inducen infecciones bacterianas en modelos animales y se intenta revertir esta infección mediante el desarrollo de una respuesta Th1 anti-infectiva por parte del péptido o hidrolizado inmunomodulante (Scott y col., 2007).

Por otra parte, para el estudio de la actividad inmunomodulante de la respuesta Th2 característica de la alergia alimentaria, se han llevado a cabo ensayos para la evaluación *in vitro* de péptidos e hidrolizados enzimáticos mediante la utilización de estimulaciones inespecíficas con mitógenos en PBMCs humanas (Holvoet y col., 2013; Lozano-Ojalvo y col., 2016a) o cultivos primarios aislados de modelos animales (Lozano-Ojalvo y col., 2016b; Sharma y col., 2007). Además, también se ha descrito el efecto de péptidos e hidrolizados inmunomodulantes en PBMCs y clones de células T aislados a partir de sangre procedentes de pacientes con alergia alimentaria (Pastorello y col., 2010; Tordesillas y col., 2009).

1.2.2 Hidrolizados y péptidos en la inmunoterapia oral.

Varios autores han analizado el efecto curativo de diferentes hidrolizados y péptidos en la OIT frente a diversos alérgenos alimentarios. Yang y col (2009), estudiaron la inmunomodulación ejercida por un hidrolizado de EW en ratones sensibilizados a esta misma. Estos mismos autores utilizaron un modelo de ratón sensibilizado a OVA para estudiar el efecto inmunoterapéutico de péptidos sintéticos procedentes de la secuencia completa de esta proteína (Yang y col., 2010). De manera similar, se estudió el efecto curativo de epítomos de células T procedentes de OM en ratones BALB/c sensibilizados a EW (Rupa y Mine, 2012). Esta terapia basada en la administración de hidrolizados inmunomodulantes, ha sido también estudiada en otros tipos de alergia alimentaria como la alergia a los frutos secos, a la leche y a los crustáceos (Wai y Col., 2016). Kulis y col (2012), observaron el efecto terapéutico de un hidrolizado con actividad inmunogénica generado a partir de un extracto de anacardo con pepsina en ratones sensibilizados a la proteína completa. Por último, Than y Zhao (2015) estudiaron en un modelo *in vivo* el efecto inmunomodulante de epítomos procedentes de la β -Lactoglobulina.

En todos ellos se observó un resultado común, la disminución en la producción de IgE específica del alérgeno y de las principales citoquinas Th2, IL-4 e IL-5. Aun así, algunos resultados presentan discrepancias atribuyéndose a los diferentes mecanismos

inmunomodulantes subyacentes, que en función de la dosis y de la vía por la cual el ratón es sensibilizado pueden variar.

Pese a que el diseño experimental de los ejemplos anteriormente citados presentaban diferencias en cuanto a las dosis del tratamiento curativo utilizado, la vía de sensibilización y provocación, así como las diferentes concentraciones utilizadas en estas dos últimas fases; todos llegaban a la misma conclusión sobre el potencial curativo e hipoalergénico que presentan el uso de hidrolizados y péptidos en el tratamiento de las alergias alimentarias.

1.2.3 Mecanismos de inducción a la tolerancia oral.

La tolerancia inmunológica se define como la falta de respuesta inmunitaria adaptativa frente a un antígeno, que en el caso de la alergia alimentaria, supone la tolerancia oral al alérgeno al que los individuos se encuentran sensibilizados sin que aparezca una respuesta inmunológica frente a éste (Berin y Mayer, 2009). Han sido descritos tres posibles mecanismos por los cuales los hidrolizados inmunomodulantes son capaces de inducir tolerancia oral inmunológica frente a los alérgenos alimentarios: anergia clonal de linfocitos T, depleción clonal de linfocitos T e inducción de células Treg (Weiner y col., 2011).

Con altas dosis de epítomos inmunogénicos, la tolerancia oral se puede dar mediante anergia o depleción clonal de células T. La activación de células T específicas para un antígeno necesita la presencia de dos señales: el reconocimiento del antígeno asociado al MHCII (de las APCs) y el reconocimiento de la molécula coestimuladora CD40 (Weiner y col., 2011). En la anergia clonal, la señal coestimuladora no está presente, por lo tanto, no se induce la activación de los linfocitos T, contribuyendo al mantenimiento de la tolerancia oral (Strobel, 2003; Weiner y col., 2011). La depleción clonal es un mecanismo de apoptosis que se induce cuando la presentación del antígeno tiene lugar en presencia de ligandos inhibidores. Este proceso ocurre normalmente en las PP y se sospecha que pueda estar mediado por las células *natural killer* a través de la interacción con las células Th2 vía Fas-FasL (Kim y col., 2006; Weiner y col., 2011).

La inducción de la tolerancia oral mediante la acción de las células Treg ha sido ampliamente estudiada, y es generada a través de la migración de DCs desde la lámina propia hacia los MLNs, la migración está controlada mediante la expresión regulada de citoquinas quimiotácticas y sus receptores, como la quimioquina CCR7 (Spahn y col., 2002; Weiner y col., 2011). En los MLNs, las DCs tolerogénicas presentarán los antígenos procesados a los linfocitos Th0 y, mediante la producción de IL-10 y TGF- β , serán capaces de inducir la diferenciación a células Treg (figura 4) (Spahn y col., 2001). En este punto se inicia una cascada de inducción y mantenimiento de este subtipo de células Treg del tipo Th3 tolerogénicas productoras de TGF-

β , cuyo efecto principal es la inhibición de la diferenciación de linfocitos Th0 a Th2 (Spahn y col., 2002).

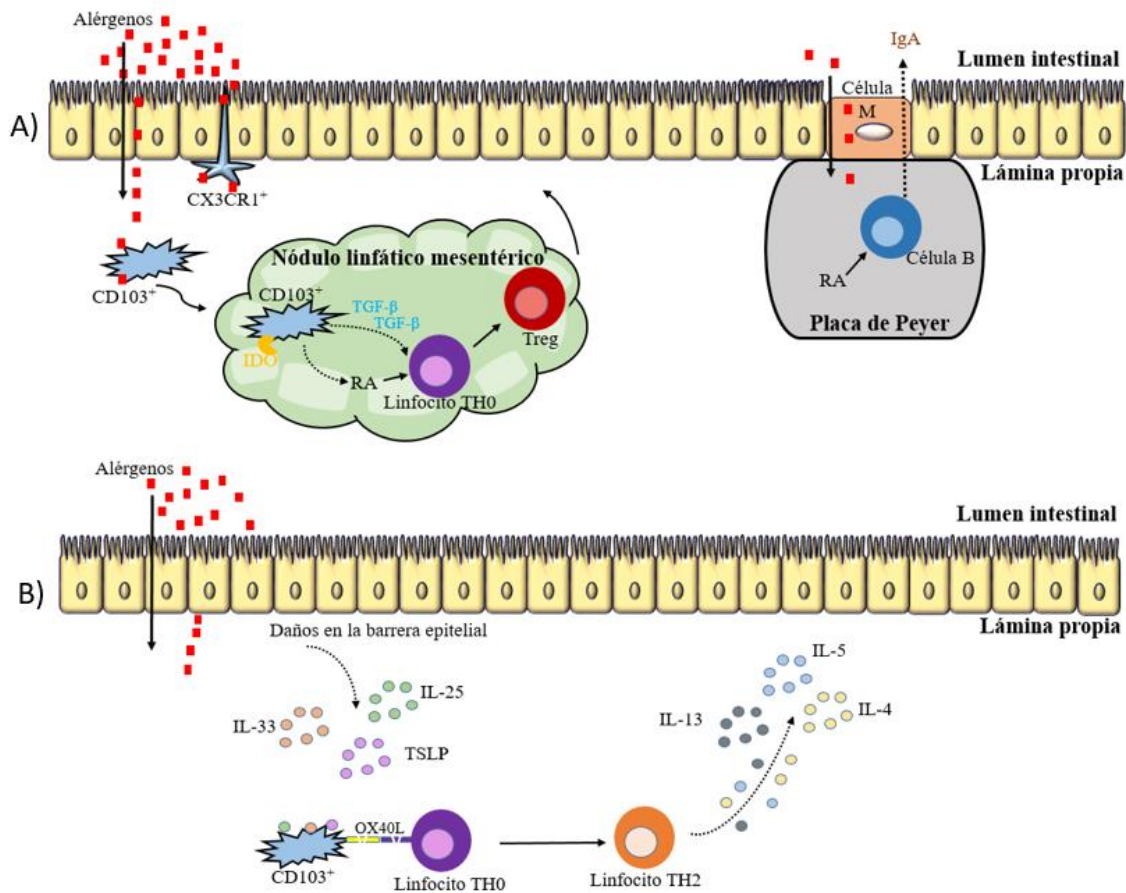


Figura 4: Mecanismos inmunológicos subyacentes en: A) Tolerancia oral mediante la inducción de células Treg, y B) Ruptura de la tolerancia oral.

De los sitios inductores de la respuesta inmunitaria, se ha visto que las PP son prescindibles para el desarrollo de la tolerancia, mientras que los MLNs son necesarios para alcanzarla (Mazzini y col., 2014). Recientes estudios han demostrado que el bloqueo del drenaje normal de los MLNs y del tráfico de linfocitos mediante una linfadenectomía mesentérica o la deficiencia en CCR7, impiden la inducción de la tolerancia oral en ratones, confirmándose así la importancia de los MLNs en el correcto desarrollo de la tolerancia oral (Milling y col., 2010; Worbs y col., 2006).

El estudio de los mecanismos de acción que subyacen a la tolerancia oral utilizando hidrolizados y péptidos inmunomodulantes han sido ampliamente estudiados (Sharma y col., 2015; Thang y Zhao, 2015; Wai y col., 2016). Los resultados más prometedores obtenidos en estos estudios, como la inducción de las células Treg tolerogénicas o la anergia de los linfocitos Th2, han sido alcanzados mediante el estudio de la expresión génica de las células involucradas mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR) (Rupa y

Mine, 2012; Yang y col., 2010). Estas investigaciones ponen de manifiesto la elevada importancia del estudio de la expresión génica en la determinación de los mecanismos de acción por los cuales los hidrolizados y péptidos inmunomodulantes ejercen sus efectos terapéuticos en modelos murinos de alergia alimentaria.

1.3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Estrictamente, el término expresión génica abarca desde la activación del gen hasta que el ARN mensajero (ARNm) comienza la traducción a una determinada proteína. Este hecho puede ser abordado mediante el análisis de las proteínas producidas (ELISA, western blot, u otras técnicas inmunohistoquímicas) o mediante técnicas que permitan el estudio de la expresión génica como la hibridación *in situ*, *microarrays*, *northern Blot* y las diferentes variantes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Hay una clara correlación entre la abundancia de los ARNm y el número de moléculas por célula de ese transcrito. Por esta razón, en la práctica, el grado de expresión de un gen puede ser estudiado con gran aproximación mediante detección y/o cuantificación de los ARNm funcionales del citoplasma (Devlin, 2004). De las técnicas mencionadas, el presente trabajo abordará el uso y las aplicaciones de RT-qPCR en el estudio de la expresión génica, ya que permite el análisis de una gran cantidad de genes, además, presenta una gran sensibilidad y especificidad, es altamente reproducible y los tiempos de análisis son cortos.

La RT-qPCR consta de dos etapas principales: una primera etapa de transcripción inversa en la que las moléculas de ARN son utilizadas como molde para la síntesis del correspondiente ADN complementario (ADNc) y una segunda etapa que consiste en estudiar la amplificación del ADNc mediante qPCR.

1.3.1 Extracción del ARN celular y síntesis del ADNc.

El éxito de la extracción de ARN es totalmente dependiente de la eliminación de toda posible contaminación con ribonucleasas que degradan el ARN (ARNsas) durante y después de la extracción. Las ARNsas suponen un gran problema principalmente porque son enzimas termorresistentes, activas en un amplio rango de pH y no requieren cofactores para su actividad. La concentración de ARNsas varía en función del tejido, por ejemplo, en el bazo los contenidos de ARNsas son elevados, mientras que en el intestino presentan niveles menores (Copoys y col., 2013).

Otro problema adicional en la extracción del ARN es el bajo contenido de ARNm de las células eucariotas, que contienen aproximadamente 10^{-5} μg de ARN total, del que tan sólo el 1-5 % corresponde a ARNm. Por esta razón, una pequeña contaminación con ARNsas, tanto endógena, procedente de la lisis de la estructura celular a la hora de la extracción, como exógena del material utilizado en el proceso de extracción, interferirá en el estudio de la expresión génica (Mackay y col., 2007).

Tras la extracción del ARN, es necesaria la síntesis de ADNc que será el sustrato de la enzima ADN polimerasa en la técnica qPCR. Dicha síntesis consiste en la transcripción inversa llevada a cabo mediante la enzima transcriptasa inversa, que utiliza como molde una molécula de ARN a la que se han unido unos pequeños fragmentos de oligonucleótidos que actúan como cebadores de la reacción. En la reacción de retrotranscripción no sólo es importante la actividad catalítica de la enzima, también lo son los cebadores utilizados. Esta reacción puede desarrollarse mediante tres mecanismos: con hexanucleótidos con secuencias al azar (*random primers*), con oligonucleótidos sintéticos de polideoxitimidina (oligo dT) o con oligonucleótidos específicos (figura 5) (Kolitz y col., 2013). El uso de este último se evita casi siempre porque el ADNc obtenido será muy diferente en función de los oligonucleótidos empleados como cebadores.

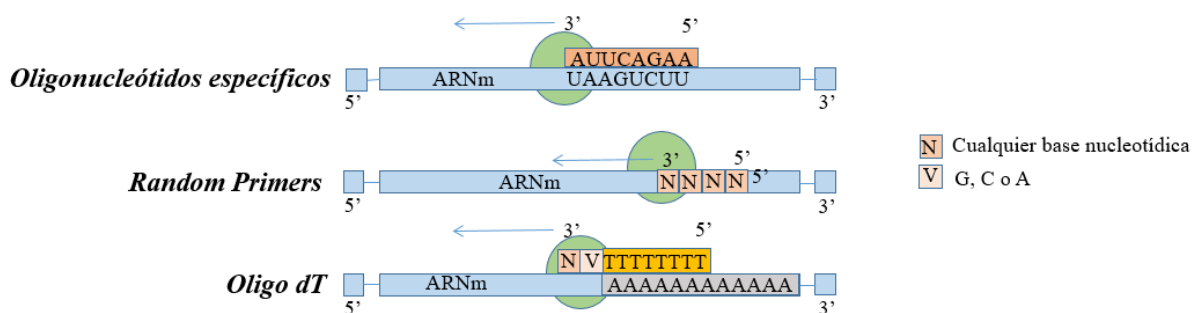


Figura 5. Representación de las diferentes estrategias utilizadas en la síntesis de ADNc. Donde G, C, A y T son respectivamente guanina, citosina, adenina y timina.

El ADNc es sintetizado a partir de todos los tipos de ARN existentes en las células eucariotas. Pero de todos ellos nuestro principal objetivo es que se retrotranscriba todo el ARNm; dado que la mayoría de los ARNm presentan una cola poliadenilada, los oligo dT van a unirse a esa secuencia nucleotídica en el extremo 3' favoreciendo la síntesis de este tipo de ARN. Sin embargo, no todos los ARNm tienen una cola poliadenilada en su extremo 3', circunstancia que es solventada mediante el uso de *random primers* en la reacción de retrotranscripción (figura 5).

1.3.2 qPCR

La qPCR es una variante de la PCR convencional utilizada para cuantificar simultáneamente la amplificación del ADNc en cada ciclo de la reacción (Fratamico y Bayles, 2005). La qPCR se fundamenta en la repetición cíclica de tres etapas (Watson y col., 1992):

1. Desnaturalización del ADNc: En esta etapa, el ADNc es desnaturalizado como consecuencia de la alta temperatura aplicada, de esta manera, las hebras complementarias se separan permitiendo la iniciación de la siguiente etapa.
2. Hibridación: tras el descenso de la temperatura, se favorece la unión específica de los cebadores a las regiones específicas del ADNc para las cuales han sido diseñados.
3. Extensión enzimática: durante esta etapa se produce la extensión de las secuencias complementarias en dirección 5'- 3' mediante la incorporación de nucleótidos catalizada por la enzima ADN polimerasa.

Dado que las hebras sintetizadas en un ciclo sirven de molde en el siguiente, el número de copias del ADNc diana se duplica aproximadamente en cada ciclo. Al comenzar la reacción, los niveles de fluorescencia no son detectables. El ciclo en el que se acumula suficiente producto como para generar una señal fluorescente destacable, se denomina ciclo umbral o Ct, siendo su valor inversamente proporcional a la cantidad de ADNc inicial (Mackay y col., 2007).

1.3.2.1 Diseño de cebadores

El diseño de cebadores es uno de los factores fundamentales para la correcta optimización de los sistemas de RT-qPCR, por esta razón, para su puesta a punto es fundamental la selección de oligonucleótidos altamente estables, específicos y que no produzcan interferencias en la reacción de qPCR (Chuang y col., 2013). En lo que refiere a la especificidad de los cebadores, es necesario comprobar mediante técnicas *in silico* que los cebadores seleccionados sólo amplifiquen la región del ADN que es objeto de estudio y que no existan productos inespecíficos de otras regiones del ADN ni dimerizaciones entre ellos (Rodríguez y col., 2015). El algoritmo BLAST es una herramienta bioinformática que permite la evaluación de la calidad de las secuencias nucleotídicas diseñadas, así como la adecuación de las condiciones térmicas y de estabilidad de los mismos (Bustin y col., 2009). La aplicación BLAST garantiza un 100% de veracidad en cuanto a la complementariedad de los cebadores con respecto a la secuencia objeto de estudio (Wu y col., 2004). A pesar de que las herramientas *in silico* proporcionan información valiosa sobre la especificidad del ensayo qPCR, los criterios teóricos establecidos

para su validación han de ser evaluados empíricamente mediante su análisis técnico y experimental (Bustin y col., 2009).

Además de la especificidad por la secuencia del gen diana y de los criterios técnicos que se detallan en el apartado de Material y Métodos **2.2.1**, es de elevada importancia la consideración de otros criterios teóricos específicos como la localización de los cebadores en exones diferentes. Cualquier método de extracción de ARN lleva implícita una contaminación de ADN genómico (ADNg), el cual también puede incluir secuencias nucleotídicas del gen de interés. La coamplificación del ADNg podría ser evitada mediante el diseño de cebadores situados en dos exones diferentes, lo cual evita la producción de productos derivados de intrones inespecíficos que podrían interferir en la detección específica de los productos diana (Raymaekers y col., 2009).

1.3.2.2 Sistemas de detección de la fluorescencia en la qPCR

La qPCR permite la cuantificación del ADN mediante su amplificación cíclica durante la reacción a través de la incorporación de fluoróforos en los productos de amplificación generados (Rodríguez y col., 2015). Los principales sistemas de detección utilizados en la técnica de qPCR se basan primordialmente en las metodologías Taqman y SYBR Green.

Las sondas de hidrólisis Taqman son oligonucleótidos que se unen específicamente a una región interna del fragmento que se pretende amplificar junto con la unión complementaria a los cebadores previamente optimizados. Este tipo de sondas, marcadas en el extremo 5' con un fluoróforo donador y en el extremo 3' por uno aceptor, son las responsables de la producción de la fluorescencia acumulada mediante la acción de 5' exonucleasa de la ADN polimerasa, lo cual permite la cuantificación mediante la tecnología de qPCR (Mackay y col., 2007).

Por su parte, el fluoróforo SYBR Green, se trata de un agente intercalante que permite el estudio de la acumulación de la fluorescencia generada mediante su incorporación en las secuencias de ADN bicatenario generadas tras las reacciones de amplificación derivadas en los productos de qPCR (figura 6). Al finalizar la reacción de qPCR, el fluoróforo se encuentra unido al producto de amplificación, siendo detectada la fluorescencia emitida por el sistema de qPCR (Mackay y col., 2007).

El principal inconveniente de este agente intercalante es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a los productos generados específicamente (producto de amplificación) o inespecíficamente, como son los dímeros de los cebadores, muy frecuentes en las reacciones de qPCR. Para solventar esta limitación, es necesario comprobar la especificidad

de los productos amplificados en la reacción, estudiando la curva de disociación de los fragmentos aplicando un gradiente de temperatura ascendente, donde finalmente los fragmentos de ADN amplificados se disocian a una temperatura de fusión (T_m), produciéndose una disminución brusca de la señal fluorescente (Willheim y Pingoud, 2003). Además, para evitar la inespecificidad se deben emplear unas condiciones de reacción óptimas y una selección cuidadosa de cebadores para disminuir el riesgo de formación de dímeros (Costa, 2004).

El sistema de detección de la fluorescencia utilizado en el presente trabajo ha sido el SYBR Green, debido a la fácil optimización y el bajo costo de este agente intercalante.

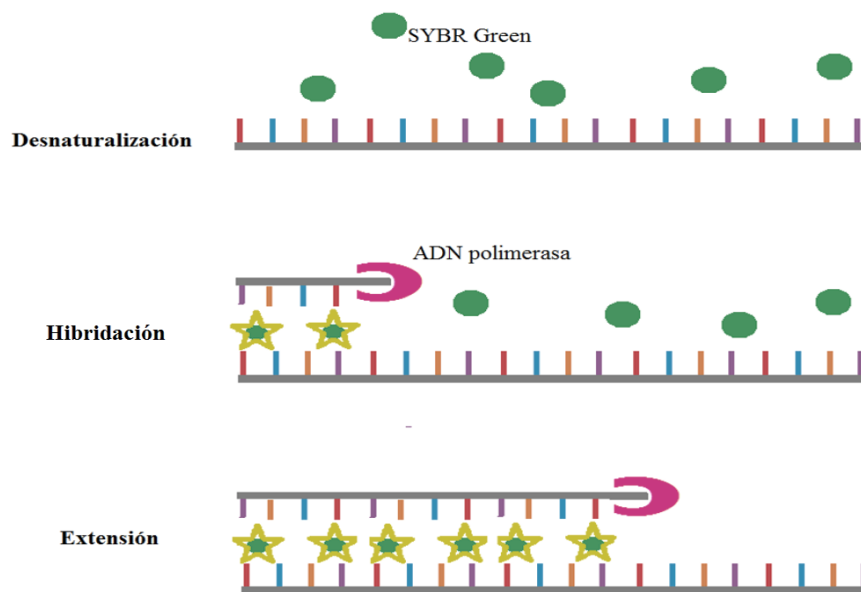


Figura 6. Mecanismo de acción del agente intercalante SYBR Green.

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo principal de este trabajo consistió en la evaluación de los efectos terapéuticos *in vivo* de hidrolizados inmunomodulantes de OVA con alcalasa y pepsina mediante el estudio de la expresión génica utilizando sistemas de RT-qPCR.

Con este fin, se siguió el plan de trabajo descrito a continuación:

1. Obtención sensible de un ARN celular total puro e íntegro a partir de tejidos complejos (duodenos y PP) y células (MLNs) procedente de ratones sometidos a un tratamiento de OIT.
2. Optimización de sistemas de RT-qPCR que permitan cuantificar la expresión relativa de los genes FoxP 3, GATA 3, IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17, IL-22, IL-25, IL-33, T-bet, TGF- β , y TSLP de una manera sensible y eficiente.

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ARN

2.1.1 Obtención de las muestras biológicas

Las muestras biológicas utilizadas en el presente trabajo proceden de un experimento previo llevado a cabo por el grupo BIOPEP, en el cual se evaluaron los posibles efectos terapéuticos de dos hidrolizados enzimáticos de OVA en un modelo murino de alergia al huevo. Ratonas, de la cepa BALB/c, de 7 semanas de edad (Charles River, Saint-Germain-Nuelles, Francia), fueron distribuidas en grupos de 5 individuos y sensibilizadas a EW utilizando como adyuvante la toxina del cólera (CT) según el protocolo previamente establecido por Pablos y col (2015). Todos los protocolos realizados siguieron la normativa europea relativa a la experimentación animal (Directiva 2010/ 63/UE) y fueron aprobados por el Comité de Bioética del CSIC y de la Comunidad de Madrid (PROEX 089/15). Tras la sensibilización, los animales fueron sometidos a un tratamiento de OIT durante 3 semanas utilizando dos hidrolizados de OVA, uno generado con pepsina (OP) y el otro con alcalasa (OA), cuya actividad inmunomodulante ha sido previamente descrita por Lozano-Ojalvo y col (2016a y 2016b). El protocolo de sensibilización, de OIT y de provocación, así como, su duración y las dosis empleadas se encuentran resumidos en la figura 7 con el objetivo de clarificar el origen de las muestras biológicas empleadas, sin que ninguna de estas etapas experimentales hayan sido desarrolladas durante la realización del presente trabajo.

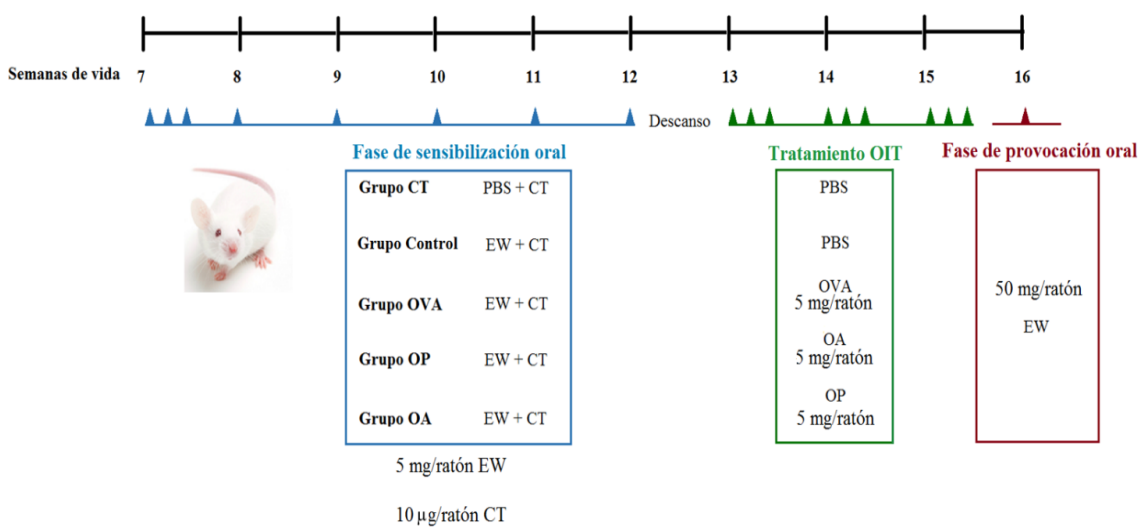


Figura 7. Esquema experimental llevado a cabo para el estudio de los efectos terapéuticos de los hidrolizados de ovoalbúmina en un modelo murino de alergia al huevo.

2.1.2 Aislamiento de las muestras de ARN y ADN

A la finalización del protocolo y tras el sacrificio de las ratonas, se tomaron muestras de duodeno, MLNs y PP individualmente para el estudio de su expresión génica. Los segmentos de duodenos, de aproximadamente 2 cm, fueron limpiados internamente tres veces con 10 mL de PBS que contenía un 1% de β -mercaptoetanol, con ayuda de una jeringuilla, y posteriormente fueron conservados en 350 μ L del buffer comercial RA 1 (Macherey-Nagel, Bethlehem, EE.UU). Las células de los MLNs (2×10^6) fueron aisladas según describe Pablos-Tanarro (2015) y conservadas en 350 μ L buffer RA 1, al igual que las PP. Las muestras fueron rápidamente congeladas en nitrógeno líquido y, posteriormente, conservadas a -80°C hasta su utilización.

El proceso de extracción de ARN a partir de las muestras biológicas previamente recuperadas se llevó a cabo utilizando el kit comercial NucleoSpin RNA[®] (Macherey-Nagel, Bethlehem, EE.UU) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras fueron descongeladas y mantenidas a 4°C durante todo el proceso de obtención de ARN. En el caso de los duodenos y las PP, los tejidos fueron homogenizados utilizando un Ultra-Turrax T8 homogenizator (IKA Labortechnik, Staufen, Germany). Las células de los MLNs fueron lisadas durante 15 min con ayuda de un sonicador Branson SFX 150 Digital (BIOGEN Científica S.L., Madrid, España). Una vez extraído, el ARN fue resuspendido en 30 μ L de agua mili Q tratada con 0,1 % de dietilpircarbonato (DEPC), para inactivar las ARNsas presentes normalmente en el agua sin tratar.

Por su parte, las muestras de ADN utilizadas para la optimización de la RT-qPCR y la generación de las curvas de eficiencia de los cebadores se obtuvieron a partir de esplenocitos de los bazos del grupo de ratones CT del ensayo previamente descrito (figura 7). Un total de 25 mg de bazo se utilizó para la extracción del ADN utilizando el kit comercial Tissue gDNA Isolation Kit (NZYTech Genes&Enzymes, Lisboa, Portugal) siguiendo estrictamente el protocolo establecido por el fabricante.

2.1.3 Caracterización del ARN aislado

2.1.3.1 Evaluación de la concentración y pureza del ARN

La determinación de la concentración del ARN presente en las diferentes muestras, así como el grado de pureza de las mismas debida a la posible contaminación por ADN, proteínas y alcoholes, se determinó utilizando el equipo Nanodrop 3300 (Thermo Fisher Scientific Inc, Wilmington, EE.UU). Como blanco para la medición de las muestras se utilizó 1 μ L de agua DEPC. Los criterios utilizados para la evaluación de la pureza de las muestras obtenidas se basó

en la información recogida en la bibliografía (Desjardins y Conklin, 2010; Kolitz y Lorsch, 2013), dónde se especifica que en las muestras de ARN de alta pureza el ratio de absorbancias 260/280 ($A_{260/280}$) es de $2,00 \pm 0,10$ y el ratio 260/230 ($A_{260/230}$) es de $2,00 \pm 0,20$. Una disminución del ratio $A_{260/280}$ indica una posible contaminación de las muestras por proteínas y/o polisacáridos durante el proceso de extracción, mientras que el descenso en el ratio $A_{260/230}$ pondría de manifiesto una contaminación por alcoholes.

2.1.3.2 Evaluación de la integridad del ARN

Para comprobar la integridad de las moléculas de ARN obtenidas se llevó a cabo el análisis electroforético en gel de agarosa al 1% de todas las muestras. Además, la pureza e integridad de una cantidad representativa de las muestras fueron analizadas mediante el equipo Bionalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU). Este análisis fue externalizado al servicio de Genómica y Secuenciación Masiva del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO, Madrid, España).

El análisis electroforético de las muestras se realizó mediante una electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1% (p/v). Los geles se prepararon en tampón TAE 50X (Tris/acetato 40mM, EDTA 0,5M, pH 8) con agua tratada con DEPC y, como agente intercalante para visualizar los fragmentos de ARN, se añadió bromuro de etidio a una concentración de 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras y el indicador de pesos moleculares se mezclaron con *buffer* de carga comercial Orange G (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU) y se añadieron 5 μL de muestra en cada pocillo del gel (Relación 1:1,5 entre el frente de carga y la muestra). La carrera se llevó a cabo mediante la inmersión del gel de agarosa en el tampón TAE 50X con un voltaje constante de 90 V y un tiempo de análisis de 40 min. Una vez finalizada la electroforesis, los geles se visualizaron mediante el transiluminador de luz ultravioleta integrado en el sistema de análisis de imágenes G-Box F3 (Syngene, Cambridge, Reino Unido).

2.2 OPTIMIZACIÓN DE LOS SISTEMAS DE RT-qPCR

2.2.1 Selección y diseño de los cebadores utilizados

Los genes objeto de estudio mediante los ensayos RT-qPCR fueron FoxP 3, GATA 3, IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17, IL-22, IL-25, IL-33, T-bet, TGF- β , TSLP y β -actina, siendo éste último el control endógeno de expresión constitutiva utilizado como gen de referencia para el estudio de la expresión génica.

Dada la amplia variedad de cebadores para el estudio de la expresión génica en ratones presentes en la bibliografía, se llevó a cabo una revisión bibliográfica exhaustiva en las bases de datos WOS (www.webofknowledge.com), PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) y rtpimerdb (www.rtpimer.org), utilizándose como criterios de búsqueda: *gene expression*, *mRNA expression level*, *RT-qPCR*, *food allergy* y el nombre del gen de interés. Las parejas de cebadores seleccionadas fueron aquellas que cumplieron los criterios técnicos descritos en la tabla 1 (D'haene y col., 2010; Hugget y col., 2013).

Dichos requisitos fueron evaluados *in silico* mediante el empleo de las herramientas bioinformáticas Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast), PRIMER 3 Plus (www.bioinformatics.nl/primer3plus) y Primer Quest (www.eu.idtdna.com/primerquest), con el fin de seleccionar cebadores que cumpliesen, en mayor medida, los criterios establecidos y pudiesen ser evaluados posteriormente mediante ensayos técnicos de RT-qPCR.

Tabla 1. Criterios técnicos de aceptación, validados para el diseño de los cebadores en los sistemas RT-qPCR (adaptado de Bustin y col., 2009; Rodríguez y col., 2015).

Criterio técnico	Rango aceptado
Contenido en guanina y citosina (GC)	30 - 65 % (óptimo 50 %)
Temperatura melting (Tm) del cebador	58 - 65 °C (óptimo en 60 °C) La Tm entre los cebadores no debe diferir más de 2°C
Longitud del cebador	15 - 30 pares de bases (bp)
Longitud del producto de amplificación	50 -150 bp (óptimo 80 bp)
Formación de dímeros y horquillas	No permitido
Estabilidad en el extremo 3'	Máximo dos GC en las últimas 5 bp
Estabilidad en el extremo 5'	No debe acabar en G
Grado de degeneración de las bases	No permitido
Localización de los cebadores en la secuencia génica	En distintos exones dentro de secuencias altamente conservadas

En el caso del gen que codifica para IL-17, más allá de la escasa bibliografía encontrada, cuando las parejas de cebadores fueron evaluadas, ninguna de las disponibles cumplía con los criterios de selección (tabla 1). Por lo tanto, para este gen, se llevó a cabo el diseño íntegro de la pareja de cebadores mediante la utilización del software PRIMER 3 Plus, UCSC Genoma Browser, Primer Quest y Primer Express, a partir de las regiones consenso del gen que codifica para IL-17 en el ratón común (*Mus musculus*). Dichas secuencias están disponibles en la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.com](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)). Posteriormente se realizó una validación *in silico* y una

alineación de las secuencias nucleotídicas mediante el empleo de las herramientas bioinformáticas Primer-BLAST y Clustal-Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo), respectivamente. Los cebadores utilizados en el presente trabajo fueron suministrados por IDT (Integrated DNA Technologies Inc, Leuven, Bélgica) a una concentración de 100 μ M.

2.2.2 Desarrollo de la técnica de RT-qPCR

La amplificación y detección mediante qPCR de todos los protocolos desarrollados se llevaron a cabo utilizando la metodología SYBR Green en el termociclador ViiA™ 7 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EE.UU). El análisis de los resultados se estudió con el correspondiente software, ViiA™ 7 Software v1.2.4 (Thermo Fisher Scientific). Todas las reacciones fueron preparadas en un volumen final de 12 μ L y en placas de 384 pocillos cubiertas con una lámina óptica adhesiva. El ensayo qPCR se realizó por triplicados para cada muestra, junto con un control negativo, sin muestra de ADNc (NTC), un control de ARN, para controlar la posible contaminación con ADNg de las muestras durante su procesamiento, y una muestra con una Ct conocida para cada gen diana y reproducible entre diferentes reacciones de qPCR (IRC).

2.2.2.1 Optimización de las condiciones de los sistemas de RT-qPCR

Tras la selección *in silico* de las parejas de cebadores que cumplieron con los requisitos teóricos necesarios para la adecuada generación de productos específicos de los genes objeto de estudio, fue necesario llevar a cabo la evaluación experimental de la amplificación de dichos genes, para lo cual se llevó a cabo la optimización de las condiciones térmicas de la etapa de hibridación y extensión de los diferentes sistemas de qPCR. En primera instancia se ensayaron diferentes temperaturas de hibridación y extensión para cada pareja de cebadores que variaron desde 58 hasta 60 °C. Además, se realizó un fraccionamiento en dos temperaturas (desde 58 hasta 60 °C) para una misma etapa de hibridación/extensión, de 1 min de duración en función de la T_m característica de cada pareja de cebadores. Finalmente las condiciones de qPCR utilizadas en la reacción fueron: 1 ciclo de 50 °C durante 2 min para activar la enzima Uracil-N-glicosidasa (UNG), 1 ciclo de 5 ó 10 min a 95 °C para activar a la ADN polimerasa y 40 ciclos de 95 °C durante 15 s durante la etapa de desnaturalización cíclica, variando las etapas de hibridación y extensión en 60 °C durante 1 min o 45 s a 58 °C seguido de 15 s a 60 °C. Los valores del Ct fueron calculados de manera automática por el equipo de qPCR utilizando los parámetros consignados en el aparato por defecto. Después del ciclo final de la qPCR, se llevó a cabo el análisis de la curva de disociación de los productos amplificados mediante el calentamiento de los mismos desde 60 °C a 95 °C y se tomaron continuas medidas de la fluorescencia para verificar los productos de PCR específicos para cada pareja de cebadores.

A continuación, se ensayaron diferentes concentraciones para cada uno de los cebadores utilizados que variaron desde 160 nM a 313 nM en el caso de los cebadores directos y de 125 nM a 313 nM para los cebadores reversos. En el caso de las concentraciones de ADNg aislado de esplenocitos, se utilizaron concentraciones que variaron desde 5 pg a 50 ng. En todos los casos, los ensayos se realizaron en un volumen final de 12 µL, que contenían 2,5 µL de ADNc, 6,25 µL de SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara Bio Inc, Mountain View, EE.UU) y 0,12 µL (1% v/v) de ROX™ Reference Dye (Takara Bio Inc, Mountain View, EE.UU). En la tabla 2 se detallan las condiciones seleccionadas de los componentes de la mezcla de las reacciones optimizadas. La condición I fue utilizada para la adecuada amplificación de los genes FoxP 3, GATA 3, IL-17, IL-25, IL-33, T-bet, TSLP y β-actina, mientras que la condición II se usó para la amplificación de β-actina, IFN-γ, L-4, IL-10, IL-22 y TGF-β.

Tabla 2. Composición de las mezclas de la reacción seleccionadas para la amplificación de los genes dianas utilizados en los sistemas de RT-qPCR optimizados.

Reactivos	Condición I	Condición II
SYBR Green	6,25 µL	6,25 µL
ROX 1%	0,12 µL	0,12 µL
FW (10µM)	0,375 µL	0,2 µL
RV(10µM)	0,375 µL	0,2 µL
ADNc	2,5 µL	2,5 µL
H₂O DEPC	2,5 µL	2,9 µL
Volumen final de la reacción: 12 µL		

2.2.2.2 Estudio de la sensibilidad y la eficiencia de los sistemas de RT-qPCR optimizados

Para el estudio de la sensibilidad de los genes seleccionados se llevaron a cabo diluciones decimales seriadas de ADNg extraído de esplenocitos, cuyas concentraciones variaron de 0,0005 ng/µL a 50 ng/µL. De esta forma se construyeron curvas estándar que relacionaron las concentraciones de ADNg con el valor Ct obtenido para cada concentración. El límite de detección del sistema de qPCR se definió como la menor concentración de ADN detectada en la reacción. Los criterios considerados para determinar la fiabilidad de los resultados fueron el coeficiente de determinación (R^2) y la eficiencia de la reacción (E), la cual fue calculada mediante la fórmula $E = 10^{\frac{-1}{P}}$, donde P es la pendiente de la curva estándar. Valores de la pendiente entre -3,1 y -3,6 se corresponden con un 100 % de eficiencia (Bustin y col., 2009).

2.3 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA INDUCCIÓN A LA TOLERANCIA ORAL MEDIANTE RT-qPCR

Para poder llevar a cabo el análisis de la expresión génica de los genes FoxP 3, GATA3, IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17, IL-22, IL-25, IL-33, T-bet, TGF- β y TSLP en las muestras de duodeno, MLNs y PP obtenidas en el ensayo *in vivo* de terapia con los hidrolizados de OVA, se procedió a realizar el estudio de la expresión génica de dichas muestras mediante los sistemas de RT-qPCR optimizados. Las reacciones de RT-qPCR constaron de dos etapas. En la primera, se procedió a la síntesis del ADNc utilizando como molde el ARN de las muestras de duodeno, MLNs y PP, mediante la transcripción inversa. En la segunda etapa, se procedió a la cuantificación de la expresión relativa de los genes objeto de estudio mediante los protocolos de qPCR previamente optimizados.

2.3.1 Síntesis del ADNc

La síntesis de ADNc se realizó mediante un protocolo de PCR convencional utilizando como molde 1 ng de ARN total extraído de las muestras de duodeno, MLNs y PP, tal y como se detalla en el punto 2.1.2 del presente trabajo. Para llevar a cabo la reacción se utilizó el kit comercial TAKARA PrimeScript™ RT Reagent Kit (Takara Bio Inc, Mountain View, EE.UU) siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante. Las mezclas de la reacción contenían 5 μ L de la muestra de ARN (con una concentración máxima de 0,2 μ g/ μ L), 0,5 μ L de los cebadores aleatorios *Random 6 mers* (100 μ M), 0,5 μ L de OligoDT (50 μ M), 0,5 μ L de la enzima transcriptasa inversa “PrimerScript RT Enzyme Mix I” y agua ultrapura estéril tratada con DEPC para llevar el volumen final de la reacción a 10 μ L.

Las condiciones de amplificación de la PCR consistieron en un ciclo de 15 min a 37°C para que se produjera la transcripción inversa, un ciclo de 5 s a 85°C para la inactivación de la enzima y una etapa final de enfriamiento a 4°C. El ADNc resultante se almacenó a -20°C hasta su utilización posterior como molde en las reacciones de qPCR.

2.3.2 Cuantificación de la expresión relativa de los genes objeto de estudio

El análisis de los resultados obtenidos mediante RT-qPCR se llevó a cabo mediante el método de expresión génica relativa propuesto por Pflaff (2004). El método se basa en la cuantificación relativa de los niveles de expresión de los genes problema (FoxP 3, GATA 3, IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17, IL-22, IL-25, IL-33, T-bet, TGF- β , y TSLP) respecto al gen de referencia (β -actina).

Esta cuantificación se centra en la determinación del valor Ct de cada muestra, una vez establecido el límite de detección mínima mediante la línea base o umbral. En el método del $\Delta\Delta$ Ct (Livak y Schmittgen, 2001; Plaff, 2004), el valor de Δ Ct se determina restando a la media

de los valores de Ct del gen problema (FoxP 3, GATA 3, IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17, IL-22, IL-25, IL-33, T-bet, TGF- β y TSLP), la media de los valores de Ct obtenidos para el gen de referencia (β -actina). El cálculo del valor $\Delta\Delta Ct$ se obtiene restando a cada uno de los valores de ΔCt el valor del ΔCt de un control calibrador, que es la muestra utilizada como referencia para obtener el valor relativo de las demás (en nuestro caso, los ratones del grupo CT). Una vez obtenidos estos valores, la expresión relativa, normalizado a un gen de referencia (β -actina) y relativa a un calibrador (ratones CT), se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$E^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde E, es la eficiencia obtenida para cada gen, $\Delta Ct = Ct \text{ gen diana} - Ct \text{ gen de referencia}$ y $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ gen diana} - \Delta Ct \text{ calibrador}$.

2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el software GraphPrism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EE.UU). El análisis estadístico de los datos obtenidos consistió en la realización del test no paramétrico Mann Whitney de comparaciones dos a dos. El nivel de significación estadística se estableció en $P < 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS DE ARN

El éxito para el correcto diseño y desarrollo de sistemas de RT-qPCR que permitan estudiar la expresión de los genes implicados en la inducción a la tolerancia oral en un modelo murino de alergia al huevo reside en un material genético de partida (ARN) íntegro y puro. En el presente trabajo, se llevó a cabo la extracción del ARN celular total de muestras de duodeno, PP y MLNs procedentes de ratones sensibilizados a EW que fueron sometidos a una OIT utilizando hidrolizados hipoadérgicos de OVA obtenidos con pepsina y alcalasa, cuya actividad inmunomodulante había sido previamente demostrada *in vitro* (Lozano-Ojalvo y col., 2016a y 2016b).

3.1.1 Determinación de la pureza y concentración del ARN extraído

La concentración y el grado de pureza de las muestras de ARN extraído se determinaron mediante el análisis espectrofotométrico, utilizando como índices de referencia de su pureza los ratios $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ (tabla 3), que indican la posible contaminación de las muestras por otros componentes celulares.

Las concentraciones resultantes fueron elevadas y muy diversas, dependiendo del órgano del que se obtuvo la muestra de ARN, variando entre 1892,00 y 78,70 ng/ μ L. Como se observa en la tabla 3, los menores valores de concentración se encontraron en las muestras procedentes de las células de los MLNs mientras que aquellos procedentes de los duodenos y las PP fueron superiores. Este hecho podría ser debido al material biológico de partida, ya que en el caso de los MLNs, las células fueron previamente aisladas y su concentración se ajustó a 2×10^6 en todos los casos, lo que explica una menor variación en los valores de concentración, encontrándose entre 78,70 y 220,50 ng/ μ L. Sin embargo, en el caso de las muestras extraídas de los duodenos y las PP, los valores de concentración obtenidos fueron superiores y con una mayor variación dado que el material biológico de partida fue seleccionado en función del tamaño (duodenos) o del número de unidades (PP), sin que se conociese el recuento celular de partida en ninguno de los casos.

El grado de pureza del ARN se considera adecuado cuando el valor del índice $A_{260/280}$ es de $2,00 \pm 0,10$ y $A_{260/230}$ es de $2,00 \pm 0,20$ (Desjardins y Conklin, 2010; Kolitz y Lorsch, 2013). Los valores del ratio $A_{260/280}$ desvelaron que las muestras de ARN extraído poseían una alta pureza al encontrarse índices que variaron entre 1,90 y 2,18 (tabla 3). Valores del ratio $A_{260/280}$ inferior a 1,90 podría indicar una contaminación por proteínas retenidas de los tejidos o por fenoles y otros reactivos utilizados en el proceso de extracción (Gadkar y Filion, 2014). La

escasa contaminación con proteínas y/o fenoles que presentan las muestras de ARN extraídas indica la adecuada preparación de las muestras biológicas antes de su procesado y el correcto protocolo de extracción de ARN utilizado.

Tabla 3. Concentraciones e índices de pureza ($A_{260/280}$ y $A_{260/230}$) de las muestras de ARN obtenidas a partir del duodeno, las PP y las células de los MLNs.

Muestra	Duodeno			PP			MLNs		
	ARN ng/ μ L	Ratio 260/280	Ratio 260/230	ARN ng/ μ L	Ratio 260/280	Ratio 260/230	ARN ng/ μ L	Ratio 260/280	Ratio 260/230
CT 1	1088,70	2,12	2,20	871,80	2,10	2,15	89,80	1,91	2,20
CT 2	404,10	2,08	2,20	242,10	2,12	2,06	79,40	1,99	2,19
CT 3	603,70	2,20	2,08	732,20	2,11	2,03	98,60	1,87	2,17
CT 4	632,90	2,13	2,11	1205,10	2,10	2,13	99,30	1,91	2,17
CT 5	401,30	2,08	2,20	304,40	2,10	2,12	94,10	1,90	2,03
Control 1	884,50	2,12	2,20	630,60	1,98	2,12	78,30	1,99	2,18
Control 2	1254,50	2,12	2,13	1004,80	2,11	2,07	193,80	1,98	2,18
Control 3	631,30	2,13	2,19	656,80	2,10	2,15	151,80	1,92	2,19
Control 4	783,20	2,13	2,05	430,30	2,03	2,11	164,70	1,95	2,04
Control 5	925,36	2,10	2,08	724,56	2,04	2,10	126,95	1,93	2,10
OVA 1	614,50	2,14	2,10	1058,70	2,09	2,14	112,40	1,92	2,06
OVA 2	406,80	2,07	2,18	914,40	2,07	2,20	116,50	1,92	1,99
OVA 3	1254,60	2,12	2,13	997,40	2,05	2,19	107,30	1,98	2,32
OVA 4	869,30	2,12	2,18	1024,80	2,07	2,20	151,40	1,95	2,19
OVA 5	769,47	2,13	2,08	957,89	2,06	2,11	121,54	1,94	2,07
OA 1	596,70	2,18	2,07	358,10	2,01	1,80	80,20	1,94	2,20
OA 2	992,60	2,11	2,23	1345,70	2,11	2,14	98,00	1,99	2,19
OA 3	815,10	2,12	2,16	1892,00	2,08	2,11	89,70	1,88	2,02
OA 4	395,00	2,09	2,11	1118,80	2,11	2,19	293,40	1,96	2,19
OA 5	611,00	2,14	2,00	1048,80	2,08	2,20	78,70	1,99	2,07
OP 1	413,80	2,09	2,01	344,90	2,09	2,11	149,30	1,95	2,16
OP 2	917,60	2,14	2,11	325,40	1,96	1,79	81,40	1,90	2,08
OP 3	278,40	2,10	2,12	283,20	2,09	2,18	220,50	1,93	2,19
OP 4	788,90	2,16	2,00	366,70	2,01	1,92	80,30	1,98	1,99
OP 5	114,90	2,17	1,99	1236,30	2,08	2,20	80,10	1,99	2,14

Por su parte, los resultados del índice $A_{260/230}$ pusieron de manifiesto la adecuada pureza de las muestras de ARN obtenidas, ya que los valores variaron entre 1,79 y 2,23. Valores del ratio $A_{260/230}$ inferior a 1,80 indicaría una posible contaminación con polisacáridos o alcoholes (Gadkar y Filion, 2014). Por lo tanto, en aquellas muestras de ARN obtenidas donde se observan menores valores de este índice (tabla 3) podría existir una limitada presencia de alcoholes, probablemente debida a la incompleta evaporación del etanol al 99 % utilizado en las distintas soluciones del protocolo de extracción, que varían en un rango entre el 5 y el 80 %.

3.1.2 Determinación de la integridad del ARN

Para el adecuado estudio de la expresión génica, no sólo es importante que las muestras de ARN utilizadas no presenten contaminaciones con otros compuestos, sino que es elemental que el molde de ARN utilizado sea íntegro y no se encuentre degradado, ya que esto permitirá la adecuada retrotranscripción del ADNc que será amplificado en la qPCR y evitará los falsos positivos durante el análisis de la expresión. Por esta razón, el análisis de la integridad de todas las muestras de ARN obtenidas, se estudió mediante el análisis del perfil electroforético de las mismas. Además, con el objetivo de confirmar los resultados de pureza e integridad de las muestras de ARN, un número representativo de las muestras obtenidas fue examinado mediante el equipo Bioanalyzer (Agilent Technologies).

En la figura 8 se presenta una muestra representativa del análisis electroforético de los ARNs extraídos para la ratona 1 de cada uno de los grupos de estudio. La presencia de unas bandas adecuadamente definidas de los ARNr 28S y 18S indican que la integridad del ARN extraído es adecuada para su uso en el estudio de la expresión génica, ya que la calidad del ARNr sirve como referencia para la evaluación de la degradación del ARN total durante el proceso de extracción (Fleige y Plaffl, 2006; Mueller y col., 2000). Este hecho pone de manifiesto que las medidas llevadas a cabo frente a las ARNsas endógenas y exógenas, mediante la utilización de reactivos previamente tratados con DEPC, el mantenimiento a una temperatura de 4 °C, durante el proceso de extracción y a -80 °C, durante el almacenamiento de las muestras, evitaron la degradación de las muestras de ARN extraídas (Mueller y col., 2000).

Además, el gel de agarosa muestra en su frente como los ácidos nucleicos de bajo peso molecular (ARN de transferencia, otros ARNr o los nucleótidos libres) migraron adecuadamente durante el desarrollo de la electroforesis. Así mismo, reflejaron que las muestras de ARN presentaban una escasa (figura 8, 4a) o nula (figura 8, 1-5c) contaminación por ADNg, pues la presencia de ácidos nucleicos de alto peso molecular retenidos en los pocillos del gel es bajo (Copoys y col., 2013). Los resultados mostraron que las muestras de ARN que presentaban contaminación con ADNg fueron aquellas que procedían del duodeno, circunstancia que podría

ser debida a la elevada concentración de ADNg durante el proceso de extracción de ARN al tratarse de un tejido rico en diferentes tipos celulares (enterocitos, células de Globet o células de Paneth, entre otras) y que puede presentar contaminaciones de la microbiota comensal residente

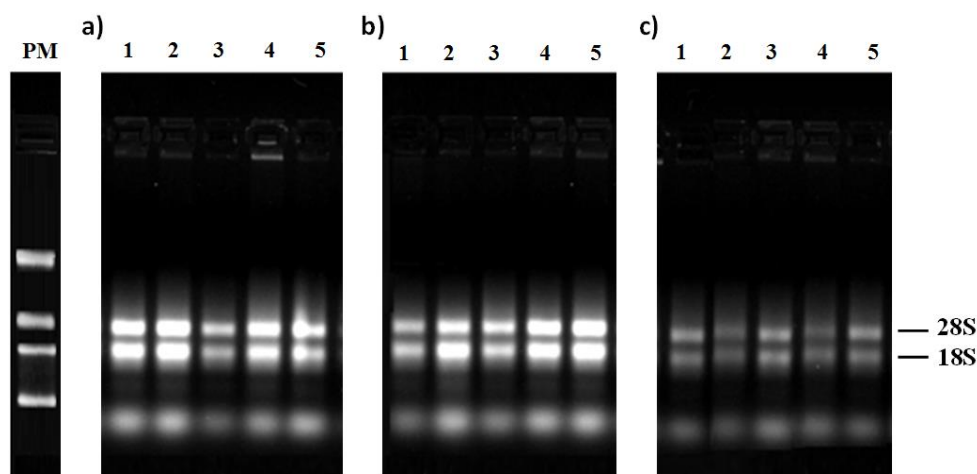


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de una muestra representativa de los ARNs obtenidos a partir del duodeno (a), las PP (b) y las células de los MLNs (c) de la ratona 1 de los diferentes grupos de sensibilización. PM: marcador del peso molecular (0,15 – 2,1 kbp); 1: grupo CT; 2: grupo control; 3: grupo OVA; 4: grupo OA; 5: grupo OP.

Para solventar este problema inicial, aquellas muestras que presentaron contaminación por ADNg tras el análisis electroforético fueron sometidas a una re-purificación con enzimas desoxirribonucleasas (ADNsas) para evitar que el ADNg contaminante pudiese interferir en el posterior estudio de la expresión génica mediante RT-qPCR. Este proceso se llevó a cabo en dos etapas consecutivas siguiendo las instrucciones del fabricante del kit comercial NucleoSpin RNA® (Macherey-Nagel). En una primera etapa se trató la muestra con una ADNsa, para digerir el exceso de este ácido nucleico y, en una segunda etapa, se llevó a cabo la re-purificación del ARN mediante su precipitación con etanol y posterior evaporación y resuspensión en agua tratada con DEPC. Para comprobar que la eliminación del ADNg contaminante había sido exitosa, las muestras de ARN re-purificadas fueron de nuevo sometidas a un análisis electroforético, concluyendo la completa eliminación de la contaminación por ADNg (datos no mostrados).

Además, para confirmar los resultados obtenidos en el análisis de la pureza y la integridad mediante espectrofotometría y electroforesis, respectivamente, se llevó a cabo un estudio de ambos parámetros en muestras representativas de los ARNs obtenidos (duodeno, PP y MLNs de la ratona 1 de cada uno de los 5 grupos de estudio) mediante la tecnología ultrasensible Bioanalyzer (Agilent Technologies). Este dispositivo utiliza una tecnología de microfluidos proporcionando separaciones electroforéticas de alta resolución en función de su peso molecular, los resultados obtenidos se representan en forma de electroferogramas donde la

cantidad de fluorescencia emitida se correlaciona con la cantidad de ARN de un tamaño dado (Mueller y col., 2000). Al igual que los resultados obtenidos mediante el análisis espectrofotométrico, con la tecnología nanocapilar del equipo Bioanalyzer se pudo calcular el parámetro RIN (*RNA Integrity Number*) que aporta información sobre la pureza de las muestras de ARN, confirmándose la elevada pureza del ARN extraído, procedente del duodeno, PP y MLNs. El índice RIN es calculado a partir de en un algoritmo matemático que cuantifica la pureza del ARN desde 0 a 10, siendo las moléculas de ARN más integra, cuanto más alejadas del valor cero estén (Schroeder y col., 2006). La media de los valores RIN para las muestras de ARN analizadas fue $8,21 \pm 0,02$, cumpliendo con los requisitos necesarios para ser consideradas óptimas para el análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR (Fleige y Pfaffl, 2006). Como control positivo en esta técnica, se utilizó una muestra de ARN contaminado con proteínas y degradado por la acción de las ARNsas (muestra A), la cual presentó un valor de RIN de 1,30 poniendo de manifiesto la elevada pureza de las muestras de ARN obtenidas (figura 9, A).

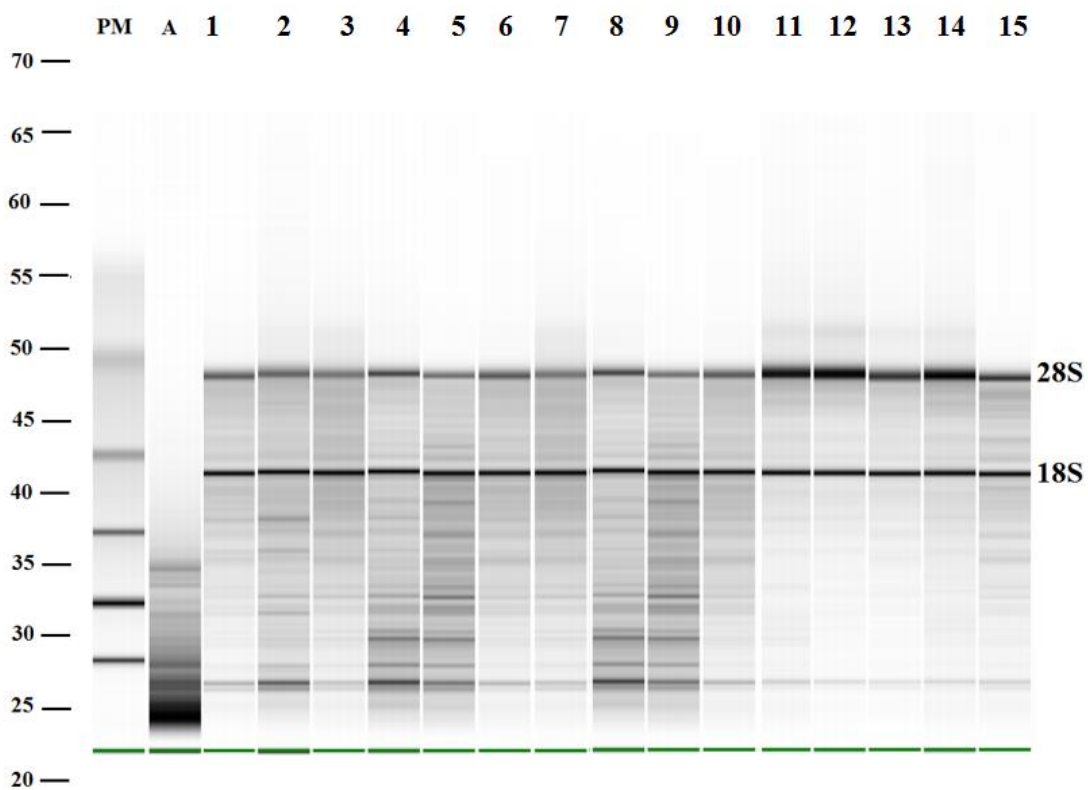


Figura 9. Electroforesis nanocapilar, realizada mediante el equipo Bioanalyzer, de muestras representativas del ARN extraídas del duodeno (1-5), las PP (6-10) y los MLNs (11-15) correspondientes de la ratona 1 de cada grupo de estudio. PM: marcador del peso molecular; A: muestra de ARN contaminada por proteínas y degradada por ARNsas.

El estudio de la integridad del ARN mediante la tecnología Bioanalyzer (Agilent Technologies) proporciona no sólo el perfil electroforético de las muestras, sino también la relación existente entre los ARNr 28S y 18S. El análisis de las muestras representativas del total

estudiadas mostró una alta definición e integridad de las bandas correspondientes a los ARNr (figura 9), lo cual confirma los resultados obtenidos mediante la electroforesis en gel de agarosa. Sin embargo, del total de muestras de ARN estudiadas, se observó como aquellas procedentes de MLNs presentaban una mayor integridad del conjunto del ARN extraído ya que las bandas de los ARNr 28S y 18S estaban mejor definidas (figura 9, 11-15) así como una menor degradación cromática vertical correspondiente a los fragmentos de ARN liberados tras su degradación (Schroeder y col., 2006). Por el contrario, las muestras procedentes de los duodenos y las PP mostraron una mayor cantidad de bandas inespecíficas que evidencia una mayor degradación del ARN extraído (figura 9, 1-10).

Estos resultados ponen de manifiesto que el ARN extraído de las células previamente aisladas de los MLNs presenta una mayor integridad que aquel procedente de los tejidos completos (duodenos y PP). Esta circunstancia puede ser debida a que al tratarse de tejidos, la complejidad de la muestra es mucho mayor presentando componentes (como la grasa, el tejido conectivo y otros tipos celulares) que pueden degradar *per se* el ARN y aumentar la posibilidad de contaminación con ARNsas endógenas (Fleige y Pfaffl, 2006; Schroeder y col., 2006). Además, en el caso de las muestras procedentes del duodeno, la contaminación por ARNsas exógenas presentes en la luz intestinal, como aquellas procedentes de la microbiota comensal, puede aumentar el riesgo de degradación del ARN extraído (Fleige y Pfaffl, 2006).

Estos resultados fueron además confirmados por el análisis del ratio 28S/18S (figura 10), que enfrenta el área bajo ambas curvas, de tal manera que las muestras con una buena integridad presentarán valores cercanos a 2 (Schroeder y col., 2006). Los valores medios obtenidos en las muestras de ARN analizadas presentaron un valor medio de $1,72 \pm 0,04$. Sin embargo, aunque las muestras de ARN procedentes de los duodenos y de las PP muestren un cierto grado de degradación, según los parámetros previamente descritos por Fleige y Pfaffl (2006), siguen siendo consideradas óptimas para servir como molde en el estudio de la expresión génica mediante RT-qPCR (Fleige y Pfaffl, 2006; Mueller y col., 2000).

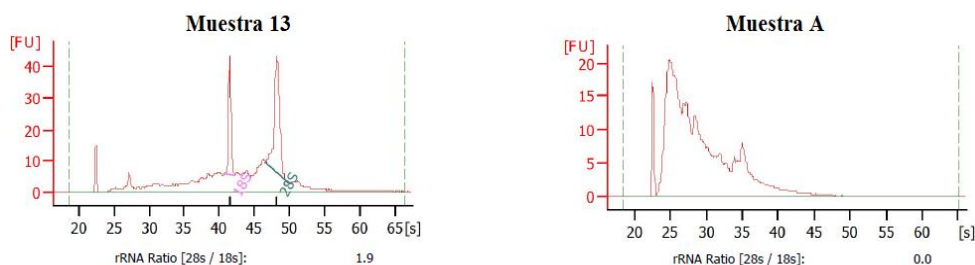


Figura 10: Ejemplo de la representación del ratio 28S/18S de una muestra de ARN de alta pureza e integridad (ratona 1 del grupo OVA, muestra13) en comparación con una muestra de ARN contaminada con proteínas y con un alto grado de degradación por ARNsas (control positivo de la técnica, muestra A).

3.2. OPTIMIZACIÓN DE LOS SISTEMAS RT-qPCR.

Como punto de partida para el proceso de optimización de los sistemas de RT-qPCR se llevó a cabo la selección y/o el diseño, así como la validación teórica, de las parejas de cebadores para ser utilizados en el estudio de la expresión génica de FoxP 3, GATA 3, IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17, IL-22, IL-25, IL-33, T-bet, TGF- β , TSLP y β -actina. A continuación, se seleccionaron las condiciones térmicas de la reacción y las concentraciones más adecuadas de los cebadores para la correcta amplificación de los productos específicos de la RT-qPCR. Por último, se llevó a cabo el análisis de la sensibilidad y eficiencia de los sistemas de RT-qPCR optimizados.

3.2.1 Selección y diseño de las parejas de cebadores

La correcta elección de los cebadores que van a ser utilizados en la reacción de amplificación es esencial para el adecuado desarrollo de los métodos de RT-qPCR, así como para el análisis preciso de la expresión relativa de los genes objeto de estudio. Tras una exhaustiva revisión en las bases de datos bibliográficas, utilizando los parámetros de búsqueda utilizados e indicados anteriormente, se realizó una primera selección de 5 a 20 parejas de cebadores específicas para cada gen objeto de estudio del total de las posibilidades presente en la bibliografía. Éstos fueron evaluados *in silico* en las aplicaciones bioinformáticas que se especifican en el mismo punto del apartado anteriormente citado. Para llevar a cabo la selección de las parejas de cebadores más adecuadas en cada gen diana, se utilizaron como criterios técnicos de evaluación: la longitud de los cebadores, la longitud del producto de amplificación, el contenido GC y la T_m de los cebadores. Una vez analizadas todas las opciones de parejas de cebadores posibles para cada gen, se seleccionaron aquellas que más se aproximaban a los criterios teóricos óptimos incluidos en el punto 2.2.1 del presente trabajo (Bustin y col., 2009; Rodríguez y col., 2015). En la tabla 4 se recogen las parejas de cebadores seleccionadas para ser utilizadas en las siguientes etapas de optimización de los sistemas de RT-qPCR.

Bustin y col (2009), pusieron de manifiesto la inminente necesidad de unificar los criterios de evaluación en materia del estudio de la expresión génica mediante RT-qPCR dado el elevado incremento de deficiencias técnicas y teóricas presentes en los artículos científicos que utilizaban esta técnica. Con este fin, y avalados por la comunidad científica, fue publicada una guía sobre la mínima información necesaria para la publicación de estudios que utilizaran RT-qPCR (Guía MIQE), la cual supuso una base de referencia tanto para los investigadores como para los revisores y editores de las revistas científicas (Bustin y col., 2009). Estudios previos apoyan los resultados obtenidos en el presente trabajo en lo que refiere a la escasa consistencia de las parejas de cebadores evaluadas, mostrando que un elevado número de criterios no son

cumplidos durante el diseño de los cebadores utilizados en la reacción, lo cual puede suponer la aparición de productos inespecíficos de RT-qPCR que induzcan a la interpretación errónea de los resultados de expresión génica obtenidos y, por lo tanto, a conclusiones equívocas (Bustin, 2010; Bustin y col., 2010).

Tabla 4. Secuencia de nucleótidos de las parejas de cebadores seleccionadas y los valores obtenidos para los criterios teóricos evaluados.

Gen	Cebador (5'- 3')	Tm ^a	% GC ^b	LC ^c	LP ^d	Referencia
β-actina	D ^e AGCTGCGTTTTACACCCTTT	58,31	45,00	20	81	Cardoso y col., 2009
	R ^f AAGCCATGCCAATGTTGTCT	58,36	45,00	20		
GATA 3	D CCTTAAACTCTTGGCGTCC	56,73	50,00	20	133	Thang y col., 2015
	R AGACACATGTCATCCCTGAG	56,63	50,00	20		
FoxP 3	D ACAACCTGAGCCTGCACAAGT	62,48	52,38	21	155	Cardoso y col., 2009
	R GCCCACCTTTTCTTGGTTTTG	58,44	47,62	21		
IFN-γ	D GCTCTTCCTCATGGCTGTTT	58,17	50,00	20	154	Yang y col., 2009
	R GTCACCATCCTTTTGCCAGT	58,38	50,00	20		
IL-4	D CCTCACAGCAACGAAGAACA	58,42	50,00	20	155	Yang y col., 2009
	R ATCGAAAAGCCCGAAAGAGT	57,53	45,00	20		
IL-10	D GCCTTATCGGAAATGATCCA	55,28	45,00	20	151	Yang y col., 2009
	R AGGGGAGAAATCGATGACAG	56,71	50,00	20		
IL-17	D TGCCTGTGGCACTGAAGTAG	59,96	55,00	20	243	Diseñado
	R TTCATGGCTGCAGTGAAAAG	56,91	45,00	20		
IL-22	D CATGCAGGAGGTGGTACCTT	59,38	55,00	20	198	Chu y col., 2013
	R CAGACGCAAGCATTCTCAG	57,48	50,00	20		
IL-25	D ACAGGGACTTGAATCGGGTC	59,39	55,00	20	121	Li y col., 2012
	R TGGTAAAGTGGGACGGAGTTG	59,93	52,38	21		
IL-33	D ATTTCCCGGCAAAGTTCAG	58,74	50,00	20	118	Li y col., 2012
	R AACGGAGTCTCATGCAGTAGA	58,55	47,62	21		
T-bet	D GTATCCTGTTCCCAGCCGTTTC	61,26	54,55	22	97	Thang y col., 2015
	R ACTGTGTTCCCGAGGTGTCC	61,76	60,00	20		
TGF-β	D TTGCTTCAGCTCCACAGAGA	58,95	50,00	20	156	Yang y col., 2009
	R TACTGTGTGTCCAGGCTCCA	60,47	55,00	20		
TSLP	D AGGCTACCCTGAAACTGAGA	57,67	50,00	20	120	Negishiy col., 2012
	R GGAGATTGCATGAAGGAATAC	54,42	42,86	21		

^aTemperatura *melting*; ^bPorcentaje del contenido en guanina y citosina; ^clongitud del cebador; ^dLongitud del producto de amplificación; ^eCebador directo (D); ^fCebador reverso (R).

Sin embargo, aunque los criterios teóricos establecidos son de elevada importancia para evitar la producción de productos inespecíficos durante la reacción de qPCR, desde el punto de vista de la técnica se ha evidenciado que estos criterios idóneos no son estancos sino que

presentan cierta flexibilidad en la práctica experimental, obteniéndose productos específicos de amplificación que permiten la correcta evaluación de la expresión génica (Hugget y col., 2013).

En lo que refiere a la longitud idónea de la secuencia nucleotídica de los cebadores seleccionados varían entre 20 y 22 bp, habiéndose previamente establecido que cebadores con un rango de 15 a 30 bp favorecen la unión específica entre éstos y el gen de interés (Wu y col., 2004). El producto de amplificación idóneo tiene que contener entre 50 y 150 bp, alcanzándose el óptimo de la reacción en 80 bp. El hecho de que el producto de RT-qPCR de algunos de los cebadores seleccionados sobrepase el valor de 150 bp (tabla 4), no interfiere significativamente en su análisis, no recomendándose que el producto de amplificación llegue a valores de 400 bp, ya que la susceptibilidad a formar estructuras secundarias sería demasiado elevada, repercutiendo estos valores en la eficiencia de la qPCR (Toouli y col., 2000). Además, el contenido en GC de cada cebador debe oscilar en torno al 50%; si se supera, podrían existir problemas en la amplificación, aumentando la probabilidad de hibridación entre los cebadores y disminuyendo la eficiencia de la reacción (Raymaekers y col., 2009).

Más allá de los criterios comentados anteriormente, es importante reducir al mínimo valor las posibles dimerizaciones conjuntas y propias, así como la formación de horquillas, en los cebadores seleccionados para los sistemas de RT-qPCR (Kubista y col., 2006). Por esta razón, el análisis *in silico* de las parejas de cebadores seleccionados mostró que las posibles dimerizaciones conjuntas eran menores de tres, que las dimerizaciones propias eran inferiores a dos y que no existía la posibilidad de que los cebadores formasen horquillas.

En lo que se refiere a la pareja de cebadores para el estudio de la expresión de IL-17, ninguna de las 10 opciones recogidas de la bibliografía, y sometidas al análisis de los parámetros anteriormente citados, cumplieron adecuadamente con los criterios teóricos establecidos (Rodríguez y col., 2015). La principal discordancia con estos criterios fue el excesivo tamaño del producto de amplificación, que variaban entre 568 y 795 bp y la elevada T_m de los cebadores que en todas las ocasiones sobrepasaba los 65°C. Por esta razón, se llevó a cabo el diseño de una pareja de cebadores que permitiesen la adecuada amplificación del gen IL-17, utilizando como punto de partida para su diseño la secuencia para este gen con referencia de acceso XM_006505618.1 en la base de datos GenBank del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). El proceso de selección de los cebadores se llevó a cabo mediante el uso de las herramientas bioinformáticas detalladas en el punto 2.2.1 del presente trabajo. Finalmente, la pareja de cebadores seleccionado cumplió con todos los criterios teóricos evaluados (tabla 4) y su análisis *in silico* en la base de datos Primer-BLAST puso de manifiesto que estos cebadores sólo amplificaban para las referencias de acceso XM_006505618.1 y NM_008359.2, ambas dos correspondientes a las secuencias de ARNm del gen IL-17 en la especie *Mus musculus*.

3.2.2 Optimización de las condiciones de la reacción

Una vez seleccionadas las parejas de cebadores para el análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR, se realizó la optimización de las concentraciones de los cebadores necesarias en la mezcla de la reacción y las condiciones térmicas para la adecuada amplificación un producto de RT-qPCR específico para el gen objeto de estudio. Como punto de partida de este proceso, se utilizaron las condiciones de la reacción previamente descritas para cada pareja de cebadores en las referencias bibliográficas de las cuales procedían (tabla 4) y estas fueron modificadas en función de otras condiciones presentes en la bibliografía para este tipo de estudios (Wai y col., 2016; Yang y col., 2010). El objetivo fundamental fue reducir el número de posibilidades para que con la menor cantidad de condiciones posibles los cebadores seleccionados amplificasen adecuada y específicamente el producto de RT-qPCR.

Para ello se ensayaron concentraciones que variaron desde 160 nM a 313 nM en el caso de los cebadores directos y de 125 nM a 313 nM para los cebadores reversos. Al mismo tiempo, se llevó a cabo la puesta a punto de las temperaturas y los tiempos de las etapas de incubación con la enzima UNG, pre-desnaturalización, desnaturalización del ciclo de amplificación y de la etapa de hibridación/extensión. Por su parte, las condiciones de incubación con la enzima UNG (50 °C durante 2 min) y la etapa de desnaturalización del ciclo de amplificación (95 °C durante 15 s) fueron mantenidas. Sin embargo, para la etapas de pre-desnaturalización se analizaron dos tiempos de 5 ó 10 min a una temperatura constante de 95 °C y para la etapa de hibridación/extensión se analizaron diferentes posibilidades (58 - 60 °C durante 45seg-1min).

Finalmente, se seleccionaron seis condiciones de la reacción (A-F) que combinaban diferentes concentraciones de cebadores, número de ciclos, temperaturas y tiempos de pre-desnaturalización e hibridación/extensión en las que al menos una de la pareja de cebadores amplificaba adecuadamente su producto específico (tabla 5).

Al tratarse de la metodología SYBR Green, la especificidad de los productos generados en la reacción de qPCR fue determinada mediante una curva de disociación, basada en un aumento progresivo de la temperatura, que permite estimar una T_m específica para el producto amplificado.

No todas las condiciones fueron utilizadas con todas las parejas de cebadores analizadas, tan sólo aquellas que produjeron un producto de amplificación específico (determinado mediante la curva de disociación por una T_m concreta) en la etapa de optimización previa fueron las utilizadas para la realización de la curva de eficiencia, tal y como se detalla en la tabla 6.

Tabla 5. Condiciones de concentración de la pareja de cebadores, de las temperaturas y tiempos de pre-desnaturalización e hibridación/extensión seleccionadas para la amplificación de los genes dianas que fueron utilizadas para llevar a cabo el análisis de la eficiencia de las reacciones de amplificación para los diferentes genes estudiados.

CR ^a	μL D ^b (100μM)	μL R ^c (100μM)	Ciclos ^d	Pre-desnaturalización	Hibridación/extensión
A	0,375	0,375	40	95 °C /10 min	60 °C / 1 min
B	0,2	0,2	40	95 °C /5 min	58 °C / 45 s + 60°C / 15 s
C	0,2	0,125	40	95 °C /5 min	58 °C / 45 s + 60°C / 15 s
D	0,2	0,2	45	95 °C /5 min	58 °C / 45 s + 60°C / 15 s
E	0,2	0,2	40	95 °C /10 min	60 °C / 1 min
F	0,375	0,375	40	95 °C /5 min	58 °C / 45 s + 60°C / 15 s

^aCondición de la reacción; ^bCebador directo (D); ^cCebador reverso (R); ^dNúmero de ciclos de amplificación.

Estudios previos (Fredlung y col., 2008), establecieron una serie de criterios para interpretar correctamente estos análisis, siendo el principal criterio de selección que la pendiente de la curva de eficiencia se encuentre entre -3,10 y -3,60, lo cual se corresponde con un porcentaje de eficiencia del 80 al 110%, y que el valor de R² sea superior a 0,98. Tal y como muestran los resultados obtenidos para las condiciones de qPCR seleccionadas para cada gen objeto de estudio, las curvas de eficiencia realizadas con ADNg y los valores de Ct obtenidos mostraron unas pendientes enmarcadas en los parámetros establecidos (figura 11), además de una alta correlación lineal, encontrándose un R² de los valores finalmente seleccionados (color sombreado) superior o igual a 0,98 (tabla 6).

Además, el desarrollo de las curvas de eficiencia permitió la determinación de la sensibilidad de los sistemas de RT-qPCR optimizados, alcanzándose un límite de detección de este método que se estableció en 0,5 ng para GATA 3, IL-17 e INF-γ; en 0,05 ng para IL-4, IL-10 y TGF-β; y en 0,005 ng para β-actina, FoxP 3, IL-22, IL-25, IL-33, T-bet y TSLP.

Tabla 6. Estudio de la eficiencia de la reacción, utilizando las condiciones de concentración de cebadores, temperatura y tiempo previamente optimizadas para cada pareja de cebadores. La línea sombreada muestra cuales fueron las condiciones finales seleccionadas para cada gen objeto de estudio.

Gen	Tm	Condición	R ²	% E	Gen	Tm	Condición	R ²	% E
β-actina	77,80 ± 0,01	A	0,99	82%	IL-22	84,68 ± 0,02	B	0,99	101%
	77,66 ± 0,02	B	0,99	101%	IL-25	87,58 ± 0,01	A	0,99	89%
	77,84 ± 0,02	E	0,99	91%		87,82 ± 0,02	D	0,93	80%
FoxP 3	85,28 ± 0,03	A	0,99	100%	IL-33	87,84 ± 0,02	E	0,96	106%
	85,51 ± 0,01	B	0,98	112%		84,29 ± 0,03	A	0,98	105%
	85,56 ± 0,04	E	0,99	89%		84,25 ± 0,04	D	0,97	78%
GATA 3	88,64 ± 0,02	A	0,99	111%	T-bet	84,27 ± 0,02	E	0,99	90%
	88,66 ± 0,02	B	0,99	87%		84,51 ± 0,02	A	0,99	91%
	88,81 ± 0,02	E	0,99	85%		84,59 ± 0,01	B	0,97	107%
IFN	81,41 ± 0,02	B	0,98	110%	TGF-β	84,55 ± 0,01	E	0,97	101%
IL-4	82,35 ± 0,03	B	0,98	95%		85,31 ± 0,03	A	0,99	89%
IL-10	85,00 ± 0,02	A	0,99	197%	TSLP	85,49 ± 0,02	B	0,99	98%
	84,91 ± 0,03	B	0,98	95%		79,81 ± 0,01	A	0,98	98%
IL-17	86,85 ± 0,01	A	0,99	93%	TSLP	80,10 ± 0,03	D	0,93	83%
	87,05 ± 0,01	D	0,97	79%		80,12 ± 0,04	E	0,97	111%
	87,17 ± 0,01	F	0,97	67%					

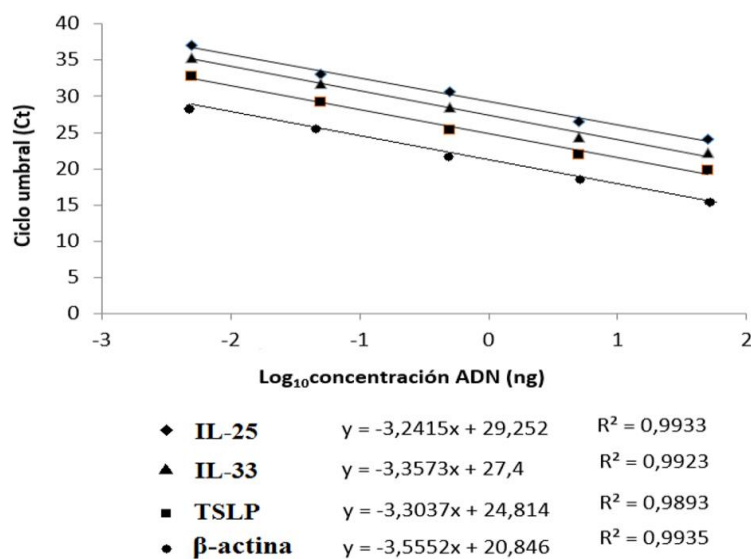


Figura 11. Curvas estándar obtenidas de las principales citoquinas intestinales, así como del gen de referencia, a partir de concentraciones de ADNg de esplenocitos frente a los valores del ciclo umbral, obtenidos a partir del método optimizado de qPCR.

3.2.3 Estudio de la expresión de los genes implicados en la inducción a la tolerancia oral mediante RT-qPCR.

Tras la optimización de los sistemas de RT-qPCR se realizó una validación de los mismos en el estudio de la expresión génica en muestras de duodeno, PP y MLNs para caracterizar los efectos terapéuticos de la OIT con los hidrolizados OA y OP en un modelo murino de alergia al huevo. Como controles se utilizaron: un grupo sensibilizado exclusivamente a CT (utilizado como calibrador en el estudio de la expresión génica), un grupo sensibilizado a EW que no fue tratado (control) y otro tratado con OVA sin hidrolizar (OVA).

En primera instancia se evaluó la influencia de la OIT sobre las células epiteliales del intestino mediante el estudio de la expresión de las citoquinas IL-33, IL-25 y TSLP, las cuales juegan un papel elemental en las fases afectoras y efectoras de la reacción alérgica ya que desencadenan el desarrollo de la respuesta Th2 (Chinthrajah y col., 2016). Los resultados mostraron un incremento significativo de expresión de IL-33 e IL-25 en el grupo control mientras que en el caso de los animales tratados con OVA, OA y OP sufrieron una disminución de la expresión de estos genes (figura 12 a y b). La especial relevancia de IL-33 y su influencia en el desarrollo de la respuesta alérgica y anafiláctica, a través de la inducción de OX40L producido por las DCs en la generación de la respuesta Th2, ha sido previamente descrita (Chu y col., 2012). La reducción observada durante la OIT con OVA y sus hidrolizados podría sugerir un efecto en la desensibilización de los animales tratados. Si bien la expresión de IL-25 mostró un patrón similar al de IL-33, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos en los niveles de TSLP (figura 12 c). El TSLP actúa sobre las DCs y los linfocitos T, amplificando la respuesta Th2 y suprimiendo las respuestas Th1 y Th17 (Taylor y col., 2009; Blazquez y col., 2010). Sin embargo, nuestros resultados no mostraron diferencias significativas para esta citoquina.

Para analizar los efectos de la administración oral de los hidrolizados OA y OP en las dos principales poblaciones de las células T involucradas en la alergia alimentaria, Th2 y Th1, se estudiaron los genes que codifican para IL-4 e IFN- γ como marcadores de esas dos respuestas, respectivamente. La citoquina IL-4 conduce a la diferenciación de los linfocitos Th0 hacia un fenotipo Th2, promoviendo un entorno alérgico a nivel intestinal y sistémico, mientras que el IFN- γ es fundamental para el desarrollo de un fenotipo Th1 (Yang y col., 2009).

El grupo control muestra una elevada expresión de IL-4 tanto en PP como en MLNs, lo que pone de manifiesto el alto grado de sensibilización a la EW de estos animales (figura 13). Sin embargo, los grupos OVA, OP y OA sufrieron un marcado descenso en los niveles de expresión de este gen (figura 13). Estos resultados están en concordancia con estudios previos

realizados en modelos de ratones alérgicos que han demostrado que la OIT tanto con la proteína intacta como con hidrolizados inmunomodulantes son capaces de producir un descenso en la generación de las citoquinas del tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) relacionado con una desensibilización al alérgeno al cual se encuentran sensibilizados (Yang y col., 2009; Jiménez-Saiz y col., 2011).

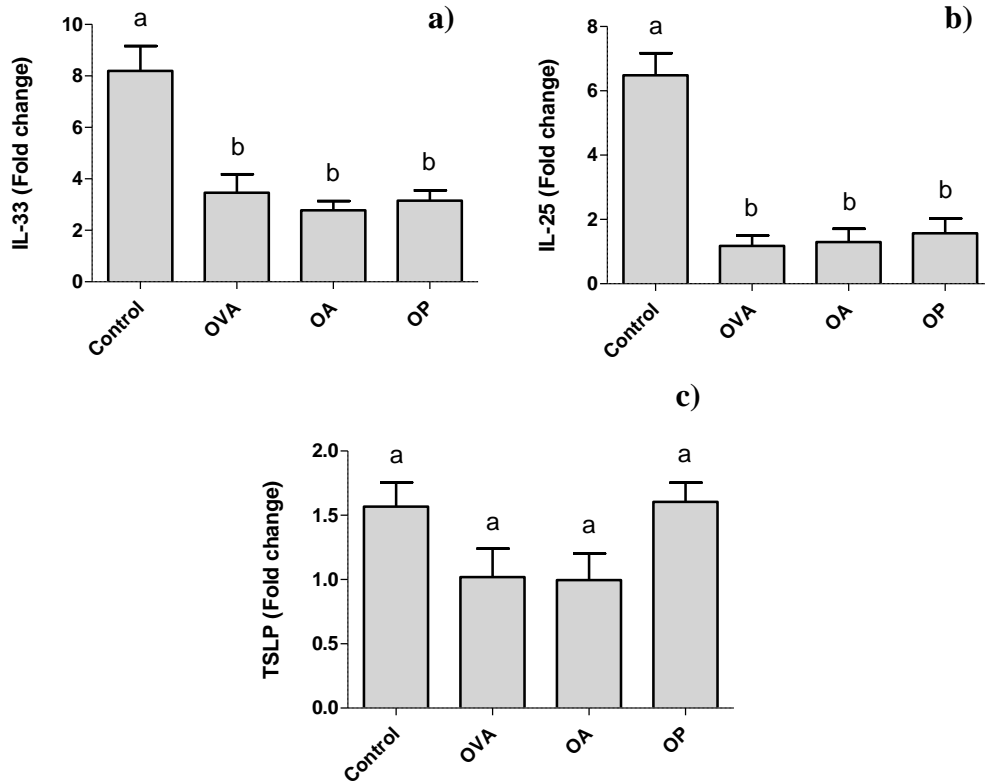


Figura 12. Expresión de los genes IL-33 (a), IL-25 (b) y TSLP (c) en las muestras de duodenos. Todos los valores están normalizados respecto al grupo calibrador (CT) cuyo valor de referencia es 1. Las letras a-b indican las diferencias significativas ($P < 0,05$).

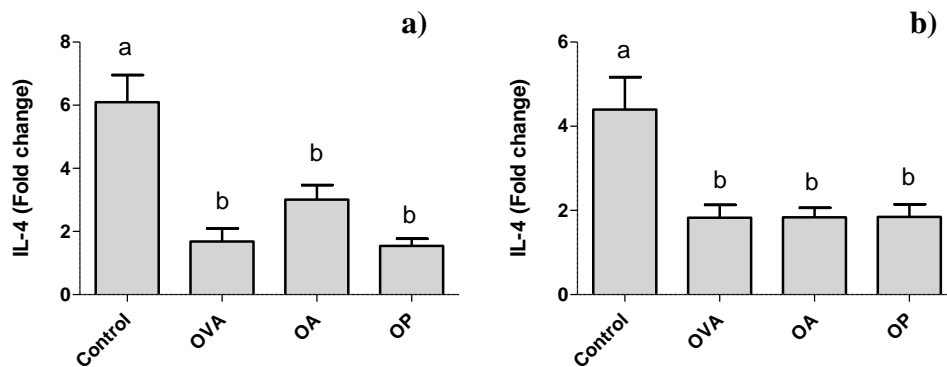


Figura 13. Expresión del gen IL-4 en las PP (a) y en los MLNs (b). Todos los valores están normalizados respecto al grupo calibrador (CT) cuyo valor de referencia es 1. Las letras a-b indican las diferencias significativas ($P < 0,05$).

La expresión relativa del IFN- γ utilizado en este caso como representante de las citoquinas del tipo Th1, mostró una disminución significativa en los animales tratados con el hidrolizado, mientras que cuando no fueron tratados (control) o se utilizó OVA para su tratamiento se observaron elevados niveles de expresión de este gen a nivel de los MLNs (figura 14). Este hecho puede ser atribuido a un posible efecto compensatorio entre la respuesta Th1/Th2 previamente descrito como uno de los posibles mecanismos de acción de la desensibilización en individuos alérgicos (Yang y Mine, 2009; Lozano-Ojalvo y col., 2016a). Los resultados sugieren que la posible disminución de citoquinas promotoras de la respuesta Th2 (IL-33 e IL-4) originada por el tratamiento con la proteína intacta (OVA), puede ser debido a la liberación de péptidos inmunogénicos durante la digestión de la misma que, puede relacionarse con la polarización de la respuesta alérgica hacia un reclutamiento de células Th1 que resuelva con la respuesta alérgica (Rupa y Mine, 2012). Sin embargo, el tratamiento de los animales sensibilizados a EW con los hidrolizados de OVA indujo una disminución en la expresión de IFN- γ , lo cual implica que la disminución observada de la respuesta Th2 no es debida a la inducción de un respuesta tipo Th1 (figura 14), sugiriendo la participación de otras poblaciones celulares (Weiner y col., 2011).

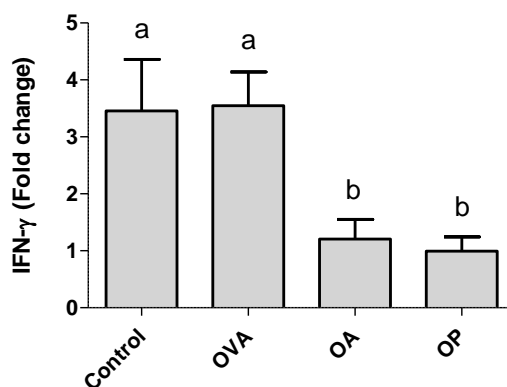


Figura 14. Expresión del gen IFN- γ en los MLNs. Todos los valores están normalizados respecto al grupo calibrador (CT) cuyo valor de referencia es 1. Las letras a-b indican las diferencias significativas ($P < 0,05$).

Por esta razón se llevó a cabo un estudio de las poblaciones Th1, Th2 y Treg, en los diferentes órganos recuperados, a través de la expresión génica de T-bet, GATA 3 y FoxP 3, respectivamente (figura 15). Estos resultados confirman los previamente observados, mostrándose un incremento significativo en la expresión de T-bet (Th1) y GATA 3 (Th2) en los animales sin tratar o tratados con OVA mientras que en los ratones que recibieron los hidrolizados se observa una disminución significativa de estos genes (figura 15 a y b). Sin embargo, el estudio de la expresión de la población de células Treg mostró un elevado aumento en la expresión de FoxP 3 en el grupo de ratones tratados con OP a nivel de duodeno, PP y MLNs (figura 15 c, d y e). Este hecho sugiere que el posible efecto curativo de este hidrolizado

puede ser generado por la expansión de células Treg, tal y como se ha descrito para ciertos hidrolizados inmunogénicos en otros modelos de alergias alimentarias (Kulis y col., 2012; Wai y col., 2016). Cabe resaltar la importancia de que el aumento de los niveles de expresión de FoxP 3 en los ratones tratados con OP se observe en los MLNs y las PP (Figura 15 c y e), ya que estos sitios anatómicos han sido previamente descritos como inductores para el desarrollo de la tolerancia oral (Mazzini y col., 2014).

Estudios previos han observado que la reducción en la producción de ambos tipos de citoquinas, Th1 y Th2, durante la desensibilización a los alérgenos alimentarios puede estar relacionado con un doble efecto de inhibición, inducido por la actividad supresora de IL-10 y TGF- β producidas por las células Treg (Nouel y col., 2014; Verhagen y col., 2006; Yan y col., 2009). La figura 16 muestra un aumento significativo de la expresión de IL-10 en los ratones tratados con OP tanto a nivel de las PP como de los MLNs. Los posibles efectos de los hidrolizados inmunomodulantes en la inducción a la tolerancia oral, debido a un incremento de las células Treg productoras de IL-10 han sido previamente descritos (Mazzini y col., 2014).

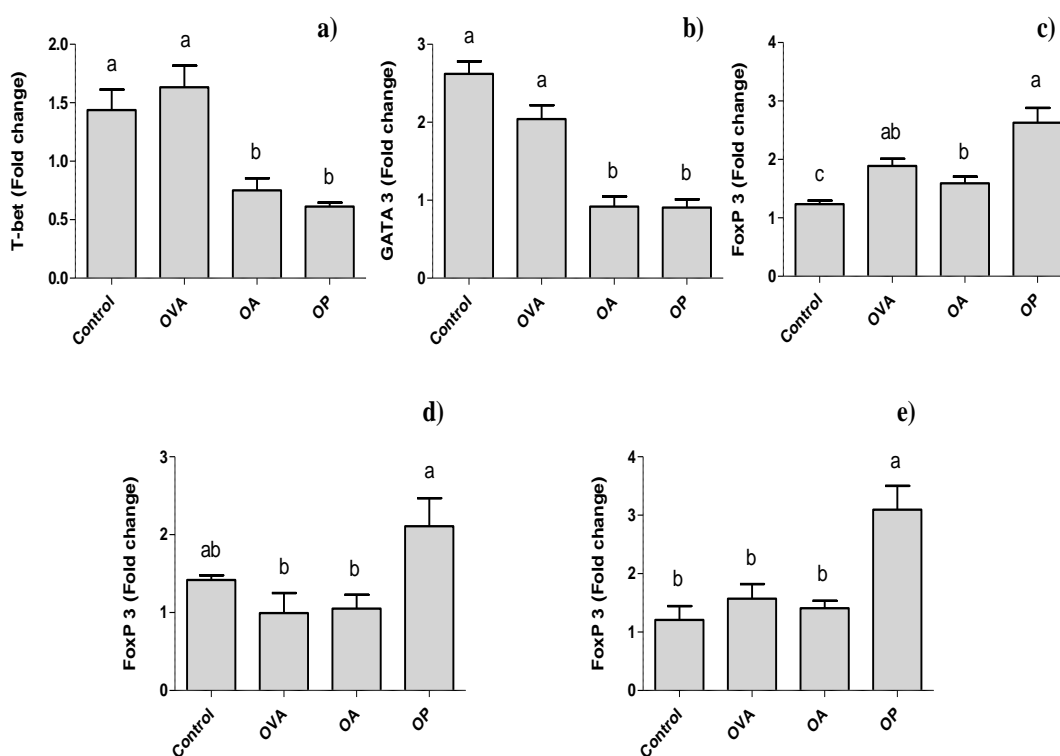


Figura 15. Expresión de los genes T-bet (a), GATA 3 (b) y FoxP 3 (c, d y e) en los MLNs (a, b y c) y en duodeno (d) y en las PP (e). Todos los valores están normalizados respecto al grupo calibrador (CT) cuyo valor de referencia es 1. Las letras a-c indican las diferencias significativas ($P < 0,05$).

Además, se realizó el estudio de la expresión génica de TGF- β observándose un incremento significativo en los niveles de expresión de este gen tanto en el duodeno como en los MLNs del grupo de ratones tratados con hidrolizado OP (figura 16 c y d). Por el contrario,

en los ratones tratados con OA no se observó ninguna diferencia significativa en la expresión de FoxP 3 (figura 15) ni de IL-10 o TGF- β (figura 16), descartándose la opción de que el posible efecto inhibitorio de las citoquinas Th2 previamente observado para IL-33 e IL-4 pueda ser debido al posible efecto tolerogénico de las células Treg.

El papel del TGF- β secretado por las células Treg en la inducción y mantenimiento de la tolerancia ha sido ampliamente descrito (Spahn y col., 2001; Weiner y col., 2011; Yang y col., 2010). Estudios previos en modelos murinos de alergia alimentaria han demostrado que TGF- β bloquea la proliferación y el desarrollo de las células Th1 y Th2 mediante la modificación de la expresión de los factores de transcripción T-bet y GATA 3 respectivamente (Gorelik y col., 2000; Gorelik y col., 2002), hecho que se corrobora con nuestros resultados (figura 15).

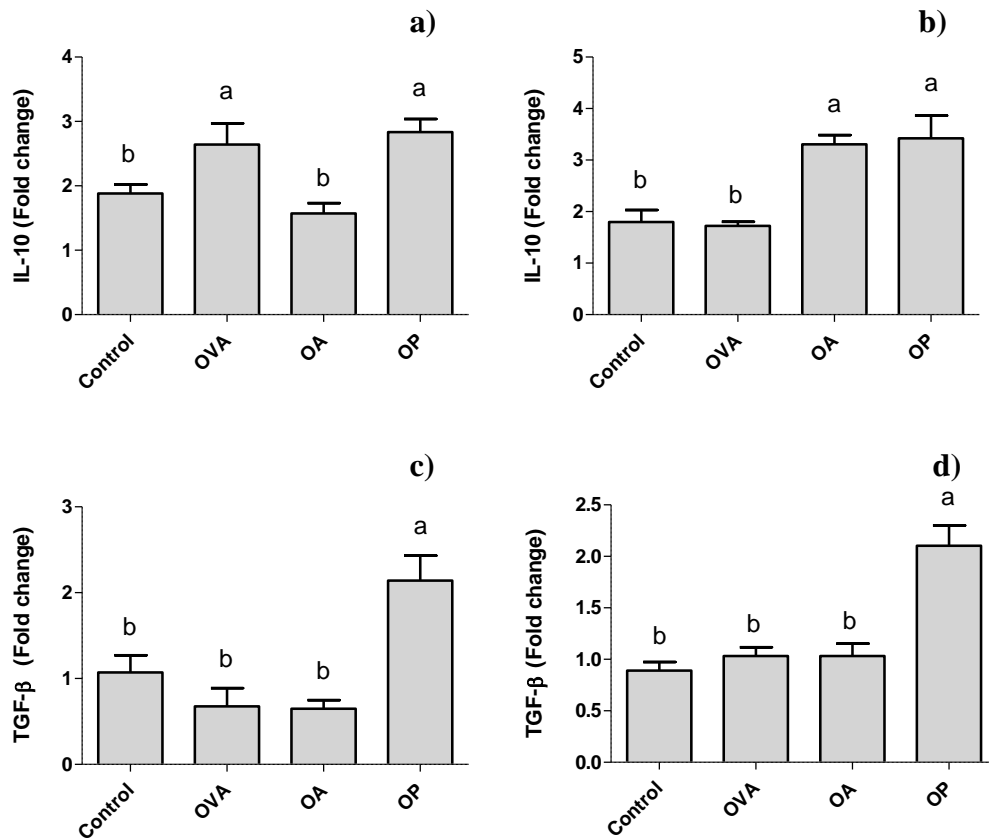


Figura 16. Expresión de los genes IL-10 (a y b) y TGF- β (c y d) en los MLNs (a y d), las PP (b) y en el duodeno (c). Todos los valores están normalizados respecto al grupo calibrador (CT) cuyo valor de referencia es 1. Las letras a-b indican las diferencias significativas ($P < 0,05$).

Más allá del estudio de las principales poblaciones de células T involucradas en las alergias alimentarias, los tipos Th1 y Th2, en el presente trabajo se quiso llevar a cabo el desarrollo de sistemas de RT-qPCR que permitiesen estudiar las respuestas del tipo Th17 y Th22 a través de la expresión de los genes IL-17 e IL-22, respectivamente. Estas dos poblaciones celulares, aunque poco conocidas en la actualidad, han sido recientemente descritas

por jugar un importante papel en el desarrollo de la tolerancia oral en la alergia alimentaria, aunque por el momento existen bastantes controversias en cuanto al mecanismo regulatorio que ejercen (Kiewiet y col., 2015).

Los resultados obtenidos mostraron un incremento significativo de la expresión de IL-17 cuando los ratones sensibilizados a EW fueron tratados con OP, mientras que no se encontraron diferencias en el resto de grupos estudiados (figura 17a). Schnyder-Candrian y col (2006) describieron que la citoquina IL-17 reprime la producción de citoquinas del tipo Th2 como IL-4 e IL-13. Además, otros estudios han sugiriendo que la baja producción de IL-17 por parte de las células T de individuos alérgicos podría originar una respuesta Th2 exacerbada (Bin y col., 2013). En coherencia con estos hallazgos, los resultados mostrados en la figura 17 apoyarían el hecho de que el incremento de los niveles de expresión de IL-17 en las PP de los ratones tratados con OP pudiese tener un efecto tolerogénico basado en la disminución de las poblaciones de células que expresan GATA 3 (Th2) que se relacionaría con una menor expresión del gen IL-4 tal y como se mostró anteriormente (figura 13 y 15). Sin embargo, Berin y Mayer (2009) observaron que la inducción de células Treg FoxP 3+ generaba una supresión sobre la expansión de las células Th17, lo cual entra en contradicción con los resultados obtenidos en este trabajo donde se pone de manifiesto un aumento significativo de la expresión tanto de FoxP 3 como de IL-17 tras la administración del hidrolizado de OP.

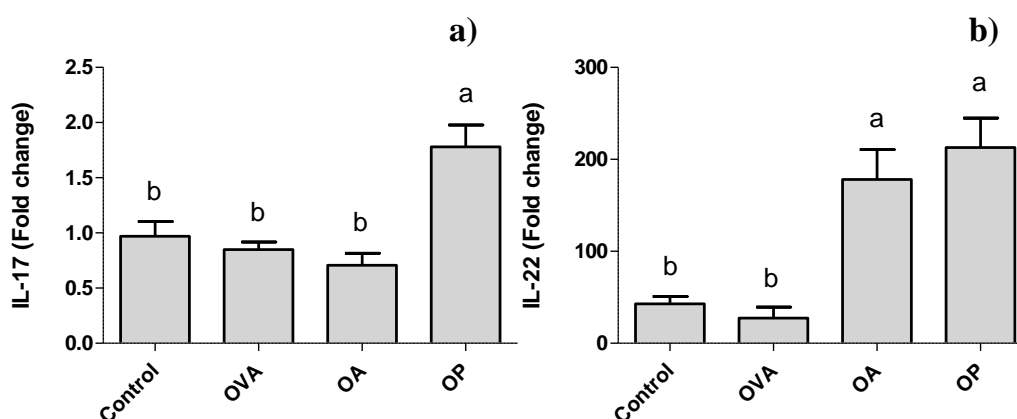


Figura 17. Expresión de los genes IL-17 (a) e IL-22 (b) analizadas en las PP. Todos los valores están normalizados respecto al grupo calibrador (CT) cuyo valor de referencia es 1. Las letras a-b indican las diferencias significativas ($P < 0,05$).

Por otro lado, los resultados obtenidos para IL-22 mostraron un incremento muy marcado de la expresión de este gen en las PP de los ratones tratados con ambos hidrolizados de OVA (figura 17 b). Cuando los niveles expresión de IL-22 fueron estudiados en las muestras de MLNs se observaron ratios que llegaron a alcanzar un *fold change* de hasta 600, lo cual pone de manifiesto un importante efecto de los hidrolizados de OA y OP en la síntesis de esta citoquina. La interacción de estas citoquinas con las células del epitelio intestinal ha sido previamente

descrita por Stelfka y col (2014). Estudios recientes demuestran que IL-22 es capaz de interactuar con las células de Goblet e inducir en este tipo celular la secreción de mucus (Sabat y col., 2014). Este efecto podría ser de elevado interés en el estudio de los mecanismos de acción de los hidrolizados de OVA sobre la inducción a la tolerancia oral, pues de manera indirecta, un incremento en la producción de mucus a nivel de la barrera epitelial permitiría la regulación de la permeabilidad del intestino, protegiendo las uniones de las células epiteliales y disminuyendo la captación de los alérgenos alimentarios (Booth y Potten, 2000).

En su conjunto, los resultados obtenidos mediante los sistemas de RT-qPCR desarrollados durante el presente trabajo muestran como en los animales que recibieron OP durante la OIT sufren un aumento de las células Treg tolerogénicas productoras de IL-10 y TGF- β (figura 16). El concomitante aumento de los niveles de expresión de estos genes, pone de manifiesto el posible efecto inhibitorio de la respuesta alérgica mediante el tratamiento oral con OP a través de una expansión de las células Treg. Este mecanismo de acción en la resolución de las alergias ha sido previamente descrito para otros hidrolizados inmunomodulantes, poniendo de manifiesto la especial relevancia que tienen las células Treg tolerogénicas en la resolución de las alergias alimentarias y la inducción a la tolerancia oral (Perezábad y col., 2015; Schevach y col., 2008; Yang y col., 2010).

4. CONCLUSIONES

1. Las muestras de ARN obtenidas de duodenos, PP y MLNs de ratones sometidos a una OIT para el tratamiento de la alergia al huevo fueron de una pureza e integridad óptima para ser utilizados en el estudio de la expresión génica mediante la técnica de RT-qPCR.

2. La selección y validación de los cebadores, así como la optimización de las condiciones de amplificación de las reacciones de RT-qPCR, permitió la puesta a punto de sistemas de alta eficiencia para el estudio de la expresión génica de FoxP 3, GATA 3, IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17, IL-22, IL-25, IL-33, T-bet, TGF- β y TSLP.

3. El hidrolizado de OVA con pepsina mostró un efecto terapéutico en ratones sensibilizados a EW basado en una disminución de la expresión de IL-33, IL-4 y GATA 3 y un incremento en los niveles de expresión de los genes relacionados con la población de células Treg (FoxP 3, IL-10 y TGF- β).

5. BIBLIOGRAFÍA

Bedoret, D., Singh, A.K., Shaw, V., Hoyte, E.G., Hamilton, R., DeKruyff, R.H. (2012). Changes in antigen-specific T-cell number and function during oral desensitization in cow's milk allergy enabled with omalizumab. *Mucosal Immunology*, 5: 267-276.

Berin, M.C., Mayer, L. (2009). Immunophysiology of experimental food allergy. *Mucosal Immunology*, 2: 24-32.

Berin, M.C., Sampson, H.A. (2013). Food allergy: an enigmatic epidemic. *Trends in immunology*, 34: 390-397.

Berin, M.C., Sicherer, S. (2011). Food allergy: mechanisms and therapeutics. *Current Opinion in Immunology*, 23: 794-800.

Bin, D.K., d'Hennezel, E., Ben-Shoshan, M. (2013). Altered T helper 17 responses in children with food allergy. *International Archives of Allergy and Immunology*, 162: 318-322.

Blazquez, A.B., Mayer, L., Berin, M.C. (2010). Thymic stromal lymphopoietin is required for gastrointestinal allergy but not oral tolerance. *Gastroenterology*, 139: 1301-1309.

Booth, C., Potten, C. (2000). Gut instincts: Thoughts on intestinal epithelial stem cells. *Journal of Clinical Investigation*, 105: 1493-1499.

Boyce, J.A., Assad, A., Burks, W., Jones, S.M., Sampson, H.A., Wood, R.A., Plaut, M., Cooper, S.F., Fenton, M.J., Arshad, S.H., Bahna, S., Schwanger, J.M. (2010). Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: summary of the NIAID-Sponsored expert panel report. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126: 1105-1118.

Bush, R.K., Heffle, S.L. (1996). Food allergens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36: 119-163.

Bustin, S.A. (2010). Why the need for qPCR publication guidelines? The case for MIQE. *Methods*, 50: 217-226.

Bustin, S.A., Beaulieu, J.F., Huggett, J., Jaggi, R., Kibenge, F.S., Olsvik, P.A., Penning, L.C., Toegel, S. (2010). MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Molecular Biology*, 11: 74.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55: 611-622.

Cardoso, C.R., Provinciatto, P.R., Godoi, D.F., Ferreira, B.R., Teixeira, G., Rossi, M.A. (2009). IL-4 regulates susceptibility to intestinal inflammation in murine food allergy. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296: 593-600.

Caubet, J.C., Wang, J. (2011). Current understanding of egg allergy. *Pediatric Clinics of North America*, 58: 427-443.

Chehade, M. y Mayer, L. (2005). Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115: 3-12.

Chinthrajah, R.S., Hernández, J.D., Boyd, S.D., Galli, S.J., Nadeau, K.C. (2016). Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137: 984-997.

Chu, D., Mohammed-Ali, Z., Walker, T., Goncharova, S., Llop-Guevara, A., Barra, N., Gillgrass, A., Ashkar, A., Bramson, J., Humbles, A., Kolbeck, R., Wasserman, S., Jordana, M. (2013). Initiation of food allergy by a CD4(+) T cell-intrinsic IL-4 program, controlled by OX40L. *Journal of immunology*, 190: 621.

Chuang, L.Y., Cheng, Y.H., Yang, C.H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology Letters*, 35: 1541-1549.

Clark, A.T., Islam, S., King, Y., Deighton, J., Anagnostou, K., Ewan, P.W. (2009). Successful oral tolerance induction in severe peanut allergy. *Allergy*, 64: 1218-1220.

Cohn, L., Homer, R.J., Niu, N., Bottomly, K. (1999). T helper 1 cells and interferon gamma regulate allergic airway inflammation and mucus production. *Journal of Experimental Medicine*, 190: 1309-1317.

Copois, V., Bret, C., Bibeau, F., Brouillet, J.P., Del Río, M., Berthe, M.L., Maudelonde, T., Boulle, N. (2013). Assessment of RNA quality extracted from laser-captured tissues using miniaturized capillary electrophoresis. *Laboratory Investigation*, 83: 599-602.

Costa, J. (2004). Real time PCR. *Enfermedades infecciosas y microbiología*, 5: 299-305.

Desjardins, D., Conklin, P. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualized Experiments*, 45: 2565.

Devlin, T. M. (2004). *Bioquímica*, 4ª edición. Reverté, Barcelona. ISBN 84-291-7208-4.

Fernández-Rivas, M. (2012) ¿Qué es la alergia a los alimentos? *Enfermedades alérgicas de la fundación BBVA*. 217-222.

Fleige, S., Pfaffl, M.W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time RT-qPCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 126-139.

Flier, L., Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annual Review of Physiology*, 71: 241-260

Fratamico, P.M., Bayles, D.O. (2005). Molecular approaches for detection, identification and analysis of foodborne pathogens. En: *Foodborne pathogens: Microbiology and molecular Biology*. Eds: Fratamicos, P.M, Bhunia, A.K., Smith, J.L. Horizon Scientific Press, Norfolk, Reino Unido, 1-15.

Fredlung, E., Gidlund, A., Olsen, M., Borjesson, T., Spliid, N.H., Simonsson, M. (2008). Method evaluation of DNA extraction from wheat for down stream real time PCR quantification. *Journal of Microbiological Methods*, 73: 33-40.

Gadkar, V.J., Filion, M. (2014). New developments in quantitative real-time polymerase chain reaction technology. *Current Issues in Molecular Biology*, 16: 1-6.

Gorelik, L., Fields, P.E., Flavell, R.A. (2000). Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *Journal of immunology*, 165: 4773-4777.

Gorelik, L., Fields, P.E., Flavell, R.A (2002). Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nature Reviews Immunology*, 2: 46-49.

Gray, C.L., Goddard, E., Karabus, S., Kriel, K., Lang, A.C., Manjra, A.I., Risenga, S.M., Terblanche, A.J., van der Spuy, D.A., Levin, M.E. (2015). Epidemiology of IgE mediated food allergy. *South African Medical Journal*, 105: 68-69.

Hersberg, R.M., Mayer, L.F. (2000). Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells –polarity and complexity. *Immunology Today*, 21: 123-128.

Ho, C.H., Wong, W.H., Chang, C. (2014). Clinical spectrum of food allergies: a comprehensive review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 46: 225-240.

Holvoet, S., Zuercher, A.W., Julien-Javaux, F., Perrot, M., Mercenier, A. (2013). Characterization of candidate anti-allergic probiotic strains in a model of Th2-skewed human peripheral blood mononuclear cells. *International Archives of Allergy and Immunology*, 161: 142-154.

Hugget, Jim F., Foy, Carole A., Benes, Vladimir., Emslie, Kerry., Garson, Jeremy A., Haynes, Ross., Hellemans, Jan., Kubista, Mikael., Mueller, Reinhold., Nolan, Tania., Pfaffl, Michael.W., Shipley, Gregory.L., Wittwer, Carl.T., Bustin, Stephen.A. (2013). Guidelines for minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 59: 66-74.

Islam, S.S., Luster, A.D. (2012). T cell homing to epithelial barriers in allergic disease. *Nature Medicine*, 18: 705-715.

Itoh, N., Itagaki, Y., Kurihara, K. (2010). Rush specific oral tolerance induction in school-age children with severe egg allergy: one year follow up. *Allergology International*, 59: 43-51.

Jacquot, A., Gauthier, S.F, Drouin, R., Boutin, Y. (2010). Proliferative effects of synthetic peptides from β -lactoglobulin and α -lactalbumin on murine splenocytes. *International Dairy Journal*, 20: 514-521.

Jayashree, B., Bibin, Y.S., Prabhu, D. (2013) Increased circulatory levels of lipopolysaccharide (LPS) and zonulin signify novel biomarkers of proinflammation in patients with type 2 diabetes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 388: 203-210.

Jiménez-Saiz, R., Rupa, P., Mine, Y. (2011). Immunomodulatory effects of heated ovomucoid-depleted egg white in a BALB/c mouse model of egg allergy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 13195-13202.

Kasera, R., Lavasa, S., Prasad, K.N., Arora, N. (2015). Enzymatic hydrolysis: a method in alleviating legume allergenicity. *Food and Chemical Toxicology*, 76: 54-60.

Kiewiet, M.B.G., Gros, M., van Neerven, R.J.J., Faas, M.M., Vos, P. (2015). Immunomodulating properties of protein hydrolysates for application in cow's milk allergy. *Pediatric Allergy and Immunology*, 26: 206-217.

Kim, H., Hwang, S., Kim, B., Jung, K., Chung, D. (2006). NKT cells play critical roles in the induction of oral tolerance by inducing regulatory T cells producing IL-10 and transforming growth factor beta, and by clonally deleting antigen-specific T cells. *Immunology*, 118: 101-111.

Kolitz, S., Lorsch, J. (2013). Explanatory chapter: nucleic acid concentration determination. *Laboratory methods in enzymology: RNA. Methods in Enzymology*, 530: 331-336.

Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 95-125.

Kulis, M., Macqueen, I., Li, Y., Zhong, X.P., Burks, A.W. (2012). Pepsinized cashew proteins and hypoallergenic and immunogenic and provide effective immunotherapy in mice with cashew allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130: 716-723.

Lack, G., Fox, D., Northstone, K., Golding, J. (2003) Factors associated with the development of peanut allergy in childhood. *The New England Journal of Medicine*, 348: 977-985.

Li, J., Wang, Y., Tang, L., Villiers, W.J., Cohen, D., Woodward, J., Finkelman, F.D., Eckhardt, E.R. (2013). Dietary medium-chain triglycerides promote oral allergic sensitization and orally induced anaphylaxis to peanut protein in mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131: 442-450.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25: 402-408.

López-Fandiño, R. (2006). Alergias alimentarias e intolerancias alimentarias. En: *Alimentación y nutrición. (Módulo II)*. Ed. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmaceúticos. A. Acción Médica, S.A. Madrid, España: 149-172.

Lozano-Ojalvo, D., Molina, E., López-Fandiño, R. (2016a). Hydrolysates of egg white proteins modulate T- and B-cell responses in mitogen-stimulated murine cells. *Food and function*, 7: 1048-1056.

Lozano-Ojalvo, D., Molina, E., López-Fandiño, R. (2016b). Regulation of exacerbated immune responses in human peripheral blood cells by hydrolysed egg white proteins. *PLoS ONE*, 13: 57-61.

Luther, S.A., Cyster, J.G. (2001). Chemokines as regulators of T cells differentiation. *Nature Immunology*, 2: 102-107.

Mackay, I.M., Mackay, J.F., Nissen, M.D., Sloots, T.P. (2007). Real time: history and fluorogenic chemistries. En: Real time PCR in microbiology: From diagnosis to characterisation. Mackay, I.M. Horizon Scientific Press. Norfolk, Reino Unido 1- 40.

Martorell, C., Muriel-García, A., Martorell-Aragones, A., De la Hoz Caballer, B. (2014). Safety and efficacy profile and immunological changes associated with oral immunotherapy for IgE-mediated cow's milk allergy in children: systematic review and meta-analysis. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 24: 298-307.

Mazzini, E., Massimiliano, L., Penna, G., Rescigno, M. (2014). Oral tolerance can be established via gap junction transfer of fed antigens from CX3CR1+ macrophages to CD103+ dendritic cells. *Immunity*, 40: 248-261.

Miller, H., Zhang, J., Kuolee, R. (2007). Intestinal M cells: the fallible sentinels? *World Journal of Gastroenterology*, 13: 1477-1486.

Milling, S., Yrlid, U., Cerovic, V., MacPherson, G. (2010). Subsets of migrating intestinal dendritic cells. *Immunological Reviews*, 234: 259-267.

Mills, E.C.N., Moreno, J., Sancho, A., Jenkins, J.A., Wichers, H.J. (2004). Processing approaches to reducing allergenicity in proteins. *Proteins in Food Processing*. Yada R (ed): 396-421. CRC Press.

Mine, Y., Yang, M. (2009). Novel T-cell epitopes of ovalbumin in Balb/c mouse: Potential for peptide immunotherapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 378: 203-208.

Mine, Y. y Zhang, J.W. (2002). Comparative studies on antigenicity and allergenicity of native and denatured egg white proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2679-2683.

Mueller, O., Hahnenberger, K., Dittmann, M., Yee, H., Dubrow, R., Nagle, R., Isley, D. (2000). A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis*, 21: 128-134.

Mueller, O., Lightfoot, S., Schroeder, A. (2004). RNA integrity number, standardization of RNA quality control. Agilent Application Note, publication 5989-1165EN: 1-8.

Muraro A., Hoffmann-Sommergrube, K., Holzhauser T., Poulsen L. K., Gowland M. H., Akdis C. A., Mills E. N., Papadopoulos N., Roberts G., Schnadt S., van Ree R., Sheikh A., Vieths S. (2014). EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines. Protecting consumers with food allergies: understanding food consumption, meeting regulations and identifying unmet needs. *Allergy*, 69: 1464-1472.

Negishi, H., Miki, S., Sarashina, H., Taguchi-Atarashi, N., Nakajima, A., Matsuki, K., Endo, N., Yanai, H., Nishio, J., Honda, K., Taniguchi, T. (2012). Essential contribution of IRF3 to intestinal homeostasis and microbiota-mediated Tslp gene induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 21016-21021.

Nouel, A., Simon, Q., Jamin, C., Pers, J. O., Hillion, S. (2014). Regulatory B cells: an exciting target for future therapeutics in transplantation. *Frontiers in Immunology*, 5: 11.

Nwaru, B.I., Hickstein, L., Panesar, S.S., Roberts, G., Muraro, A., Sheikh, A. (2014). Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*, 69: 992-1007.

O'Toole, M. (2013). *Miller-Keane Encyclopedia and Dictionary of Medicine, Nursing, and Allied Health*, Seventh Edition. Ed.; Saunders / Elsevier.

Pablos-Tanarro, A., López-Expósito, I., Lozano-Ojalvo, D., López-Fandiño, R., Molina, E. (2015). Antibody production, anaphylactic symptoms, and Th1 and Th2 responses induced by oral sensitization with OVA in Balb/c mice. *Allergy, Asthma and Immunological Research*, 4: 40-42

Pastorello, E.A., Monza, M., Pravettoni, V., Longhi, R., Bonara, P., Scibilia, J., Primavesi, L., Scorza, R. (2010). Characterization of the T-Cell Epitopes of the Major Peach Allergen Pru p 3. *International Archives of Allergy and Immunology*, 153: 1-12.

Perezábad, L., Reche, M., Valbuena, T., López-Fandiño, R., Molina, E., López-Expósito, I. (2015). Clinical efficacy and immunological changes subjacent to egg oral immunotherapy. *Annals of allergy, asthma and immunology*, 114: 504-509.

Perezábad, L., Reche, M., Valbuena, T., López-Fandiño, R., Molina, E., López-Expósito, I. (2016). Oral food desensitization in children with IgE-mediated cow's milk allergy: immunological changes underlying desensitization. (No publicado).

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29: 45-51.

Pfaffl, M.W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin SA (ed) A-Z of Quantitative PCR (IUL Biotechnology, No.5). International University Line (IUL), San Diego, CA, pp 87–112.

Pott, J., Hornef, M. (2012). Innate immune signalling at the intestinal epithelium in homeostasis and disease. *EMBO reports*, 13: 684-698.

Raymaekers, M., Smets, R., Maes, B. (2009). Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 23: 145-151.

Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J.J., Andrade, M.J. (2015). Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. *Methods in Molecular Biology*, 1275: 31-56.

Rühl, A. (2005). Glial cells in the gut. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 17: 777-790.

Rupa, P., Mine, Y. (2012). Oral immunotherapy with immunodominant T-cell epitope peptides alleviates allergic reactions in a Balb/c mouse model of egg allergy. *Allergy*, 67: 74-82.

Sabat, R., Ouyang, W., Wolk, K. (2014). Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13: 21-38.

Schnyder-Candrian, S., Togbe, D., Couillin, I., Mercier, I., Brombacher, F., Fossiez, F., Ryffel, B., Schnyder, B. (2006). Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *Journal of Experimental Medicine*. 203: 2715-2725.

Schroeder, A., Mueller, o., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, 7: 3-10.

Schulzke, J., Fromm, M. (2009). Tight junctions: Molecular structure meets function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1165: 1-6.

Scott, M.G., Dullaghan, E., Mookherjee, J, N., Glavas, N., Waldbrook, M., Thompson, A., Wang, A., Lee, K., Doria, S., Hamill, P., Yu, J.J., Donini, O., Guarna, M.M., Finlay, B.B., North, J.R., Hancock, R.E. (2007). An anti-infective peptide that selectively modulates the innate immune response. *Nature Biotechnology*, 25: 465-472.

Sellge, G., Laffer, S., Mierke, C., Vrtala, S., Hoffman, M.W., Klempnauer, J. (2005). Development of an *in vitro* system for the study of allergens and allergen-specific immunoglobulin E and immunoglobulin G. *Clinical and Experimental Allergy*, 35: 774-781.

Shan, M., Gentile, M., Yeiser, J. (2013). Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. *Science*, 342: 447-453.

Sharma, S., Gaur, S.N., Arora, N. (2015). Immunotherapy with B cell epitopes ameliorates inflammatory responses in Balb/c mice. *Clinical and Experimental Immunology*, 79: 128-136.

Sharma, S., Kulkarni, S.K., Agrewala, J.N. (2007). Resveratrol and curcumin suppress immune responses through CD28/CTLA-4 and CD80 co-stimulatory pathway. *Clinical and Experimental Immunology*, 147: 155-163.

Sicherer, S.H y Sampson, H.A. (2013). Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133: 291-307.

Spahn, T.W., Fontana, A., Faria, A.M., Slavin, A.J., Eugster, H.P., Zhang, X. (2001) Induction of oral tolerance to cellular immune responses in the absence of Peyer's patches. *European Journal of Immunology*. 31: 1278-1287.

Spahn, T.W., Weiner, H.L., Rennert, P.D., Luger, N., Fontana, A., Domschke, W. (2002). Mesenteric lymph nodes are critical for the induction of high-dose oral tolerance in the absence of Peyer's patches. *European Journal of Immunology*, 32: 1109-1113.

Stelfka, A.T., Feehley, T., Tripathi, P., Qiu, J., McCoy, K., Mazmanian, A.K., Tjota, M.Y. (2014). Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 111: 13145-13150.

Strobel, S. (2003). Understanding primary oral tolerance induction: the end of the beginning. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 151: 10-16.

Thang, C.L., Zhao, X. (2015). Effects of orally administered immunodominant T-cell epitope peptides on cow's milk protein allergy in a mouse model. *Food Research International*, 71: 126-131.

Taylor, B.C., Zaph, C., Troy, A.E., Du, Y., Guid, K.J., Comeau, M.R. (2009). TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *The Journal of Experimental Medicine*, 206: 655-667.

Tordesillas, L., Cuesta-Herranz, J., Gonzalez-Muñoz, M., Pacios, L.F., Compés, E., Garcia-Carrasco, B., Sanchez-Monge, R., Salcedo, G., Diaz-Perales, A. (2009). T-cell epitopes of the major peach allergen, Pru p 3: Identification and differential T-cell response of peach-allergic and non-allergic subjects. *Molecular Immunology*, 46: 722-728.

Toouli, C.D., Turner, D.R., Grist, S.A. (2000). The effect of cycle number and target size on polymerase chain reaction amplification of polymorphic repetitive sequences. *Analytical Biochemistry*, 280: 324-326.

Turner, J. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9: 799-809.

Varshney, P., Jones, S.M., Scurlock, A.M. (2011). A randomized controlled study of peanut oral immunotherapy: clinical desensitization and modulation of the allergic response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 27: 654-660.

Wai, C.Y.Y., Leung, N.Y.H., Leung, P.S.C., Chu, K.H. (2016). T cell epitope immunotherapy ameliorates allergic responses in a murine. *Clinical and Experimental Allergy*, 46: 491-503.

Watson, J.D., Gilman, T., Lee, S., Taylor, J.W. (1992). Amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. En: PCR protocols: a guide to methods and applications. Innis, M.A., Gelgard, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. Academic Press. New York, EE.UU. 315-322.

Weiner, H.L., Cunha, A.P., Quintana, P., Wu, H. (2011). Oral tolerance. *Immunological Reviews*, 241: 241-259.

Willheim, J., Pingoud, A. (2003). Real time polymerase chain reaction. *Chemistry and Biochemistry*, 4: 1120-1128.

Wong, S.S., Zhou, H.R., Marín-Martínez, M.L., Brooks, K., Pestka, J.J. (1998). Modulation of IL-1 β , IL-6 and TNF- α secretion and mRNA expression by the tichothecene vomitoxin in the RAW 264.7 murine macrophage cell line. *Food and Chemical Toxicology*, 36: 409-419.

Worbs, T., Bode, U., Yan, S., Hoffmann, M.W., Hintzen, G., Bernhardt, G. (2006). Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 203: 519-527.

Wu, J.S., Lee, C., Wu, C.C. (2004). Primer design using genetic algorithm. *Bioinformatics*, 20: 1710-1717.

Yang, M., Yang, C., Mine, Y. (2010). Multiple cell epitope peptides suppress allergic responses in an egg allergy mouse model by the elicitation of forkhead box transcription factor 3- and transforming growth factor- β -associated mechanisms. *Clinical and Experimental Allergy*, 40: 668-678.

Yang, M., Yang, C., Nau, F., Pasco, M., Juneja, L.R., Okubo, T., Mine, Y. (2009). Immunomodulatory effects of egg white enzymatic hydrolysates containing immunodominant epitopes in a Balb/c mouse model of egg allergy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 2241-2248.

Zhao, W.H., Hu, Z.Q. (2012). Up-regulation of IL-33 expression in various types of murine cells by IL-3 and IL-4. *Cytokine*, 58: 267-73.