



---

**Universidad de Valladolid**

**Búsqueda de Probióticos con Actividad  
Inmunoduladora en Procesos Alérgicos mediados  
por Inmunoglobulina E**

**Trabajo Fin de Máster**

**Septiembre 2013**

**Alumno: Julio Flecha García**

**Tutor: Felicidad Ronda Balbás**

**Co-tutor: José Manuel Rodríguez**

**Tutor Empresa: Óskar Bañuelos Hortigüela**

**Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias**

**Campus de Palencia (La Yutera)**

**Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a la empresa *Biosearch Life*, en especial al Departamento de Descubrimiento formado por Óskar Bañuelos Hortigüela, Roberto Luque Buitrago y Ana Isabel Sañudo, por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo en sus instalaciones y ayudarme en todas las consultas, dudas e imprevistos surgidos durante el proyecto.

Agradecer también la paciencia y la amabilidad con la que me han tratado, haciendo mi estancia en Granada muy positiva, integrándome rápidamente en su laboratorio y sus actividades, gracias por enseñarme a investigar y por ayudarme en todo lo que he necesitado.

Gracias a Felicidad Ronda Balbás y a José Manuel Rodríguez, por toda la ayuda facilitada para la presentación del presente proyecto.

**ÍNDICE**

RESUMEN .....	4
1.INTRODUCCIÓN .....	5
1.1 Primera exposición a alérgenos. ....	7
1.1.1 Secreción de dos interleuquinas. ....	7
1.1.2 Expresión del CD40-Ligando en el Th2.....	8
1.2 Segunda exposición a alérgenos. ....	8
1.3 Terapias.....	9
2.OBJETIVO .....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	13
3.1 Materiales. ....	13
3.2 Métodos. ....	14
3.2.1 Cultivo Celular. ....	14
3.2.2 Técnica Elisa. ....	14
3.2.3 Ensayo de probióticos. ....	15
3.2.4 Prueba de proliferación celular mediante WST-1. ....	15
4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	16
4.1 Búsqueda de muestras Positivas. ....	16
4.2 Confirmación de positivos. ....	22
4.3 Ensayo de toxicidad de positivos.....	23
5. CONCLUSIÓN .....	25
BIBLIOGRAFÍA.....	26
ANEXO I.....	31

## Resumen

La alergia es una enfermedad cuya prevalencia en los últimos cincuenta años está aumentando sin ninguna explicación, aparte de la hipótesis de la higiene. Diversas terapias para esta enfermedad han surgido siendo la eliminación de los alimentos que contienen alérgenos como la más efectiva. El objetivo de esta investigación es la búsqueda de una nueva terapia mediante el uso de probióticos que actúen como inmunomoduladores de procesos alérgicos alimentarios. El procedimiento empleado consistió en una búsqueda de una colección de 336 muestras de probióticos vivos e inactivados por diversos métodos y metabolitos derivados de ellos. Los probióticos utilizados pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Bifidobacterium*. Se midió la síntesis de IgE producida por la línea celular U266 y se buscaron diferencias entre cultivos con probióticos y ausencia de probióticos. La técnica empleada para esta cuantificación fue el Elisa tipo "sándwich". Se seleccionaron como positivos, aquellos que redujeron más de un 20% la síntesis de IgE. Además, se realizaron pruebas de toxicidad con WST-1. Se obtuvo un posible probiótico inmunomodulador, la muestra MPB17 perteneciente al género *Lactobacillus*. Investigaciones futuras confirmarán dicha actividad sobre humanos y establecerán el mecanismo de su actuación.

## Abstract

Allergy is a disease whose prevalence in the last fifty years is increasing without any explanation except the hygiene hypothesis. Various therapies for this disease have emerged, being the removal the food which contains allergens from the diet as the most effective one. The aim of this research is the search a new therapy which involves the use of probiotics as possible immunomodulatory in IgE mediated allergic processes. The procedure consisted in a screening of 336 samples of live and inactivated probiotics by various methods and metabolites derived of them. The probiotics employed belong to *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* and *Bifidobacterium*. Synthesis of IgE by the cell line U266 was measured and it was searched differences between culture with probiotics and without probiotics. The technique used for this study was the Elisa "sandwich". We selected as positive, those probiotics which reduced more than 20% of IgE synthesis. Toxicity tests with WST-1 were carried out. Probiotic obtained as possible immunomodulator was the sample MPB17 which belongs to *Lactobacillus*. Subsequent researchs will confirm this activity in humans and the mechanism will be discovered.

## 1. INTRODUCCIÓN

En 1906 Clemens Freiherr von Pirquet, pediatra austriaco, acuña por primera vez el término alergia del griego *allos* (extraño) y *ergos* (actividad) que significa respuesta alterada. Las respuestas alérgicas son reacciones ante sustancias que normalmente son inocuas. A estas sustancias se las denomina alérgenos y en el caso concreto de alérgenos alimentarios, son a menudo proteínas (Sohi y Warner, 2008). Los factores bioquímicos que determinan su alergenicidad son: un peso molecular inferior a 70kDa, su glicosilación, resistencia a desnaturalizaciones térmicas y químicas, alta concentración en el alimento de origen, epítipo lineal y soluble en agua (Vickery et al., 2011).

Los alimentos pueden producir reacciones adversas en las que están implicados distintos mecanismos, considerándose solamente alergia alimentaria aquella reacción adversa de patogenia inmunológica comprobada que presenta un individuo tras la ingesta de un alimento al que ha sido previamente sensibilizado, y puede ocurrir después de la ingesta de muy pequeñas cantidades. Existen tres mecanismos: mediado por inmunoglobulina E (IgE), no mediado por IgE y mixto. Las enfermedades alérgicas mediadas por IgE, constituyen una de las patologías crónicas y recurrentes más frecuentes en todo el mundo. (Méndez et al., 2008). La alergia alimentaria puede ser debida también a un defecto a la tolerancia oral a los alérgenos (Chafen et al., 2010). Los principales alimentos que desencadenan las alergias alimentarias son el huevo, la leche, el cacahute, la nuez, el pescado, el marisco, el trigo y la soja (Sicherer, 2011).

Durante los últimos 50 años se está observando un aumento de la prevalencia de las alergias a los alimentos por razones que son desconocidas (Berin y Sampson, 2013; Prescott y Allen, 2011; Nowak-Wegrzyn y Sampson, 2011; Wang y Sampson, 2010; Sohi y Warner, 2008; Untersmayr y Jensen-Jarolim, 2006). Una posible explicación se basa en la hipótesis de la higiene, la cual dice que una temprana exposición a microorganismos está asociada con la reducción del riesgo a desarrollar enfermedades alérgicas (Isolauri et al., 2012). En Estados Unidos las alergias se han triplicado (0,4-1,4%) entre los años 1997 a 2008 (Sicherer y Sampson, 2009; Sicherer, 2011). Las investigaciones actuales se están centrando en entender la bases inmunológicas de la alergia alimentaria, identificar los factores medioambientales que contribuyen al aumento de esta prevalencia y al desarrollo de inmunoterapias (Berin y Sampson, 2013). Estas respuestas adversas a los alimentos afectan aproximadamente al 5% de los niños y al 3-4% de los adultos en países desarrollados. La alergia a los alimentos es responsable de diversos síntomas y desórdenes que afectan a la piel y a los tractos gastrointestinales y respiratorios (Sicherer y Sampson, 2010).

El tracto gastrointestinal tiene una tarea inevitable que es identificar y responder ante constantes estímulos medioambientales que puedan ser tanto beneficiosos o perjudiciales para el individuo. La correcta ejecución de esta tarea es importante para la homeostasis del hospedador (Vickery et al., 2011). El tracto gastrointestinal representa el mayor órgano inmunológico del cuerpo humano cuyas funciones principales

son: la barrera de defensa ante posibles patógenos, tolerancia ante agentes inocuos y digestión e incorporación de componentes de los alimentos. El primer lugar de contacto tras la ingesta de las proteínas de los alimentos es la mucosa bucal, la cual representa en algunos casos el primer lugar de entrada de los antígenos (Untersmayer y Jensen-Jarolim, 2006).

Tras la deglución, las proteínas pasan rápidamente al esófago para alcanzar el lumen gástrico. En el esófago, los alérgenos de la comida juegan un importante rol en la patogénesis de la esofagitis alérgica eosinófila (Sgouros et al., 2006; Garcia-Careaga y Kerner, 2005; Potter et al., 2004). Después de la digestión gástrica de las proteínas, principalmente llevada a cabo por las pepsinas junto con el ácido del estómago, los péptidos y aminoácidos libres entran al duodeno. Esto representa el desencadenante para que las células epiteliales del duodeno y yeyuno secreten colescitoquininas las cuales actúan como estímulo de las células acinares pancreáticas que liberan tripsinógeno y otras enzimas pancreáticas. Tripsinas, quimotripsina y procarboxipeptidasas hidrolizan los péptidos a aminoácidos o oligopéptidos (Freeman et al., 1979). Oligopéptidos por debajo de los 8 aminoácidos no tienen las estructuras involucradas en el reconocimiento o presentación de antígenos así que son ignoradas inmunológicamente (York et al., 1999). Sin embargo, las proteínas podrían escapar o resistir la digestión de estas enzimas y traspasar el lumen intestinal con su estructura original. En el intestino de un individuo adulto el 2% de las proteínas ingeridas son absorbidas sin modificación de su forma original (Husby et al., 1987).

Por definición, la alergia alimentaria mediada por inmunoglobulina E es caracterizada por la presencia de inmunoglobulina E específica de los antígenos presentes en los alimentos desencadenantes de la reacción alérgica (Sampson et al., 2001; Komata et al., 2007). La inmunoglobulina E fue descubierta a mediados de los sesenta, gracias a los trabajos pioneros de Teruko y Kimishige Ishzaka en Denver, EEUU (Méndez et al., 2008). La inmunoglobulina E (Fig.1) pertenece al grupo de las gammaglobulinas y es una de las cinco inmunoglobulinas secretadas por el sistema inmune. Todas las moléculas de anticuerpos comparten las mismas estructuras básicas, pero presentan una notable variabilidad en las regiones de unión al antígeno. La estructura básica es simétrica compuesta de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas unidas por medio de puentes disulfuro. La inmunoglobulina E es una gammaglobulina que circula como monómero y normalmente se encuentra en el plasma en concentraciones inferiores a 1 pg/ml mientras que en procesos atópicos puede aumentar por encima de los 1000 pg/mL (Abbas et al., 2001).

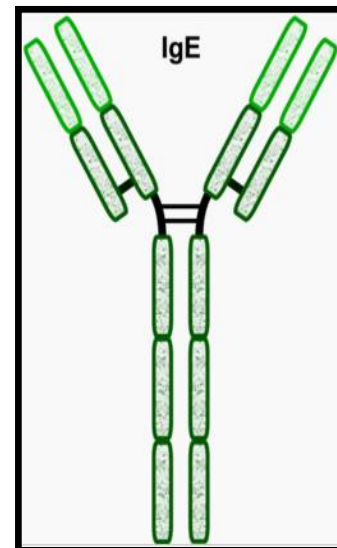


Figura 1. Estructura de la Inmunoglobulina E (Méndez et al., 2008)

La secuencia de acontecimientos típica en la alergia alimentaria también llamada hipersensibilidad inmediata mediada por IgE o hipersensibilidad tipo I consta de varias etapas:

### 1.1 Primera exposición a alérgenos.

En este primer contacto los alérgenos son capturados por células presentadoras de antígenos, especialmente células dendríticas (DCs) de la lámina propia del intestino. Los alérgenos son internalizados por las DCs por procesos de endocitosis, macropinocitosis o fagocitosis, o por la incorporación de las microvesículas de la superficie de células vecinas así como por su interacción con nanovesículas o exosomas. Tras ser capturados, los alérgenos son ubiquitinados, lo cual es la señal para la degradación de la proteína en los complejos proteosomales donde se degradan hasta fragmentos peptídicos. Estos fragmentos peptídicos son presentados por el complejo de histocompatibilidad tipo II (MHC-II) y los linfocitos T CD4+ inmaduros los reconocen (Fig.2). Las células T colaboradoras o células T CD4+ se dividen en dos clases Th1 y Th2 siendo estos últimos los necesarios para el desarrollo de la alergia alimentaria. El desarrollo hacia linfocitos de Th2 se realiza gracias al estímulo ejercido por la interleuquina 4 (IL-4) (Abbas et al., 2001; Kumar et al., 2012).

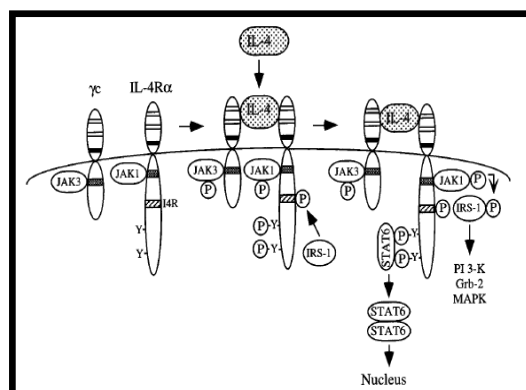


Figura 2. Contacto APC-Th2 (Kumar et al., 2012)

Estos linfocitos Th2 una vez diferenciados inducen el cambio de isotipo de inmunoglobulina de las células B a la producción de IgE. El proceso de cambio de isotipo hacia la secreción de IgE se basa en dos señales (Bacharier y Geha, 2000; Altin et al., 2010; Kumar et al., 2012):

1.1.1 Secreción de dos interleuquina. por el Th2: IL-4 e IL-13. IL-4 (Fig.3) provoca la activación de dos tirosin-quinazas de la familia Janus, JAK1 y JAK3 las cuales lideran la activación de un regulador transcripcional STAT-6 (Bacharier y Geha, 2000; Kumar et al., 2012). Posteriormente STAT6 se fosforila y se generan homodímeros pudiendo ahora translocarse al interior del núcleo donde se unen específicamente a una secuencia de DNA (TTCNNN(N)GAA) en la región promotora de los genes que codifican IL-4 y región constante ε. IL-13 provoca las mismas funciones mediante la activación de JAK2 y TYK2 (Bacharier y Geha, 2000).

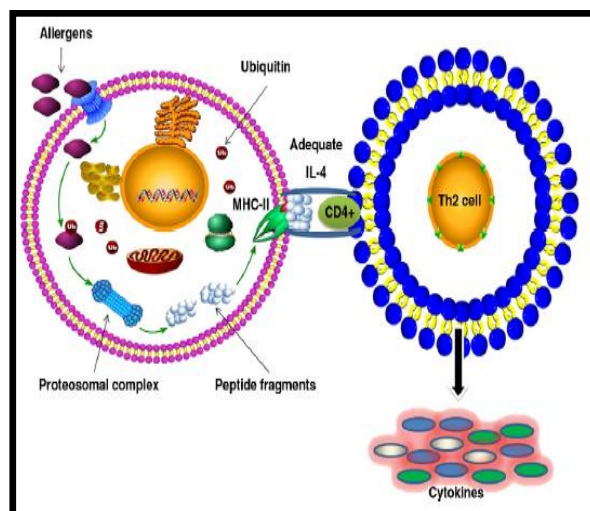


Figura 3. Vía de señalización Th2 (Bacharier, 2000)

### 1.1.2 Expresión del CD40-Ligando en el Th2

CD40 es una glicoproteína transmembrana miembro de los receptores de la superfamilia de TNF, presente en la superficie de las células B. La expresión del ligando CD40 en la superficie de los Th2 activa una vía de señalización que desencadena el cambio de isotipo a IgE (Fig. 4). Esta vía consta de cuatro proteínas intracelulares pertenecientes a la familia de factores asociados al receptor de TNF (TRAF) y son TRAF2, TRAF3, TRAF5 y TRAF6. Por último las IgE generadas se unirán a los FcεR1 de los mastocitos, basófilos y eosinófilos. FcεR1 (Fig. 5) es un receptor de IgE en humanos compuesto por cuatro subunidades: α, β, γ1, y γ2 (Abramsom y Pecht, 2007). La subunidad α está involucrada en la unión a IgE mientras que β, γ1, y γ2 están involucradas en procesos de fosforilación. En mastocitos y basófilos FcεR1 se encuentra en forma tetramérica, mientras que en células presentadoras de antígenos se encuentra de forma trimérica (Call y Wucherpfening, 2005). La expresión de FcεR1 está regulada de forma positiva por la presencia de IgE (Abbas et al., 2001).

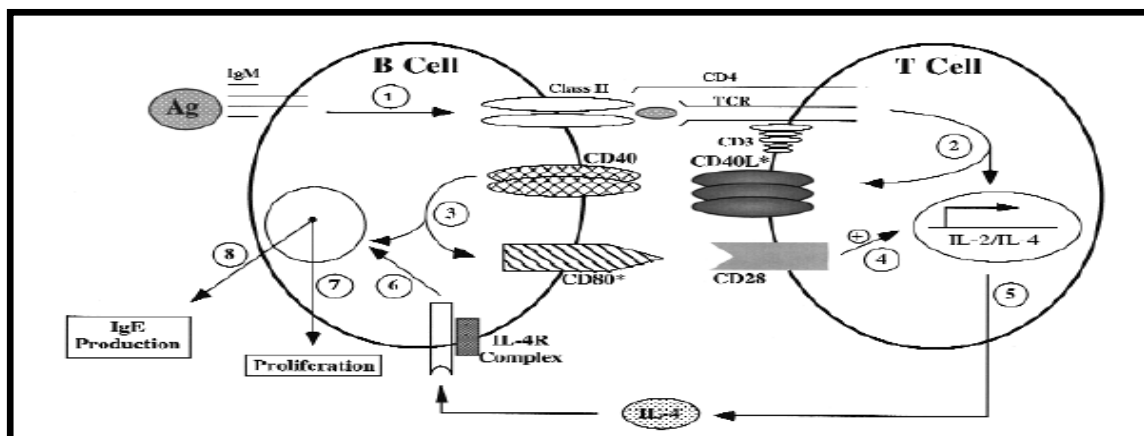


Figura 4. Interacción Th2-Célula B (Bacharier, 2000)

### 1.2 Segunda exposición a alérgenos.

Una vez que se forma el complejo IgE-FcεR1 (Fig. 5) en la superficie de los mastocitos y basófilos, ante la entrada de nuevo del alérgeno, se forma el complejo alérgeno-IgE-FcεR1, que provocará la activación de inmunoreceptores de motivos de tirosina (ITAMs) (Kubo et al., 2001; Hübner et al., 2011). En la alergia alimentaria tiene lugar una vía no intrínseca de tirosina quinasa. Los ITAMs son los responsables del inicio de la ruta debido a la presencia de una secuencia de tirosinas, que puede ser fosforilada después de la interacción del complejo alérgeno-IgE-FcεR1. Estas ITAMs activas pueden proveer sitios de unión para varias moléculas de la familia de las Src quinastas, incluyendo también las familias Lyn y Syk y probablemente la Fyn. La fosforilación de estas Src quinastas puede inducir la activación tanto del linker de células T o el de célula no T o de ambos. La activación de estos linkers puede que involucren diversas



moléculas tales como SLP76, Grb2, Vav, Gads, Sos, PLC $\gamma$ , PI3K y GNEF (Siraganian et al., 2002; Okkenhaug et al., 2006; Metcalfe et al., 2009). DAG y IP3 son moléculas inducidas por PLC $\gamma$  y PI3K que causan un aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular y desencadena la degranulación de mastocitos (Tkaczyk et al., 2004). Esta degranulación provocará la liberación de mediadores tales como prostanglandinas, citoquinas, leucotrienos, histamina, SRS-A, heparina, PAF, factor eosinófilo de anafilaxis, enzimas proteolíticas que generan los síntomas típicos de los alergias, como son la dilatación del músculo liso, obstrucción de capilares, síntomas alérgicos de inflamación. En algunos casos pueden ocurrir con mucha energía provocando la anafilaxis y a veces la muerte (Kumar et al., 2012).

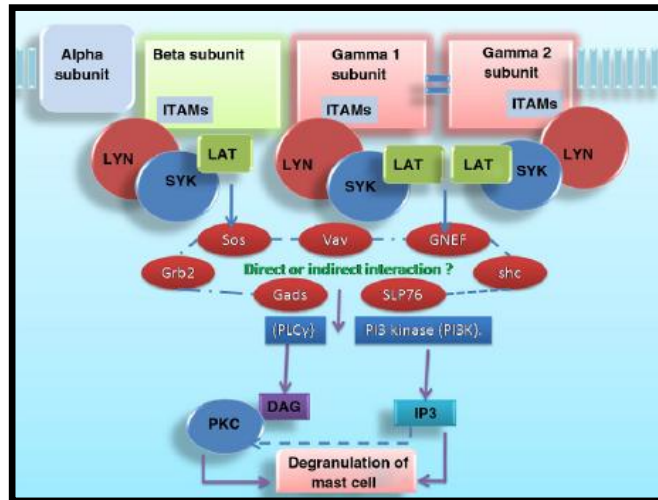


Figura 5. Vía de Señalización Alérgeno-IgE- FcεR1 (Kumar et al., 2012)

### 1.3 Terapias.

El principal método para el tratamiento de las alergias alimentarias ha sido la eliminación del alimento de la dieta de los individuos atópicos (Kirjavainen et al., 1999). Ante este aumento de la prevalencia de la alergia se han realizado diversas investigaciones sobre posibles terapias o estrategias para intentar disminuir o eliminar las consecuencias de esta hipersensibilidad a los alérgenos de los alimentos. Las principales estrategias que se han llevado a cabo son (Nowak-Wegrzyn y Sampson, 2011):

- Dieta que contiene leche y huevos que han sido calentados durante períodos largos de tiempo, ya que los epítomos conformacionales son destruidos tras la exposición al calor.
- Inmunoterapia subcutánea.
- Inmunoterapia oral.
- Inmunoterapia con proteínas modificadas por mutagénesis o por polimerización de proteínas.
- Utilización de anticuerpos monoclonales anti-IgE.
- Medicina tradicional china.
- Probióticos, prebióticos y simbióticos.

Dentro de las últimas estrategias anteriormente descritas, se encuentra el motivo de esta investigación sobre los probióticos, prebióticos y los simbióticos como terapia ante la alergia.

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios para la salud del hospedador (Araya et al., 2002). Existen diversas cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* que pueden influenciar la función inmunológica a través de distintas

vías tales como efectos sobre células presentadoras de antígeno, células dendríticas, monocitos, enterocitos, células T colaboradoras, linfocitos T y linfocitos B (Prescott y Björkstén, 2007).

Los prebióticos son definidos como ingredientes alimentarios no digeribles que afectan positivamente al hospedador mediante la estimulación del crecimiento o actividad de una o varias bacterias presentes en el aparato digestivo, lo cual mejora la salud del hospedador. Posteriormente, la definición ha evolucionado considerando a los prebióticos como determinados ingredientes fermentativos que provocan cambios específicos tanto en la composición, como en la actividad de la microbiota gastrointestinal lo que confiere beneficios en la salud del individuo (Saad et al., 2013). Los simbióticos son definidos como una combinación de probióticos y prebióticos con el objetivo de incrementar la supervivencia y la actividad probada de los probióticos, así como la estimulación de probióticos presentes en el tracto gastrointestinal (Eamonn, 2011). El regular consumo de simbióticos induce a beneficios en la salud, como la mejora de la respuesta inmune, mantener la integridad intestinal, disminuir las infecciones intestinales, regular las respuestas alérgicas, influir en las digestiones y la motilidad gástrica (Amar et al., 2011).

Los factores ambientales y los factores propios del hospedador también influyen en el modo de acción de los probióticos en cuanto a los efectos positivos que puedan generar (Prescott y Björkstén, 2007).

Es conocido que la microflora presente en el tracto gastrointestinal es importante como factor estimulador del desarrollo del sistema inmune. Ratones crecidos en ambientes libres de microorganismos tuvieron un sistema inmune poco desarrollado y no poseían tolerancia oral ante diversos alérgenos. Pero tras administrarles bifidobacterias para restaurar la microflora se observó la capacidad de desarrollar parte de la tolerancia (Sudo et al., 1997). La microflora humana es un complejo ecosistema que puede contener en torno a 1000-1150 tipos de especies y entre  $10^{13}$ - $10^{14}$  microorganismos (Guarner y Malagelada, 2003).

Los posibles factores que quizá predispongan a los sujetos a sufrir alergia alimentaria pueden ser bastante diversos, pero es claro que se debe a una combinación de factores genéticos y medioambientales (Hopkin, 1995). El balance de bifidobacterias frente a clostridios en la flora neonatal, parece determinar el estatus alérgico de los niños (Kalliomaki et al., 2001). Además de las bifidobacterias, también estudios epidemiológicos han indicado los efectos positivos de los lactobacilos ante la alergia alimentaria; así lo demuestra un estudio desarrollado que mostró en Estonia una prevalencia de la alergia baja, mientras que en Suecia la prevalencia era alta. Se observó que los niños que padecían alergia en ambos países poseían menos lactobacilos y que tenían altas poblaciones de microorganismos aerobios, tales como coliformes y *Staphylococcus aureus* (Björkstén et al., 1999).

La flora microintestinal es un importante constituyente de la barrera que la mucosa del intestino genera frente a los alérgenos de los alimentos. En ausencia de microflora intestinal, se ha observado que el transporte de antígenos se incrementa (Heyman et al., 1987) y la inducción de la tolerancia oral ante estos antígenos es eliminada (Moreau y Corthier, 1988).

Algunos probióticos tienen la capacidad de producir proteasas extracelulares que pueden generar la proteólisis de los alérgenos proteicos de los alimentos generando péptidos que no causan respuesta inmunológica (Abbas et al., 2001). Se ha visto que algunos lactobacilos pueden provocar la degradación de las proteínas de la leche que provocan respuestas alérgicas (Sutas et al., 1996). Este descubrimiento sugiere uno de los mecanismos a través del cual los probióticos pueden inmunomodular las alergias alimentarias, pero no parece que sea la única explicación posible de tales efectos, ya que algunas de las proteínas poseen un tamaño extremadamente pequeño para que la actividad proteolítica pueda desarrollarse (von der Weid et al., 2002).

La pérdida de la homeostasis inmunológica frente a los antígenos provoca una respuesta alérgica inflamatoria (Coffman y von der Weid, 1997). El balance entre las respuestas mediadas por Th1 y Th2 es importante para mantener la homeostasis en el individuo, pero se ha visto que una exagerada respuesta mediada por Th1 o Th2 provoca inmunopatologías. La alergia está asociada con una respuesta excesiva de Th2 (Maggi, 1998). El balance Th1/Th2 debe ser mantenido en unos niveles para mantener las homeostasis y es llevado a cabo por diversas células reguladoras que producen citoquinas supresoras tales como IL-10 y TGF- $\beta$ , siendo estas células reguladoras parte del desarrollo de tolerancia oral y la homeostasis intestinales (Groux et al., 1997; Miller et al., 1992). En un intestino sano el sistema inmune es capaz de crear un balance entre la capacidad protectora de la mucosa intestinal y la tolerancia oral, pero en las alergias alimentarias este balance se encuentra desviado y la tolerancia oral a los antígenos no es desarrollada o mantenida (Isolauri et al., 1993; Sanderson y Walker, 1993; Fargeas et al., 1995).

Se ha visto que bifidobacterias y lactobacilos potencian la producción de IgA en las placas de Peyer e incrementan la respuesta ante antígenos peligrosos (Kirjavainen et al., 1999). Una respuesta potenciada de IgA podría prevenir los efectos ante antígenos provenientes de la dieta. Existe la evidencia de que existen poblaciones que secretan dos tipos de IgA siendo una de ellas menos específica y quizá involucrada en el control de la composición de la flora (Mestecky et al., 1999).

Estudios de los efectos de los probióticos sobre la secreción de citoquinas por parte de las células del sistema inmune, indican que algunos de los efectos inmunológicos podrían inducir la diferenciación de linfocitos T CD4+ no maduros (Tho) hacia linfocitos colaboradores Th1; de tal manera que este desvío hacia la generación de linfocitos Th1 aliviaría las inflamaciones debidas a procesos alérgicos puesto que disminuiría la secreción de IgE. Las principales citoquinas que inducen la formación de Th1 son IFN- $\gamma$ , IL-12 y IL-2 y su secreción parece ser potenciada ante la presencia de probióticos (de Simone et al., 1992; Miettinen et al., 1996; Matsuzaki et al., 1998; Shida et al., 1998).

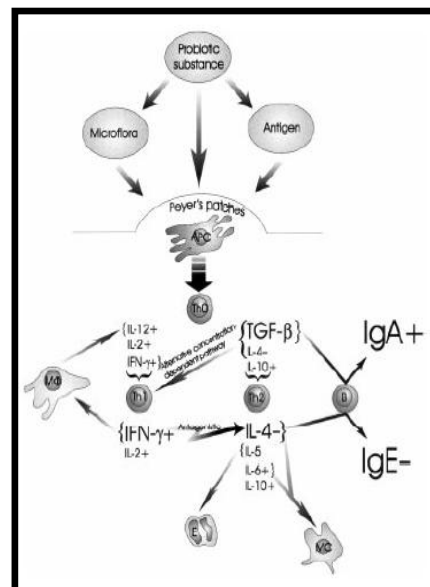


Figura 6. Desvío inmunitario debido a probióticos (Kirjavainen, 1999)

La secreción de IL-4, la más importante citoquina en la diferenciación de linfocitos Th2, es regulada negativamente (Matsuzaki et al., 1998). Además la activación de secreción de IL-12 potencia la diferenciación hacia Th1 (Shida et al., 1998). A este proceso de modificación de diferenciación de los linfocitos T colaboradores se le ha llamado “desvío inmunitario”; de tal manera que un desvío hacia Th1 provocaría una respuesta más moderada ante los alérgenos alimentarios (Fig.6) (von der Weid et al., 2002).

Este mecanismo ha sido estudiado *in vitro* y en ratones con la cepa *Lactobacillus casei* shirota que mostró un descenso de las citoquinas que provocan la diferenciación hacia Th2, unos menores niveles de IgE y un aumento de las citoquinas para la diferenciación de Th1, potenciando la secreción de IL-12 por parte de macrófagos (Shida et al., 1998; Yasui et al., 1999; Shida et al., 2002). La cepa *Lactobacillus paracasei* NCC2461 aislada de las heces de bebés sanos tuvo unos efectos similares (von der Weid et al., 2001). Además este último probiótico también provocó un descenso de IgE en cultivos de esplenocitos frente a la proteína  $\beta$ -lactoglobulina (von der Weid et al., 2002). Sin embargo, existe una preocupación ante el desvío de Th2 a Th1 y es la posibilidad de infiltración celular de estos Th1 y que secreten citoquinas proinflamatorias en la mucosa intestinal, pero se ha visto que *Lactobacillus paracasei* NCC2461 induce la generación de IL-10 y TGF- $\beta$  y podría suprimir los efectos inflamatorios de Th1 y Th2 (von der Weid et al., 2001). Estudios similares se han visto con *Lactobacillus johnsonii* cepa La1 induce la secreción de TGF- $\beta$  en cultivos celulares con células CACO-2 (Haller et al., 2000).

El consumo de dos probióticos *Lactobacillus gasseri* CECT 5714 y *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711 estimula el sistema inmune en personas sanas, generando una disminución de los niveles de IgE en el grupo que consumió los probióticos durante cuatro semanas con respecto al grupo control (Olivares et al., 2006). La administración oral a ratones de probióticos y lactobacilos lácteos generó efectos sobre la proliferación de linfocitos, reduciendo la producción de inmunoglobulina E en estos animales (Kirjavainen et al., 2006). También la administración oral de *Lactobacillus brevis* SBC8803 inactivado por un tratamiento de calor, tuvo efectos similares a los anteriores en esplenocitos de ratón que habían sido sensibilizados frente a ovoalbúmina. Se observó una disminución de los niveles de inmunoglobulina E producidos por estos esplenocitos a través de una mejora en la relación Th1/Th2 (Segawa et al., 2008).

Hasta lo que se conoce, los efectos de los probióticos, sobre los linfocitos B y su capacidad de síntesis de IgE son desconocidos. Con este estudio se intentará observar el efecto de este tipo de microorganismos como posibles inmunomoduladores de procesos alérgicos alimentarios.

## 2. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es la búsqueda de probióticos vivos o inactivados y metabolitos derivados de ellos pertenecientes a una colección de muestras de la empresa *Biosearch Life* con una funcionalidad inmunomoduladora sobre procesos alérgicos, encuadrado dentro del Proyecto POSTBIO ([www.biosearchlife.es](http://www.biosearchlife.es)). Para ello:

- Se midió la producción de inmunoglobulina E por parte de una línea celular de linfocitos B en presencia y ausencia de estas muestras mediante la técnica Elisa tipo “sándwich”.
- Se realizó también un análisis de la toxicidad para establecer si las muestras positivas tienen un efecto positivo sin exhibir toxicidad al cultivo celular.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Materiales.

- Línea Celular U266 ATCC<sup>R</sup> TIB-196<sup>TM</sup>
- Kit Elisa eBioscience. Human IgE Ready Set Go<sup>R</sup> Elisa 10x. 88-50610
- Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche Applied Science
- Muestras de probióticos a analizar (Tabla 1) pertenecientes al género *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Bifidobacterium*. Fueron analizadas un total de 336 muestras. Estas muestras se encuentran vivas únicamente en la placa Control. Y a partir de estas, se inactivaron por tratamientos térmicos, ácidos, básicos, microondas, peróxido de hidrógeno, etanol, altas presiones, extracción con agua, extracción con etanol y extracción con acetona. Las muestras de sobrenadantes son los sobrenadantes obtenidos tras las fermentaciones de los microorganismos.

**Tabla 1.** Muestras a analizar; 1.Control; 2.Térmico; 3.Ácido; 4.Base; 5.Microondas; 6.H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 7.Etanol; 8.Altas Presión; 9.Sobrenadantes; 10.Extracción Agua; 11. Extracción con Etanol; 12. Extracción con Acetona

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Control	Térmico	Ácido	Base	Microon.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Etanol	Alta Pres.	Sobren.	ExtAgu	ExtEtanol	ExtAceto
MPB001	MPB028	MPB055	MPB082	MPB109	MPB136	MPB163	MPB190	MPB217	MPB244	MPB271	MPB298
MPB002	MPB029	MPB056	MPB083	MPB110	MPB137	MPB164	MPB191	MPB218	MPB245	MPB272	MPB299
MPB003	MPB030	MPB057	MPB084	MPB111	MPB138	MPB165	MPB192	MPB219	MPB246	MPB273	MPB300
MPB004	MPB031	MPB058	MPB085	MPB112	MPB139	MPB166	MPB193	MPB220	MPB247	MPB274	MPB301
MPB005	MPB032	MPB059	MPB086	MPB113	MPB140	MPB167	MPB194	MPB221	MPB248	MPB275	MPB302
MPB006	MPB033	MPB060	MPB087	MPB114	MPB141	MPB168	MPB195	MPB222	MPB249	MPB276	MPB303
MPB007	MPB034	MPB061	MPB088	MPB115	MPB142	MPB169	MPB196	MPB223	MPB250	MPB277	MPB304
MPB008	MPB035	MPB062	MPB089	MPB116	MPB143	MPB170	MPB197	MPB224	MPB251	MPB278	MPB305
MPB009	MPB036	MPB063	MPB090	MPB117	MPB144	MPB171	MPB198	MPB225	MPB252	MPB279	MPB306
MPB010	MPB037	MPB064	MPB091	MPB118	MPB145	MPB172	MPB199	MPB226	MPB253	MPB280	MPB307
MPB011	MPB038	MPB065	MPB092	MPB119	MPB146	MPB173	MPB200	MPB227	MPB254	MPB281	MPB308
MPB012	MPB039	MPB066	MPB093	MPB120	MPB147	MPB174	MPB201	MPB228	MPB255	MPB282	MPB309
MPB013	MPB040	MPB067	MPB094	MPB121	MPB148	MPB175	MPB202	MPB229	MPB256	MPB283	MPB310
MPB014	MPB041	MPB068	MPB095	MPB122	MPB149	MPB176	MPB203	MPB230	MPB257	MPB284	MPB311
MPB015	MPB042	MPB069	MPB096	MPB123	MPB150	MPB177	MPB204	MPB231	MPB258	MPB285	MPB312
MPB016	MPB043	MPB070	MPB097	MPB124	MPB151	MPB178	MPB205	MPB232	MPB259	MPB286	MPB313
MPB017	MPB044	MPB071	MPB098	MPB125	MPB152	MPB179	MPB206	MPB233	MPB260	MPB287	MPB314
MPB018	MPB045	MPB072	MPB099	MPB126	MPB153	MPB180	MPB207	MPB234	MPB261	MPB288	MPB315
MPB019	MPB046	MPB073	MPB100	MPB127	MPB154	MPB181	MPB208	MPB235	MPB262	MPB289	MPB316
MPB020	MPB047	MPB074	MPB101	MPB128	MPB155	MPB182	MPB209	MPB236	MPB263	MPB290	MPB317
MPB021	MPB048	MPB075	MPB102	MPB129	MPB156	MPB183	MPB210	MPB237	MPB264	MPB291	MPB318
MPB022	MPB049	MPB076	MPB103	MPB130	MPB157	MPB184	MPB211	MPB238	MPB265	MPB292	MPB319
MPB023	MPB050	MPB077	MPB104	MPB131	MPB158	MPB185	MPB212	MPB239	MPB266	MPB293	MPB320
MPB024	MPB051	MPB078	MPB105	MPB132	MPB159	MPB186	MPB213	MPB240	MPB267	MPB294	MPB321
MPB025	MPB052	MPB079	MPB106	MPB133	MPB160	MPB187	MPB214	MPB241	MPB268	MPB295	MPB322
MPB026	MPB053	MPB080	MPB107	MPB134	MPB161	MPB188	MPB215	MPB242	MPB269	MPB296	MPB323
MPB027	MPB054	MPB081	MPB108	MPB135	MPB162	MPB189	MPB216	MPB243	MPB270	MPB297	MPB324
MPB325	MPB326	MPB327	MPB328	MPB329	MPB330	MPB331	MPB332	MPB333	MPB334	MPB335	MPB336

## 3.2 Métodos.

### 3.2.1 Cultivo Celular.

El cultivo celular es una técnica que nos permite *in vitro* mantener en crecimiento continuo una línea celular para poder realizar los ensayos requeridos. La línea celular U266 es una línea derivada de un hombre que falleció en 1968 a causa de un mieloma y del que se extrajeron diversas biopsias de la médula ósea y de ganglios linfáticos. El tipo celular es un linfocito B que produce IgE e IL-6 (Nilsson et al., 1970; Schwab et al., 1991). El medio de cultivo empleado para mantener la línea celular durante el experimento es el medio RPMI-1640, (Sigma-Aldrich) al 15% FBS (suero fetal bovino), (PAA) y 1% de Streptomycin-Penicilina, (Sigma-Aldrich). El medio de cultivo se reemplazó cada dos días y la cantidad de células por mililitro entre las que el cultivo se mantuvo, fueron entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  células/mL. Para realizar el conteo celular y mantener la población celular en los niveles deseados, se utilizó la cámara de Neubauer, tras haber realizado una centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos. Las condiciones de incubación en la estufa fueron a 37°C, una humedad en torno al 90% y un 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.2.2 Técnica Elisa.

La técnica Elisa (Enzyme linked immunosorbent assay) es un método inmunológico que permite cuantificar la cantidad de un antígeno determinado, en este caso la Inmunoglobulina E. El Kit Elisa eBioscience Human IgE Ready Set Go<sup>R</sup> se basa en el método Elisa tipo "sandwich". En este análisis se utilizaron dos anticuerpos que reaccionan con el antígeno cuya concentración se desea medir. Los pasos principales de este método son: fijar el primer anticuerpo al pocillo de la placa Marxisorp, (Nunc); añadir la muestra que contiene una cantidad variable de antígeno; eliminar aquello que no se ha unido mediante lavado; añadir un segundo anticuerpo marcado específico para epítomos distintos; eliminar mediante lavado el segundo anticuerpo marcado no unido; determinar la cantidad de segundo anticuerpo unido interpolando en la recta de calibrado elaborada en cada Elisa.

En el kit empleado, el anticuerpo secundario se encontraba marcado con la enzima HRP que es una peroxidasa obtenida del rábano, la cual cataliza la reacción de oxidación del TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) hacia productos intermedios que dan una coloración azulada. Posteriormente se añadió H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,8N para parar la reacción, lo que provocaba que estas soluciones cambiasen de color azul hacia amarillo. Posteriormente se medía la absorbancia a 450 nm en espectrofotómetro, Tecan, (Genios).

### 3.2.3 Ensayo de probióticos.

La selección de probióticos se basó en el método experimental que se basó en: añadir 180µL de cultivo celular a cada uno de los 96 pocillos de placas Nunclon Delta Surface, (Nunc), de tal manera que a cada pocillo se añadió 40000 linfocitos B; incubar 24 horas a 37 °C, 90 % Humedad y al 5 % CO<sub>2</sub>; añadir a cada pocillo 20µL de cada muestra de probiótico, de tal manera que en cada placa existiesen tres pocillos con el mismo probiótico que provienen de una suspensión de PBS con 5x10<sup>9</sup> cels./mL; incubar 24 horas a 37 °C, 90 % HR y al 5% CO<sub>2</sub>; centrifugar durante 10 minutos a 2000 rpm y a una temperatura de 4°C, centrifuge 5804R Eppendorf; retirar de cada pocillo 70µL sin perturbar el pellet; conservar a -80°C hasta la realización del Elisa.

Cada ensayo también tuvo pocillos con 180µL de cultivo celular más 20µL de PBS (PBS), pocillos con 180µL de cultivo celular más 20µL de medio de cultivo (C+) y pocillos con 200µL de medio de cultivo (Blanco).

Este procedimiento se repitió para cada una de las 12 placas de muestras anteriormente comentadas. De cada placa se seleccionaron como positivo aquellas muestras que indujeron una reducción de la concentración de IgE superior al 20% tomando como referencia las concentraciones obtenidas en los pocillos de PBS.

### 3.2.4 Prueba de proliferación celular mediante WST-1.

Una vez identificadas aquellas muestras positivas, se realizó un ensayo de proliferación de los linfocitos B empleando el reactivo comercial WST-1 (sal estable de tetrazolium), (Roche). De esta manera se pudo observar cuales de los positivos ejercían un efecto tóxico sobre los linfocitos. La reacción (Fig.7) que tiene lugar en esta prueba se basa en la respiración celular que realizan los linfocitos B sintetizando NADH, el cual participa en la reacción del WST-1. Esto provocará un cambio de color, rojo suave a rojo oscuro en aquellas muestras donde exista respiración, es decir, que estén vivas. La no presencia de cambio de color indicará ausencia de respiración, en consecuencia toxicidad.

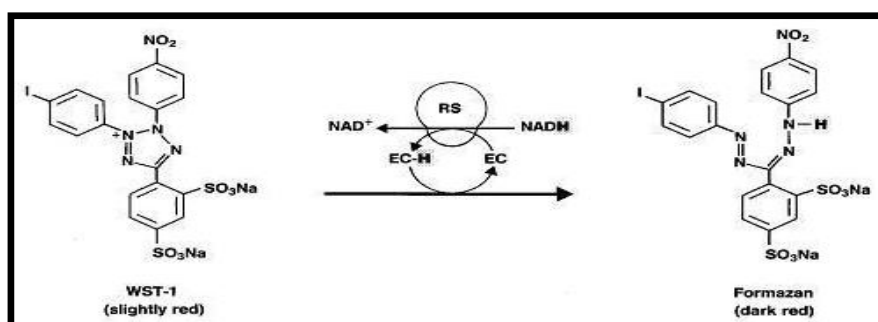


Figura 7. Reacción del agente WST-1. (Roche)

El método experimental seguido se basó en: añadir a cada pocillo 180µL del cultivo celular que contienen 40000 linfocitos B; incubar durante 24 horas a 37 °C, 90 % HR y 5 % CO<sub>2</sub>, Inco BBD6220; añadir 20µL de

muestras de los positivos obtenidos en los Elisás; incubar durante 24 horas a 37 °C, 90 % HR y 5 % CO<sub>2</sub>, Inco BBD6220; añadir 20µL WST-1 (dilución 1:10); incubar y medir absorbancia a 450nm - 595nm.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 4.1 Búsqueda de muestras Positivas.

. Esta primera fase se realizó para buscar aquellas muestras que redujesen la producción de Inmunoglobulina E por parte de los linfocitos B cultivados (línea celular U266). Se siguió el método experimental de ensayo de probióticos para cada muestra. Se analizó la producción de IgE a partir de los valores de concentración relativa de IgE, con respecto a la concentración observada en los controles incubados con PBS. Aquellas muestras que disminuyeron la cantidad de IgE por encima de un 20% se consideraron como posibles positivas (color amarillo). Los datos obtenidos en los Elisás se encuentran presentes en el Anexo I y se representan en las siguientes figuras.

##### Ensayo con muestras vivas, Control.

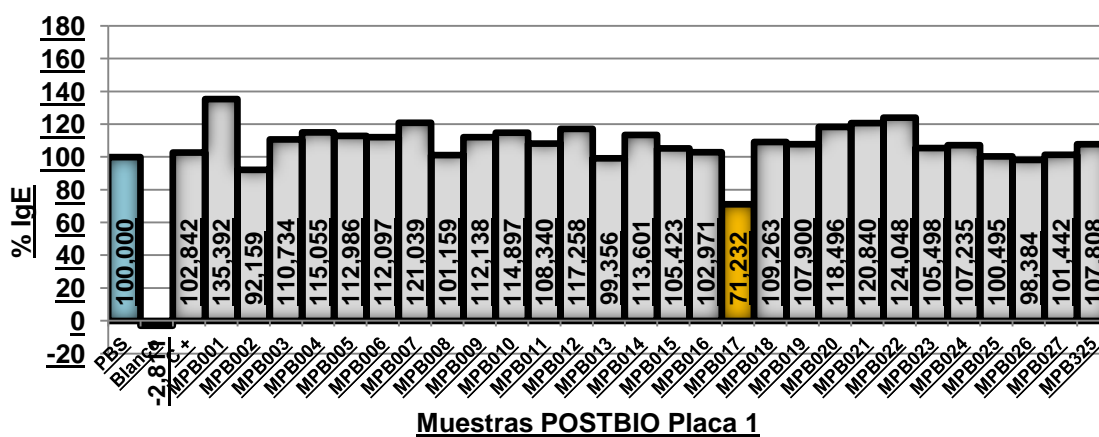


Figura 8. Ensayo con muestras vivas (Placa Control). Representación de la producción de IgE por linfocitos B en presencia de probióticos, tomando como referencia el cultivo celular con PBS (100%) (color azul). Las muestras consideradas positivas disminuyen un porcentaje mayor o igual a 20% (color amarillo) y el resto consideradas negativas (color gris)



Ensayo con muestras inactivadas térmicamente, (Térmico)

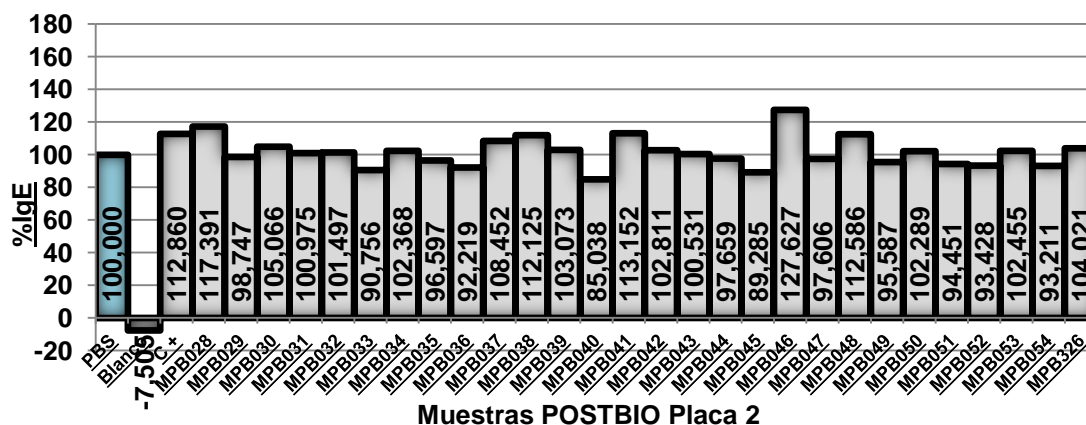


Figura 9. Ensayo con muestras inactivadas térmicamente (Placa Térmica). Representación de la producción de IgE por linfocitos B en presencia de probióticos, tomando como referencia el cultivo celular con PBS (100%) (color azul). Las muestras consideradas positivas disminuyen un porcentaje mayor o igual a 20% (color amarillo) y el resto consideras negativas (color gris)

Ensayos con muestras inactivadas con ácido, (Ácido)

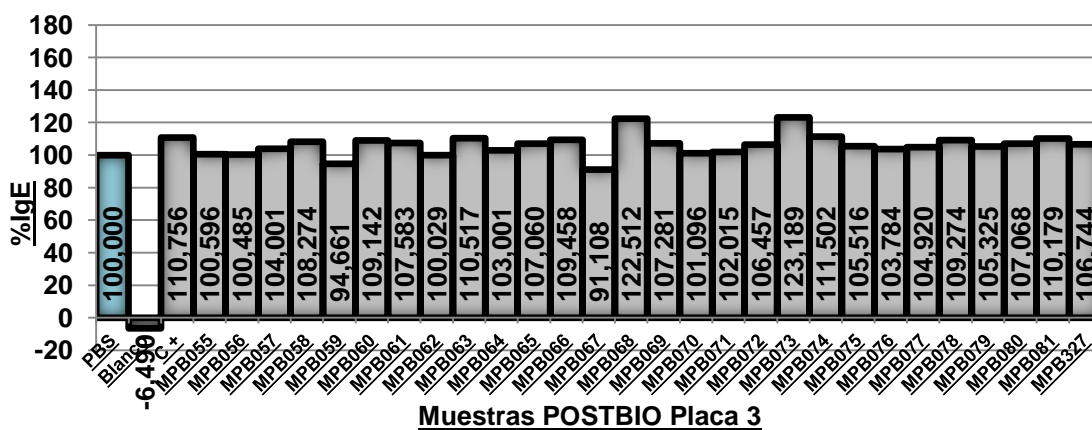


Figura 10. Ensayo con muestras inactivadas con ácido (Placa Térmica). Representación de la producción de IgE por linfocitos B en presencia de probióticos, tomando como referencia el cultivo celular con PBS (100%) (color azul). Las muestras consideradas positivas disminuyen un porcentaje mayor o igual a 20% (color amarillo) y el resto consideras negativas (color gris)

Muestras inactivas por tratamiento básico, (Básico)

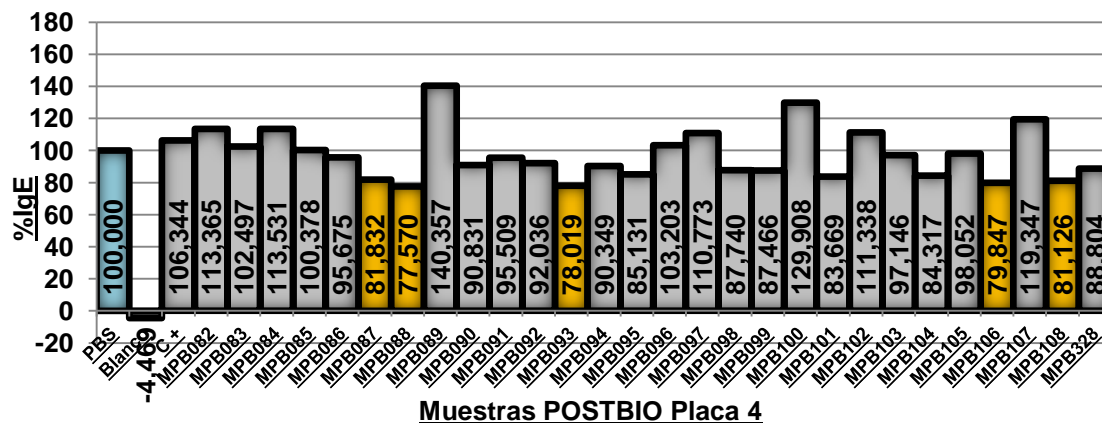


Figura 11. Ensayo con muestras inactivadas con tratamiento básico (Placa Base). Representación de la producción de IgE por linfocitos B en presencia de probióticos, tomando como referencia el cultivo celular con PBS (100%) (color azul). Las muestras consideradas positivas disminuyen un porcentaje mayor o igual a 20% (color amarillo) y el resto consideras negativas (color gris)

Ensayo de muestras inactivadas con microondas, (Microondas)

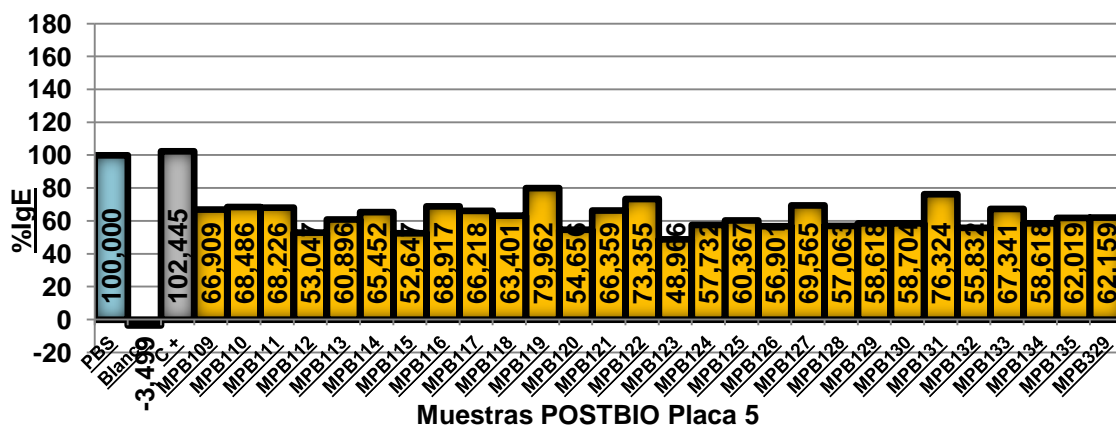


Figura 12. Ensayo con muestras inactivadas con tratamiento microondas (Placa Microondas). Representación de la producción de IgE por linfocitos B en presencia de probióticos, tomando como referencia el cultivo celular con PBS (100%) (color azul). Las muestras consideradas positivas disminuyen un porcentaje mayor o igual a 20% (color amarillo) y el resto consideradas negativas (color gris)

Ensayo de muestras inactivadas con Peróxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

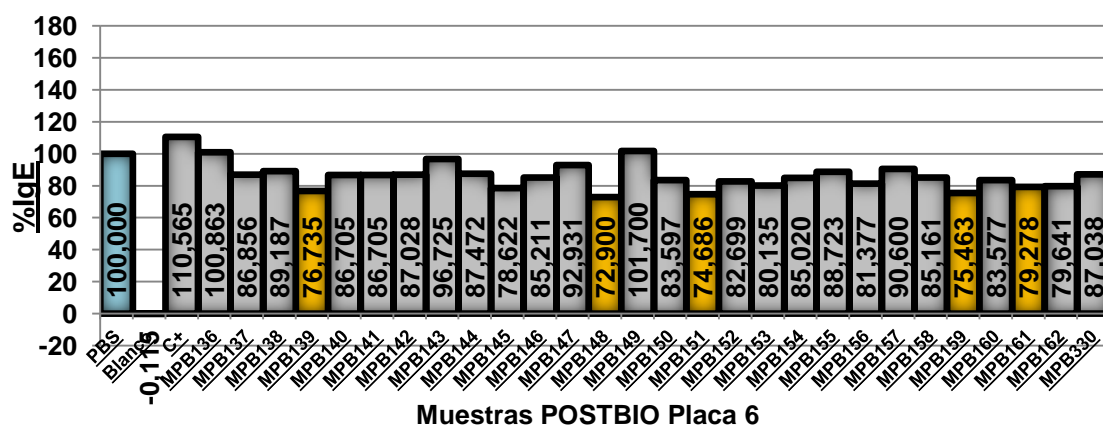


Figura 13. Ensayo con muestras inactivadas con tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Placa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Representación de la producción de IgE por linfocitos B en presencia de probióticos, tomando como referencia el cultivo celular con PBS (100%) (color azul). Las muestras consideradas positivas disminuyen un porcentaje mayor o igual a 20% (color amarillo) y el resto consideradas negativas (color gris)

Ensayo de muestras inactivadas con Etanol (Etanol)

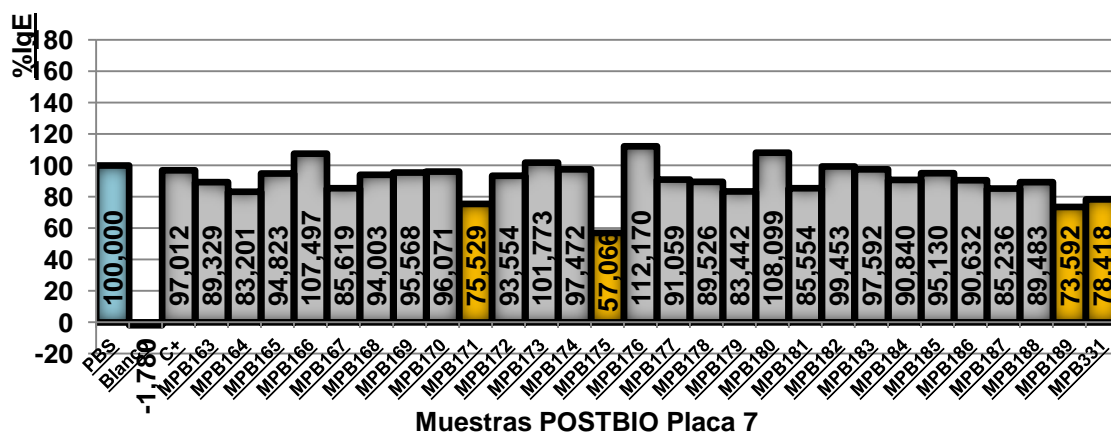


Figura 14. Ensayo con muestras inactivadas con tratamiento de Etanol (Placa Etanol). Representación de la producción de IgE por linfocitos B en presencia de probióticos, tomando como referencia el cultivo celular con PBS (100%) (color azul). Las muestras consideradas positivas disminuyen un porcentaje mayor o igual a 20% (color amarillo) y el resto consideradas negativas (color gris)

Ensayo con muestras tratadas con altas presiones (Altas Presiones)

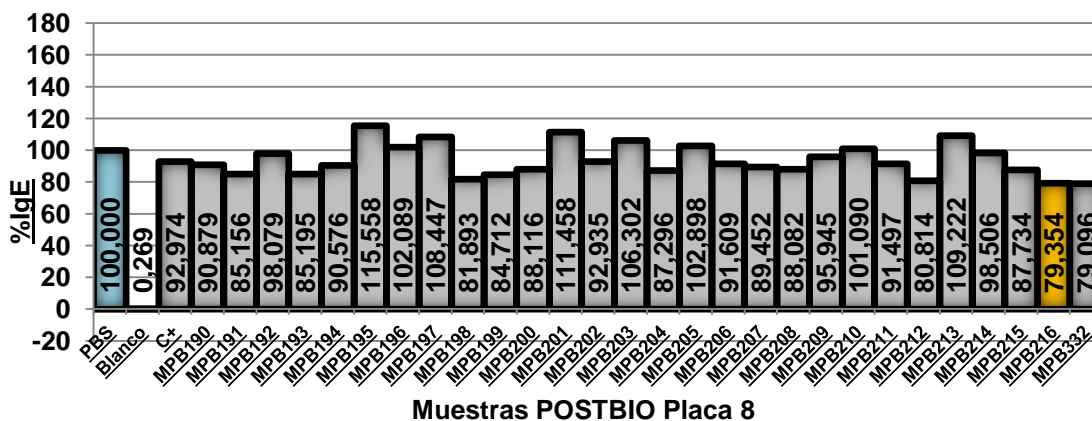


Figura 15. Ensayo con muestras inactivadas con tratamiento de Altas Presiones (Placa Altas Presiones). Representación de la producción de IgE por linfocitos B en presencia de probióticos, tomando como referencia el cultivo celular con PBS (100%) (color azul). Las muestras consideradas positivas disminuyen un porcentaje mayor o igual a 20% (color amarillo) y el resto consideradas negativas (color gris)

Ensayo con sobrenadantes de las fermentaciones (Sobrenadante)

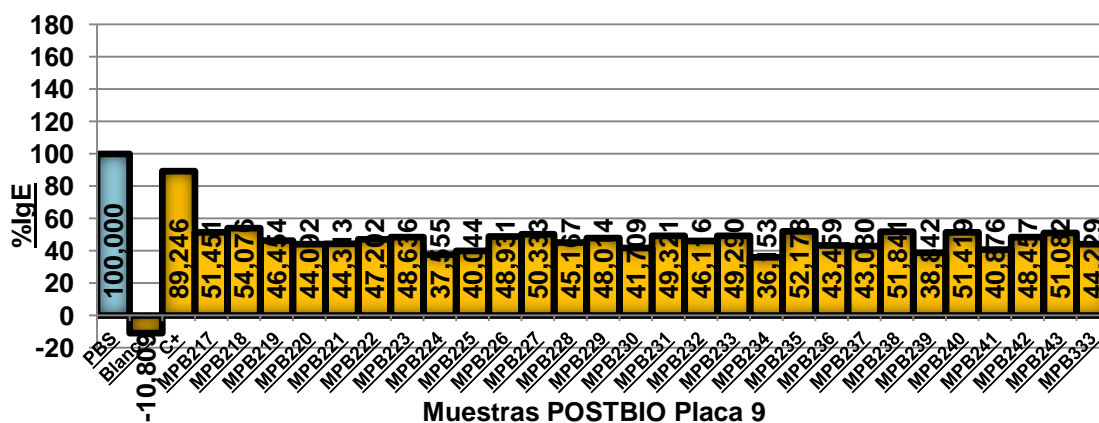


Figura 16. Ensayo con muestras de sobrenadantes de las fermentaciones (Placa Sobrenadantes). Representación de la producción de IgE por linfocitos B en presencia de probióticos, tomando como referencia el cultivo celular con PBS (100%) (color azul). Las muestras consideradas positivas disminuyen un porcentaje mayor o igual a 20% (color amarillo) y el resto consideradas negativas (color gris)

Ensayo con muestras tratadas con extracción por agua (Extracción Agua)

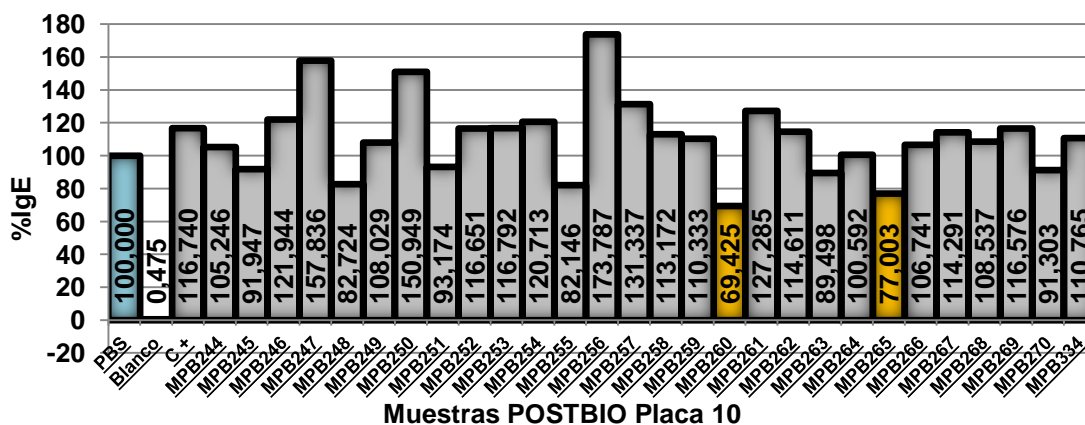


Figura 17. Ensayo con muestras tratadas con extracción de agua (Placa Extracción Agua). Representación de la producción de IgE por linfocitos B en presencia de probióticos, tomando como referencia el cultivo celular con PBS (100%) (color azul). Las muestras consideradas positivas disminuyen un porcentaje mayor o igual a 20% (color amarillo) y el resto consideradas negativas (color gris)

Ensayo tras Extracción Etanol

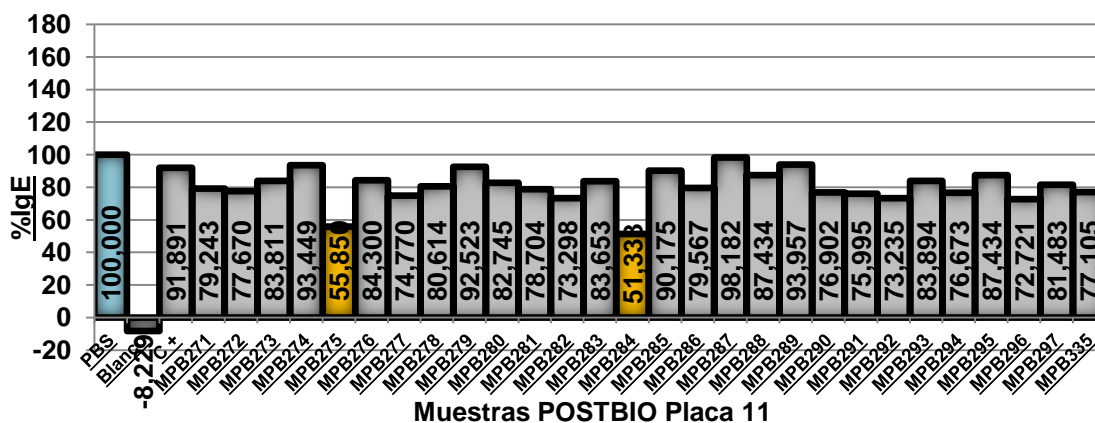


Figura 18. Ensayo con muestras tratadas con extracción etanol (Placa Extracción Etanol). Representación de la producción de IgE por linfocitos B en presencia de probióticos, tomando como referencia el cultivo celular con PBS (100%) (color azul). Las muestras consideradas positivas disminuyen un porcentaje mayor o igual a 20% (color amarillo) y el resto consideradas negativas (color gris)

Ensayo tras Extracción con Acetona

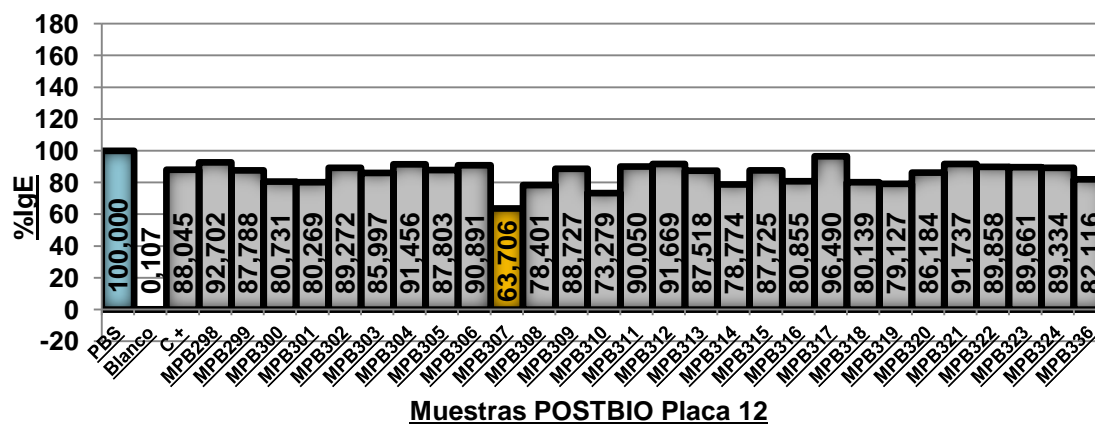


Figura 19. Ensayo con muestras tratadas con extracción con acetona (Placa Extracción Acetona). Representación de la producción de IgE por linfocitos B en presencia de probióticos, tomando como referencia el cultivo celular con PBS (100%) (color azul). Las muestras consideradas positivas disminuyen un porcentaje mayor o igual a 20% (color amarillo) y el resto consideradas negativas (color gris)

Se analizaron los resultados obtenidos (Fig. 8-19), considerándose como positivos aquellas muestras que generaron una reducción superior o igual a un 20% (color amarillo en las Figuras 8-19) en la producción de inmunoglobulina E por los linfocitos B. En las placas 11 y 12 se consideró positivo con una reducción mayor al 40% para eliminar la posibilidad de toxicidad, debida a restos de etanol y acetona utilizados durante su inactivación. De tal manera que a la vista de los resultados conseguidos, las muestras seleccionadas y valoradas inicialmente como posibles positivos fueron los presentes en la Tabla 2. Existen positivos en todas las placas excepto de las placas procesadas por tratamiento térmico (Fig. 9) y por tratamiento ácido (Fig. 10). La ausencia de positivos en la placa de tratamiento térmico no concuerda con el efecto que se observó

en un estudio en el que *Lactobacillus Breve SBC8803* era inactivada por un procesado térmico, la cual generaba reducción de IgE (Segawa et al., 2008).

Tabla 2. Muestras positivas seleccionadas tras analizar los resultados de los Elis as realizados

Las placas que mayores positivos iniciales tuvieron con cinco muestras cada una de ellas, fueron las placas de tratamiento básico (Fig. 11) y de tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 13). La placa de tratamiento con etanol (Fig. 14) tuvo cuatro, mientras que las placas de tratamiento de extracción con agua (Fig. 17) y extracción con etanol (Fig. 18) tuvieron dos positivos iniciales. Por último, con un único positivo estuvieron las placas de tratamiento con extracción de acético (Fig. 19), altas presiones (Fig. 15) y la placa control (Fig. 8).

MUESTRA	REDUCCIÓN (%)
MPB17	28,7683
MPB88	22,4300
MPB93	21,9813
MPB106	20,1534
MPB139	23,2650
MPB148	27,1000
MPB151	25,3140
MPB159	24,5370
MPB161	20,7220
MPB171	24,4710
MPB175	42,9340
MPB189	26,4080
MPB216	20,6460
MPB260	30,5752
MPB265	22,9972
MPB275	44,1500
MPB284	48,6674
MPB307	36,2944
MPB331	21,5820

En relación a la placa de tratamiento con microondas (Fig. 12) y la placa de sobrenadantes (Fig. 16) se observó un descenso significativo en todas las muestras de las dos placas. Las posibles hipótesis que podrían explicar este evento podrían ser:

- Efecto positivo de todas las muestras, debido a algún componente común en todas las muestras, debido a que el tratamiento recibido por las muestras era el mismo.
- Efecto negativo sobre los linfocitos B, es decir, toxicidad de las muestras sobre la viabilidad de los mismos. De tal manera que al añadir los probióticos a las 24 horas provocaría la muerte del cultivo.
- La presencia de algún "artefacto" ejercido por las muestras y que afecte al método de detección de la inmunoglobulina E en los Elis as, a través de una posible interferencia sobre la enzima HRP del anticuerpo secundario, la unión de IgE a los anticuerpos y otros mecanismos dando lugar a la identificación de muestras como falsos positivos.

Para intentar descartar la posibilidad del artefacto se realizó un experimento distinto al seguido anteriormente, que consistió en añadir una cantidad fija de inmunoglobulina E a cada pocillo de una placa Elisa. La cantidad de inmunoglobulina E añadida por pocillo fue de 500 ng/mL. Posteriormente se añadió la misma concentración de muestras que en la existente en los sobrenadantes de los ensayos realizados de cultivos celulares. Las muestras que se probaron fueron escogidas al azar y pertenecían a las tres primeras columnas de la placa de sobrenadantes (Fig. 12) y las tres primeras columnas de la placa con tratamiento de microondas (Fig. 16). Los resultados obtenidos se observan en la Figura 20.

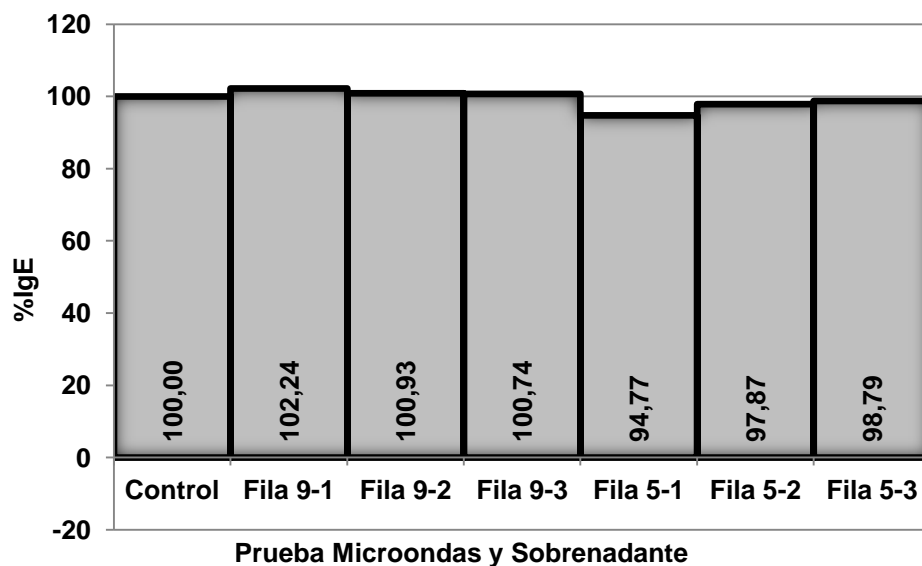


Fig. 20. Prueba Placa de muestras inactivadas por microondas y muestras de sobrenadantes. Se representa el porcentaje de IgE detectada tras añadir muestras directamente al pocillo con una cantidad prefijada de IgE. Tomando como valor de referencia aquellos pocillos a los que no se les añadió muestras (Control)

A la vista de los resultados, no se vieron diferencias significativas entre el Control y las distintas muestras probadas por lo que se pudo descartar la presencia de un artefacto que afectase al método de cuantificación de IgE. Por ello las explicaciones más probables para estos resultados, podrían ser la existencia de componentes comunes a todas las muestras, como podría ser la existencia de proteasas que pudieron afectar a la inmunoglobulina E durante el Elisa. Tampoco podemos descartar un efecto citotóxico de estas muestras sobre la línea celular U266. Estas hipótesis están siendo investigadas actualmente.

#### 4.2 Confirmación de positivos.

Esta fase sirvió de confirmación para todos aquellos positivos seleccionados a partir de los resultados obtenidos en los doce Elisas realizados y eliminar la posibilidad de falsos positivos presentes en las primeras investigaciones. Se volvió a realizar el mismo proceso experimental con los posibles positivos (Tabla 2) seleccionados previamente por triplicado, de tal manera que así pudimos minimizar el posible error cometido en las técnicas empleadas durante el experimento. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 21.

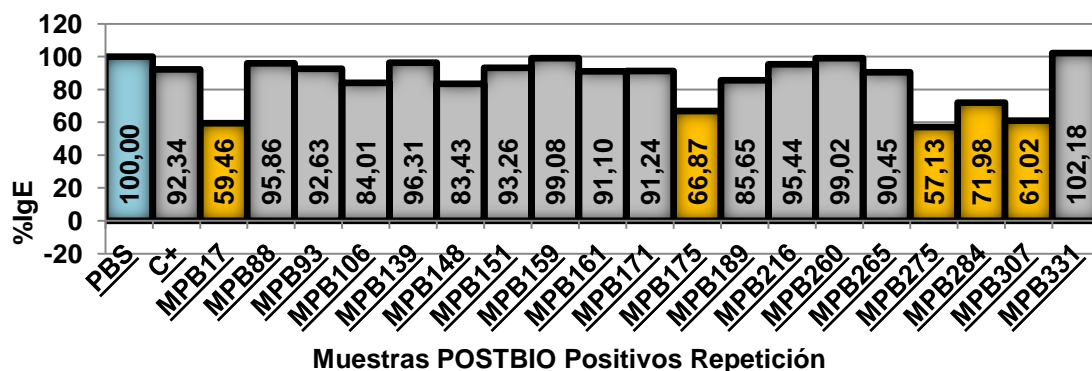


Figura 21. Repetición de los positivos seleccionados en las primeras investigaciones para confirmar su actividad. Seleccionados como positivos (amarillo) aquellos que reducen más del 20% la producción de IgE en comparación con el PBS (azul). Muestras negativas (color gris)



Tras observar los resultados, se confirmó que los posibles probióticos positivos para la función inmunomoduladora de reducción de inmunoglobulina E fueron estas muestras:

- **MPB 17** con una reducción del 40,543%, de la placa con muestras vivas.
- **MPB 175** con una reducción del 33, 125%, de muestras inactivadas con Etanol.
- **MPB275** con una reducción del 48,868%, de muestras inactivadas con extracción de etanol.
- **MPB284** con una reducción del 28,024%, de muestras inactivadas con extracción con etanol.
- **MPB307** con una reducción del 38,982%, de muestras inactivadas con extracción con acetona.

Estas reducciones observadas de nuevo en estas cinco muestras, nos confirman el efecto reductor que poseen estos probióticos sobre la capacidad de producir IgE por parte de los linfocitos B. Destacar que no solo la cepa viva, MPB17, disminuyó los niveles de IgE en cultivo, sino que también aquellas que son inactivadas por distintos procesos tales como tratamiento con etanol, extracción con etanol y acetona generaron un efecto inmunomodulador reduciendo los niveles de la inmunoglobulina. Este hecho tiene similitud al obtenido con *Lactobacillus brevis* SBC8803 que fue inactivado por un tratamiento térmico (Segawa et al., 2008). Esto indica que la actividad moduladora no está sujeta a microorganismos vivos.

#### 4.3 Ensayo de toxicidad de positivos.

El estudio para descartar la posibilidad de toxicidad sobre los linfocitos B por parte de las muestras confirmadas, fue llevado a cabo mediante el agente de proliferación WST-1, que cuantifica la respiración celular mediante la producción de NADH y una reacción asociada que provoca un cambio de color, rojo suave a rojo oscuro y por lo tanto diferencias en la absorbancia. Siendo los resultados, los recogidos en la Figura 22.

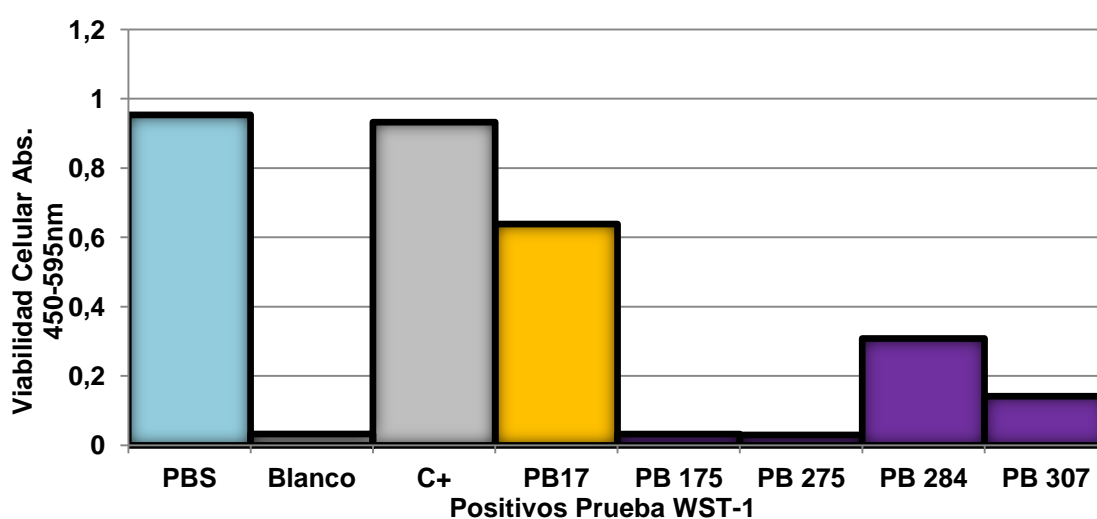


Figura 22. Prueba agente proliferación WST-1, para medir la viabilidad celular de los cultivos. Siendo un cultivo celular vivo aquel en el que se encuentren diferencias de absorbancia entre el tiempo final y el tiempo inicial del experimento. Muestras que no ejercen toxicidad en color amarilla y las que ejercen toxicidad en color morado siendo el control el PBS (azul)

Una vez vistos los resultados y analizados, se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Las muestras, **MPB175**, **MPB275**, **MPB284** y **MPB307** tienen efectos tóxicos (morado) para el cultivo celular, lo cual provocó el descarte de estas muestras como posibles inmunomoduladores de procesos alérgicos, ya que el efecto que provocaron para disminuir las cantidades de IgE fue la muerte celular.
2. La muestra **MPB17** no mostró un grado de toxicidad en el cultivo celular que fuera significativo, por lo que la reducción de la producción de IgE se debió a otros mecanismos.

La muestra **MPB17** es una cepa perteneciente al género *Lactobacillus* y fue la única muestra que induce una reducción en la producción de IgE sin producir toxicidad al cultivo celular. Este resultado obtenido concuerda con las investigaciones realizadas sobre la cepa *Lactobacillus casei* shirota y su efecto sobre el desvío inmunitario lo cual provocaba una reducción en los niveles de IgE (Shida et al., 1998; Shida et al., 2002). Así como el efecto reductor de las cantidades de IgE en bebés sanos con presencia de *Lactobacillus paracasei* NCC2461 (von der Weid et al., 2002). También posee similitud con el estudio realizado sobre el consumo de los probióticos *Lactobacillus gasser* CECT 5714 y *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711 y la reducción de los niveles de inmunoglobulina E (Olivares et al., 2006). Comentar que tiene concordancia con la cepa *Lactobacillus brevis* SBC8803 inactivada térmicamente, la cual redujo los niveles de IgE en cultivo de esplenocitos (Segawa et al., 2008).

En cuanto al efecto de **MPB17** sobre la producción de IgE, las posibles explicaciones serían: la presencia de una proteasa específica de IgE o también la presencia de una proteasa específica de IL-6 o del receptor de IL-6. Se conoce que IL-6 es una citoquina proinflamatoria producida por la línea U266 la cual actúa de forma autocrina (Schwab et al., 1991) induciendo la proliferación del cultivo. Por lo que la degradación de esta citoquina o su receptor, provocaría una disminución de células en el cultivo generando una disminución en la cantidad de IgE sintetizada. Otros mecanismos también podrían explicar los resultados observados, aunque solo se abordará su naturaleza tras la confirmación del efecto de la muestras MB17 en modelos animales *in vivo* de alergia.



## 5. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en la búsqueda de probióticos que posean una funcionalidad reductora sobre la producción de Inmunoglobulina E en procesos alérgicos, mediante cultivo *in vitro* de linfocitos B productores de esta inmunoglobulina (línea U266), nos han indicado la presencia de un positivo para esta actividad inmunológica. Esta muestra fue la **MPB17**, presente dentro de las 336 muestras (proyecto POSTBIO) analizadas en la investigación. Este positivo pertenecía a la *placa Control* (muestras vivas).

La muestra **MPB17** es un microorganismo vivo con actividad inmunomoduladora perteneciente al género *Lactobacillus* por lo que se podría considerar como probiótico. La reducción de producción de inmunoglobulina E observada fue en torno al 30-40% con respecto al control. El mecanismo mediante el cual ejerce esta actividad todavía no es conocido, aunque los futuros estudios podrían indicarnos como realiza esta función.

Esta es la primera fase en la búsqueda de posibles probióticos inmunomoduladores de procesos alérgicos. Posteriores investigaciones confirmarán si la muestra MPB17 tiene este efecto positivo en las personas afectadas por esta enfermedad.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S., 2001. *Inmunología celular y molecular*. McGraw-Hill-Interamericana. 4ª Edición.
- Abramsom, J., Pecht, I., 2007. Regulation of the mast cell response to the type 1 Fc epsilon receptor. *Immunological Reviews* 54, 217-231.
- Altin, J., Shen, C., Liston, A., 2010. Understanding the genetic regulation of IgE production. *Blood Reviews* 24(4-5), 163-169.
- Amar, J., Chabo, C., Wagget, D., Aurelie, K., Vachoux, C., Bermúdez-Humarán, L.G., 2011. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanism and probiotic treatment. *EMBO Molecular Medicine* 3, 559-572.
- Araya, M., Morelli, L., Reid, G., Sanders, M.E., Stanton, C., 2002. Joint FAO/WHO Working Group Report on Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario.
- Bacharier, L. B., Geha, R. S., 2000. Molecular mechanisms of IgE regulation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105(2, Part 2), S547-S558.
- Berin, M. C., Sampson, H. A., 2013. Food allergy: An enigmatic epidemic. *Trends in Immunology*, 1031.
- Björkstén, B., Naaber, P., Sepp, E., Mikelsaar, M., 1999. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clinical and Experimental Allergy* 29, 342-346.
- Call, M.E., Wucherpfenning, K.W., 2005. The T cell receptor: critical role the membrane environment in receptor assembly and function. *Annual Reviews of Immunology* 23, 101-25.
- Chafen, J.J., Newberry, S.J., Riedl, M.A., Bravata, D.M., Maglione, M., Suttrop, M.J., Sundaram, V., Paige, N.M., Towfigh, A., Hulley, B.J., Shekelle, P.G., 2010. Diagnosing and managing common food allergies: a systematic review. *The Journal of the American Medical Association* 303(18), 1848-1856.
- Coffman, R.L., von der Weid, T., 1997. Multiple pathways for the initiation of T helper 2 (Th2) responses. *Journal of Experimental Medicine* 185, 373-375.
- de Simone, C., Ciardi, A., Grassi, A., 1992. Effect of *Bifidobacterium bifidum* and peripheral blood B lymphocytes. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 14, 331-340.
- Eamonn, M.M., 2011. Gut microbiota and the role of probiotics in therapy. *Current Opinion in Pharmacology* 11(6), 593-603.
- Fargeas, M.J., Theodorou, V., More, J., Wal, J.M., Fioramonti, J., Bueno, L., 1995. Boosted systemic immune and local responsiveness after intestinal inflammation in orally sensitized guinea pigs. *Gastroenterology* 109, 53-62.
- Freeman, H.J., Kim, Y.S., Sleissenger, M.H., 1979. Protein digestion and absorption in man. Normal mechanism and protein-energy malnutrition. *The American Journal of Medicine* 67, 1030-1036.
- García-Careaga, M., Jr., Kerner, J. A., Jr., 2005. Gastrointestinal manifestations of food allergies in pediatric patients. *Nutrition in Clinical Practice* 20, 526-535.

- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., 1997. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevent colitis. *Nature* 389, 737-742.
- Guarner, F., Malagelada, J.R., 2003. Gut flora in health and disease. *The Lancet* 361, 512-519.
- Haller, D., Bode, C., Hammes, W.P., Pfeifer, A.M., Schiffrin, E.J., Blum, S., 2000. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Journal of Gastroenterology and Hepatology, Gut* 47, 70-87.
- Heyman, M., Corthier, G., Petit, A., Meslin, J.C., Moreau, C., Desjeux, J.F., 1987. Intestinal absorption of macromolecules during viral enteritis: an experimental study on rotavirus-infected conventional and germ-free mice. *Pediatric Ressearch* 22, 72-78.
- Hopkin, J.M., 1995. Genetics of atopy. *Pediatric Allergy and Immunology* 6, 139-144
- Hübner, M.P., Larson, D., Torrero, M.N., Mueller, E., Shi, Y., Killoran, K.E., Mitre, E., 2011. Anti FcεR1 antibody injections activate basophils and mast cells and delay Type 1 diabetes onset in NOD mice. *Clinical Immunology* 141, 205-217.
- Husby, S., Foged, N., Host, A., Svehag, S. E., 1987. Passage of dietary antigens into the blood of children with coeliac disease. Quantification and size distribution of absorbed antigens. *Journal of Gastroenterology and Hepatology, Gut*, 28, 1062-1072.
- Isolauri, E., Majamaa, H., Arvola, T., Rantala, I., Virtanen, E., Arvilommi, H., 1993. *Lactobacillus casei* strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk suckling rats. *Gastroenterology* 105, 1643-1650.
- Isolauri, E., Rautava, S., Salminen, S., 2012. Probiotics in the development and treatment of allergic disease. *Gastroenterology Clinics of North America* 41(4), 747-762.
- Kalliomaki, M., Kirjavainen, P., Eerola, E., Kero, P., Salminen, S., Isolauri, E., 2001. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 107, 129-134.
- Kirjavainen, P.V., Apostolou, E., Salminen, S.J., Isolauri, E., 1999. New aspects of probiotics – a novel approach in the management of food allergy. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 54, 909-915.
- Kirjavainen, P.V., Apostolou, E., Salminen, S.J., Isolauri, E., 1999. New aspects of probiotics – a novel approach in the management of food allergy. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology* S4, 909-915.
- Kirjavainen, P.V., El-Nezami, H.S., Salminen, S.J., Ahokas, J.T., Wright, P.F.A., 2006. The effect of orally administered viable probiotic and dairy lactobacilli on mouse lymphocyte proliferation. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 26(2), 131-135.
- Komata, T., 2007. The predictive relationship of food-specific serum IgE concentrations to challenge outcomes for egg and milk varies by patient age. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 122, 298-304.

- Kubo, S., Matsuoka, K., Taya, C., Kitamura, F., Takai, T., Yonekawa, H., 2001. Drastic up-regulation of Fcεpsilon1 on mast cells is induced by IgE binding through stabilization and accumulation of Fcεpsilon1 on the cell surface. *Journal of Immunology* 167, 3427-3434.
- Kumar, S., Verma, A. K., Das, M., Dwivedi, P. D., 2012. Molecular mechanisms of IgE mediated food allergy. *International Immunopharmacology* 13(4), 432-439.
- Kumar, S., Verma, A.K., Das, M., Dwivedi, P.D., 2012. Allergenic diversity among plant and animal food and their allergenicity. *Food Reviews International* 28, 277-298.
- Maggi, E., 1998. The Th1/Th2 paradigm in allergy. *Immunotechnology* 3, 233-244.
- Matsuzaki, T., Yamazaki, R., Hashimoto, S., Yokokura, T., 1998. The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice. *Journal of Dairy Science* 81, 48-53.
- Méndez, J., Huerta, J.G., Bellanti, J.A., Ovilla, R., Escobar, A., 2008 *Alergia: Enfermedad multisistémica. Fundamentos básicos y clínicos*. Editorial Médica Panamericana. 1ª Edición.
- Mestecky, J., Russell, M.W., Elson, C.O., 1999 Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface. *Journal of Gastroenterology and Hepatology Gut* 44, 2-5.
- Metcalf, D.D., Peavy, R.D., Gilfillan, A.M., 2009. Mechanism of mast cell signaling in anaphylaxis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 124, 639-646.
- Miettinen, M., Vuopio-Varkkila, J., Varkkila, K., 1996. Production of human tumour necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infection and Immunology* 64, 5403-5404.
- Miller, A., Lider, O., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Weiner, H.L., 1992. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 421-425.
- Moreau, M.C., Corthier, G., 1988. Effect of the gastrointestinal microflora on induction and maintenance of oral tolerance to ovalbumin in C3H/HeJ mice. *Infection and Immunology* 56, 2766-2768.
- Nilsson, K., Bennich, H., Johansson, S.G.O., Pontén, J., 1970. Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient. *Clinical and Experimental Immunology* 7, 477-489.
- Nowak-Węgrzyn, A., Sampson, H. A., 2011. Future therapies for food allergies. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127(3), 558-573.
- Okkenhaug, K., Patton, D.T., Bilancio, A., Garcon, F., Rowan, W.C., Wanhaesebroeck, B., 2006. The p110delta isoform of phosphoinositide 3-kinase controls clonal expansion and differentiation of Th cells. *Journal of Immunology* 177, 5122-5128.
- Olivares, M., Díaz-Roperó, M.P., Gómez, N., Lara-Villoslada, F., Sierra, S., Maldonado, J.A., Martín, R., Rodríguez, J.M., Xaus, J., 2006. The composition of two new probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT y *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, boosts the immune system of healthy humans. *International Microbiology* 9, 47-52.

- Potter, J., Saeian, K., Staff, D., Massey, B. T., Komorowski, R.A., Shaker, R., 2004. Eosinophilic esophagitis in adults: an emerging problem with unique esophageal features. *Gastrointestinal Endoscopy* 59, 355-361.
- Prescott, S. L., Björkstén, B., 2007. Probiotics for the prevention or treatment of allergic diseases. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120(2), 255-262.
- Prescott, S., Allen, K. J., 2011. Food allergy: Riding the second wave of the allergy epidemic. *Pediatric Allergy and Immunology* 22(2), 155-160.
- Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. M., Bressollier, P., 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology* 50(1), 1-16.
- Sampson, H.A., 2001. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 107, 891-896.
- Sanderson, I.R., Walker, W.A., 1993. Uptake and transport of macromolecules by the intestine: possible role in clinical disorders (an update). *Gastroenterology* 104, 622-639.
- Schwab, G., Siegall, C.B., Aarden, L.A., Neckers, L.M., Nordan, R.P., 1991. Characterization of an interleukin-6 mediated autocrine growth loop in the human multiple myeloma cell line U266. *Blood Journal* 77, 587-593.
- Segawa, S., Nakaita, Y., Takata, Y., Wakita, Y., Kaneko, T., Kaneda, H., Watari, J., Yasui, H., 2008. Effect of oral administration of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 on total and ovalbumin-specific immunoglobulin E production through the improvement of Th1/Th2 balance. *International Journal of Food Microbiology* 121, 1-10.
- Sgouros, S. N., Bergele, C., Mantides, A., 2006. Eosinophilic esophagitis in adults: a systematic review. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 18, 211-217.
- Shida, K., Makino, K., Morishita, A., 1998. *Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. *International Archives of Allergy and Immunology* 11, 278-287.
- Shida, K., Takahashi, R., Iwadate, E., Takamizawa, K., Yasui, H., Sato, T., Habu, S., Hachimura, S., Kaminogawa, S., 2002. *Lactobacillus casei* strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model. *Clinical and Experimental Allergy* 32(4), 563-570.
- Sicherer, S.H., 2011. Epidemiology of food allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127, 594-602.
- Sicherer, S.H., 2011. Food Allergy. *Mount Sinai Journal of Medicine* 78(5), 683-696.
- Sicherer, S.H., Sampson, H.A., 2009. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Annual Reviews of Medicine* 60, 261-77.
- Sicherer, S.H., Sampson, H.A., 2010. Food Allergy. *The Journal of Clinical Immunology* 125(2), 116-125.
- Siraganian, R.P., Zhang, J., Suzuki, K., Sada, K., 2002. Protein tyrosine kinase Syk in mast cell signaling. *Molecular Immunology* 38, 1229-1233.

- Sohi, D. K., Warner, J. O., 2008. Understanding allergy. *Paediatrics and Child Health* 18(7), 301-308.
- Sudo, N., Sawamura, S., Tanaka, K., Aiba, Y., Kubo, C., Koga, Y., 1997. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *Journal of Immunology* 159, 1739-1745.
- Sutas, Y., Soppi, E., Korhonen, H., Syvaöja, E.L., Saxelin, M., Rokka, T., 1996. Suppression of lymphocyte proliferation in vitro by bovine caseins hydrolyzed with *Lactobacillus Casei* GG-derived enzymes. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 98, 216-224.
- Tkaczyk, C., Okayama, Y., Metcalfe, D.D., Gilfillan, A.M., 2004. Fc gamma receptor on mast cells: activatory and inhibitory regulation of mediator release. *International Archives of Allergy and Immunology* 133, 305-315.
- Untersmayr, E., Jensen-Jarolim, E., 2006. Mechanisms of type I food allergy. *Pharmacology and Therapeutics* 112(3), 787-798.
- Vickery, B. P., Scurlock, A. M., Jones, S. M., Burks, A. W., 2011. Mechanisms of immune tolerance relevant to food allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127(3), 576-584.
- von der Weid, T., Bulliard, C., Schiffrin, E.J., 2001. Induction by a lactic acid bacterium of a population of CD4+ T cells with low proliferative capacity that produce transforming growth factor beta and interleukin-10. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 8, 695-701.
- von der Weid, T., Ibnou-Zekri, N., Pfeifer, A., 2002. Novel probiotics for the management of allergic inflammation. *Digestive and Liver Disease*, 34, Supplement 2(0), S25-S28.
- Wang, J., Sampson, H.A., 2011. Food Allergy. *The Journal of Clinical Investigation* 121(3), 827-835.
- Yasui, H., Shida, K., Matsuzaki, T., Yokokura, T., 1999. Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. *Antoine Van Leeuwenhoek* 76(1-4), 383-389.
- York, I. A., Goldberg, A. L., Mo, X. Y., Rock, K. L., 1999. Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. *Immunological Reviews* 172, 49-66.

# ANEXOS

**ANEXO I**

Tabla Elisa PLACA 1-CONTROL

Tabla 3. Datos obtenidos sobre la cantidad de IgE tras la realización del Elisa. Positivos en color Amarillo.

Muestra	IgE	%	%Reducción
PBS	1128,992	100	0
Blanco	-31,731	-2,811	102,811
C +	1161,082	102,842	-2,842
MPB001	1528,560	135,392	-35,392
MPB002	1040,463	92,159	7,841
MPB003	1250,173	110,734	-10,734
MPB004	1298,965	115,055	-15,055
MPB005	1275,601	112,986	-12,986
MPB006	1265,562	112,097	-12,097
MPB007	1366,523	121,039	-21,039
MPB008	1142,0814	101,159	-1,159
MPB009	1266,031	112,138	-12,138
MPB010	1297,182	114,897	-14,897
MPB011	1223,151	108,340	-8,340
MPB012	1323,830	117,258	-17,258
MPB013	1121,720	99,356	0,644
MPB014	1282,545	113,601	-13,601
MPB015	1190,216	105,423	-5,423
MPB016	1162,537	102,971	-2,971
MPB017	804,199	71,232	28,768
MPB018	1233,566	109,263	-9,263
MPB019	1218,178	107,900	-7,900
MPB020	1337,811	118,496	-18,496
MPB021	1364,271	120,840	-20,860
MPB022	1400,489	124,048	-24,048
MPB023	1191,061	105,498	-5,498
MPB024	1210,671	107,235	-7,235
MPB025	1134,575	100,495	-0,495
MPB026	1110,742	98,384	1,616
MPB027	1145,272	101,442	-1,442
MPB325	1217,145	107,808	-7,808



Tabla Elisa PLACA 2-TÉRMICO

Tabla 4. Datos obtenidos sobre la cantidad de IgE tras la realización del Elisa. Positivos en color Amarillo.

Muestra	IgE	%	%Reducción
PBS	1057,048	100	0
Blanco	-79,326	-7,505	107,505
C +	1192,988	112,860	-12,860
MPB028	1240,877	117,391	-17,391
MPB029	1043,799	98,747	1,253
MPB030	1110,596	105,066	-5,066
MPB031	1067,353	100,975	-0,975
MPB032	1072,873	101,497	-1,497
MPB033	959,337	90,756	9,244
MPB034	1082,074	102,368	-2,368
MPB035	1021,073	96,597	3,403
MPB036	974,794	92,219	7,781
MPB037	1146,387	108,452	-8,452
MPB038	1185,213	112,125	-12,125
MPB039	1089,526	103,073	-3,073
MPB040	898,889	85,038	14,962
MPB041	1196,070	113,152	-13,152
MPB042	1086,766	102,811	-2,811
MPB043	1062,660	100,531	-0,531
MPB044	1032,298	97,659	2,341
MPB045	943,788	89,285	10,715
MPB046	1349,077	127,627	-27,627
MPB047	1031,746	97,606	2,394
MPB048	1190,090	112,586	-12,586
MPB049	1010,401	95,587	4,413
MPB050	1081,246	102,289	-2,289
MPB051	998,394	94,451	5,549
MPB052	987,583	93,428	6,572
MPB053	1082,994	102,455	-2,455
MPB054	985,283	93,211	6,789
MPB326	1099,555	104,021	-4,021

Tabla Elisa PLACA 3-ÁCIDO

Tabla 5. Datos obtenidos sobre la cantidad de IgE tras la realización del Elisa. Positivos en color Amarillo.

Muestra	IgE	%	%Reducción
PBS	987,829	100	0
Blanco	-64,107	-6,490	106,490
C +	1094,079	110,756	-10,756
MPB055	993,713	100,596	-0,596
MPB056	992,624	100,485	-0,485
MPB057	1027,350	104,001	-4,001
MPB058	1069,560	108,274	-8,274
MPB059	935,085	94,661	5,339
MPB060	1078,133	109,142	-9,142
MPB061	1062,731	107,583	-7,583
MPB062	988,119	100,029	-0,029
MPB063	1091,718	110,517	-10,517
MPB064	1017,470	103,001	-3,001
MPB065	1057,573	107,060	-7,060
MPB066	1081,257	109,458	-9,458
MPB067	899,995	91,108	8,892
MPB068	1210,210	122,512	-22,512
MPB069	1059,752	107,281	-7,281
MPB070	998,654	101,096	-1,096
MPB071	1007,735	102,015	-2,015
MPB072	1051,615	106,457	-6,457
MPB073	1216,894	123,189	-23,189
MPB074	1101,453	111,502	-11,502
MPB075	1042,316	105,516	-5,516
MPB076	1025,207	103,784	-3,784
MPB077	1036,432	104,920	-4,920
MPB078	1079,440	109,274	-9,274
MPB079	1040,427	105,325	-5,325
MPB080	1057,645	107,068	-7,068
MPB081	1088,376	110,179	-10,179
MPB327	1054,449	106,744	-6,744

Tabla Elisa PLACA 4-BASE

Tabla 6. Datos obtenidos sobre la cantidad de IgE tras la realización del Elisa. Positivos en color Amarillo.

Muestra	IgE	%	%Reducción
PBS	1062,586	100	0
Blanco	-47,484	-4,469	104,469
C +	1129,996	106,344	-6,344
MPB082	1204,601	113,365	-13,365
MPB083	1089,117	102,497	-2,497
MPB084	1206,367	113,531	-13,531
MPB085	1066,603	100,378	-0,378
MPB086	1016,631	95,675	4,325
MPB087	869,540	81,832	18,168
MPB088	824,247	77,570	22,430
MPB089	1491,411	140,357	-40,357
MPB090	965,158	90,831	9,169
MPB091	1014,866	95,509	4,491
MPB092	977,960	92,036	7,964
MPB093	829,015	78,019	21,981
MPB094	960,038	90,349	9,651
MPB095	904,591	85,131	14,869
MPB096	1096,622	103,203	-3,203
MPB097	1177,054	110,773	-10,773
MPB098	932,314	87,740	12,260
MPB099	929,401	87,466	12,534
MPB100	1380,386	129,908	-29,908
MPB101	889,052	83,669	16,331
MPB102	1183,058	111,338	-11,338
MPB103	1032,259	97,146	2,854
MPB104	895,939	84,317	15,683
MPB105	1041,882	98,052	1,948
MPB106	848,439	79,847	20,153
MPB107	1268,170	119,347	-19,347
MPB108	862,036	81,126	18,874
MPB328	943,616	88,804	11,196

Tabla 4. Placa Base

Tabla Elisa PLACA 5-MICROONDAS

Tabla 7. Datos obtenidos sobre la cantidad de IgE tras la realización del Elisa. Positivos en color Amarillo.

Muestra	IgE	%	%Reducción
PBS	834,576	100	0
Blanco	-29,200	-3,499	103,499
C +	854,984	102,445	-2,445
MPB109	558,409	66,909	33,091
MPB110	571,564	68,486	31,514
MPB111	569,402	68,226	31,774
MPB112	442,716	53,047	46,953
MPB113	508,222	60,896	39,104
MPB114	546,245	65,452	34,548
MPB115	439,383	52,647	47,353
MPB116	575,168	68,917	31,083
MPB117	552,642	66,218	33,782
MPB118	529,126	63,401	36,599
MPB119	667,344	79,962	20,038
MPB120	456,142	54,656	45,344
MPB121	553,814	66,359	33,641
MPB122	612,201	73,355	26,645
MPB123	408,657	48,966	51,034
MPB124	481,821	57,732	42,268
MPB125	503,806	60,367	39,633
MPB126	474,883	56,901	43,099
MPB127	580,575	69,565	30,435
MPB128	476,235	57,063	42,937
MPB129	489,210	58,618	41,382
MPB130	489,931	58,704	41,296
MPB131	636,980	76,324	23,673
MPB132	465,963	55,832	44,168
MPB133	562,013	67,341	32,659
MPB134	489,210	58,618	41,382
MPB135	517,592	62,019	37,981
MPB329	518,764	62,159	37,841

Tabla Elisa PLACA 6-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Tabla 8. Datos obtenidos sobre la cantidad de IgE tras la realización del Elisa. Positivos en color Amarillo.

Muestra	IgE	%	%Reducción
PBS	848,340	100,000	0
Blanco	-0,975	-0,115	100,115
C +	937,972	110,565	-10,565
MPB136	855,660	100,863	-0,863
MPB137	736,836	86,856	13,144
MPB138	756,612	89,187	10,813
MPB139	650,972	76,735	23,265
MPB140	735,552	86,705	13,295
MPB141	735,552	86,705	13,295
MPB142	738,291	87,028	12,972
MPB143	820,561	96,725	3,275
MPB144	742,058	87,472	12,528
MPB145	666,980	78,622	21,378
MPB146	722,882	85,211	14,789
MPB147	788,372	92,931	7,069
MPB148	618,441	72,900	27,100
MPB149	862,765	101,700	-1,700
MPB150	709,185	83,597	16,403
MPB151	633,593	74,686	25,314
MPB152	701,566	82,699	17,301
MPB153	679,821	80,135	19,865
MPB154	721,256	85,020	14,980
MPB155	752,674	88,723	11,277
MPB156	690,351	81,377	18,623
MPB157	768,597	90,600	9,400
MPB158	722,454	85,161	14,839
MPB159	640,185	75,463	24,537
MPB160	709,014	83,577	16,423
MPB161	672,545	79,278	20,722
MPB162	675,627	79,641	20,359
MPB330	738,377	87,038	12,962

Tabla Elisa PLACA 7-ETANOL

Tabla 9. Datos obtenidos sobre la cantidad de IgE tras la realización del Elisa. Positivos en color Amarillo.

Muestra	IgE	%	%Reducción
PBS	740,459831	100,000	0
Blanco	-13,1828055	-1,780	101,780
C +	718,336773	97,012	2,988
MPB163	661,44891	89,329	10,671
MPB164	616,068278	83,201	16,799
MPB165	702,129405	94,823	5,177
MPB166	795,970068	107,497	-7,497
MPB167	633,97742	85,619	14,381
MPB168	696,051641	94,003	5,997
MPB169	707,63991	95,568	4,432
MPB170	711,367605	96,071	3,929
MPB171	559,261451	75,529	24,471
MPB172	692,729131	93,554	6,446
MPB173	753,5878	101,773	-1,773
MPB174	721,74032	97,472	2,528
MPB175	422,552297	57,066	42,934
MPB176	830,5728	112,170	-12,170
MPB177	674,252731	91,059	8,941
MPB178	662,907573	89,526	10,474
MPB179	617,851088	83,442	16,558
MPB180	800,427095	108,099	-8,099
MPB181	633,491199	85,554	14,446
MPB182	736,407989	99,453	0,547
MPB183	722,631726	97,592	2,408
MPB184	672,631994	90,840	9,160
MPB185	704,398436	95,130	4,870
MPB186	671,092294	90,632	9,368
MPB187	631,14113	85,236	14,764
MPB188	662,583425	89,483	10,517
MPB189	544,91793	73,592	26,408
MPB331	580,655177	78,418	21,582

Tabla Elisa PLACA 8-ALTAS PRESIONES

Tabla 10. Datos obtenidos sobre la cantidad de IgE tras la realización del Elisa. Positivos en color Amarillo.

Muestra	IgE	%	%Reducción
PBS	726,506	100,000	0
Blanco	1,9526	0,269	99,731
C +	675,460	92,974	7,026
MPB190	660,240	90,879	9,121
MPB191	618,661	85,156	14,844
MPB192	712,551	98,079	1,921
MPB193	618,947	85,195	14,805
MPB194	658,037	90,576	9,424
MPB195	839,532	115,558	-15,558
MPB196	741,685	102,089	-2,089
MPB197	787,874	108,447	-8,447
MPB198	594,954	81,893	18,107
MPB199	615,438	84,712	15,288
MPB200	640,165	88,116	11,884
MPB201	809,745	111,458	-11,458
MPB202	675,174	92,935	7,065
MPB203	772,287	106,302	-6,302
MPB204	634,207	87,296	12,704
MPB205	747,560	102,898	-2,898
MPB206	665,545	91,609	8,391
MPB207	649,876	89,452	10,548
MPB208	639,920	88,082	11,918
MPB209	697,045	95,945	4,055
MPB210	734,422	101,089	-1,089
MPB211	664,729	91,497	8,503
MPB212	587,120	80,814	19,186
MPB213	793,505	109,222	-9,222
MPB214	715,652	98,506	1,497
MPB215	637,390	87,734	12,266
MPB216	576,511	79,354	20,646
MPB332	574,634	79,096	20,9044

Tabla Elisa PLACA 9-SOBRENADANTE

Tabla 11. Datos obtenidos sobre la cantidad de IgE tras la realización del Elisa. Positivos en color Amarillo.

Muestra	IgE	%	%Reducción
PBS	965,764	100,000	0
Blanco	-104,392	-10,809	110,809
C +	861,910	89,246	10,7535767
MPB217	496,893	51,451	48,549
MPB218	522,246	54,076	45,924
MPB219	448,631	46,454	53,546
MPB220	425,824	44,092	55,908
MPB221	427,962	44,313	55,687
MPB222	455,860	47,202	52,798
MPB223	469,707	48,636	51,364
MPB224	362,697	37,555	62,445
MPB225	386,726	40,044	59,956
MPB226	472,559	48,931	51,069
MPB227	486,100	50,333	49,667
MPB228	436,209	45,167	54,833
MPB229	463,701	48,014	51,986
MPB230	402,813	41,709	58,291
MPB231	476,326	49,321	50,679
MPB232	445,373	46,116	53,884
MPB233	476,020	49,290	50,710
MPB234	349,155	36,153	63,847
MPB235	503,918	52,178	47,822
MPB236	419,7151	43,459	56,541
MPB237	416,050	43,080	56,920
MPB238	500,660	51,841	48,159
MPB239	375,119	38,842	61,158
MPB240	496,587	51,419	48,581
MPB241	394,770	40,876	59,124
MPB242	467,977	48,457	51,543
MPB243	493,329	51,082	48,918
MPB333	427,148	44,229	55,771



Tabla Elisa PLACA 10-EXTRACCIÓN AGUA

Tabla 12. Datos obtenidos sobre la cantidad de IgE tras la realización del Elisa. Positivos en color Amarillo.

Muestra	IgE	%	%Reducción
PBS	913,139	100,000	0
Blanco	4,339	0,475	99,525
C +	1066,001	116,740	-16,740
MPB244	961,046	105,246	-5,246
MPB245	839,606	91,947	8,053
MPB246	1113,521	121,944	-21,9443
MPB247	1441,266	157,836	-57,8364
MPB248	755,384	82,724	17,276
MPB249	986,458	108,029	-8,029
MPB250	1378,379	150,949	-50,9494
MPB251	850,809	93,174	6,826
MPB252	1065,186	116,651	-16,651
MPB253	1066,473	116,792	-16,792
MPB254	1102,274	120,713	-20,713
MPB255	750,104	82,146	17,854
MPB256	1586,916	173,787	-73,787
MPB257	1199,288	131,337	-31,337
MPB258	1033,42	113,172	-13,172
MPB259	1007,492	110,333	-10,333
MPB260	633,944	69,425	30,575
MPB261	1162,286	127,285	-27,285
MPB262	1046,555	114,611	-14,611
MPB263	817,241	89,498	10,502
MPB264	918,548	100,592	-0,592
MPB265	703,142	77,003	22,997
MPB266	974,696	106,741	-6,741
MPB267	1043,636	114,291	-14,291
MPB268	991,094	108,537	-8,53701
MPB269	1064,499	116,576	-16,576
MPB270	833,725	91,303	8,697
MPB334	1011,441	110,765	-10,765

Tabla Elisa PLACA 11-EXTRACCIÓN ETANOL

Tabla 13. Datos obtenidos sobre la cantidad de IgE tras la realización del Elisa. Positivos en color Amarillo.

Muestra	IgE	%	%Reducción
PBS	1171,623	100,000	0
Blanco	-96,411	-8,229	108,229
C +	1076,621	91,891	8,109
MPB271	928,431	79,243	20,757
MPB272	909,995	77,670	22,330
MPB273	981,953	83,811	16,189
MPB274	1094,870	93,449	6,551
MPB275	654,351	55,850	44,150
MPB276	987,677	84,300	15,700
MPB277	876,023	74,770	25,330
MPB278	944,487	80,614	19,386
MPB279	1084,017	92,523	7,477
MPB280	969,465	82,745	17,255
MPB281	922,112	78,704	21,296
MPB282	858,777	73,298	26,702
MPB283	980,095	83,653	16,347
MPB284	601,424	51,333	48,667
MPB285	1056,513	90,175	9,825
MPB286	932,221	79,567	20,433
MPB287	1150,326	98,182	1,818
MPB288	1024,399	87,434	12,566
MPB289	1100,817	93,957	6,043
MPB290	901,000	76,902	23,098
MPB291	890,370	75,995	24,005
MPB292	858,034	73,235	26,765
MPB293	982,919	83,894	16,106
MPB294	898,324	76,673	23,327
MPB295	1024,399	87,434	12,566
MPB296	852,013	72,721	27,279
MPB297	954,672	81,483	18,517
MPB335	903,379	77,105	22,895

Tabla Elisa PLACA 12-EXTRACCIÓN ACÉTICO

Tabla 14. Datos obtenidos sobre la cantidad de IgE tras la realización del Elisa. Positivos en color Amarillo.

Muestra	IgE	%	%Reducción
PBS	806,409	100,000	0
Blanco	1,289	0,107	99,893
C +	1065,053	88,045	11,955
MPB298	1121,389	92,702	7,298
MPB299	1061,946	87,788	12,212
MPB300	976,578	80,731	19,269
MPB301	970,992	80,269	19,731
MPB302	1079,898	89,272	10,728
MPB303	1040,29	85,998	14,002
MPB304	1106,324	91,456	8,544
MPB305	1062,134	87,803	12,197
MPB306	1099,482	90,891	9,109
MPB307	770,630	63,706	36,294
MPB308	948,395	78,401	21,599
MPB309	1073,307	88,727	11,273
MPB310	886,441	73,279	26,721
MPB311	1089,314	90,050	9,950
MPB312	1108,898	91,669	8,331
MPB313	1058,682	87,518	12,482
MPB314	952,914	78,774	21,226
MPB315	1061,193	87,725	12,275
MPB316	978,085	80,855	19,145
MPB317	1167,211	96,490	3,510
MPB318	969,423	80,139	19,861
MPB319	957,182	79,127	20,873
MPB320	1042,55	86,184	13,816
MPB321	1109,714	91,737	8,263
MPB322	1086,991	89,858	10,142
MPB323	1084,606	89,661	10,339
MPB324	1080,651	89,334	10,666
MPB336	993,338	82,116	17,884

Tabla Elisa Repetición Positivos

Tabla 15. Datos obtenidos sobre la cantidad de IgE de las muestras seleccionadas previamente en los anteriores Elis. Confirmación de Positivos (color Amarillo).

Muestra	IgE	%	%Reducción
PBS	1777,061	100,000	0
C+	1640,88	92,336	7,664
MPB17	1056,596	59,457	40,543
MPB87	1758,072	98,931	1,069
MPB88	1703,525	95,861	4,139
MPB93	1646,092	92,631	7,369
MPB106	1492,877	84,008	15,992
MPB108	1618,167	91,059	8,941
MPB139	1711,53	96,312	3,688
MPB148	1482,545	83,426	16,574
MPB151	1657,355	93,264	6,736
MPB159	1760,678	99,078	0,922
MPB161	1618,819	91,095	8,905
MPB171	1621,425	91,242	8,758
MPB175	1188,402	66,875	33,125
MPB189	1522,012	85,647	14,353
MPB216	1696,078	95,443	4,557
MPB260	1759,561	99,015	0,985
MPB265	1607,37	90,451	9,5489
MPB275	1015,267	57,132	42,868
MPB284	1279,065	71,976	28,023
MPB307	1084,334	61,018	38,982
MPB331	1815,78	102,179	-2,179