



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

**Trabajo de Tesis Doctoral**

**Estudio de la relación entre alteraciones de  
la mucosa colónica y la alergia a leche de  
vaca en pacientes pediátricos**

---

**Tesista: Lic. Canziani Karina Eva**

**Director: Dr. Docena Guillermo Horacio**

**Codirectora: Dra. Muglia Cecilia Isabel**

**Año: 2020**

El presente trabajo de tesis para optar por el grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata ha sido realizado bajo la dirección del Dr. Guillermo H. Docena y la co-dirección de la Dra. Cecilia I. Muglia en el Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP) dependiente de UNLP-CONICET sitio Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

**La Plata, Abril de 2020**

*A mi familia.*

## **Agradecimientos**

Este trabajo de Tesis ha significado un gran crecimiento en lo profesional como en lo personal, y no se hubiera podido llevar a cabo sin el apoyo incondicional de muchas personas. A todos ellos, quiero expresar mi más profundo agradecimiento.

A mi director, Guillermo, por su dedicación, optimismo y por darme la posibilidad de integrarme a su grupo de trabajo para poder realizar este trabajo de Tesis. A Cecilia, mi co-directora, por sus enseñanzas, todo su apoyo y paciencia. A ambos gracias por confiar en mí y abrirme las puertas del IIFP, lugar en el cual he conocido y trabajado con personas maravillosas.

Quiero agradecer a todo el personal del Servicio de Gastroenterología, en especial a Lorena, Luciana y Viviana, a Eugenia del Servicio de Anatomía Patológica, a Marcela del Servicio de Alergia del Hospital de Niños Sor María Ludovica, a pacientes y familiares por permitir que este trabajo se lleve a cabo. Es invaluable el aporte de todos ellos.

Un tremendo gracias a todas y cada una de las personas del IIFP: Paolin, Reni, Juancito M, Costy, David, Andre, Coqui, Agus, Rodri, Lu, Araya, Romi C, Loli, Pablo, JC, Maxi, Iva, Ceci A, Meli, Mati, Ile, Jorge, Iñaki, Fer B, Gri, Marina, Ague, Agus A, Martín, Fer C, Paula R, Vero, Pedro, Nico, Clara, Valen, Oscar con las que compartí momentos de trabajo, mates, charlas, afterlabs, congresos, asados, etc., etc., etc. Gracias por todos los consejos tanto experimentales como personales y su gran ayuda desde mis inicios en el IIFP. A Meli P por su gran ayuda y apoyo con parte de los experimentos. Gracias a Alberto, por sus consejos, su amabilidad y sus anécdotas en el almuerzo que hacían que te quedaras un rato más solo para escucharlas. Al box 4 y asociados, Ema M, Juani, Pau C, Ema B, Juli Va, Ivi, Juli Ve, Gero, Mica quiénes no solo fueron compañeros de trabajo sino de la vida, me brindaron su amistad, ayuda y paciencia principalmente en el último tiempo. A Maira, Belu y Flor T que siguieron sus sueños y ya no están en el IIFP, pero me dejaron hermosos momentos compartidos que por suerte se pueden repetir cuando la rutina nos lo permite. En especial me gustaría agradecerles a Flor GC, Fede P y a los sis, Malenita, Mai, Gasty y Carito no solo por ser excelentes compañeros de trabajo sino también grandes, me quedo chica, gigantes amigos que me dio el IIFP.

Gracias por todos los momentos compartidos, todo el apoyo, cariño, risas, mates, ayuda, lágrimas, etc., por todo mil gracias.

Gracias a mis compañeros de la cátedra de Biología Vegetal, Laura, Susana, Edu, Lau y Eli, y de la cátedra de Biología, Cele, Agus, Lu, Nacho, Martín, Julio, Santi por dejarme compartir la tarea docente con ustedes, y por enseñarme a enseñar.

Gracias a mis amigos de la vida de acá y allá, So, Vir, Ine, Santi, Nado y a la mafia, Bruno, Caro, Fío y Aldi, que extraño tanto porque la vida y los sueños nos llevaron por distintos caminos, pero que en todos estos años me han acompañado y apoyado siempre sin importar la distancia, compartiendo mates, charlas, viajes, video llamadas, alegrías, tristezas, sueños, frustraciones, etc., etc., ect. A Santi, si bien nuestros caminos se separaron, fue un gran apoyo para mí por sus consejos y risas en todo el tiempo que compartimos. Y en especial a Aye que, además de todo eso, bancó mis locuras y emprendimientos todos estos años de convivencia y me brindó todo su apoyo.

A mis compañeros de Kung Fu, Sebas, Mari, Jony y Ban, por escucharme, apoyarme y hacer que me olvide de los problemas con sus increíbles energías.

A Fede, a quien la vida me dio la increíble oportunidad de conocer este último año, por lo que estoy tremendamente agradecida porque se ha convertido en una persona muy muy especial para mí. Gracias infinitas por compartir este tiempo a mi lado, por el apoyo constante y la tremenda paciencia que me has tenido, principalmente en este último tiempo. Gracias por escucharme, aconsejarme, por brindarme tu amor y hacerme reír tanto.

Quiero agradecer enormemente a mi familia... A Mami, Dante, Patri, quiénes me apoyaron en todo lo que emprendí, me permitieron cumplir las metas que me propuse y siempre estuvieron ahí para lo que necesitara, brindando su cariño y apoyo incondicional. A mis sobris, Mile y Ori, con sus ocurrencias, sus abrazos y risas reponedoras de energías. Un millón de gracias a todos ellos. Y a mí Papá y a Franquito, que donde quiera que se encuentren, me motivaron a elegir este camino que transito. A Teo, Elsa, Yesi, Maru, Fede y Benja, que me demostraron que no es necesario tener

lazos sanguíneos para convertirse en tu familia. Gracias por todo el amor que me brindan cada día.

Aunque las palabras siempre quedan chicas, a todos ellos ¡Un millón de gracias!

Finalmente, mi agradecimiento a CONICET por otorgarme la beca que permitió mi desarrollo profesional y el de mi Tesis doctoral; y a la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por brindarme la formación de grado y de posgrado, en su carácter de pública y gratuita, y de la que orgullosamente formo parte.

**Abreviaturas**

<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>Ag</b>	Antígeno
<b>AID</b>	Deaminasa de citidina inducida por activación
<b>ALV</b>	Alergia a leche de vaca
<b>CD</b>	Célula dendrítica
<b>CFSE</b>	Éster de succinimidil-carboxifluoresceína
<b>CG</b>	Centro germinal
<b>CH</b>	Región constante de la cadena pesada
<b>CPA</b>	Células presentadoras de antígeno
<b>CSR</b>	Recombinación del cambio de clase/isotipo
<b>CT</b>	Transcripto circular
<b>EBV</b>	Linfocito B inmortalizado con el virus de Epstein-Bar
<b>GALT</b>	Tejido linfoide asociado a la mucosa gastrointestinal
<b>GDI</b>	Genes de interés
<b>GLT</b>	Transcripto de línea germinal
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulador de la formación de colonias de granulocitos y macrófagos
<b>HNL</b>	Hiperplasia nodular linfoide
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano picante
<b>I</b>	Exón I de línea germinal
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>ILC</b>	Células linfoides innatas
<b>LB</b>	Linfocito B
<b>LCTLP</b>	Línea celular T obtenida de lámina propia
<b>LCTSP</b>	Línea celular T obtenida de sangre periférica

<b>LT</b>	Linfocito T
<b>MLN</b>	Ganglios linfoides mesentéricos
<b>PHA</b>	Fitohematoglutinina
<b>PJ</b>	Pólipo juvenil
<b>PLV</b>	Proteínas de la leche de vaca
<b>RIC</b>	Rango Intercuartilo
<b>S</b>	Región de cambio
<b>SILT</b>	Tejidos linfoides aislados solitarios
<b>SIM</b>	Sistema inmune de mucosa
<b>SPT</b>	Prueba cutánea
<b>TCP</b>	Tejido circundante al pólipo
<b>TFH</b>	Linfocito T folicular colaborador
<b>TGI</b>	Tracto gastrointestinal
<b>Treg</b>	Linfocito T regulador
<b>TSLP</b>	Linfopoyetina del estroma tímico
<b>UI</b>	Unidades internacionales
<b>VH</b>	Región variable de la cadena pesada



# ÍNDICES Y RESUMEN

---

**Índice de contenidos**

<b>Índices y Resumen .....</b>	<b>13</b>
Índice de contenidos .....	14
Índice de figuras .....	17
Índice de tablas.....	19
Resumen .....	20
<b>Introducción.....</b>	<b>22</b>
El tracto gastrointestinal y el sistema inmune de mucosas .....	23
Generalidades de las alergias alimentarias .....	31
<i>Prevalencia</i> .....	33
<i>Mecanismos inmunológicos</i> .....	35
<i>Cambio de isotipo en linfocitos B de la mucosa intestinal</i> .....	43
<i>Diagnóstico</i> .....	51
Pólipos colorectales.....	58
<i>Pólipos juveniles</i> .....	59
Alteraciones en la mucosa colónica asociadas a alergias alimentarias .....	61
<b>Hipótesis de trabajo y objetivos .....</b>	<b>64</b>
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>66</b>
1. Pacientes y muestras biológicas .....	67
2. Estudio de la condición alérgica de los pacientes .....	67
2.1 <i>Anamnesis del paciente</i> .....	67
2.2 <i>Pruebas in vitro e in vivo</i> .....	68
3. Estudios histológicos e inmunofluorescentes .....	70
3.1 <i>Análisis histológico mediante la tinción de hematoxilina y eosina</i> .....	70
3.2 <i>Tinción Tricrómica de Masson</i> .....	70
3.3 <i>Análisis inmunohistoquímicos</i> .....	71
3.4 <i>Análisis de fluorescencia por microscopía confocal</i> .....	71
4. Análisis de la expresión génica .....	73
4.1 <i>Extracción ARN total y síntesis de ADN complementario (ADNc)</i> .....	73
4.2 <i>Cuantificación de la expresión génica por PCR en tiempo real</i> .....	73
5. Cuantificación de proteínas solubles.....	74

6. Estudio de inmunoglobulinas por microscopía de disección láser y análisis génico por PCR.....	75
6.1 <i>Análisis de la recombinación del cambio de clase de inmunoglobulinas</i> .....	75
6.2 <i>Estudio de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas</i> .	78
7. Cultivos primarios y establecimiento de líneas celulares .....	78
7.1 <i>Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica y establecimiento de líneas de linfocitos B y T</i> .....	78
7.2 <i>Aislamiento de células epiteliales de pólipos colorrectales y análisis génico</i> ..	80
7.3 <i>Aislamiento de células de la lámina propia de pólipos colorrectales</i> .....	80
7.4 <i>Establecimiento de línea de linfocitos T de lámina propia</i> .....	81
8. Análisis de las células obtenidas por citometría de flujo multiparamétrica .....	81
8.1 <i>Estudio de las poblaciones celulares</i> .....	81
8.2 <i>Ensayos de proliferación celular y secreción de citoquinas</i> .....	82
9. Análisis estadístico .....	83
<b>Resultados .....</b>	<b>84</b>
<b>Capítulo 1. Evaluación clínica de los pacientes y caracterización de los pólipos juveniles.....</b>	<b>85</b>
Objetivos específicos.....	85
1. Caracterización de la cohorte de pacientes y resultados hallados .....	85
2. Caracterización de los pólipos colorectales removidos .....	94
2.1. <i>Análisis histológico</i> .....	94
2.2. <i>Estudio del infiltrado eosinofílico</i> .....	97
2.3. <i>Estudio de citoquinas en los tejidos</i> .....	102
<b>Capítulo 2. Linfocitos B y estudio de la producción local de IgE .....</b>	<b>110</b>
Objetivos específicos.....	110
1. Estudio de la presencia de centros germinales en pólipos juveniles .....	110
2. Análisis de la expresión de diferentes isotipos .....	112
3. Estudio del cambio de isotipo en los pólipos juveniles .....	116
4. Estudio de las regiones variables de las inmunoglobulinas .....	124
<b>Capítulo 3. Linfocitos T, cultivos celulares y estudio de su especificidad .....</b>	<b>127</b>
Objetivos específicos.....	127
1. Cultivo de linfocitos T de sangre periférica y de pólipos juveniles .....	127

2. Estudio de la especificidad de las líneas celulares T generadas a partir de sangre periférica y lámina propia .....	130
<b>Discusión .....</b>	<b>133</b>
<b>Conclusiones Generales .....</b>	<b>143</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>147</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1. Anatomía de la mucosa intestinal y el sistema inmune asociado. ....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 2. Variación del sistema inmune a lo largo del tracto intestinal. ....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 3. Descripción general de la anatomía y estructura de las placas de Peyer/placas colónicas y el SILT. ....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 4. Respuesta inflamatoria mediada por células T<sub>H</sub>2 a un antígeno oral en el intestino humano. ....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 5. Reacción del centro germinal. ....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 6. Posibles sitios de producción de IgE en el intestino humano. ....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 7. Mecanismo de recombinación del cambio de clase directo y secuencial a IgE. ....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 8. Enfoque diagnóstico. ....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 9. Esquema e histología típica de un pólipo juvenil. ....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 10. Recombinación del cambio de clase directo y secuencial a IgE. ....</b>	<b>77</b>
<b>Figura 11. Pólipos Juveniles durante una colonoscopia. ....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 12. Medida de IgE total en suero. ....</b>	<b>90</b>
<b>Figura 13. Análisis histológico mediante la tinción de hematoxilina y eosina. ....</b>	<b>95</b>
<b>Figura 14. Análisis de fibrosis mediante la tinción tricrómica de Masson ....</b>	<b>96</b>
<b>Figura 15. Análisis del infiltrado de eosinófilos en los pólipos juveniles ....</b>	<b>98</b>
<b>Figura 16. Expresión de quimioquinas atrayentes de eosinófilos ....</b>	<b>100</b>
<b>Figura 17. Análisis de células que expresan IgE ....</b>	<b>101</b>
<b>Figura 18. Estudio de la expresión y producción citoquinas en los tejidos ....</b>	<b>103</b>
<b>Figura 19. Evaluación de la expresión de TSLP en tejidos ....</b>	<b>105</b>
<b>Figura 20. Evaluación de la expresión de IL33 y de su receptor ST2 ....</b>	<b>107</b>
<b>Figura 21. Evaluación de la expresión de ST2 soluble en suero de pacientes. ....</b>	<b>108</b>

---

<b>Figura 22. Análisis histológico de pólipos juveniles. ....</b>	<b>111</b>
<b>Figura 23. Inmunohistoquímica de folículos linfoides de cortes histológicos de pólipos. ....</b>	<b>111</b>
<b>Figura 24. Análisis de la expresión y distribución de IgA e IgE. ....</b>	<b>113</b>
<b>Figura 25. Análisis de células plasmáticas IgE<sup>+</sup>. ....</b>	<b>114</b>
<b>Figura 26. Evaluación de IgE total y específica en los tejidos. ....</b>	<b>115</b>
<b>Figura 27. Expresión de AID en pólipos y tejido circundante. ....</b>	<b>116</b>
<b>Figura 28. Amplificación de transcritos de la línea germinal. ....</b>	<b>119</b>
<b>Figura 29. Análisis de la expresión de transcritos circulares ....</b>	<b>120</b>
<b>Figura 30. Expresión génica de los exones que codifican para los isotipos de cadena pesada de inmunoglobulinas. ....</b>	<b>122</b>
<b>Figura 31. Expresión proteica de IgE en los pólipos evaluados ....</b>	<b>123</b>
<b>Figura 32. Análisis de las regiones variables (VH) de la cadena pesada. ....</b>	<b>125</b>
<b>Figura 33. Poblaciones de linfocitos T presentes en sangre periférica y la correspondiente en lámina propia del pólipo juvenil ....</b>	<b>128</b>
<b>Figura 34. Ensayos de proliferación de linfocitos T y cuantificación de citoquinas en el sobrenadante de cultivo. ....</b>	<b>131</b>
<b>Figura 35. Respuesta inflamatoria desarrollada en los pólipos juveniles. ....</b>	<b>141</b>

**Índice de tablas**

<b>Tabla 1. Secuencia de cebadores utilizados para el estudio de la expresión relativa de ARNm por PCR en tiempo real.....</b>	<b>74</b>
<b>Tabla 2. Secuencia de cebadores utilizados para el estudio del cambio de isotipo por PCR. ....</b>	<b>76</b>
<b>Tabla 3. Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación de las diferentes familias de VH por PCR. ....</b>	<b>78</b>
<b>Tabla 4. Pacientes que presentan PJ e HNL.....</b>	<b>88</b>
<b>Tabla 5. Pacientes que presentan HNL .....</b>	<b>89</b>
<b>Tabla 6. Información completa de los pacientes incluidos en el trabajo. ....</b>	<b>91</b>
<b>Tabla 7. Relación <math>\kappa:\lambda</math> por PCR en diferentes tejidos .....</b>	<b>124</b>
<b>Tabla 8. Frecuencia de subpoblaciones celulares aisladas de sangre periférica y de lámina propia de pólipos colorrectales.....</b>	<b>129</b>

## Resumen

La alergia a las proteínas de la leche de vaca (ALV) es la alergia alimentaria que se presenta con mayor prevalencia en el mundo y en nuestro país, pudiendo afectar hasta un 10% de la población pediátrica. En las últimas décadas se han producido cambios en la epidemiología de las reacciones alérgicas y, en particular, las alergias alimentarias han despertado una especial atención porque constituyen lo que se ha llamado la segunda ola epidémica de alergia. Además, se ha agravado la forma en que se presentan, reportándose mayor incidencia de anafilaxias causadas por alimentos. Por estos motivos, existe un marcado interés en comprender la fisiopatogenia de estos desórdenes inflamatorios y el desarrollo de terapias correctivas del defecto inmunológico que se produce en estos pacientes. Dado que las reacciones IgE-dependientes son las más prevalentes y las que originan reacciones anafilácticas, resulta crítico comprender las bases moleculares y celulares de la síntesis de la IgE. En el presente trabajo de Tesis se decidió abordar el estudio de la asociación entre la ALV y el desarrollo de pólipos juveniles (PJ) colorrectales en pacientes pediátricos que presentan sangrado rectal al momento del diagnóstico, e investigar la biología de la IgE. A partir de la caracterización del infiltrado inflamatorio alérgico que domina el estroma de los PJ, en los cuales la frecuencia de células mononucleares y eosinófilos está significativamente elevada, estudiamos distintos marcadores de una respuesta  $T_H2$ -dependiente. Encontramos que las citoquinas tipo 2, interleuquina- (IL-) 4, IL-5 e IL-13, se encuentran significativamente elevadas en el estroma de los pólipos, como así también las alarminas IL-33 y TSLP, mediadores pro-inflamatorios que intervienen en las primeras etapas de una reacción alérgica. A partir de la historia clínica y los resultados positivos de la serología para IgE de los pacientes con PJ, estudiamos la localización y mecanismos de síntesis de la IgE. Encontramos centros germinales activos en la lámina propia de los PJ y marcadores biológicos que indican una síntesis local de IgE a través de mecanismos de recombinación para cambio de isotipo directo y secuencial. Asimismo, encontramos que en centros germinales individuales se sintetizan más de un isotipo de inmunoglobulina y que, según un análisis sin distinción del isotipo, se emplean genes variables de las familias VH1/7, VH3 y VH5 en la síntesis de las regiones variables de las cadenas pesadas. Como control se analizaron en todos



los casos biopsias de tejido colónico adyacente a los pólipos, donde no encontramos un infiltrado inflamatorio, ni IgE, o citoquinas tipo 2. Por lo tanto, en el estroma de los PJ existen centros germinales en los que se sintetiza IgE, donde el nivel de IgE presente allí se correlaciona con la concentración de IgE presente en el plasma de cada individuo. Estos resultados en su conjunto permitirían alcanzar un mejor conocimiento de la regulación de los procesos alérgicos, de la localización y mecanismos de síntesis de IgE, y sobre la asociación entre el sangrado rectal, la presencia de pólipos colorrectales y la síntesis mucosal de IgE. Por lo tanto, es importante estudiar en pacientes con sangrado rectal la presencia de pólipos y la potencial asociación con una enfermedad alérgica para indicar la remoción de los pólipos, y definir una conducta terapéutica.

# INTRODUCCIÓN

## **El tracto gastrointestinal y el sistema inmune de mucosas**

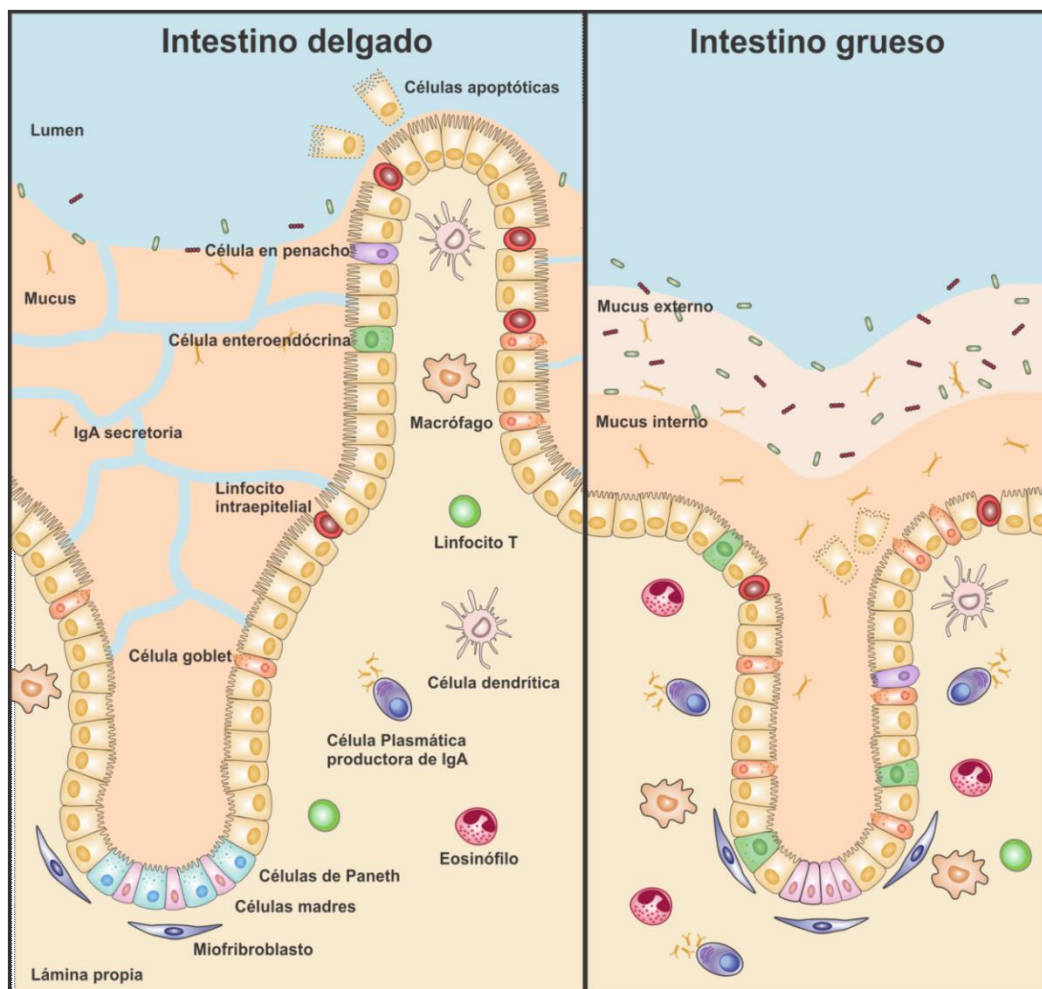
El tracto gastrointestinal (TGI) es una estructura compleja especializada en digerir los alimentos, absorber nutrientes y agua, y eliminar desechos. En particular el intestino, que posee un área efectiva de aproximadamente 300 m<sup>2</sup> y una longitud de 8 m en un adulto, representa un importante sitio de entrada de microorganismos y antígenos alimentarios. En el lumen intestinal se alojan un elevado número de microorganismos (bacterias, hongos, parásitos y virus) que forman una comunidad, y junto a los metabolitos que producen constituyen la microbiota, la cual tiene un gran impacto en la fisiología y fisiopatología del hospedador (Tokuhara et al., 2019). A pesar de su complejidad y dinamismo, la homeostasis intestinal es mantenida bajo control gracias al sistema inmune de mucosa (SIM), que tiene la capacidad de discernir entre microorganismos comensales, patógenos y antígenos inocuos como son algunos componentes de la dieta o del medio ambiente. Frente a los antígenos que se deben conservar (antígenos de la dieta y microorganismos comensales), el SIM induce complejos mecanismos de tolerancia no del todo comprendidos aún, mientras que frente a microorganismos patógenos activa, en forma inmediata, potentes y efectivos mecanismos de defensa. Funcionalmente, el SIM se divide en 2 compartimentos: sitios inductivos (donde se induce e inicia la respuesta inmune) y sitios efectores (donde actúan los mecanismos efectores inducidos). Los primeros comprenden principalmente el compartimento epitelial y los ganglios linfoides asociados a cada porción del TGI, mientras que la lámina propia constituye el sitio efector más extenso.

Debido a que el TGI está constituido por varios segmentos especializados, y con presiones ambientales distintas, el sistema inmune ha adoptado estrategias de defensa disímiles dependiendo de la región (Mowat y Agace, 2014). Los componentes de la microbiota varían en cantidad y calidad en las distintas secciones del TGI, las células del SIM difieren de una sección a otra e inclusive los ganglios asociados a las distintas porciones del intestino cumplen funciones diferentes dependiendo de la porción que drenen. El intestino delgado es cuatro veces más largo que el grueso y se caracteriza por tener criptas alternadas con proyecciones hacia el lumen conocidas como vellosidades, las cuales aumentan el área expuesta, favoreciendo la absorción y secreción de nutrientes; en contraste, la superficie del colon intercala regiones planas

con invaginaciones denominadas criptas de Lieberkühn, donde se lleva a cabo principalmente la reabsorción de agua (**Figura 1**). En las criptas se generan las distintas células epiteliales encargadas de recubrir toda la mucosa, con diferentes funciones asociadas a la digestión y absorción de nutrientes, e importantes funciones inmunológicas. El intestino está recubierto por una monocapa de células epiteliales, las cuales en conjunto con la capa de mucus constituyen la principal barrera física-bioquímica encargada de separar el lumen del medio interno. En el resto de las secciones del tracto, el epitelio puede ser múltiple, como es el caso del esófago, y su función está principalmente asociada a constituir una barrera física. Si bien la mayoría de las células del compartimento epitelial son enterocitos con función de absorción, también se pueden encontrar intercaladas células goblet encargadas de producir mucus y muestrear antígenos luminales, ubicadas mayormente en el colon; células de Paneth que producen péptidos antimicrobianos y colaboran con las células madres intestinales en la diferenciación celular y la regeneración tisular, solo presentes en el intestino delgado; células en penacho (*Tuft cells* en inglés), cuya actividad quimiosensorial juega un papel clave en la defensa contra helmintos; y células neuroendócrinas que juegan un rol central en el control de la secreción y la motilidad del TGI, el consumo de comida, los niveles de glucosa postprandial y el metabolismo (Allaire et al., 2018; Gassler, 2017; Latorre et al., 2016; Mowat y Agace, 2014). El epitelio intestinal también contiene numerosos linfocitos denominados linfocitos intraepiteliales, los cuales se encuentran intercalados entre células epiteliales adyacentes; estos cumplen importantes funciones en la mantención y protección de la barrera epitelial, como así también se han visto implicados en la regulación y el mantenimiento de la homeostasis (Ahluwalia et al., 2017).

El epitelio intestinal es renovado cada 4 o 5 días e involucra una rápida y continua proliferación de células madres multipotentes en la base de las criptas, con una subsecuente migración de estas células a lo largo del eje cripta-vellosidad (Umar, 2010). Como ya se mencionó, el tejido epitelial se encuentra recubierto por una capa de mucus, que varía en cada sección del intestino, siendo el más complejo el encontrado en el colon, lugar donde existe la mayor diversidad de microorganismos. Está compuesto por distintas glicoproteínas de mucina, las cuales forman una capa de

densidad variable que impiden el contacto de los microorganismos con la cara apical de las células epiteliales. Además de funcionar como barrera física, estos hidratos de carbono tienen la capacidad de interactuar con la IgA que se produce y se secreta en el SIM, reteniéndola en su interior. Esto determina que si una molécula de IgA reconoce a un microorganismo, se prevenga el contacto con el compartimento epitelial. Particularmente en el colon, el mucus está compuesto por dos partes: una interna, densa, que está unida al epitelio y donde normalmente no penetran los microorganismos, y otra externa, laxa, que es similar a la encontrada en el intestino delgado y que es permanentemente removida y eliminada con la materia fecal (Mowat y Agace, 2014). La abundante producción de mucus, necesaria para mantener esta estructura, determina que la función de las células goblet sea muy intensa en el colon.



**Figura 1. Representación gráfica de la histología de la mucosa intestinal y el sistema inmune asociado.**

Distribución de las principales células presentes en la mucosa del intestino delgado y grueso. Figura adaptada de Mowat y Agace, 2014 y Allaire et al., 2018.

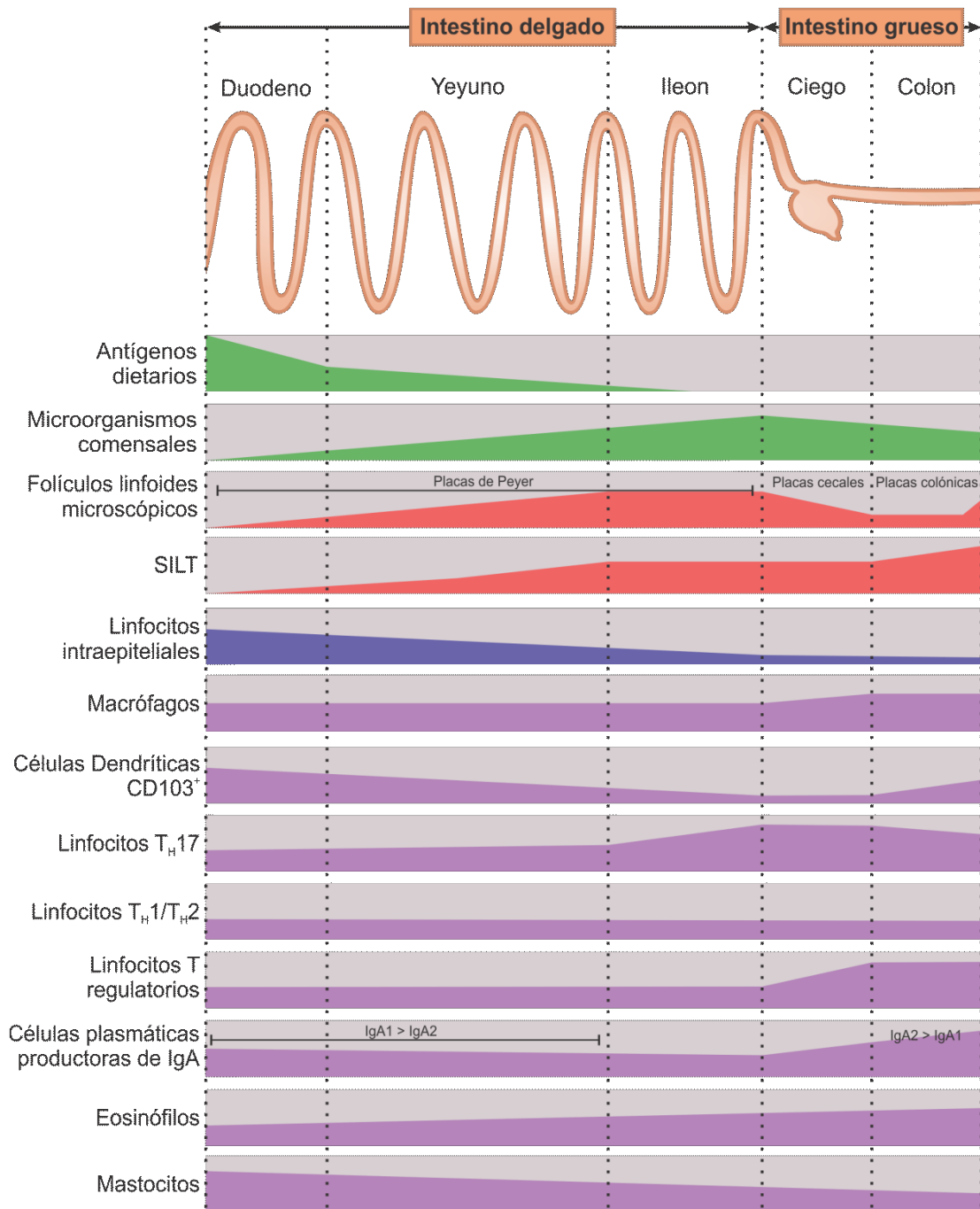
Las células epiteliales también juegan un importante rol muestreando antígenos (Ag), un proceso íntimamente relacionado con la inducción de mecanismos de activación inmunológica o de tolerancia. La mayoría de las macromoléculas ingeridas alcanzan la circulación ya degradadas (pase intracelular), pero una pequeña parte lo hace en estado nativo dado que ingresan en forma paracelular. Aunque esto ocurre con una baja frecuencia (solo el 1-10% de las proteínas totales), si lo extendemos a los 300 m<sup>2</sup> de intestino podemos comprender que es el principal mecanismo de absorción de proteínas nativas, que luego pasan a circulación (Snoeck et al., 2005). Sin embargo, existen otras formas de muestreo de Ags que están principalmente vinculadas al SIM:

- Mecanismos mediados por células M: estas células se encuentran exclusivamente en los sitios inductivos del intestino delgado y grueso, básicamente en los folículos linfoides, y conforman lo que se denomina epitelio asociado al folículo. Las células M tienen la capacidad de traslocar Ags sin procesarlos y presentarlos a las células del sistema inmune subyacente, principalmente células presentadoras de antígenos (CPA) tales como linfocitos B (LB), macrófagos y células dendríticas (CD), las cuales se alojan en la invaginación que presenta la célula M en su cara basal.

- Mecanismos asociados a macrófagos: existen en el intestino poblaciones de macrófagos especializadas en protruir parte de su citoplasma entre las células epiteliales y muestrear los Ags que se encuentran en el lumen intestinal. Este mecanismo está altamente regulado, principalmente por la fractaltina (quimioquina producida por las células epiteliales), y el receptor de fractaltina (se expresa solo en la porción de la membrana que formará la dendrita que protruirá), y, por lo tanto, no altera la integridad física de la barrera epitelial. Los Ags captados luego serán traslocados a las CD alojadas en la lámina propia (expresan el marcador CD103), encargadas de migrar a los ganglios linfoides mesentéricos (MLN) para iniciar la activación de los linfocitos T (Shakhar y Kolesnikov, 2014). Este mecanismo está principalmente involucrado en la inducción de tolerancia frente a microorganismos comensales y Ags lumbinales.

La capa de tejido conectivo que se encuentra por debajo del epitelio se denomina lámina propia. Su función principal es actuar como sitio efector de la

respuesta inmune previniendo la entrada y propagación de agentes patógenos a través de la mucosa intestinal y la destrucción de los mismos en caso de invasión. Es por esto que allí se encuentran la mayor parte de las células del sistema inmune intestinal: células de la inmunidad innata que incluyen CD, macrófagos, mastocitos, eosinófilos y células linfoides innatas (ILC, por su sigla en inglés de *Innate lymphoid cells*); y células de la inmunidad adaptativa tales como linfocitos T CD4 o CD8, células B en su mayoría diferenciadas a células plasmáticas productoras de IgA y células regulatorias. Cabe destacar que el intestino es el lugar de residencia del 70-80% de los linfocitos del organismo. El ingreso y egreso de las células del sistema inmune hacia el interior o exterior de la lámina propia se realiza a través de los numerosos vasos sanguíneos y linfáticos que alcanzan la mucosa, los cuales a su vez permiten la comunicación con otros sitios inductivos y efectores, manteniendo así la inmunidad local y sistémica (Ahluwalia et al., 2017). La **Figura 2** resume las variaciones de los principales componentes del SIM a lo largo del tracto gastrointestinal.

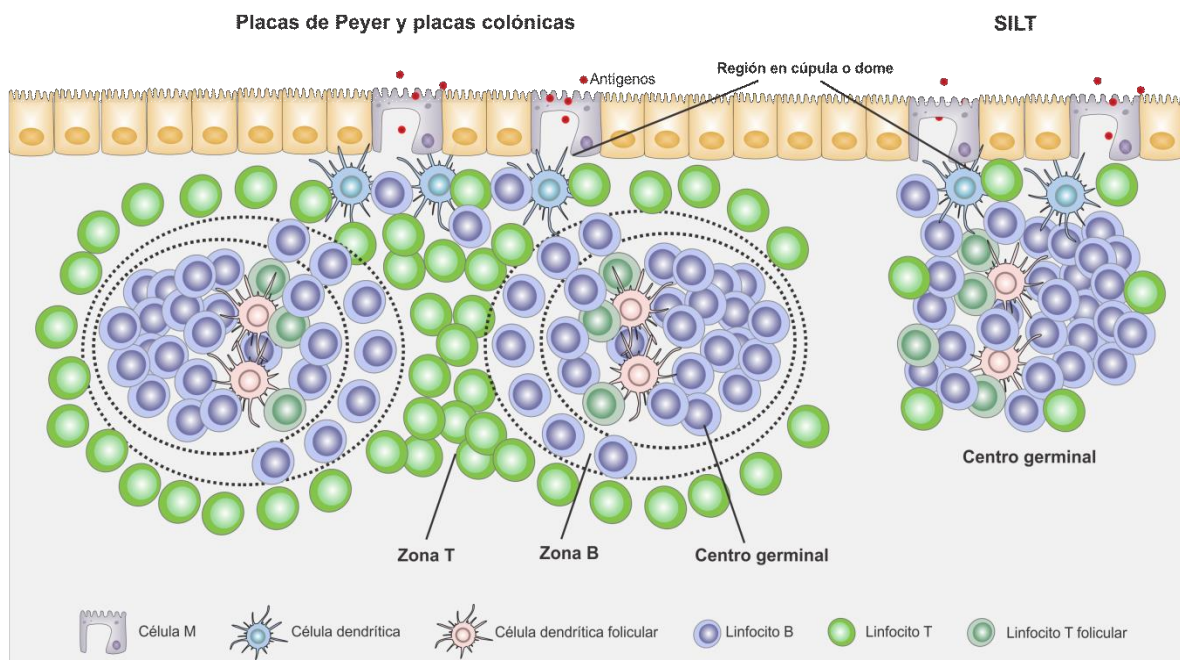


**Figura 2. Variación del sistema inmune a lo largo del tracto intestinal.**

La figura destaca la especialización regional indicando cómo el contenido antigénico (gráficos verdes), el tejido linfoide asociado al intestino (gráficos rojos) y varias poblaciones de leucocitos (gráficos violetas) cambian de frecuencia a lo largo del tracto intestinal. Figura adaptada de Mowat y Agace, 2014



En el intestino delgado, el tejido linfoide asociado a la mucosa gastrointestinal (GALT, por su sigla en inglés de *gut associated lymphoid tissue*) está formado por folículos linfoides, Placas de Peyer (conjunto de folículos linfoides, concentrados principalmente en la porción terminal del íleon), MLN y la lámina propia, mientras que en el intestino grueso los sitios inductivos están conformados por parches colónicos (equivalentes a las Placas de Peyer), tejidos linfoides aislados solitarios o SILT (por su sigla en inglés de *solitary isolated lymphoid tissue*) y los MLN colónicos. En este caso la lámina propia solo constituye el sitio efector (Baptista et al., 2013; Mowat y Agace, 2014) (**Figura 3**).



**Figura 3. Descripción general de la histología de las placas de Peyer/placas colónicas y el SILT.**

Las placas de Peyer son folículos linfoides estructurados, que contienen varios centros germinales dominados por células B y distintas áreas de células T y B. Por el contrario, los SILT maduros contienen un solo folículo de células B o centro germinal sin un área T definida.

En los folículos linfoides se inicia la respuesta inmune con los Ags que llegan principalmente a través de las células M o de las células epiteliales. Por debajo de estas zonas, en la región en cúpula o área dome, se alojan las CPAs encargadas de dar origen a los centros germinales en la mucosa o de migrar a los ganglios regionales para iniciar la activación de linfocitos en un mecanismo de producción de anticuerpos T-

dependiente que requiere la activación y colaboración de los linfocitos B y T. En estos casos se forma una estructura linfoide con un área T (aloja linfocitos T y CD) y el área B que contiene al centro germinal (CG) y es donde se encuentran principalmente linfocitos B acompañados de linfocitos T foliculares y CD foliculares. Estas estructuras linfoides son la principal fuente de plasmablastos IgA<sup>+</sup> en el intestino delgado y grueso, donde los linfocitos B son las principales CPA que reconocen el Ag en el dome y migran al área B y T para generar o mantener los centros germinales (Buettner y Lochner, 2016; Knoop y Newberry, 2012; Masahata et al., 2014). La frecuencia de SILTs en el colon se triplica a medida que uno baja del colon ascendente al colon recto-sigmoideo dado que aquí se concentra la mayor carga microbiana y por lo tanto se requiere una mayor frecuencia de estructuras inductivas para poder sostener la homeostasis intestinal y evitar la inflamación en respuesta a la presencia de microorganismos procarióticos (Mowat y Agace, 2014).

En el intestino existe una intensa actividad inmunológica, y esto es consecuencia de la alta y permanente carga antigénica a la que se encuentra expuesto. Como hemos mencionado, en el intestino delgado se produce principalmente la absorción de nutrientes por lo cual se sostiene que la respuesta inmune específica en esta sección del TGI está dirigida contra estos Ags, y es básicamente de tolerancia para preservar la integridad de los mismos. En el intestino grueso se produce la absorción de agua y aquí se encuentra la mayor presencia de componentes de la microbiota. Por lo tanto, en esta porción del TGI la activación del SIM está fuertemente asociada a estos microorganismos, pero no podemos descartar que también exista especificidad hacia otros componentes del lumen intestinal, como proteínas e hidratos de carbono. Por otro lado, se sabe que las células que se inducen y activan en el SIM tienen una elevada movilidad, no solo entre los sitios inductivos y efectores, sino también entre diferentes mucosas (Bergqvist et al., 2013). Es decir que un linfocito B que se genera en un folículo linfoide del intestino delgado, puede también encontrarse en un folículo linfoide del intestino grueso; o una célula efectora (linfocito B o T) que se genera en el intestino delgado puede migrar al tracto respiratorio, el tracto genito-urinario o la piel. Esta característica es un rasgo evolutivo del SIM que determina que las demás mucosas estén protegidas frente a una posterior exposición al microorganismo

patógeno. Por lo tanto, el SIM es un sistema muy complejo y altamente regulado, que en situación fisiológica se caracteriza por una elevada frecuencia de células inmunes en el tejido y una activa generación de mecanismos de tolerancia, evitando así la inducción de procesos inflamatorios frente a la presencia de Ags inócuos. Por el contrario, frente a la presencia de un patógeno predominará la activación inmunológica, donde las células que se induzcan dependerán de las características del Ag que inicia la respuesta. Esto se refleja a nivel de la mucosa donde se generó la respuesta, pero también en otras mucosas e inclusive a nivel sistémico.

### **Generalidades de las alergias alimentarias**

Como mencionamos anteriormente, el SIM es capaz de discernir Ags de la dieta y la microbiota de los Ags provenientes de patógenos, y, en consecuencia, generar diferentes mecanismos de activación inmunológica. Frente a los primeros, se desarrollan diferentes mecanismos de tolerancia, que en su conjunto se denominan tolerancia oral. Fallas en estos mecanismos se consideran centrales en la instauración de las reacciones de hipersensibilidad a los Ags de los alimentos, también conocidas como alergias alimentarias. Es importante resaltar que un alimento puede desencadenar una intolerancia alimentaria, en la que no participa el sistema inmune, o una alergia, en el que el sistema inmune tiene un rol patogénico. Dentro de las alergias, éstas pueden estar mediadas por IgE o por mecanismos IgE-independientes. Las primeras son los más importantes ya que son las responsables de mediar las reacciones alérgicas más severas, tales como las respuestas anafiláticas. Una alergia alimentaria es una reacción inflamatoria que se induce por la exposición a alimentos en el TGI y la piel, pudiendo involucrar también el tracto respiratorio. En consecuencia, los síntomas con que puede manifestarse son muy variados y van desde leves (picazón, cólicos, etc.) hasta severos (diarrea, eccema, etc.) con la posibilidad de poner en riesgo la vida del paciente (anafilaxia), y pueden afectar un único tejido o mucosa (síntomas localizados) o múltiples órganos (sistémicos) como es el caso de la anafilaxia (Berin y Sampson, 2013).

Las reacciones alérgicas IgE-mediadas son las que nos interesan en este estudio. Estos mecanismos se manifiestan a los minutos u horas luego de la exposición al alimento y son los que más profundamente se han caracterizado desde el punto de vista molecular y celular. Constituyen más del 60 % de las alergias alimentarias, siendo los signos clínicos más frecuentes diarrea, urticaria, eczema, asma, rinitis, distensión abdominal, el síndrome de alergia oral con manifestaciones peri-orales, esofagitis, anafilaxia, etc. (Flom y Sicherer, 2019; Sicherer y Sampson, 2018). Las respuestas no mediadas por IgE muestran una presentación clínica tardía, manifestándose entre horas a días luego de la exposición a los alérgenos. El mecanismo exacto que se desarrolla durante este tipo de respuesta alérgica es desconocido; no obstante, la mayoría de los estudios sugieren una fisiopatología mediada por células T específicas a Ags de la dieta, o por eosinófilos. Las entidades clínicas más frecuentes dentro este tipo de respuestas son dermatitis de contacto, enteropatía y proctitis/proctocolitis inducida por proteínas alimentarias, síndrome de enterocolitis inducida por proteínas alimentarias y síndrome de Heiner (Anvari et al., 2019; Spergel, 2006). Las alergias alimentarias mixtas o mediadas por células inmunes e IgE suelen presentarse como dermatitis atópica, gastroenteritis o enteritis eosinofílicas. En general, el mecanismo incluye la producción de anticuerpos IgE específicos del alérgeno alimentario y la participación de células en la instauración del proceso inflamatorio (Anvari et al., 2019).

En las últimas décadas se han producido cambios en la epidemiología de las reacciones alérgicas o atópicas y, en particular, las alergias alimentarias han despertado una especial atención porque constituyen lo que se ha llamado la segunda ola epidémica de alergia. En 2008, el Comité Especial sobre Alergia Alimentaria de la Organización Mundial sobre Alergia (WAO) identificó a la ALV como un área en la que se debe prestar especial atención dado que se ha transformado en un problema sanitario importante en el mundo. En este contexto, se crearon las Pautas de Acción para el Diagnóstico y Fundamento Racional Contra la Alergia a la Leche de Vaca (DRACMA) de la WAO (Fiocchi et al., 2010). Este documento o *Position Paper* provee a médicos relacionados con esta patología (alergistas, pediatras, dermatólogos, etc.) herramientas de manejo para enfrentar la ALV desde el momento en que se sospecha hasta el tratamiento a aplicar.

### **Prevalencia**

Existe una extensa bibliografía que refleja un marcado incremento de la incidencia de las alergias alimentarias en las últimas décadas. Sin embargo, son pocos los estudios y los países en los que se han realizado estudios epidemiológicos completos. Esto se debe principalmente a que la percepción de las alergias alimentarias es mucho más frecuente que la alergia confirmada. Esto ha determinado que existan reportes indicando datos que oscilan entre el 1 y 17,5%, 1 y 13,5%, y 1 a 4% en niños en edad preescolar, niños de 5 a 16 años y adultos respectivamente. Los datos más confiables en epidemiología son aquellos que surgen de trabajos en los que se emplea una prueba confirmatoria de alergia alimentaria, siendo la elegida por excelencia el desafío oral doble ciego con placebo supervisado por profesionales especializados. Sin embargo, esta práctica es empleada en un número reducido de países y principalmente se aplica en ensayos clínicos más que en la práctica rutinaria debido a los costos, tiempo insumido y dificultades técnicas que implican su implementación. Por lo tanto, la prevalencia de la alergia alimentaria autoinformada resulta ser más elevada que la confirmada por desafíos orales, generando un sobre-diagnóstico y datos elevados de prevalencia (Sicherer y Sampson, 2018). Los escasos trabajos que han informado datos confirmados de prevalencia de las alergias alimentarias sugieren que la incidencia ha aumentado en la última década, llegando a afectar al 5% de la población adulta y hasta el 10% de los niños de países occidentales, con síntomas gastrointestinales en el 32-60% de los pacientes, síntomas cutáneos en el 5-90% y anafilaxia en el 0,8-9% de los casos (Loh y Tang, 2018). Estas cifras traducidas en número de pacientes indican que alrededor de 11–26 millones de personas de la población europea sufren de alergia alimentaria (Nowak-Węgrzyn y Sampson, 2011), y si esto se extiende a la población mundial la proyección sería de 200–500 millones de individuos (World Health Statistics, 2009), lo cual, como mencionamos anteriormente, representa un problema sanitario global de gran importancia y preocupación para los sistemas de Salud. El rápido aumento en la prevalencia en regiones industrializadas sugiere una importante contribución de factores ambientales, incluidos los efectos epigenéticos, dado que la base genética de la población no se ha modificado en este lapso de tiempo (Berin y Sampson, 2013).

En términos generales, más allá de la importancia de la constitución genética del individuo y sus hábitos dietarios, es importante tener en cuenta que cualquier Ag puede ser potencialmente alergénico, siempre y cuando tenga propiedades inmunogénicas y antigénicas. En la actualidad se han identificado alrededor de 170 alimentos como alergénicos, sin embargo, solo un pequeño número de estos son responsables de la mayoría de las reacciones alérgicas: leche de vaca, huevo, maní, frutos secos, soja, trigo, pescado y mariscos, también denominados como “Grupo de los ocho”. Esto puede deberse a las características de los alérgenos, reactividad cruzada entre ellos y con otros alérgenos, hábitos dietarios o frecuencia de exposición, edad de exposición, etc. (Patel y Volcheck, 2015). Los tipos de alimentos responsables de causar reacciones alérgicas también difieren según el grupo etario. La ALV es una de las reacciones adversas más común entre los niños pequeños afectando hasta un 2% de ellos dependiendo el país (confirmadas por desafío oral), con un pico de prevalencia a los 1-5 años. Estudios realizados en EE. UU. muestran que el 5,7% de la población pediátrica presenta sensibilización a proteínas de leche de vaca (PLV), alcanzando a un 22% de niños de entre 1 a 5 años, no obstante, solo el 1.8% fue confirmado por desafío oral (Flom y Sicherer, 2019). La leche de vaca también ha sido implicada como causa de reacciones graves en varios estudios, incluido el Registro Europeo de Anafilaxia, en el que la misma fue identificada como una causa importante de reacciones graves en pacientes menores de 6 años (Grabenherrich et al., 2016). Inclusive, trabajos realizados en los EE. UU. y Australia indican que en las últimas dos décadas ha habido un marcado aumento en las hospitalizaciones debido a reacciones anafilácticas desencadenadas por alimentos, con un aumento de 5,5 veces en niños de entre 0 a 4 años y en donde la leche causó el 8% de las reacciones severas (Liew et al., 2009; Sampson, 2016). Estos hallazgos han llevado a definir a partir del 2000 una segunda ola de epidemia de alergias, principalmente causada por alergias alimentarias (Peters et al., 2017; Prescott y Allen, 2011). La primera ola epidémica de alergias se inició hace aproximadamente 50 años y alcanzó el pico en los 2000. Fue principalmente causada por aeroalérgenos que provocaron enfermedades respiratorias (asma y rinitis alérgica) en determinados países industrializados o con hábitos de vida Occidental, donde afectó casi el 50% de la población (Asher et al., 2006; Robertson et al., 2004). A partir

de ese momento las alergias alimentarias comenzaron a hacerse más evidentes en esos mismos países (Australia, EE. UU. e Inglaterra) y aparentemente en el 2010 alcanzó el pico de incidencia. Muchos de estos pacientes afectados con alergias alimentarias eran los hijos de los pacientes afectados en la primera ola de epidemia de alergias. En países en desarrollo, incluyendo Argentina, la tendencia parece ser la misma, y actualmente se está observando un aparente incremento en las alergias alimentarias (Prescott et al., 2013; Trakultivakorn et al., 2007; Zar et al., 2007).

### ***Mecanismos inmunológicos***

La sensibilización a los Ags alimentarios puede tener lugar en el tracto gastrointestinal, la cavidad oral, la piel y ocasionalmente en el tracto respiratorio por reactividad cruzada con aeroalérgenos, es decir, en las mucosas por donde se produce su ingreso al organismo (Chinthrajah et al., 2016; Valenta et al., 2015). Sin embargo, los eventos que conducen a las fallas en el desarrollo de la tolerancia oral, generan la sensibilización alérgica y el desarrollo de una alergia alimentaria con el tiempo son pocos conocidos. Hay una creciente evidencia en pacientes de corta edad que sugiere que el sitio principal de sensibilización a los alimentos se produce en la piel, y que fallas en la tolerancia a nivel del intestino son los responsables de generar la sensibilización a los Ags alimentarios. Durante mucho tiempo se ha considerado que el eccema es un factor de riesgo importante para las alergias alimentarias (Martin et al., 2015). Las mutaciones en filagrina, una proteína esencial para mantener la barrera cutánea, se ha asociado con un mayor riesgo de dermatitis atópica y con alergia alimentaria (Tordesillas et al., 2017; Venkataraman et al., 2014). Trabajos en modelos animales y en pacientes con dermatitis atópica y ALV donde identificaron células T específicas al alérgeno que expresan CLA, quimioquina que direcciona a los linfocitos T a la piel (Abernathy-Carver et al., 1995), han demostrado que la sensibilización epicutánea induce un incremento en la frecuencia de mastocitos intestinales y reacciones alérgicas inducidas por alimentos (Noti et al., 2014). Los mecanismos subyacentes en esta doble regulación no son del todo claros, pero sólidas evidencias indican que la alteración de la barrera cutánea juega un rol fisiopatogénico importante.

Es probable que las CD en la piel secreten ácido retinoico, que induce a las células T específicas de alérgenos a expresar marcadores de direccionamiento intestinal a medida que se diferencian (Hammerschmidt et al., 2011). La imposibilidad de biopsiar el intestino de los pacientes con alergia alimentaria, ha impedido obtener información sobre el SIM en estos pacientes, lo cual restringe ostensiblemente el conocimiento de su inmunopatogenia.

Otros factores importantes que inciden sobre el tipo de reacción que se producirá en un individuo expuesto a un alimento son las características de los alérgenos alimentarios (existencia de enlaces disulfuro, la resistencia a la proteólisis enzimática o la degradación térmica, la actividad biológica funcional, la glicosilación, su secuencia aminoacídica, etc.), los componentes no alérgicos y/o los componentes con propiedades adyuvantes presentes en el alimento. Las proteínas y péptidos que resisten la desnaturalización y la digestión en el intestino son más proclives a alcanzar la barrera epitelial, traspasarla por los diferentes mecanismos antes descritos y luego activar las células inmunes (Ménard et al., 2010; Niess et al., 2005). En este contexto, las células epiteliales intestinales tienen un rol importante por su capacidad de presentar Ag directamente a los linfocitos T del compartimento epitelial (LT CD8<sup>+</sup>) y de la lámina propia intestinal (LT CD4<sup>+</sup>), a través de las moléculas de MHC clase I y II expresadas en la superficie basolateral (Hershberg et al., 1998; Wosen et al., 2018). Sin embargo, los trabajos que han demostrado este mecanismo *in vivo* son muy limitados y está en duda la posibilidad que esto ocurra. Por lo tanto, no se conoce exactamente el rol que juegan las células epiteliales en la inducción de los mecanismos de tolerancia oral vs sensibilización alérgica, aunque no hay dudas sobre sus funciones como células barrera y en el condicionamiento del sistema inmune subyacente. Patologías en la que este compartimento se ve alterado, como en la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, la hiperactivación del sistema inmune frente a componentes de la microbiota genera un estado inflamatorio crónico que termina dañando severamente la integridad de la pared intestinal.

El fenotipo de los linfocitos T que se desarrollen dependerá de la expresión de moléculas co-estimuladoras en la CPA y, en consecuencia, la generación de mecanismos de tolerancia vs activación inmunológica. Por lo tanto, es crucial



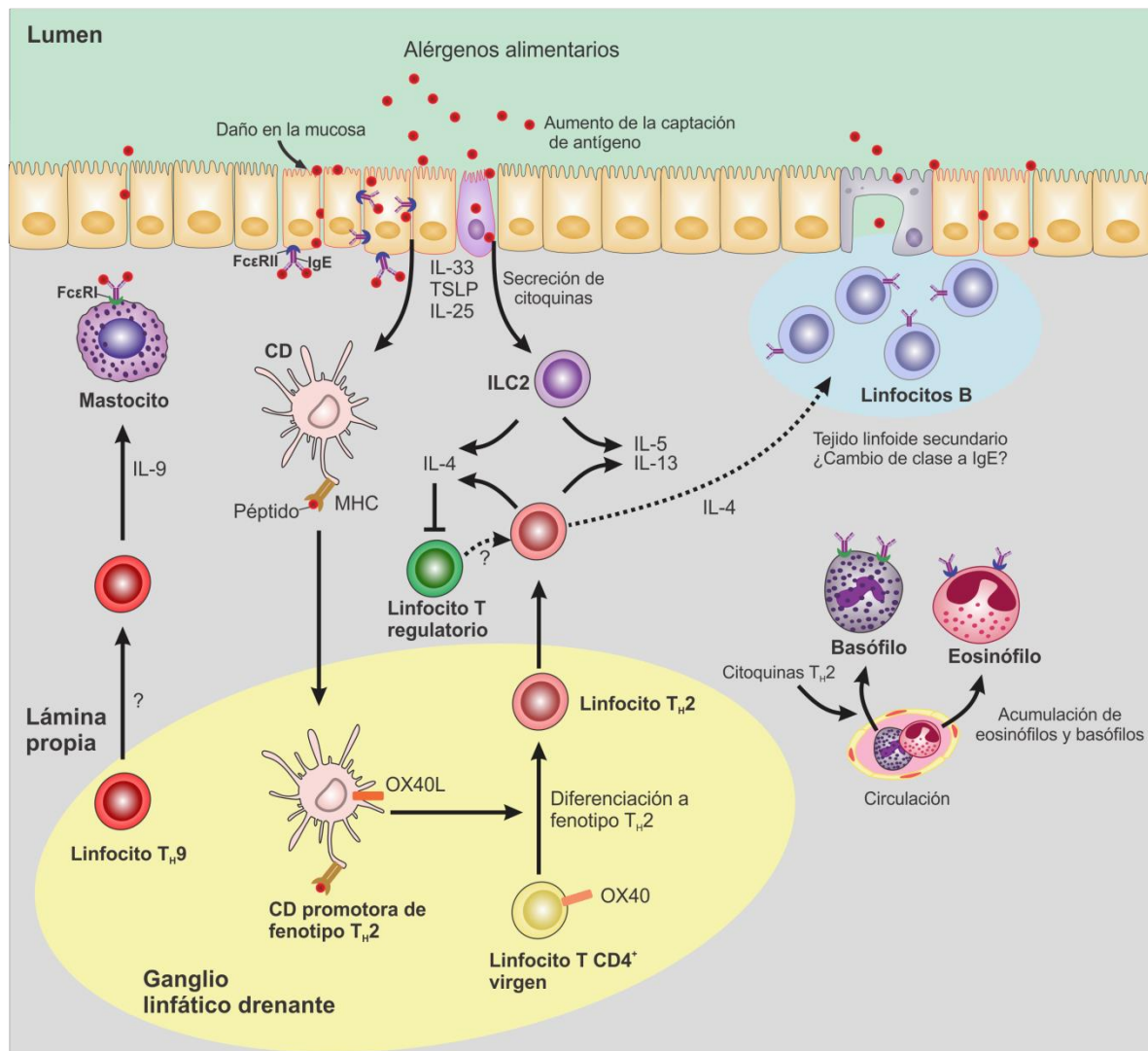
comprender cómo los Ags del lumen intestinal atraviesan la barrera epitelial y cómo se produce la activación linfocitaria. No se sabe si la activación y diferenciación de los linfocitos se produce únicamente en los MLN o en los sitios inductivos mucosales, o si se inicia en los tejidos periféricos mucosales y luego culmina en los ganglios regionales. En homeostasis, el mecanismo descrito de inducción de los linfocitos T regulatorios (Treg) contempla la participación de las CD CD103<sup>+</sup> migratorias de la lámina propia, y los macrófagos residentes en la lámina propia. Estas últimas muestrean los Ags del lumen intestinal para luego trastocarlos a las CD CD103<sup>+</sup>, las que migran a los ganglios regionales, y en el área T inducen los Treg (Pabst y Mowat, 2012; Shakhar y Kolesnikov, 2014). Este circuito es altamente dependiente del ácido retinoico que se obtiene por metabolismo de la Vitamina A (Povoleri et al., 2018). Con respecto a las otras formas en las que un Ag de la dieta puede atravesar la barrera epitelial e inducir mecanismos de tolerancia, poco es lo que sabemos.

En pacientes con alergia alimentaria, o con otros desórdenes inflamatorios intestinales, es probable que los mecanismos de tolerancia estén alterados como consecuencia del aumento en la permeabilidad intestinal, y por lo tanto el control del pasaje de Ags y activación inmunológica difiera con respecto a los puestos en juego en homeostasis, alterando el balance de poblaciones celulares regulatorias y efectoras (Perrier y Corthésy, 2011; Ventura et al., 2006). Inclusive, se ha demostrado que la IgE puede mediar la absorción de Ags a través del receptor de IgE de baja afinidad, CD23, en las células epiteliales (Yu, 2009); mecanismo que también ha sido demostrado en intestino humano (Tu y Perdue, 2006). Aunque es sabido que en pacientes con alergia alimentaria existen linfocitos T<sub>H</sub>2 específicos de Ags dietarios tanto en circulación como en la mucosa intestinal, y el microentorno tisular muestre un predominio de citoquinas tipo 2, poco es lo que se sabe sobre la producción local de IgE y sobre los mecanismos de inducción de los linfocitos T<sub>H</sub>2.

Recientemente se ha descrito que las células epiteliales de diferentes mucosas (intestino, piel y vías respiratorias) producen moléculas en respuesta a alteraciones de la barrera epitelial, que en conjunto se llamaron alarminas, tales como TSLP (por su sigla en inglés de *Thymic Stromal Lymphopoietin*), IL-25 y/o IL-33. Inclusive, se ha caracterizado un nuevo tipo de célula epitelial en las mucosas denominado células en

penacho, que son la fuente de IL-25. Estas alarminas, una vez liberadas al medio extracelular, se unen a receptores celulares presentes en células ILC, mastocitos, basófilos, linfocitos B y T, y CD, e inducen (directa o indirectamente) la diferenciación de los linfocitos T a T<sub>H</sub>2 (Hammad y Lambrecht, 2015) (**Figura 4**). Se ha demostrado que TSLP e IL-33 inducen la expresión de OX40L en CD CD103<sup>+</sup> intestinales resultando en la diferenciación de células T<sub>H</sub>2 específicas de Ag a partir de linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes en los MLN (Ito et al., 2005). Por otro lado, las células que más recientemente se han descrito con un rol fundamental en las primeras etapas de la generación de los mecanismos que median las reacciones alérgicas son las ILC de tipo 2 o ILC2. Las ILC son células que responden a cambios en el entorno tisular en el cual se encuentran; principalmente se localizan en mucosas y en baja frecuencia. Se ha demostrado que las alarminas inducen la secreción de cantidades muy elevadas de citoquinas pro-inflamatorias en estas células. Sin embargo, no está claro si las alarminas también promueven la proliferación y expansión de las ILC. Dependiendo del proceso inflamatorio que se haya inducido en la mucosa, y de las citoquinas que secreten las ILC se clasifican en tipo 1, 2 o 3. En particular, las ILC2 son las que se ha demostrado que responden a TSLP, IL-25 e IL-33 y secretan IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (citoquinas tipo 2 o T<sub>H</sub>2), las cuales intervienen en la diferenciación de los linfocitos T a T<sub>H</sub>2. Asimismo, algunos trabajos reportan que las ILC tienen capacidad de activar a los linfocitos T, dado que expresan las señales de activación 1, 2 y 3 y tienen capacidad de migrar a los ganglios linfoides (Klose y Artis, 2016; Mirchandani et al., 2014). Las ILC2, al constituir una importante fuente de citoquinas T<sub>H</sub>2, se han transformado en células de la inmunidad innata relevantes en los estadios iniciales de la respuesta inflamatoria, y de la activación de la inmunidad adaptativa. En modelos murinos de alergia experimental se ha demostrado que estas células responden a la IL-33 producida por las células epiteliales, a través del receptor ST2, produciendo grandes cantidades de IL-4, la cual, a su vez, suprime la generación de células Treg en el intestino delgado (Noval Rivas et al., 2016). Por lo tanto, estas células también participarían en los circuitos de generación y modulación de los Treg. Aunque en humanos no se ha demostrado que las células epiteliales del intestino produzcan IL-33 en respuesta a alérgenos alimentarios, en este trabajo de Tesis hemos hallado que los colonocitos de pacientes

con alergia alimentaria expresan IL-33. Además de los efectos descritos de la IL-33 sobre la inducción de células T<sub>H</sub>2, esta alarmina contribuye a las reacciones agudas (anafilaxia), dado que los mastocitos expresan ST2, y la señalización intracelular inducida sinergiza con la generada por entrecruzamiento de la IgE en la activación de estas células (Galand et al., 2016). Existen al menos dos variantes ST2: una versión transmembrana presente en la membrana plasmática y que media su acción celular (ST2L), y una isoforma soluble que actúa como un regulador negativo de la producción de citoquinas T<sub>H</sub>2, dado que secuestra en fase soluble a la IL-33 (ST2s). Se ha reportado que la secreción de la proteína ST2s está fuertemente asociada con la inflamación, probablemente como un mecanismo compensatorio para suprimir el efecto pro-inflamatorio de la IL-33. En el contexto clínico, se demostró que los niveles de ST2s aumentan en pacientes con infección por el virus del dengue, sepsis, trauma, alergia alimentaria, asma y colitis ulcerosa, entre otras (García-Miguel et al., 2013; Mildner et al., 2010). Inclusive, se han descrito polimorfismos en los genes que codifican IL-33 y ST2 en pacientes alérgicos lo cual sugiere que estos componentes tendrían un rol fisiopatogénico (Grotenboer et al., 2013).



**Figura 4. Respuesta inflamatoria mediada por células  $T_H2$  a un alérgeno alimentario en el intestino humano.**

Las líneas punteadas representan mecanismos no dilucidados por completo.

Por lo tanto, el entorno inflamatorio del tejido mucosal periférico condiciona la diferenciación y maduración de las CD, éstas captan el Ag que ingresa a la mucosa y migran a los MLN. Aquí interactúan con los LT en el área T y los LB en el área B, y promueven la inducción de los linfocitos  $T_H2$ . Posteriormente, éstos migran hacia la lámina propia de la mucosa en la cual se originaron, o de la cual las CD transportaron el Ag, y allí luego de re-activarse con el Ag específico (a través de una célula dendrítica o macrófago), secretan citoquinas pro-inflamatorias tipo 2: IL-4, IL-5 e IL-13. De esta manera, contribuyen y perpetúan el foco inflamatorio ya inducido por las ILC2, y esto genera un proceso inflamatorio crónico. Aquí la IL-5 junto con el factor estimulador de

la formación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por su sigla en inglés de *Granulocyte Macrophage colony-stimulating factor*) producido por linfocitos T, mastocitos, células endoteliales y fibroblastos, estimulan la maduración y liberación de los eosinófilos y basófilos en la médula ósea (Loktionov, 2019); luego estas células migran al foco inflamatorio atraídas por diferentes quimioquinas. Entre éstas, las más importantes son CCL-11 o eotaxina-1 en homeostasis (Marichal et al., 2017) y CCL26 o eotaxina-3, y CCL5 o RANTES (por su sigla en inglés de *regulated upon activation normal T cell expressed and secreted*), en una inflamación alérgica (Koya et al., 2006). Asimismo, se ha descrito en pacientes alérgicos un polimorfismo en CCL26 (Travers y Rothenberg, 2015). Por otro lado, la IL-4 producida por los linfocitos T<sub>H2</sub> e ILC2, promueve la recombinación en el cambio de isotipo de los linfocitos B en los folículos linfoides y centros germinales, para producir la IgE. La IL-13 también es importante en el cambio de isotipo por LB e inducción de la cadena  $\epsilon$ . Por lo tanto, IL-4 e IL-13 son relevantes en la inducción de IgE y en la sensibilización alérgica, y su producción en un tejido mucosal determina la síntesis local de este isotipo y la consiguiente sensibilización mucosal de los eosinófilos, mastocitos y basófilos.

Es ampliamente conocido que la unión de las IgE a los receptores de alta afinidad genera, por entrecruzamiento de las mismas por los Ags, la activación celular y la secreción inmediata de los componentes pro-inflamatorios que se encuentran pre-formados en los gránulos citosólicos. Al mismo tiempo se induce la síntesis de otros mediadores pro-inflamatorios (principalmente prostaglandinas y leucotrienos) que actuarán a tiempos más prolongados (horas o días de iniciado el foco infamatorio) para mantener el proceso inflamatorio en el tiempo. Pero, además, los eosinófilos presentan receptores de IgE de baja afinidad (Fc $\epsilon$ RII/CD23) en su superficie, y su unión a la IgE permite que al ser entrecruzada por el Ag se genere una señal intracelular incrementando la expresión de integrinas que median su migración al tejido inflamado y aumenta, al mismo tiempo, la vida media de estas células. Asimismo, la unión de IgE al receptor de alta afinidad Fc $\epsilon$ RI en CD o a Fc $\epsilon$ RII en LB amplifica la respuesta alérgica, dado que permite captar el Ag en forma específica por estas CPA, y de esta manera activan LT que luego colaborarán con los LB para la síntesis y secreción de IgE (Matucci et al., 2018). Por lo tanto, el estudio de estos elementos moleculares y celulares en una

mucosa de un paciente con alergia alimentaria es importante al momento de avanzar en el conocimiento de la inmunopatogenia de esta patología.

En las reacciones alérgicas se sintetiza y secreta IgE en cantidades exacerbadas; existen elevadas concentraciones de citoquinas tipo 2; los mastocitos, basófilos y eosinófilos se encuentran aumentados y sensibilizados con IgE; no obstante, poco se sabe sobre la biología de la IgE. En humanos, es muy restringida la información que contamos sobre la localización y mecanismos de su síntesis en alergia alimentaria dado que no es posible biopsiar a estos pacientes. Aunque los LB de memoria IgE<sup>+</sup> y las células plasmáticas productoras de IgE de larga vida han sido observadas en sangre periférica de pacientes asmáticos, su existencia sigue siendo motivo de controversia (Heeringa et al., 2018). La principal causa de esta falta de conocimiento es que en sangre periférica la frecuencia de linfocitos B que expresan IgE es muy reducida, como así también los linfocitos T específicos del alérgeno (1 LT específico en 10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> LT totales). La frecuencia en sangre periférica de LB IgE<sup>+</sup> con respecto a LB IgG<sup>+</sup> es 1:10.000, mientras que la de células plasmáticas específicas con respecto a la totalidad de las células sanguíneas es de 1:10.0000, y las células plasmáticas que producen IgE específica de un determinado alérgeno se encuentran en un 0.3% de las células plasmáticas totales en un paciente atópico. Esto significa que en circulación la frecuencia de células productoras de IgE es extremadamente baja para poder abastecer la síntesis de la totalidad de la IgE en individuos atópicos, y por lo tanto se sostiene que la producción de esta inmunoglobulina no se da en circulación sino en tejidos periféricos o en médula ósea. Asimismo, los niveles de IgE son muy reducidos en circulación dado que principalmente se une a los receptores de alta afinidad y tiene una vida media es 2-3 días (Saunders et al., 2019). Esto implica que para mantener los niveles de IgE es necesaria una producción constante. La información que disponemos sobre los sitios de producción de IgE es extremadamente escasa, ya que muy pocos trabajos han investigado este aspecto.

Los tratamientos en pacientes atópicos que modulan la síntesis de IgE o bloquean su acción, dupilumab o anti-IL-4 $\alpha$  y omalizumab o anti-IgE, respectivamente, han mostrado una elevada eficacia terapéutica (Stokes, 2017). Esto confirma la importancia de obtener conocimiento sobre los mecanismos que median la

síntesis de IgE, para diseñar o desarrollar mejores terapias que corrijan el defecto inmunológico en estos pacientes evitando así tratamientos costosos. En secciones posteriores retomaremos este punto.

### ***Cambio de isotipo en linfocitos B de la mucosa intestinal***

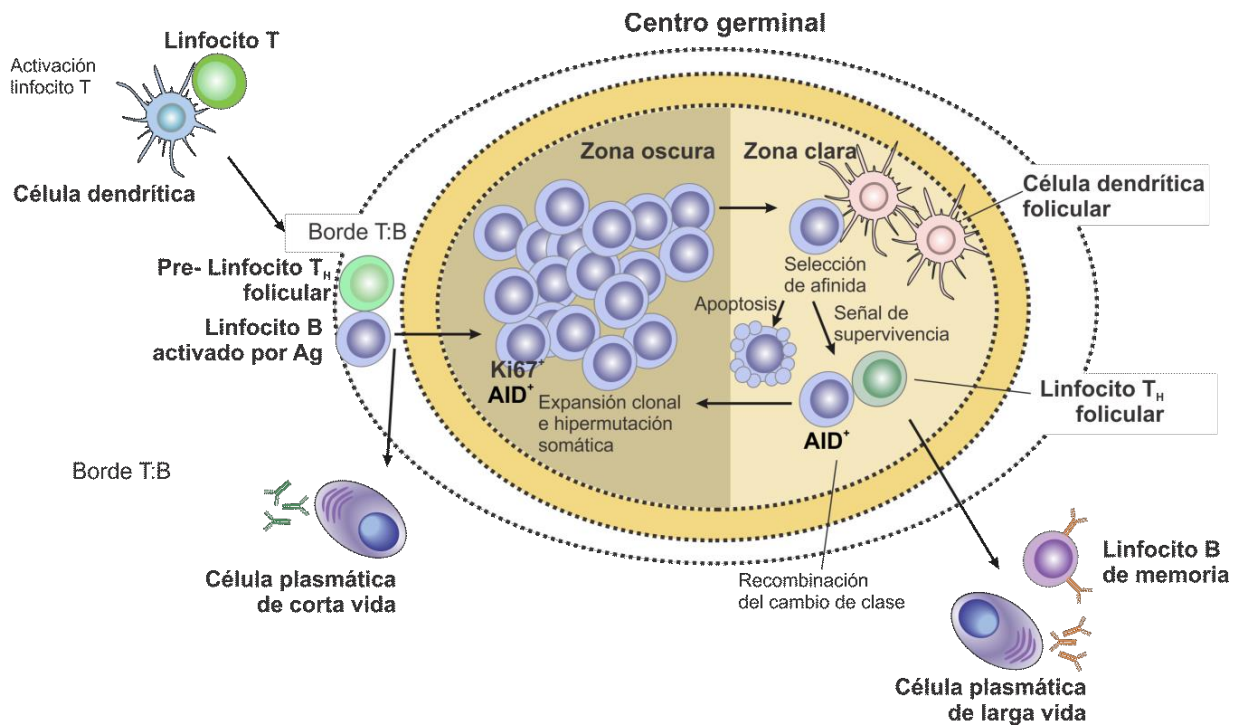
En condiciones homeostáticas, la mayoría de las células plasmáticas secretoras de anticuerpos en el intestino expresan IgA, representando el 90% de las células plasmáticas del colon. Las células plasmáticas que expresan IgG constituyen el 3-4% en el intestino grueso, mientras que un 6% secreta IgM (Brandtzaeg y Johansen, 2005). Sin embargo, existe una importante falta de conocimiento sobre la frecuencia de células productoras de IgE en el intestino de individuos sanos o alérgicos. Es sabido que la hipermutación somática y el cambio de isotipo que da origen a la IgA ocurre en la mucosa intestinal, y se cree que ocurre principalmente en los centros germinales, aunque también puede darse fuera de los mismos (Tezuka y Ohteki, 2019). Con respecto a la IgE, resta aún saber si en pacientes con alergia alimentaria, este isotipo se sintetiza en el intestino o en otras mucosas. Se han propuesto como potenciales sitios de producción estructuras linfoides secundarias como las placas de Peyer, los folículos linfoides aislados, en sitios extrafoliculares de la lámina propia o, alternativamente, otros tejidos linfoides aún no caracterizados (Hoh y Boyd, 2018; Saunders et al., 2019). Tampoco sabemos si las células que hacen la recombinación del cambio de clase a la cadena  $\epsilon$  se diferencian a células B de memoria IgE<sup>+</sup> o células plasmáticas secretoras de IgE de larga vida en el tracto gastrointestinal.

Desde el encuentro con el Ag hasta que se generan las células plasmáticas secretoras de anticuerpos específicos suele transcurrir una semana. Esta elevada eficiencia en la maduración de la producción de inmunoglobulinas denota que en estas estructuras existe un microentorno especializado que favorece la interacción entre diferentes subpoblaciones celulares, su activación a través de la inducción de distintos factores de transcripción, y su migración a través de la expresión de receptores de quimioquinas. En los sitios inductivos del intestino (folículos linfoides aislados del intestino delgado y grueso, o en las placas de Peyer del intestino delgado), el dome es

la zona esencial para inducir la síntesis de inmunoglobulinas, en especial IgA. Aquí se alojan los linfocitos B vírgenes que captan el Ag soluble de las células M del epitelio asociado al folículo o mediante la interacción con las CD, y una vez activados migran a la interface entre el área B y la T (Komban et al., 2019). Los LT que se concentran en el área T son activados y expandidos por las CD del dome, las cuales también presentan el Ag en superficie; los LT resultantes son los que luego se transforman en LT foliculares colaboradores (linfocitos TFH) y migrarán al CG (Webb y Linterman, 2017). Se ha determinado que 1 día luego del contacto con el Ag, los LB y los LT migran a la zona interfolicular para interactuar (Okada et al., 2005). Una vez que ocurre esta interacción B-T, los LB se diferencian en células plasmáticas extrafoliculares de corta vida o migran al folículo y forman un CG a medida que comienzan a proliferar (Chan et al., 2009; Takemori et al., 2014). Los LB de CG comienzan a dividirse rápidamente (Ki67<sup>+</sup>) y experimentan una expansión clonal durante la cual el CG se divide en dos compartimentos distintos conocidos como la zona oscura y la zona clara (**Figura 5**). La elevada tasa de mutaciones al azar que se producen en la zona oscura como consecuencia de la hipermutación somática en los LB, genera inmunoglobulinas con diferente afinidad. Este fenómeno se denomina maduración de la afinidad y es dependiente de la inducción en los LB de la enzima deaminasa de citidina inducida por la activación o AID (por su sigla en inglés de *Activation-induced cytidine deaminase*). Posteriormente, los LB migran a la zona clara y son seleccionados por las CD foliculares para rescatar aquellos que expresan en su superficie la inmunoglobulina con mayor afinidad. El LB reconoce al Ag específico que forma un complejo inmune en la membrana plasmática de las CD en la zona clara del CG. Una vez seleccionados, los LB pueden volver a la zona oscura para iniciar otro ciclo de proliferación, hipermutación somática y selección, o interactuar con los linfocitos TFH, los cuales inducen la recombinación de cambio de clase (CSR, por su sigla en inglés de *Class switch recombination*), que determina el cambio de la región constante manteniendo la región variable intacta. El CSR se induce por las citoquinas secretadas por el linfocito TFH, y las citoquinas presentes en el microentorno tisular, junto con la interacción entre CD40 y CD40 ligando que inducen nuevamente la expresión de AID. Cabe destacar que estudios recientes de Roco y colaboradores (Roco et al., 2019), han



demostrado que la gran mayoría de CRS ocurren antes de que el LB se diferencie a una célula de centro germinal y, por lo tanto, previamente a que sufra una hipermutación somática. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos precisos por el cual se lleva a cabo este proceso.

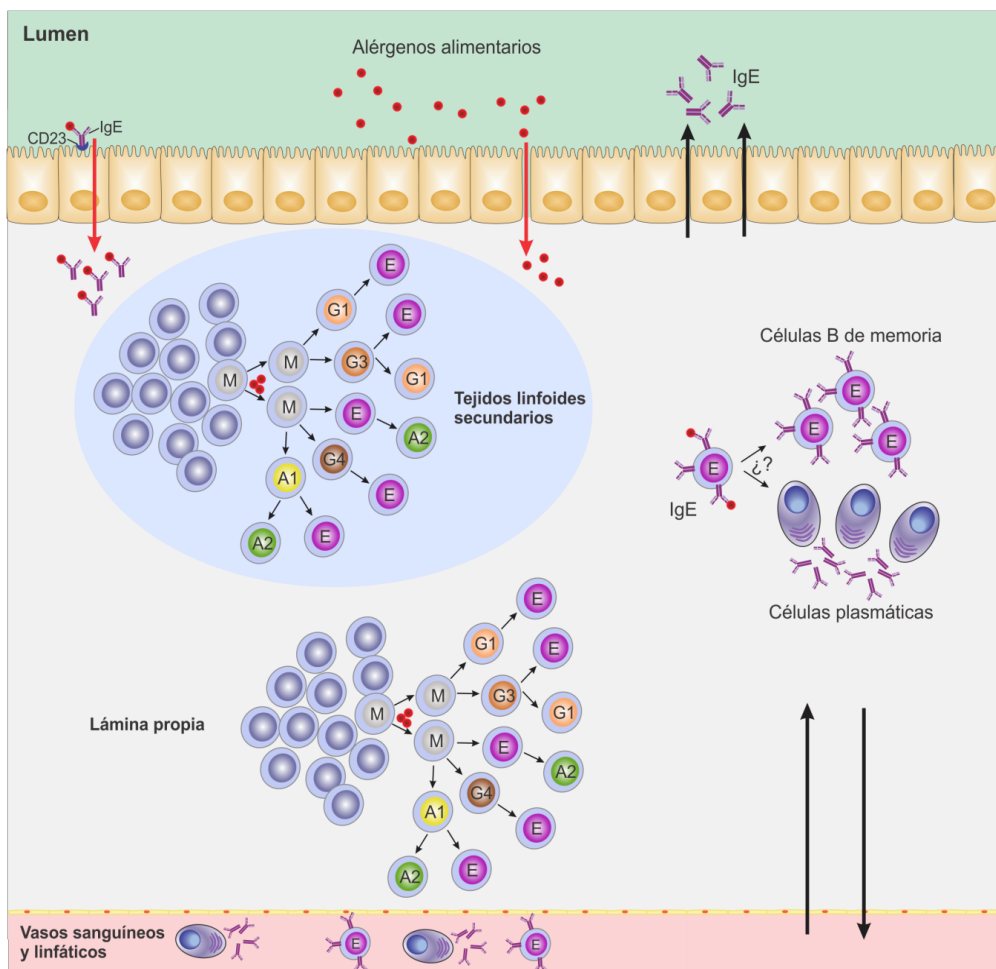


**Figura 5. Reacción del centro germinal conocida hasta ahora.**

Recientes estudios de Roco y colaboradores (Roco et al., 2019) podrían modificar lo que conocemos hasta ahora sobre este mecanismo. Ellos muestran que el CSR ocurre generalmente antes de que el LB ingrese al centro germinal.

Los CG, por lo tanto, son estructuras transitorias que se forman en respuesta a un Ag T-dependiente, y constituyen el sitio donde los LB producen las inmunoglobulinas de alta afinidad (Saunders et al., 2019). Su formación requiere de 5-7 días y culmina en la generación de células plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas de larga vida y linfocitos B de memoria. Las primeras comienzan aquí a secretar inmunoglobulinas, pero luego migran fuera del CG, y se dirigen principalmente a médula ósea donde continúan con la síntesis masiva de estas proteínas hasta que mueren por apoptosis; los LB de memoria migran también a circulación y se alojan en médula ósea donde se mantienen los reservorios de memoria con el tiempo. Estas células son las encargadas de mantener la respuesta inmune en el

tiempo frente a la presencia de un determinado Ag (Hoh y Boyd, 2018). En consecuencia, para que se sintetice IgE de alta afinidad se requiere la formación de CGs, y esto, como mencionamos anteriormente, es consecuencia de una compleja, y aún no del todo conocida, cascada de mecanismos altamente regulados que involucran numerosas poblaciones celulares que se inducen frente a la presencia de un alérgeno (**Figura 6**). Como hemos mencionado, es debatible en humanos si los LB IgE<sup>+</sup> de memoria se generan, siendo que en ratones se ha descartado su existencia (Erazo et al., 2007; Xiong et al., 2012). En humanos, existen algunos trabajos que los han evidenciado en sangre periférica, pero no está del todo claro su existencia ni su origen. La demostración de los mecanismos de formación de células plasmáticas de larga vida secretoras de IgE y de los LB de memoria IgE<sup>+</sup> permitirían explicar la inducción de las alergias.



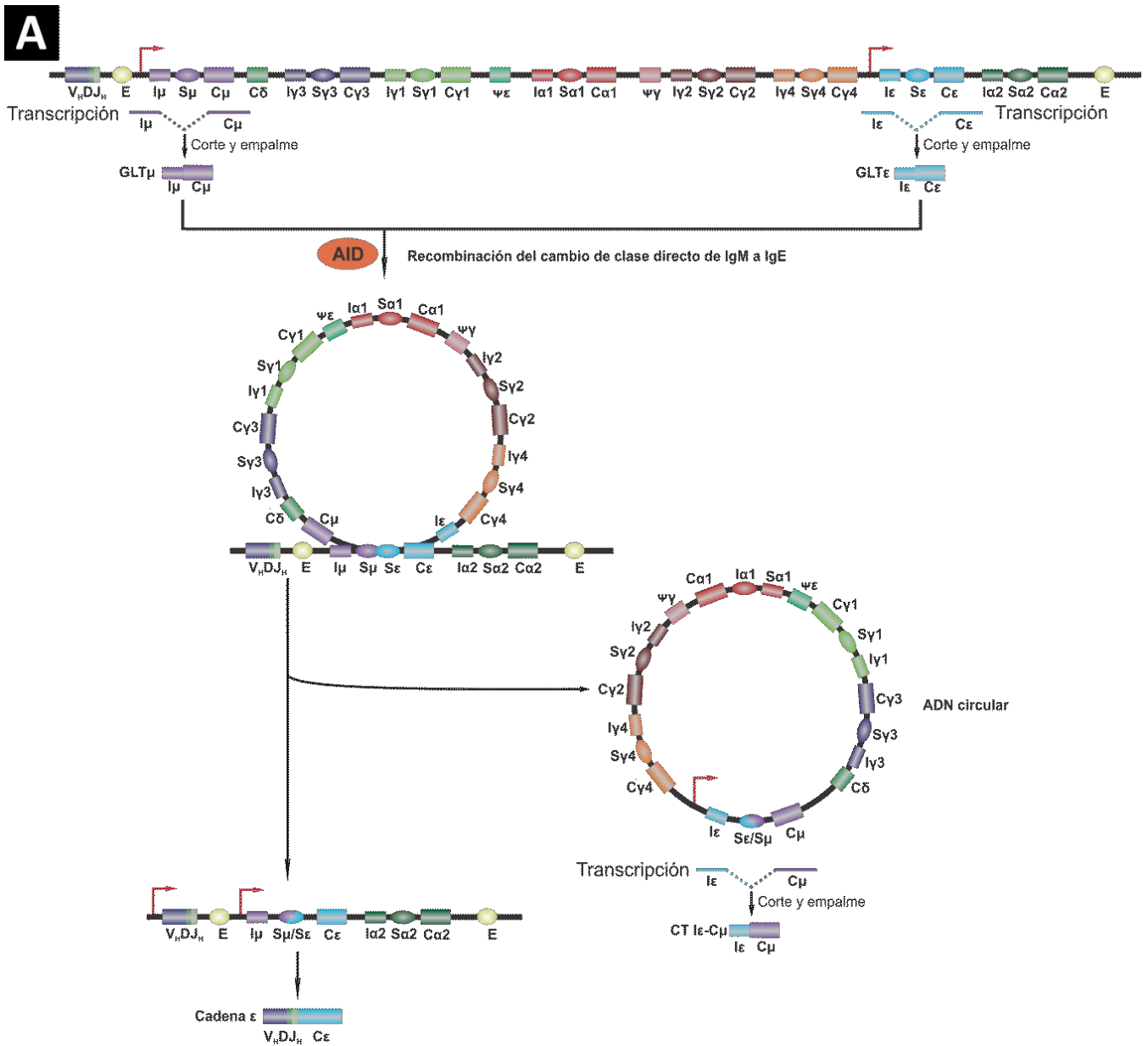
**Figura 6. Posibles sitios de producción de IgE en el intestino humano.**

La figura incluye el repertorio de anticuerpos presentes en el intestino y sus relaciones clonales. Los cambios de isotipos pueden ocurrir de forma directa (de  $\mu$  a  $\gamma/\epsilon/\alpha$ ) o secuencial, es decir con un intermediario  $\gamma$ ,  $\epsilon$  o  $\alpha$ .

Luego de los ciclos de proliferación, hipermutación somática y selección, las células B deben someterse a recombinación de cambio de clase (CSR), cambiando la región constante de la cadena pesada (CH). Existen nueve clases diferentes de regiones constantes de inmunoglobulinas ( $C\mu$ ,  $C\delta$ ,  $C\gamma3$ ,  $C\gamma1$ ,  $C\alpha1$ ,  $C\gamma2$ ,  $C\gamma4$ ,  $C\epsilon$  y  $C\alpha2$ ), que están codificadas en tándem en el cromosoma 14 humano. La secuencia de flaqueo 5' de cada exón que codifica para cada cadena pesada (excepto  $C\delta$ ) contiene un exón I de línea germinal (I) y una región de cambio (S), que contiene los sitios potenciales de recombinación no homóloga para la CSR (Stavnezer et al., 2008). La transcripción del gen de línea germinal (GLT, por su sigla en inglés de *Germline transcript*) de la cadena pesada originante y de la receptora es necesaria para el cambio de clase y se inicia desde los promotores del exón I, continuando a través de las regiones S y los exones CH (Stavnezer, 2000). La enzima AID, la cual cumple un rol crítico en la CSR, es guiada por la formación del GLT para la región  $\epsilon$  (Fear et al., 2004; Fujieda et al., 1995; Zhang et al., 1991; Zhou et al., 2003). Este GLT se transcribe transitoriamente y la acción de la AID inicia la recombinación entre las regiones S de la región CH originante y la región S próxima al exón constante aceptor; el ADN intermedio se separa y se elimina. Los extremos de los fragmentos eliminados quedan unidos formando un ADN circular extra-cromosómico que contiene el promotor del exón I corriente arriba de la región S aceptor, ahora unida a la región S del originante y al gen CH (Zhang et al., 1994). Este ADN circular se transcribe transitoriamente (CT, por su sigla en inglés de *Circle transcript*) y constituye un marcador que indica que la CSR se ha producido (Kinoshita et al., 2001). Debido a que la CSR elimina el ADN genómico entre el isotipo inicial y el isotipo resultante, el proceso es unidireccional e irreversible. Por lo tanto, la detección de los transcritos GLT y CT se emplea para estudiar el curso de la CSR.

Con respecto a la síntesis de IgE, se han descrito dos mecanismos para generar el cambio de clase de  $C\mu$  a  $C\epsilon$  en ratón: cambio directo de  $C\mu$  a  $C\epsilon$ , y cambio secuencial de  $C\mu$  a  $C\gamma$ , seguido del cambio de  $C\gamma$  a  $C\epsilon$  (**Figura 6**). En todos los casos la porción variable no se modifica y solo cambia la porción constante. En ratón se ha propuesto que la síntesis de IgE de alta afinidad solo se produce por cambio secuencial desde  $C\gamma$  a  $C\epsilon$  en linfocitos B de memoria que hicieron la hipermutación somática en el CG (He et al., 2017). Dado que no se han hallado linfocitos B de memoria IgE en los centros

germinales se postula que estas células no tienen capacidad para realizar hipermutación y por lo tanto mueren en el CG por apoptosis al ingresar. Los linfocitos B de memoria IgG que son detectados en el CG, tienen la capacidad de expresar AID y realizar hipermutación somática para madurar la afinidad y generar IgG de alta afinidad. Estas células son seleccionadas en la zona clara del CG, y en respuesta a la interacción con las CD foliculares y los linfocitos TFH inducen el cambio de clase a IgE. Estos plasmablastos luego migran al límite del CG y se transforman en células plasmáticas secretoras de IgE de alta afinidad. Salen del sitio inductivo y probablemente migran a la lámina propia y/o a la médula ósea donde continúan secretando IgE por un tiempo hasta que mueren por apoptosis. La **Figura 7** ilustra el proceso de CSR directa y secuencial de IgM (a través de IgG) a IgE.

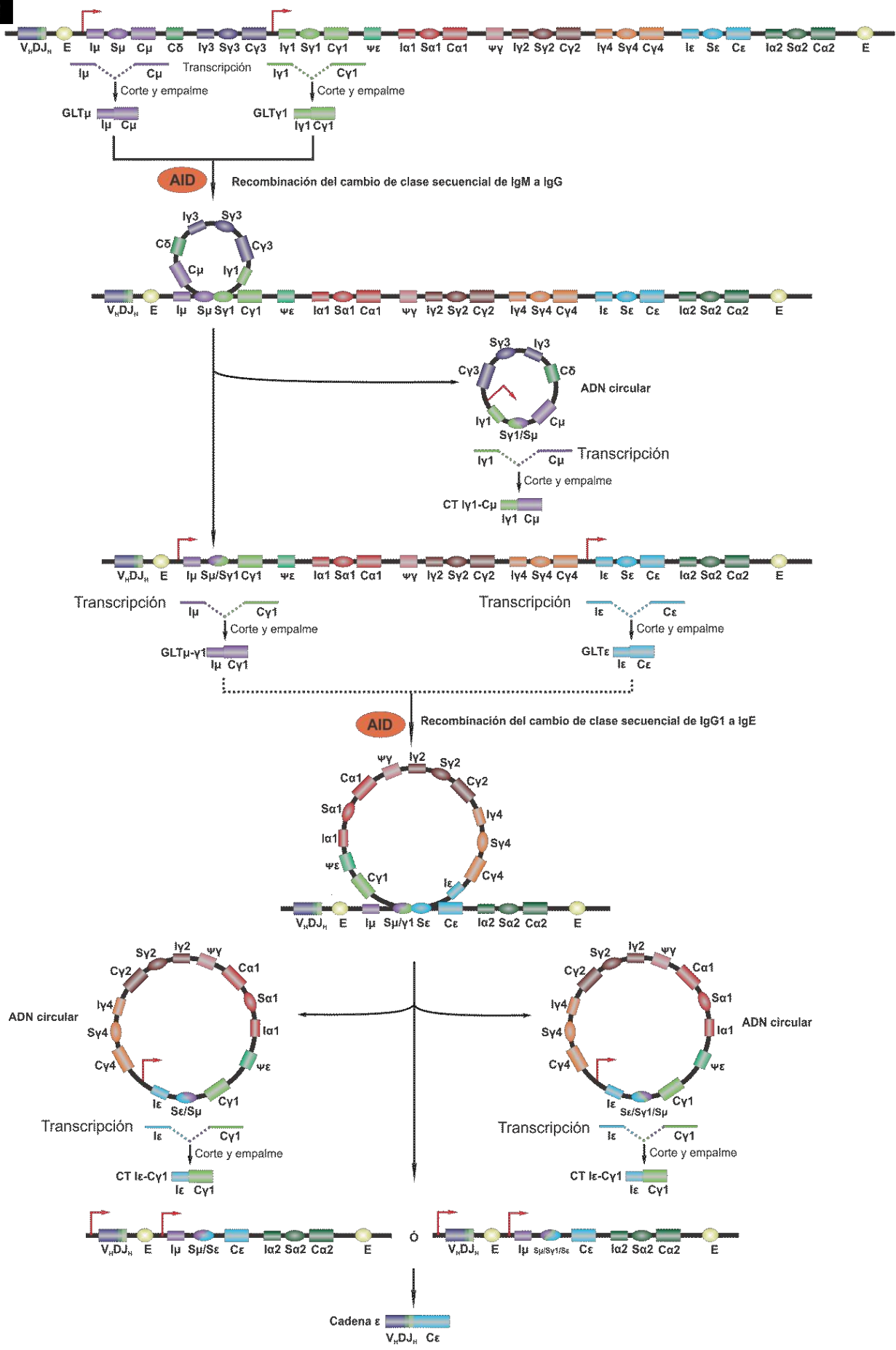


**Figura 7. Esquema del mecanismo de recombinación propuesto para el cambio de clase directo y secuencial a IgE.**

Se muestran esquemáticamente los loci de genes de las cadenas pesadas y los eventos moleculares implicados en el cambio de clase directo (A) y secuencial (B) a IgE. El cambio secuencial se ejemplifica a través de IgG1, no obstante, este puede ocurrir mediante un intermediario IgG3, IgG4 o IgA1. S, región de recombinación; I, exón I del gen de la línea germinal; C, gen de la región constante.

*Continúa en la la página siguiente*

**B**



Como se ha mencionado anteriormente, en humanos este mecanismo no se conoce aún en detalle, y no existe bibliografía que describa en alergia alimentaria cómo se genera la IgE, ni su posible localización. Los únicos trabajos que han caracterizado los mecanismos de síntesis de IgE se han realizado a partir de tejidos de la mucosa nasal proveniente de pacientes con rinitis alérgica (Gevaert et al., 2013). Se ha descrito que en la mucosa nasal (sitio inductivo del árbol respiratorio) se producen tanto los mecanismos de cambio de clase directo como secuencial a IgE (Takhar et al., 2007). Desconocemos hasta este momento si estos mecanismos son los responsables de generar la IgE de alta afinidad, responsable de intervenir en los mecanismos que dan origen a las reacciones alérgicas.

### ***Diagnóstico***

#### *Historia clínica y examen físico*

La evaluación de un paciente que asiste a la consulta de un alergista con sospecha de alergia alimentaria comienza con la confección de una historia clínica completa personal y familiar. Esta deben realizarla profesionales especialistas en alergia ya que debe diferenciarse de una intolerancia alimentaria o una reacción adversa por toxicidad causada por alimentos, las cuales suelen tener una presentación clínica similar a una alergia alimentaria (Sicherer y Sampson, 2018). Tanto el panel de expertos del NIAID (NIAID-Sponsored Expert Panel et al., 2010) como la guía de alergias alimentarias de la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (Muraro et al., 2014) clasifican a las reacciones causadas por alimentos según sean tóxicas (depende del alimento) o no tóxicas (dependen de una susceptibilidad individual), y estas últimas pueden ser una intolerancia alimentaria (no participa el sistema inmune en su fisiopatogenia) o una reacción por hipersensibilidad o alergia (con participación del sistema inmune). Por lo tanto, frente a un cuadro de aparente enfermedad por exposición a un alimento, usualmente la primera indicación es evitar la exposición al alimento sospechoso pero debe realizarse un diagnóstico diferencial dado que la gravedad, el pronóstico y el tratamiento son completamente diferentes según sea una

u otra la causa. Como se mencionó anteriormente, la tendencia es clasificar a toda reacción adversa causada por un alimento como una alergia alimentaria, y la bibliografía refiere que solo un 20% de este tipo de reacciones son diagnosticadas como una alergia alimentaria (Sicherer y Sampson, 2018). Con respecto a las alergias alimentarias, éstas pueden estar mediadas por IgE o no como se mencionó anteriormente. Cualquiera de los 4 tipos de hipersensibilidad (Tipo I a IV) pueden mediar una alergia, pero las tipo I o inmediatas, mediadas por IgE, son aparentemente las más frecuentes y las que pueden causar reacciones anafilácticas; inclusive estas reacciones son las que actualmente pueden ser tratadas con terapias correctivas. Por todas estas razones, las alergias IgE-dependientes o enfermedades atópicas son a las que se está prestando más atención desde hace varias décadas.

Con respecto a la clínica de las alergias alimentarias, la presentación es compleja ya que tienen diferentes formas de manifestarse y se podría decir que se trata de un síndrome más que de una entidad clínica única. Los síntomas más frecuentes son cutáneos, aunque en general siempre existe asociada alguna manifestación digestiva (SEAIC, 2009). La historia clínica personal no solo debe contemplar la sintomatología asociada a la exposición a un determinado alérgeno alimentario, sino que también se debe evaluar la presencia de cofactores, frecuencia de exposición, consistencia de los síntomas frente a diferentes ingestas del alimento, tipo de reacción, relación temporal entre la ingestión de alimentos y la aparición de los síntomas, etc. El examen físico puede revelar signos de una reacción aguda inmediata o hallazgos crónicos compatibles con diátesis atópicas (asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, urticaria, etc.). Sin embargo, en muchos casos la historia clínica y el examen físico por sí solos no son suficientes para establecer un diagnóstico diferencial, y se requieren pruebas complementarias. Las pruebas *in vivo* (pruebas cutáneas) e *in vitro* (IgE séricas específicas para alérgenos alimentarios) son herramientas esenciales para evaluar a los pacientes con una historia clínica sugestiva de alergia alimentaria y representan la segunda línea de estudio de estos pacientes (Manea et al., 2016).



### *Pruebas in vivo*

Las pruebas cutáneas o SPT (por su sigla en inglés de *Skin Prick Test*) constituyen el método más empleado por su sencillez, rapidez e importancia en cuanto a la especificidad y sensibilidad. La principal característica de estas pruebas es su valor predictivo negativo elevado (mayor del 90%). Las debe realizar el médico alergista, empleando extractos o proteínas recombinantes de calidad comprobada, se debe incluir controles positivo (histamina) y negativo (solución fisiológica), y son válidas cuando se evalúa el resultado a los minutos de inoculado el alérgeno. Si bien en estas pruebas se enfrenta al paciente con sospecha de sensibilización alérgica al alérgeno ofensivo, las condiciones en que se realizan aseguran riesgos mínimos para la salud del paciente. Sin embargo, en determinadas condiciones no pueden aplicarse (antecedentes de anafilaxia, alteración de la piel, dermatografismo, etc.). Dado que la especificidad no es del 100%, en general se aplican otras pruebas complementarias para poder llegar a un diagnóstico definitivo (Sicherer y Sampson, 2010; Soares-Weiser et al., 2014). La importancia de esta prueba radica en que pone de manifiesto la presencia de anticuerpos IgE específicos en la superficie de mastocitos de la piel y reproduce la reacción inflamatoria que se produciría en el órgano de choque en forma controlada. Además, al dar positiva esta prueba indica al menos una sensibilización atópica en el paciente.

### *Pruebas in vitro*

La determinación de IgE sérica específica para alérgenos alimentarios es la prueba complementaria *in vitro* más solicitada y permite evaluar la presencia de esta inmunoglobulina en circulación. Por lo tanto, es una prueba indirecta que indica la síntesis de IgE, pero no mide la IgE que da origen a los signos clínicos. De todas formas, la optimización de estos ensayos permite obtener resultados con una elevada sensibilidad y especificidad, de manera que junto a la prueba cutánea constituyen parámetros que en la mayoría de los centros le permiten al médico alergista establecer un diagnóstico diferencial, principalmente cuando se trata de una alergia mediada por IgE causada por la exposición a un determinado alimento. Cuando el paciente tiene

una historia clínica compatible con una alergia alimentaria y estas pruebas dan negativas, es posible diagnosticar una alergia no mediada por IgE, y en este caso el alimento que la desencadena surge de la historia clínica. Estas pruebas, al igual que el SPT, indican al menos, cuando dan positivas, que el paciente se encuentra sensibilizado a un determinado alérgeno. En los casos que los datos de IgE sérica se correlaciona con la historia clínica, sus niveles no se condicen con la gravedad de la reacción (Sicherer y Sampson, 2010).

Dado que la concentración de IgE es muy baja en circulación (del orden de los ng/ml), se requieren inmunoensayos de elevada detectabilidad. Inclusive para la IgE total se requiere este tipo de ensayos de interacción primaria dado que aún en casos de valores elevados, solo con este tipo de ensayos se alcanza la sensibilidad adecuada (Cerecedo et al., 2008). Los ensayos más comúnmente utilizados para este fin son el ELISA y el IMMUNOCAP, que es el método de referencia internacional y se basa en el mismo formato que un ELISA, pero es un ensayo automatizado donde el sistema de revelado es por fluorescencia.

La gran ventaja de estos ensayos *in vitro* es que no ponen en riesgo la salud del paciente. Sin embargo, la gran limitación, como mencionamos anteriormente, es que no dosan al componente patognomónico de una reacción alérgica, dado que la IgE soluble no es capaz de desencadenar una reacción de este tipo. Por lo tanto, no pueden predecir el pronóstico o la gravedad de las reacciones posteriores, pero sí indican sensibilización. A pesar de estas limitaciones, junto al SPT son las pruebas más empleadas en la actualidad.

Otras pruebas adicionales cada vez más empleadas son:

-test de degranulación de basófilos: aquí se evalúa la presencia de IgE en la superficie de basófilos en circulación de los pacientes. Se enfrenta sangre entera anti-coagulada con el alérgeno en condiciones adecuadas de cultivo, y luego de 15-30 minutos se evalúa la activación de los basófilos por citometría de flujo (aparición de marca fluorescente correspondiente a la aparición de CD63 y CD203c en la membrana

plasmática). Es una prueba con un elevado valor predictivo positivo, rápida de ejecutar, no pone en riesgo la salud del paciente, guarda una muy buena correlación con los ensayos serológicos, pero el principal limitante es el costo del ensayo y contar con un citómetro de flujo (Muraro et al., 2014).

-microarreglo de alérgenos: se basa en la detección de IgE específica sérica para componentes individuales (alérgenos recombinantes individuales) en una muestra de suero de reducido volumen y en forma masiva. En una muestra de 30-50 µl es posible determinar hasta 200 especificidades. Estos ensayos tienen un costo muy elevado y requieren una adecuada optimización en cuanto a los paneles de alérgenos que se emplean. Sin embargo, cada vez se utilizan con mayor asiduidad, debido a que permiten establecer para cada paciente perfiles de sensibilización molecular. Por esta razón, se denominan diagnóstico molecular o diagnóstico resuelto por componentes. La gran ventaja de este tipo de análisis es que permiten definir con mayor precisión qué alérgeno emplear en una SPT, o en una inmunoterapia alérgeno-específica.

#### *Desafío oral con el alimento*

Los desafíos alimentarios permiten confirmar una alergia alimentaria y pueden realizarse de distinta manera:

-domiciliario: es lo que en general ocurre en pacientes pediátricos y motiva la consulta con el médico alergista ante la aparición de signos clínicos compatibles con una alergia;

-controlado y simple ciego: se puede realizar bajo la supervisión de un especialista y solo éste sabe qué se le administra al paciente; suele realizarse con un alimento placebo. No se realiza cuando existen antecedentes de anafilaxia;

-controlado y doble ciego con placebo: es la prueba por excelencia para confirmar una alergia alimentaria, mediada o no por IgE. Este tipo de pruebas de desafío siempre se deben realizar bajo la supervisión de un médico y en un ámbito hospitalario, donde se pueda rescatar al paciente si hace una anafilaxia. Se administran

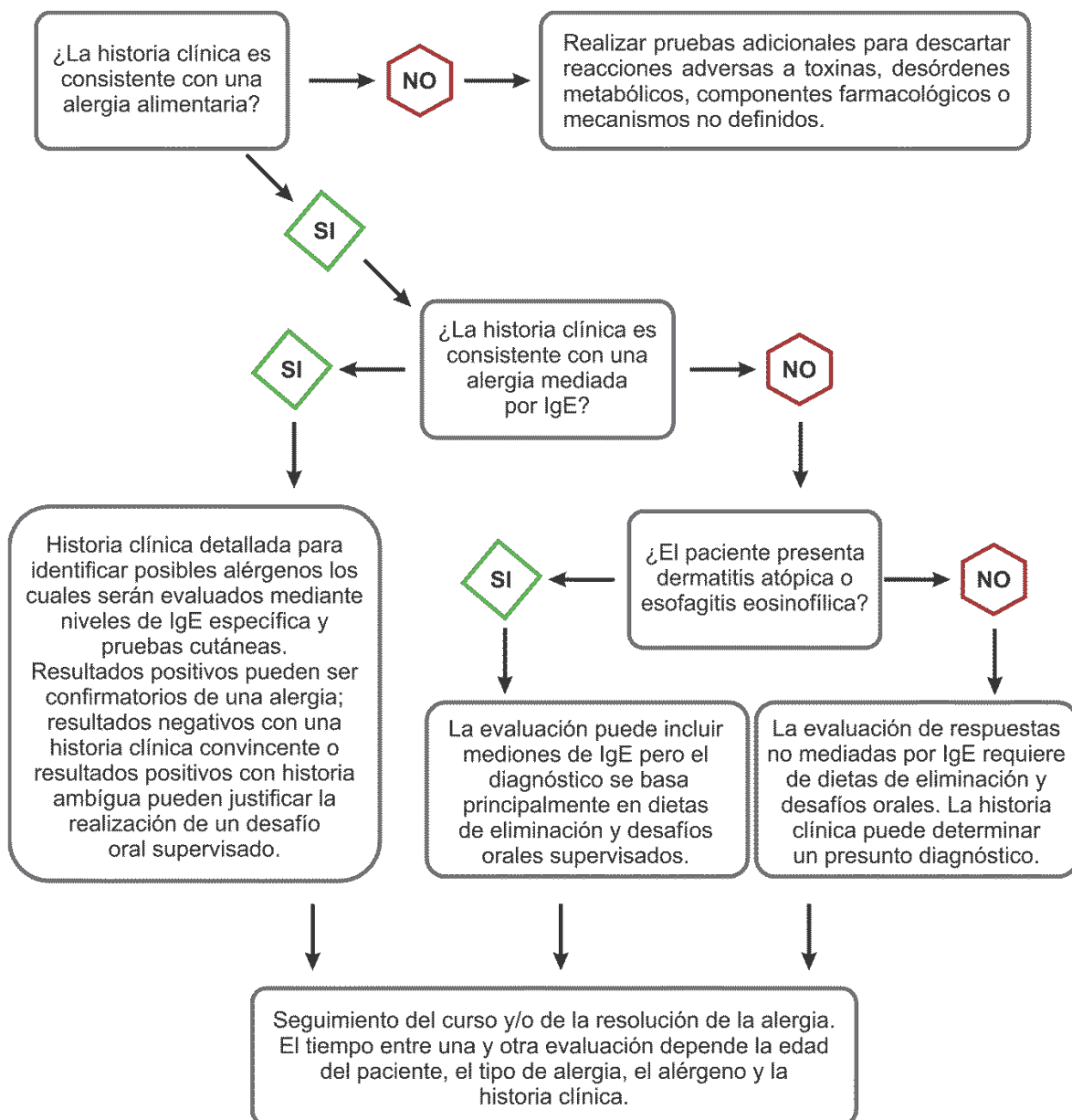
cantidades crecientes del alérgeno, a determinadas frecuencias de tiempos hasta alcanzar una dosis máxima que dependerá del alérgeno. En toda la prueba, el alergista registra la aparición de signos clínicos y supervisa la salud del paciente. Por lo tanto, se trata de una prueba que insume tiempo, requiere la hospitalización del paciente durante el día y requiere además de una infraestructura que permita preparar el alérgeno y el placebo de una manera que no sea perceptible de qué se trata. A pesar que los parámetros del ensayo son los óptimos (100% de sensibilidad, especificidad y elevados % de valor predictivo negativo y valor predictivo positivo), son muy pocos los centros en el mundo donde se realizan durante el diagnóstico (en nuestro país no se aplica), y en general solo se realizan en ensayos clínicos (Sampson et al., 2012). Los alimentos empleados se seleccionan en función de la historia clínica y los resultados de las pruebas cutáneas y/o in vitro.

#### *Reacciones no mediadas por IgE*

Para los casos en que no se ponga en evidencia la presencia de IgE específica sérica, el SPT de un resultado negativo, o la prueba confirmatoria indique que los signos clínicos no se inducen a los minutos de la exposición al alérgeno, se podría establecer un diagnóstico de alergia alimentaria no mediada por IgE frente a una historia clínica compatible. En estos casos las herramientas diagnósticas confirmatorias son muy limitadas, y en general se establece por descarte. Dependiendo de la clínica, se puede recurrir al análisis histológico de una muestra del tejido afectado (si es posible su acceso), o estudios celulares a partir de muestras de biopsias o de sangre periférica, con el objetivo de descartar otras patologías (enfermedad celíaca, procesos tumorales, etc.) o de confirmar otras patologías que recientemente se han asociado a las alergias alimentarias porque pueden ser desencadenadas por la exposición o ingesta de alimentos: patologías eosinofílicas como la esofagitis eosinofílica (Nowak-Węgrzyn et al., 2015). Ésta se observa cada vez con mayor frecuencia en pacientes pediátricos y adultos y se diagnostica en función del recuento de eosinófilos en una biopsia de cada tejido. Hasta el momento se ha asociado estos procesos eosinofílicos a mecanismos inmunológicos T<sub>H</sub>2-dependientes, pero IgE-independientes. No se conoce

exactamente su fisiopatogenia, pero se lo asocia a la ingesta de alimentos por lo cual el principal tratamiento es evitar la ingesta de estos. También pueden clasificarse las esofagitis eosinofílicas según el paciente responda o no a inhibidores de la bomba de protones. Se desconoce cuál es la relación entre la activación del sistema inmune y los procesos de acidosis.

La **Figura 8** muestra el algoritmo recomendado por Sicherer y Sampson para el diagnóstico de las alergias alimentarias (Sicherer y Sampson, 2018).



**Figura 8. Algoritmo de diagnóstico para alergias alimentarias.**

El esquema propuesto por Sicherer y Sampson, 2018 considera la historia clínica, la epidemiología, la fisiopatología y los resultados de las pruebas de diagnóstico.

## **Pólipos colorectales**

Un pólipo es un tumor o crecimiento localizado que protruye desde la pared hacia la luz de una víscera hueca, en cualquier parte del tracto gastrointestinal, genitourinario o respiratorio. En particular, los pólipos colorrectales pueden clasificarse por su aspecto macroscópico como sésiles (planos, que surgen directamente de la mucosa) o pedunculados (que se extienden desde la mucosa a través de un tallo fibrovascular); o por su histología como neoplásicos o no neoplásicos. El número puede ser muy variable; cuando existe un proceso sistémico que promueve el desarrollo de múltiples pólipos gastrointestinales se denomina poliposis. Los síndromes hereditarios de poliposis representan aproximadamente el 1% de todos los casos de cáncer colorrectal y están asociados con un amplio espectro de tumores extracolónicos. Se han descrito varios síndromes de poliposis, cada uno con su propia base genética, presentación clínica y riesgo de malignidad y distribución de pólipos característica.

La mayoría de los pólipos no producen síntomas; sin embargo, pueden producir proctorragia, por movimientos de los mismos en la peristalsis. Los pólipos más grandes pueden obstruir parcialmente la luz del colon; por lo tanto, se pueden presentar síntomas obstructivos, como dolor abdominal, hinchazón o cambio en los hábitos intestinales. El diagnóstico se lleva a cabo principalmente examinando el revestimiento del colon por endoscopia colorrectal, que incluye también el extirpado de los pólipos como medida de prevención de riesgo por un posible desarrollo de procesos tumorales con el tiempo.

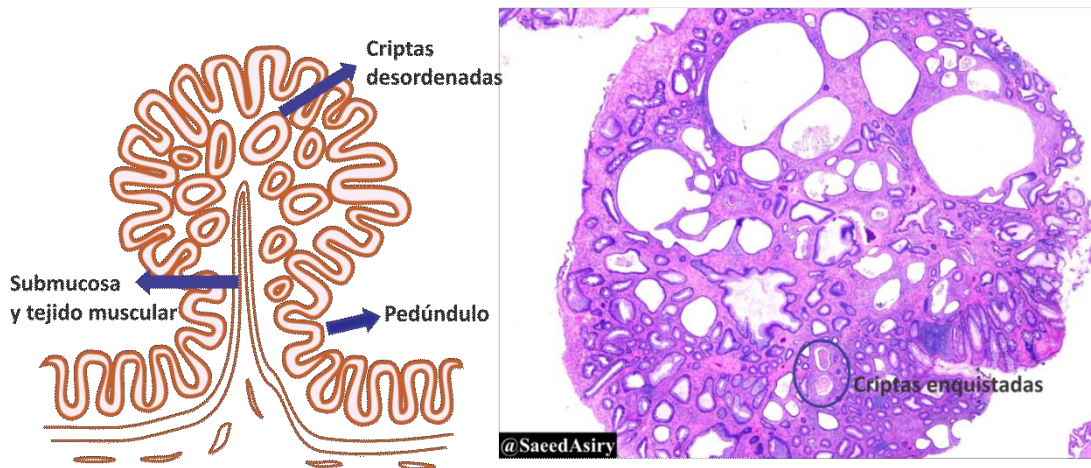
Los pólipos colorrectales pueden clasificarse histológicamente como neoplásicos o no neoplásicos (Shussman y Wexner, 2014). En el primer caso se destacan los pólipos adenomatosos y los aserrados, los cuales se presentan principalmente en la población adulta. Los pólipos adenomatosos o adenomas colorrectales son tumores benignos que se originan a partir de las células epiteliales del colon que secretan moco. Por otro lado, los pólipos aserrados mantienen una histología similar a la de los pólipos hiperplásicos (no neoplásicos) con células epiteliales de aspecto aserrado, donde también se produce una displasia. Los pólipos neoplásicos son de importancia primordial porque albergan un potencial maligno, y representan una etapa inicial en el

desarrollo del cáncer colorrectal. Aunque la mayoría de estos pólipos no evolucionan hacia el cáncer, se acepta que la mayoría de los carcinomas colorrectales evolucionan a partir de pólipos adenomatosos, que con el tiempo dan lugar a la diverticulosis y finalmente al cáncer de colon.

Los pólipos no neoplásicos incluyen los pólipos hiperplásicos, los inflamatorios y los hamartomatosos. Los pólipos hiperplásicos son el tipo más común de pólipos colorrectales, suelen ser sésiles y de menos de 5 mm de diámetro, con una histología caracterizada por hiperplasia, sin displasia. Los pólipos inflamatorios se presentan con mayor frecuencia en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. Estas lesiones no son pólipos verdaderos, sino acumulaciones de infiltraciones inflamatorias con anatomía distorsionada de la mucosa y no presentan potencial maligno. Por último, los pólipos hamartomatosos también conocidos como pólipos juveniles, consisten principalmente en tejido conectivo (músculo liso, lámina propia e infiltrados inflamatorios) cubiertos por un epitelio hipertrófico. Este tipo de pólipo es de relevancia para el presente trabajo y será detallado a continuación.

### ***Pólipos juveniles***

Los pólipos juveniles se diagnostican con mayor frecuencia a una edad temprana (75% de los niños menores de diez años) con un pico de ocurrencia entre los dos y cinco años, y representan el 90% de los pólipos gastrointestinales en la infancia. La incidencia reportada de pólipos colónicos en niños ha oscilado entre 0.08% y 3.7%, con tasas más altas reportadas en niños sintomáticos (Fox et al., 2010). Aproximadamente el 50% de los niños tienen más de un pólipo, el 90% de ellos son pedunculados y miden de 1 cm a 3 cm de diámetro. Estos pólipos se desarrollan comúnmente en el recto y el colon, y presentan una histología caracterizada por espacios quísticos dilatados distintivos, infiltrado inflamatorio denso en la lámina propia, vascularización marcada y áreas de ulceración (**Figura 9**) (Durno, 2007). Las manifestaciones clínicas que acompaña su presencia suele incluir proctorragia (están altamente vascularizados), dolor abdominal ocasional y obstrucción intestinal (con baja frecuencia) (Shussman y Wexner, 2014)



**Figura 9. Esquema e histología típica de un pólipo juvenil.**

Hematoxilina y eosina adaptada de la página web de SaeedAsiry (<https://twitter.com/SaeedAsiry/status/752181274446553088>).

La presencia de PJ múltiples puede indicar una afección pre-maligna comúnmente denominada poliposis juvenil. El diagnóstico está firmemente establecido por la presencia de cinco o más PJ junto con antecedentes familiares de PJ o mutaciones documentadas. Los pacientes con menos de 3 pólipos generalmente se han considerado de bajo riesgo de recurrencia de pólipos. Sin embargo, resultados recientes sugieren que los niños que presentan incluso un solo pólipo pueden continuar formando pólipos con el tiempo, dándose la mayor tasa de recurrencia en pacientes con múltiples pólipos (no sindrómicos) (Fox et al., 2010; Ibrahim et al., 2019).

En la actualidad, se considera que los PJ solitarios conllevan un riesgo mínimo o nulo de transformación maligna (Nugent et al., 1993). No obstante, trabajos recientes han demostrado que el 12% de los PJ presentan cambios neoplásicos, con una mayor incidencia en PJ desarrollados en el colon proximal y en pacientes con determinadas mutaciones genéticas. En consecuencia, la recomendación actual es la polipectomía durante la evaluación colonoscópica, y el seguimiento del paciente para monitorear el posible desarrollo tumoral. Dado que no se conoce la causa del desarrollo de los PJ, no existe tratamiento para prevenir la recurrencia luego de la polipectomía. En este trabajo hemos estudiado la asociación de este tipo de pólipos colorectales con la condición de atópicos de pacientes pediátricos.



**Alteraciones en la mucosa colónica asociadas a alergias alimentarias**

Como hemos mencionado anteriormente, el espectro de síntomas clínicos con que puede presentarse una alergia alimentaria puede ser muy heterogéneo y variado. Entre los desórdenes que se han descrito que alteran la mucosa colónica se encuentran el síndrome de enterocolitis inducida por proteínas alimentarias, la proctocolitis alérgica, la proctitis alérgica y la hiperplasia nodular linfoide (HNL), los cuales son no mediados por IgE.

El síndrome de enterocolitis inducida por proteínas alimentarias es una hipersensibilidad alimentaria gastrointestinal severa, mediada por células, típicamente provocada por la leche de vaca o la soja. La misma afecta tanto el intestino delgado como el colon, y se caracteriza por irritabilidad, letargo y/o deshidratación causada por vómitos prolongados y diarrea (Agyemang y Nowak-Wegrzyn, 2019). La proctocolitis inducida por proteínas alimentarias es la causa más común de sangrado rectal en lactantes pequeños; los bebés con este trastorno son sensibles a la leche de vaca o la proteína de soja. Aunque generalmente se piensa que esta condición se limita principalmente a la infancia, se ha informado que los niños sanos (de 2 a 14 años) presentan sangrado rectal persistente o recurrente, relacionado con una forma leve de colitis caracterizada por una infiltración eosinofílica prominente, HNL y una pronta respuesta clínica e histológica a la leche de vaca no mediada por IgE (Connors et al., 2018). Por otro lado, la proctitis alérgica, junto con la constipación crónica, se caracteriza por una inflamación alérgica del colon. Inicialmente, estos trastornos fueron asociados con la ALV, no obstante, sigue siendo un tema de debate en la comunidad científica (Pensabene et al., 2018). Finalmente, la HNL es un hallazgo común durante las colonoscopías pediátricas, incluso se ha considerado normal o relacionado con la edad ya que podría estar asociado con el desarrollo del sistema inmunológico intestinal, la tolerancia oral inmadura y la frecuente infección que ocurre en la infancia (Krauss et al., 2010). Varios trabajos reportan una asociación entre la HNL en el TGI superior e inferior, y la alergia alimentaria, incluso se ha descrito que representa una respuesta inmune tardía frente a la exposición a distintos alimentos, entre ellos la leche de vaca (Iacono et al., 2007; Turunen et al., 2004). Sin embargo,

estudios recientes indican que en pacientes pediátricos no existiría una relación causal entre la alergia alimentaria y la HNL (Lucarelli et al., 2015).

En la literatura existe un número reducido de trabajos que sugieren que los PJ colorrectales podrían desarrollarse como consecuencia de una respuesta inflamatoria inducida por un Ag dietario (Alexander et al., 1970; Roma-Giannikou et al., 2008). Esto refleja que no conocemos exactamente la etiología de los PJ y de la HNL, aunque se sospecha que la leche de vaca y la condición de alérgico podría tener relación con la fisiopatogenia de estos procesos. En pacientes alérgicos solamente se ha descrito una asociación entre pólipos y la condición de alérgico para pólipos nasales y rinitis alérgica.

Dado que en pacientes con sospecha de alergia alimentaria no está indicada la realización de endoscopías y tomas de muestras por razones éticas, no se ha tenido acceso al tejido mucosal, limitando así el conocimiento sobre la inmunopatogenia de estos procesos, lo cual se ve reflejado en la reducida bibliografía existente sobre el SIM intestinal y las alergias alimentarias. Los modelos murinos de alergia alimentaria que se han desarrollado y optimizado en los últimos años han permitido lograr avances importantes en la comprensión de estos mecanismos, aunque sabemos de las limitaciones de este tipo de estudios, y sus extrapolaciones al sistema inmune humano.

En el presente trabajo de Tesis hemos abordado el estudio de la asociación entre la ALV y el desarrollo de PJ colorrectales en pacientes pediátricos. La caracterización del contenido de los pólipos colorrectales nos ha permitido obtener conocimiento sobre la biología de la síntesis de IgE y las características de este tipo de formaciones intestinales. Por lo tanto, consideramos que este trabajo aporta información relevante sobre la fisiopatología de los PJ, los mecanismos de las respuestas alérgicas mediadas por IgE y los factores que median la síntesis de este isotipo. Estos resultados en su conjunto permitirían alcanzar un mejor conocimiento de la regulación de estos procesos y podrían tener un importante impacto en las terapias de las enfermedades alérgicas.

Parte de los resultados que a continuación se mostrarán han sido enviados a publicar en el 2019 en las siguientes revistas:

-“Eosinophilic colorectal polyps in sensitized patients to food allergens”, Karina Eva Canziani, Luciana Guzmán, Viviana Bernedo, Marcela García, Eugenia Margarita Altamirano, Cecilia Isabel Muglia and Guillermo Docena, JPGN 2019 (en revisión).

-“IgE production in the human colonic mucosa of patients sensitized to food allergens”, Karina Canziani, Melisa Pucci Molineris, Luciana Guzman, Viviana Bernedo, Marcela García, Eugenia Altamirano, Pablo Morande, Mirta Giordano, Cecilia Muglia, and Guillermo Docena, Allergy 2019 (en revisión).

Asimismo, parte de los resultados presentados en formato poster fueron premiados en el XXXIX Congreso Anual de la Asociación Argentina de Alergia e Inmunología Clínica (AAAeIC):

-“Impronta T<sub>H</sub>2 del infiltrado celular presente en pólipos colónicos en pacientes atópicos”, Canziani, Karina Eva; Pucci Molineris, Melisa; Balcarce, Norma; Díaz Jimenez, David; Guzman, Luciana; García, Marcela; Altamirano, Eugenia; Meier, Dominik; Hermoso Ramello; Fossati, Carlos; Muglia, Cecilia; Docena, Guillermo. XXXIX Congreso Anual AAAeIC, Ciudad de Buenos Aires, Argentina. 11 al 13 de agosto del 2016.

# HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

### **Hipótesis de trabajo**

El consumo de leche vaca desencadena un proceso inflamatorio alérgico en la mucosa colorrectal de pacientes pediátricos sensibilizados a proteínas de leche de vaca, maní y/o soja, llevando finalmente al desarrollo de pólipos juveniles en la pared intestinal, en los que la respuesta inflamatoria alérgica da origen a estructuras linfoides terciarias donde se produce la síntesis de IgE.

### **Objetivos**

Estudiar la respuesta inflamatoria en pólipos juveniles colorrectales de pacientes pediátricos que presentan sangrado rectal, investigar si existe una asociación con la alergia alimentaria y caracterizar el infiltrado inflamatorio.

### **Objetivos específicos:**

- Evaluar la condición alérgica de los pacientes que presentan sangrado rectal y pólipos juveniles colorrectales.
- Caracterizar el infiltrado inflamatorio presente en los pólipos juveniles y en las biopsias de tejido circundante.
- Estudiar la presencia de centros germinales en los pólipos colorrectales y la producción local de IgE.
- Aislar y caracterizar los linfocitos T de sangre periférica y de la mucosa intestinal de los pacientes con pólipos colorrectales.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## **1. Pacientes y muestras biológicas**

En el presente trabajo se emplearon como objeto de estudio pólipos juveniles de recto y colon sigmoideo, biopsias colónicas de tejido circundante a los PJ (TCP) y sangre periférica anticoagulada de 100 pacientes pediátricos (35 niñas y 65 niños) con edades comprendidas entre los 6 meses y 14 años de edad (promedio 5.3 años de edad) que concurrieron al Servicio de Gastroenterología del Hospital de Niños Sor María Ludovica de La Plata. El criterio de selección de los pacientes fue la presencia de proctorragia indolora. A estos pacientes se les indicó una colonoscopia para monitorear la posible causa de la pérdida de sangre y ante la presencia de pólipos colónicos, estos fueron removidos por protocolo, para su estudio histopatológico, y como medida preventiva de potenciales procesos tumorales. Asimismo, y como muestra control, se obtuvo una biopsia de tejido mucosal circundante al pólipo en todos los pacientes a los que se les extrajo el pólipo. Un fragmento de los pólipos es enviado al Servicio de Anatomía Patológica del mismo hospital, mientras que la parte restante del pólipo, y la biopsia control, se remitieron en medio de cultivo RPMI al IIFP para su estudio. Las biopsias de TCP se seleccionaron en base a la ausencia de signos macroscópicos de inflamación. La selección de pacientes con sangrado indoloro obedece a excluir los pacientes con fisura anal.

Este estudio se realizó en el marco de un proyecto aprobado por el Comité Institucional de Revisión de Protocolos de Investigación del Hospital de Niños de La Plata (IDIP-Instituto de Desarrollo e Investigación Pediátrica) con el consentimiento o asentimiento informado, dependiendo de la edad de los pacientes.

## **2. Estudio de la condición alérgica de los pacientes**

### ***2.1 Anamnesis del paciente***

Los pacientes ingresaron por el Servicio de Gastroenterología a partir de la evidencia de proctorragia identificada por los padres. Luego de una historia clínica inicial realizada por los médicos gastroenterólogos del servicio se indicó la video-colonoscopia, en caso que fuera un sangrado indoloro, y la derivación al Servicio de

Alergia. Aquí se les completó la historia clínica en base a un cuestionario pre-acordado por el equipo de trabajo. En caso de pacientes de menos de 7 años de edad los padres fueron quienes intervinieron en el aporte de información de datos personales y familiares. Por lo tanto, para cada paciente contamos con una historia clínica del Servicio de Gastroenterología y otra del Servicio de Alergia.

## **2.2 Pruebas *in vitro* e *in vivo***

Sobre la base de la historia clínica, en aquellos pacientes con sospecha de alergia alimentaria se indicó el SPT y serología para IgE.

### **2.2.1 Determinación de IgE total e IgE específica**

Los niveles plasmáticos de IgE total e IgE específica para proteínas de leche de vaca, soja y maní se evaluaron a partir de la sangre anticoagulada, mediante ELISA indirecto. Para la determinación de IgE total se sensibilizaron placas de ELISA (NUNC, Maxisorp, Dinamarca) con 50 µl de un antisuero policlonal anti-IgE humana (400 µg/ml) (Sigma, MO, EE.UU.) durante 1 hora a 37°C. El bloqueo se realizó con 100 µl de suero equino 5% en PBS durante 2 horas a 37°C. Tanto las muestras de plasma como los controles fueron analizados a una dilución 1/20 y se incubaron por 30 minutos a 37°C. Luego de incubar con anti-IgE biotinilada (Vector Laboratories, CA, EE.UU.) durante 1 hora a 37°C se agregó estreptavidina-peroxidasa (Sigma, MO, EE.UU.) por 1 hora a 37°C. El color final de la reacción se reveló con orto-fenilendiamina (MP Biomedicals, CA, EE.UU.) deteniéndose las reacciones luego de 15 minutos de reacción mediante el agregado de 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 492 nm. La curva de calibración se hizo por duplicado a partir de un estándar comercial de 1000 UI/ml diluido 1/20 al cual se le realizaron diluciones seriadas.

Para la determinación de IgE específica, las placas fueron sensibilizadas con 100 µl de leche descremada (12,5 µg/ml de proteínas), soja o maní (10 µg/ml), por 1 hora a 37°C. El bloqueo se realizó con 200 µl de suero equino 5% en PBS durante 2 horas a 37°C. Tanto las muestras de plasma como los controles (seroteca) se emplearon sin dilución previa y se incubó 100 µl de muestra durante toda la noche a 4°C. Para el



revelado se utilizó anti-IgE humana conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma, MO, EE.UU.) durante 2 horas a 37°C; y se reveló con para-nitrofenilfosfato (Sigma, MO, EE.UU.). La reacción se detuvo luego de 20 minutos con EDTA. La absorbancia se midió a 405 nm mediante un lector para placas de ELISA. Se utilizó como control negativo un pool de sueros sin IgE a los cuales se les determinó individualmente la medida de absorbancia a fin de determinar el desvío estándar de las muestras. El punto de corte para el ensayo fue la media de la absorbancia del pool más 2 desviaciones estándar. Las muestras a evaluar se interpretaron de forma semicuantitativa asignándoles valores en clases de 1 a 4 en base al valor de absorbancia de muestras controles positivas con distintos niveles de IgE específica. Para asignar los valores basales o clase 0 se empezaron muestras sin niveles detectables de IgE, mientras que las muestras positivas se confirmaron por determinación en paralelo de los niveles de IgE específica con el método de referencia de INMUNOCAP.

### 2.2.2 Prueba cutánea

La prueba fue realizada por los alergistas del Servicio de Alergia del Hospital de Niños Sor María Ludovica. Se realizó mediante la técnica del *Prick Test* o SPT, empleando una gota de extractos comerciales de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, epitelio de gato, epitelio de perro, *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., lactoalbúmina y caseína de leche de vaca, clara y yema de huevo, trigo, polen de *Ambrosía* spp. y de *Lolium* spp. (Alergo-Pharma, Buenos Aires, Argentina), y una lanceta plástica estandarizada. Se utilizó fosfato de histamina (10mg/ml) como control positivo y solución fisiológica como control negativo. Aquellos pacientes que presentaron una reacción cutánea mayor a 3 mm con respecto al control negativo fueron considerados como positivos.

### **3. Estudios histológicos e inmunofluorescentes**

#### ***3.1 Análisis histológico mediante la tinción de hematoxilina y eosina***

Para estos análisis se utilizaron tejidos provenientes de biopsias y pólipos incluidos en parafina. Brevemente, los mismos se fijaron en formol 5% p/v durante 24 horas y luego se deshidrataron empleando sucesivamente etanol 50%, 70%, 96%, 100% v/v y xilol (3 pasajes) con una incubación de 1 hora en cada solución. Finalmente, se hicieron 3 pasajes de 1 hora en parafina a 55°C y se armaron los tacos, los cuales se almacenaron a temperatura ambiente. Se realizaron cortes de 5 µm de espesor con un micrótopo (Leica, IL, EE.UU.), y se desparafinaron con 3 pasajes en xilol durante 5 minutos cada uno para luego re-hidratarlos empleando una secuencia de soluciones de concentración de etanol decreciente (100%, 96% y 50% v/v). Luego, las muestras se sumergieron en hematoxilina de Mayer (Biopack, Zárate, Bs. As., Argentina) durante 5 minutos y se lavaron con agua hasta viraje del colorante. Posteriormente, se trataron con eosina durante 30 segundos y se deshidrataron en etanol 50%, 70%, 96% y 100% v/v durante 2 minutos cada uno. Finalmente se realizaron 2 pasajes de 5 minutos en xilol y se montaron en un portaobjetos con bálsamo de Canadá (Biopack, Bs. As., Argentina).

#### ***3.2 Tinción Tricrómica de Masson***

Los cortes de 5 µm de espesor se desparafinaron y rehidrataron siguiendo los pasos del procedimiento anterior. Luego se realizaron las tinciones con los distintos colorantes lavando con agua destilada durante 3 minutos entre cada una. Primero, se sumergieron los vidrios en hematoxilina (Biopack, Zárate, Bs. As., Argentina) durante 4 minutos y se lavaron con agua corriente hasta viraje del colorante; luego se trataron con Fucsina de Ponceau (Biopack, Bs. As., Argentina) durante 5 minutos y 1 minuto con ácido fosfomolibdico 5%, y finalmente se incubaron con Azul Anilina (Biopack, Bs. As., Argentina) durante 10 minutos. La deshidratación se realizó como se indicó anteriormente. Finalmente los vidrios fueron montados con bálsamo de Canadá (Biopack, Bs. As., Argentina) para su observación en microscopio óptico.

### **3.3 Análisis inmunohistoquímicos**

Los cortes de muestras parafinadas fueron desparafinadas como se mencionó anteriormente, y se realizó una recuperación antigénica con una solución tampón de citrato de sodio pH 6.0 en una olla a presión a 100°C durante 15 minutos. La peroxidasa endógena se inactivó por incubación con peróxido de hidrógeno 2.5% v/v durante 15 minutos a 37°C, seguido de un bloqueo con BSA 1% p/v en PBS-Tween 20 (1% v/v) (PBS-T) durante 1 hora a 37°C. Luego, las secciones fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos monoclonales: ratón anti-CD20 humano (listo para usar, Clon L26, Leica Biosystems, IL, EE.UU.), ratón anti-AID humana (1:50, Clon ZA001, Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU.) y conejo anti-Ki-67 humano (1:200, Clon SP6, Abcam, Cambridge, Reino Unido). Luego de tres lavados con PBS-T, se incubó con los Ac secundarios: anticuerpo anti- $\gamma$  globulina de ratón o anti- $\gamma$  globulina de conejo conjugados a peroxidasa de rábano picante (HRP, por su sigla en inglés de *Horseradish peroxidase*) (1:1000, Bioss, MA, EE.UU.), durante 30 minutos a 37°C. La detección de los isotipos se realizó con un anticuerpo policlonal biotinilado anti-IgE humana (1:200, VECTOR Laboratories, CA, EE.UU.) o anti-IgA humana (1:1000, Sigma, MO, EE.UU.) seguido de una incubación con estreptavidina-HRP (1:1000, Sigma, MO, EE.UU.) durante 30 minutos a 37°C. La actividad peroxidasa se reveló finalmente incubando las muestras con el sustrato diaminobencidina (DAB) (Biogenex, CA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Por último, se realizó una contra-coloración con hematoxilina de Mayer (Biopack, Bs. As., Argentina). Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio Axio FOT Zeiss y luego analizadas con el programa Fiji (NIH, MR, EE.UU.).

### **3.4 Análisis de fluorescencia por microscopía confocal**

Los cortes obtenidos de biopsias y pólipos parafinados, se desparafinaron como se mencionó anteriormente, y se realizó una recuperación antigénica con buffer citrato de sodio pH 6.0 en una olla a presión a 100°C durante 15 min. Las secciones se bloquearon BSA 1% p/v en PBS-T durante 1 hora a 37°C. Luego, se incubaron durante toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios: ratón anti-CD138 humano (1:25, Clon MI15, DakoDenmark, CA, EE.UU.), ratón anti-CD3 humano (1:30, Clon

F7.2.38, DakoDenmark, CA, EE.UU.), policlonal biotinilado anti-IgE humana (1:200, VECTOR Laboratories, CA, EE.UU.), cabra anti-IL33 humano (1:25, R&D, MN, EE.UU.), cabra anti-ST2 humano (1:25, R&D, MN, EE.UU.), conejo anti-TSLP humano (1:25, R&D, MN, EE.UU.), ratón anti-CD31 humano (1:30, DakoDenmark, CA, EE.UU.) y ratón anti-vimentina humana (1:50, clon RV203, Abcam, Cambridge, Reino Unido). La incubación con el correspondiente anticuerpo secundario se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente empleando: anti- $\gamma$  globulina de ratón, cabra o conejo H&L Alexa Fluor® 647 o 488 (1:300, Abcam, Cambridge, Reino Unido). Para la detección de los anticuerpos biotinilados, se utilizó estreptavidina-FITC (1:300, eBioscience Invitrogen, CA, EE.UU.). Finalmente se colorearon los núcleos con yoduro de propidio (1 $\mu$ g/ml; Sigma, MO, EE.UU.) y se montaron los vidrios utilizando medio de montaje para fluorescencia (Dako, CA, EE.UU.).

Alternativamente, otras muestras se incluyeron en plástico, para lo cual los pólipos y biopsias se incubaron con en el fijador PLP (PBS, L-lysina 0.075M, NaIO<sub>4</sub> 0.01M, PFA 1 % p/v) durante 24 horas a 4°C protegidas de la luz. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS y se incubaron toda la noche a 4°C en sacarosa 30% p/v. Finalmente se embebieron en CRYOPLAST® (Biopack, Bs. As., Argentina), se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. Posteriormente, las muestras se cortaron en secciones de 10  $\mu$ m de espesor con micrótomo. Los cortes se lavaron con PBS para eliminar el plástico y se bloquearon con PBS, Glicina 0,3M, BSA 1 % p/v y Tween-20 0.05% v/v durante 1 hora a 37°C. En los casos en los que se necesitó permeabilizar las células para la evaluación de proteínas citoplasmáticas, se agregó el surfactante Tritón-X 0.02% v/v. Luego, las secciones fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos: cabra anti-IgE humano conjugado a FITC (1:50, SouthernBiotech, AL, EE.UU.) o cabra anti-CCL26/eotaxina-3 (1:25, R&D, MN, EE.UU.) seguido de 2 horas de anticuerpos anti-  $\gamma$  globulina de cabra Alexa Fluor® 488 (1:300, Abcam, Cambridge, Reino Unido). Finalmente se utilizó yoduro de propidio (1 $\mu$ g/ml; Sigma, MO, EE.UU.) para colorear los núcleos y se montaron con un medio de montaje para fluorescencia (Dako, CA, EE.UU.).

En todos los casos las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal SP5 Leica y se analizaron con los programas LAS AF Lite y Fiji.

#### 4. Análisis de la expresión génica

##### 4.1 Extracción ARN total y síntesis de ADN complementario (ADNc)

Los pólipos y biopsias se conservaron en *RNAlater* (Invitrogen, CA, EE.UU.) a 4°C durante 12 horas y 4 horas respectivamente. Luego de la incubación, se descartó el conservante y se almacenaron a -80°C hasta su utilización. La extracción de ARN se realizó empleando el kit comercial IllustraRNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) y la muestra se conservó a -80°C hasta su utilización. Su cuantificación y control de calidad se realizó por métodos espectrofotométricos utilizando un Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU.). Para la síntesis del ADNc se partió de 1 µg de ARN total como molde, se utilizó la transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen, CA, EE.UU.) y una mezcla de cebadores generados al azar. El producto obtenido se conservó a -20°C hasta su uso. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Master cycler gradient (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) con el siguiente programa: 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 37°C y 15 minutos a 70°C.

##### 4.2 Cuantificación de la expresión génica por PCR en tiempo real

La PCR cuantitativa para cada uno de los genes de interés (GDI) se realizó mediante el sistema SYBR Green PCR Master Mix (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.) utilizando un termociclador iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Las secuencias de los cebadores empleados se detallan en la **Tabla 1** (aquellos obtenidos de bibliografía se indican con un asterisco). El programa de amplificación utilizado fue el siguiente: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, 45 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a la temperatura indicada, con una curva final de desnaturalización 55°C a 95°C (en pasos de 0,5°C/10 segundos). El nivel de expresión relativa de los GDIs se calculó utilizando β-actina como gen normalizador utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Expresión relativa del GDI} = 2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{\text{GDI}} - Ct_{\beta\text{-actina}})} \times 10^9$$

Ct: Cycle threshold (ciclo umbral)

Los cebadores se diseñaron con el programa *PerlPrimer* (Marshall, 2004). Brevemente, utilizando una secuencia de referencia del ARNm de interés obtenida de la base de datos del NCBI (NIH, MR, EE.UU.), se buscaron secuencias que abarquen zonas de unión exón-exón de tamaño entre 20 a 24 pb, y que amplifiquen fragmentos de entre 60-120 pb. Asimismo, se tuvo en cuenta que la temperatura de apareamiento sea similar entre ambos cebadores y que el sitio de unión no sea en regiones con estructuras secundarias. Una vez obtenidos los cebadores, se verificó su eficiencia realizando una PCR cuantitativa con diluciones seriadas de una muestra que exprese el ARNm en cuestión y se evaluó la linealidad de la cuantificación.

**Tabla 1.** Secuencia de cebadores utilizados para el estudio de la expresión relativa de ARNm por PCR en tiempo real.

Gen	Secuencia (5'-3')	
	Directo	Reverso
IFN- $\gamma$	AATTGGAAAGAGGAGAGTGAC	CATTCATGTCTTCCTTGATGG
IL-13	CAGTTCAACTGAAACTTCG	TCTGCAACTCAATAGTCAG
IL-4	CGACTGCACAGCAGTTCCA	AGGTTCTGTCTGAGCCGTTT
IL-5	CATCGAACTCTGCTGATAGCC	CATCGAACTCTGCTGATAGCC
$\beta$ -ACTINA	CCTGGCACCCAGCACAAT	GCCGATCCACACGGAGTACT
CCL-5	CCCATATTCCTCGGACAC	TCTTCGGGTGACAAAGC
CCL-26*	ACACGTGGGAGTGACATATCCA	GACTTTCTTGCCTCTTTTGGTAGTG
TSLP**	ATGTTCCGCATGAAAATAAGGC	GCGACGCCACAATCCTTGTA
IL-33	GACTCCTCCGAACACAGAGCTGC	AGGCCAGAGCGGAGCTTCAT
ST2s	GGCACACCGTAAGACTAAGTAG	CAATTTAAGCAGCAGAGAAGCTCC
ST2L	ATGTTCTGGATTGAGGCCAC	GACTACATCTTCTCCAGGTAGCAT

\*(Stubbs et al., 2010, p. 26)\*\*(Bao et al., 2017)

## 5. Cuantificación de proteínas solubles

Las muestras de los tejidos o biopsias se pesaron y conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en un tubo seco hasta su procesamiento. Se obtuvo el lisado proteico de las mismas a partir de la ruptura mecánica empleando un homogeneizador de tejidos en la solución de

lisis: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% v/v Nonidet P40, 10% v/v glicerol, 1μM vanadato de sodio y el inhibidor de proteasas comercial cOmplete EDTA free Protease Inhibitor (Roche, Mannheim, Alemania). La cantidad de solución agregada se calculó según el peso de la muestra:

$$5 \times \text{peso del tejido en mg} = \text{volumen de solución de lisis en } \mu\text{l}$$

Las muestras se incubaron durante 1 hora a 4°C en agitación y se centrifugaron a 15.000 xg durante 15 minutos a 4°C. Se colectó el sobrenadante y se almacenaron a -80°C.

La concentración de IL-13, IFN-γ, IL-4 e IL5 se determinó por medio de un ELISA de captura empleando equipos comerciales (R&D Systems, MN, EE.UU.) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **6. Estudio de inmunoglobulinas por microscopía de disección láser y análisis génico por PCR**

### ***6.1 Análisis de la recombinación del cambio de clase de inmunoglobulinas***

Las muestras frescas se embebieron en CRYOPLAST® y se realizaron los cortes como se describió en 3.4. Los crio-bloques se cortaron en secciones de 20 μm de espesor con criótomo y se colocaron sobre portaobjetos específicos para microscopía de disección láser. Posteriormente, las secciones de tejido fueron fijadas con etanol 70 % v/v, teñidas con hematoxilina (Bipopack, Buenos Aires, Argentina) y deshidratadas con concentraciones ascendentes de etanol. Las muestras teñidas se observaron con luz blanca por microscopía óptica y se localizaron estructuras similares a centros germinales. Las mismas fueron cortadas usando un sistema de microdisección laser LDM 6000 (Leica, IL, EE.UU). Las disecciones fueron recolectadas en solución de lisis para ARN, el cual fue extraído y transcrito a ADNc según el protocolo de la sección 4 anterior. Como control se utilizaron secciones de los PJ totales y de las biopsias de TCP en los que no se observó infiltrado inflamatorio (evaluado por microscopía con hematoxilina). En las muestras con el ADNc se evaluaron los transcritos transitorios e intermediarios que regulan la recombinación para el cambio de isotipo (**Figura 10**) y las

inmunoglobulinas maduras. Los mismos fueron analizadas por PCR, utilizando los cebadores y las temperaturas de apareamiento detallados en la

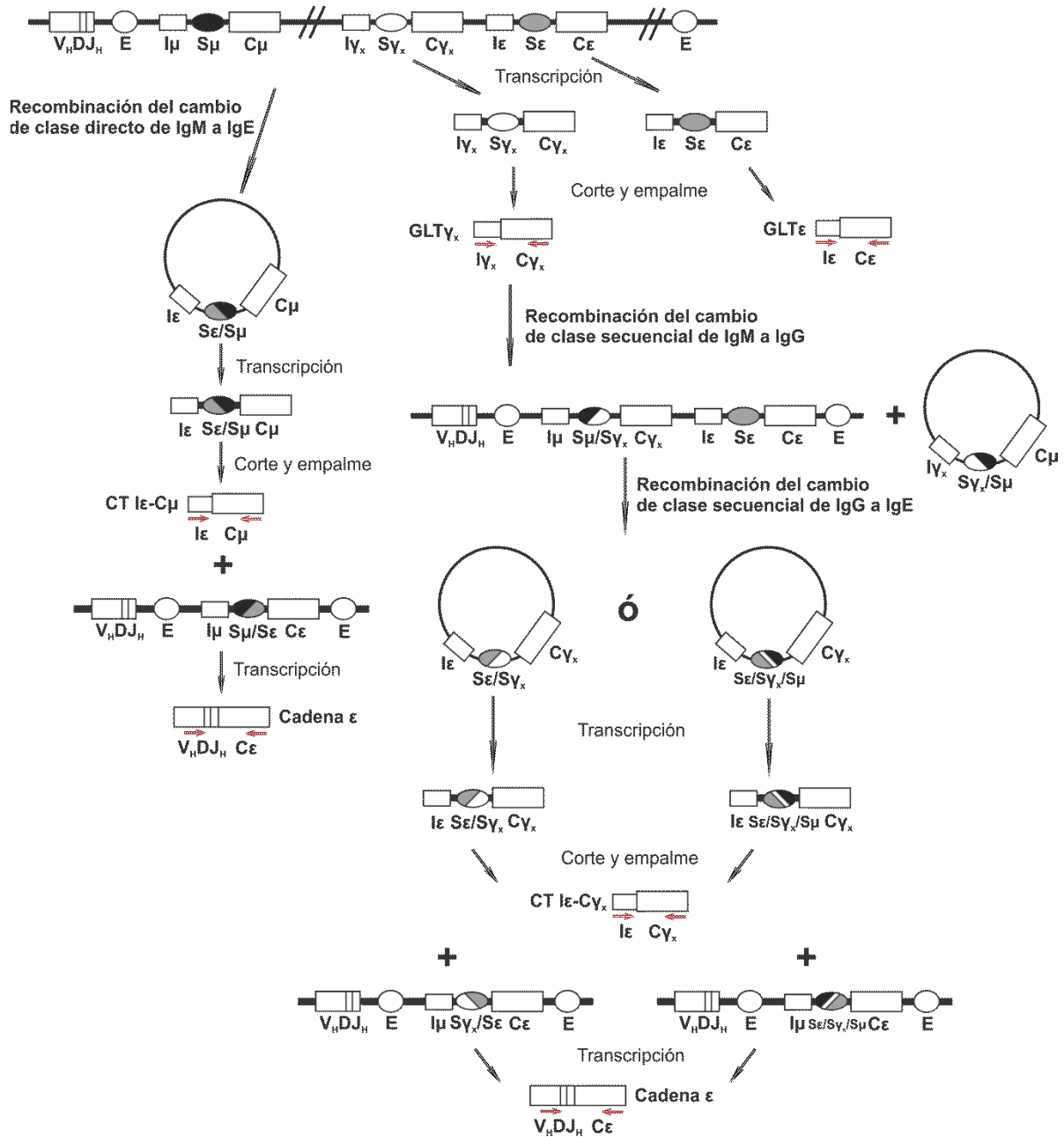
**Tabla 2.** Finalmente los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 2 % p/v en solución tampón tris-borato-EDTA, se tñieron con bromuro de etidio y se visualizaron con UV.

**Tabla 2.** Secuencia de cebadores utilizados para el estudio del cambio de isotipo por PCR.

Gen	Pasos de PCR	Secuencia (5'-3')		Temp. °C
		Directo	Reverso	
<b>AID</b>	PCR 1	GAGGCAAGAAGACACTCTGG	GTGACATTCCTGGAAGTTGC	56
	PCR 2	TAGACCCTGGCCGCTGCTACC	CAAAAGGATGCGCCGAAGCTGTCTGGAG	60
<b>GLT <math>\gamma</math>1</b>	PCR única	GATGCCAGGATGGGCACGAC	GGCATGTGTGAGTTTTGTCACAA	59
<b>GLT <math>\gamma</math>3</b>	PCR única	GATGCCAGGATGGGCACGAC	GGCACGGGGGAGG	59
<b>GLT <math>\gamma</math>4</b>	PCR única	GATGCCAGGATGGGCACGAC	GGGCATGGGGGACCATA	59
<b>GLT <math>\epsilon</math></b>	PCR única	GGCCACACATCCACAGGC	GGGGTGAAGTCCCTGGAGC	59
<b>CT <math>\mu</math>-<math>\epsilon</math></b>	PCR 1	GGGAGCTGTCCAGGAACCCGACAGAGC	GTTGCCGTTGGGGTGCTGG	66
	PCR 2	GGCCACACATCCACAGGC	GTTGCCGTTGGGGTGCTGG	60
<b>CT <math>\gamma</math>-<math>\epsilon</math></b>	PCR 1	GGGAGCTGTCCAGGAACCCGACAGAGC	CCAACCTCTTGTCCACCTTGG	66
	PCR 2	GGCCACACATCCACAGGC	CCAACCTCTTGTCCACCTTGG	60
<b>CT <math>\gamma</math>1-<math>\epsilon</math></b>	PCR 1	GGGAGCTGTCCAGGAACCCGACAGAGC	GGCATGTGTGAGTTTTGTCACAA	66
	PCR 2	GGCCACACATCCACAGGC	GGCATGTGTGAGTTTTGTCACAA	60
<b>CT <math>\gamma</math>3-<math>\epsilon</math></b>	PCR 1	GGGAGCTGTCCAGGAACCCGACAGAGC	GGCACGGGGGAGG	66
	PCR 2	GGCCACACATCCACAGGC	GGCACGGGGGAGG	60
<b>CT <math>\gamma</math>4-<math>\epsilon</math></b>	PCR 1	GGGAGCTGTCCAGGAACCCGACAGAGC	GGGCATGGGGGACCATA	66
	PCR 2	GGCCACACATCCACAGGC	GGGCATGGGGGACCATA	60
<b>Cadena <math>\epsilon</math></b>	PCR única	GACACGGCTGTGTATTACTGTGCG	CGGAGGTGGCATTGGAGG	62
<b>Cadena <math>\gamma</math>1</b>	PCR única	GACACGGCTGTGTATTACTGTGCG	GGCATGTGTGAGTTTTGTCACAA	62
<b>Cadena <math>\gamma</math>3</b>	PCR única	GACACGGCTGTGTATTACTGTGCG	TTGTGTCACCAAGTGGGGTTTTGAGC	62
<b>Cadena <math>\gamma</math>4</b>	PCR única	GACACGGCTGTGTATTACTGTGCG	GGGGTGAAGTCCCTGGAGC	62
<b>Cadena <math>\mu</math></b>	PCR única	GACACGGCTGTGTATTACTGTGCG	AGACGAGGGGGAAAAGGGTT	62
<b>Cadena <math>\delta</math></b>	PCR única	CCTCCCGAGGCGGCCTCGTGGC	GTGGCGACAGAGGGGAGCCGG	62
<b>Cadena <math>\alpha</math>1</b>	PCR única	GACACGGCTGTGTATTACTGTGCG	GGGTGGCGTTAGCGGGTCTTGG	62
<b><math>\alpha</math>2 chain</b>	PCR única	GACACGGCTGTGTATTACTGTGCG	TGTTGGCGTTAGTGGGGTCTTGCA	62
<b>HPRT1</b>	PCR única	TGACTGTCGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTCCACCAGCAAGCT	62

Temp. : Temperatura de apareamiento.





**Figura 10. Recombinación del cambio de clase directo y secuencial a IgE.**

Mecanismos involucrados en la CSR directa y secuencial en la producción de IgE. En rojo se muestran la región de unión de los cebadores utilizados para evidenciar la recombinación.

C: Región constante, I: exón I del gen de línea germinal, S: región de recombinación.

## 6.2 Estudio de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas

Las distintas familias de la región variable de la cadena pesada (VH) se estudiaron mediante PCR a partir de las muestras obtenidas por microscopía de disección láser, tejido de pólipo completo y biopsias de tejidos circundantes a los pólipos utilizando cebadores que fueron diseñados para amplificar el segmento comprendido entre la región de unión JH y VH. La temperatura de apareamiento fue de 62°C para todos los casos. En la **Tabla 3** se muestran las secuencias de los cebadores empleados. Esta metodología se realizó en colaboración con el grupo de la Dra. Mirta Giordano del IMEX.

**Tabla 3.** Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación de las diferentes familias de VH por PCR.

Gen	Secuencia (5'-3')	
	Directo	Reverso
<b>VH1/7</b>	CCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG	ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT
<b>VH2</b>	TCCTGCGCTGGTCAAAGCCACACA	ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT
<b>VH3</b>	GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA	ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT
<b>VH4</b>	CGCTGTCTCTGGTACTCCATCAG	ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT
<b>VH5</b>	GAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAA	ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT
<b>VH6</b>	CCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTG	ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT

## 7. Cultivos primarios y establecimiento de líneas celulares

### 7.1 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica y establecimiento de líneas de linfocitos B y T

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por su sigla en inglés de *Peripheral blood monuclear cell*) se aislaron utilizando un gradiente de Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, IL, EE.UU.), para el cual se diluyó la sangre anticoagulada a la mitad con PBS pH 7.4 estéril. El gradiente se realizó por centrifugación a 400xg durante 30 minutos. Las PBMCs obtenidas de cada muestra se lavaron con PBS y se dividieron en dos partes iguales, una destinada a la generación de líneas celulares B que pudieran

ser utilizadas posteriormente como CPAs singeneicas, y la otra destinada al establecimiento de líneas celulares de linfocitos T. En ambos casos, los cultivos se llevaron a cabo en placas de cultivo de 24 pocillos y fondo plano estériles (CELLSTAR, Greiner Bio-one, Kremsmünster, Austria). Todos los cultivos se realizaron a 37°C bajo atmósfera controlada de 5% CO<sub>2</sub> y humedad relativa de 95%. Las células fueron controladas periódicamente mediante observación al microscopio invertido.

#### 7.1.1. Líneas de linfocitos B (EBVs)

Las PBMCs fueron resuspendidas en 250 µl de PBS con 1 µg/ml ciclosporina A (Sigma, MO, EE.UU.) e incubadas por 5 minutos. Luego fueron inoculadas con el virus de Epstein-Barr aislado a partir de sobrenadantes de cultivo de la cepa productora B95-8, con el fin de generar líneas celulares inmortalizadas. Una vez que se observaron cúmulos de células en proliferación se transfirieron a una botella de cultivo y se mantuvieron en cultivo con medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640 – Sigma, MO, EE.UU.), suplementado con 62.4 µg/ml penicilina (Bagó, CBA, Argentina), 100 µg/ml estreptomina (Bagó, CBA, Argentina), 0,25 µg/ml de anfotericina B (Gibco® Antibiotic-Antimycotic, Thermo Fisher, MA, EE.UU.) y 10% suero fetal bovino (Gibco®, Thermo Fisher, MA, EE.UU.).

#### 7.1.2. Líneas de linfocitos T específicos de leche de bovina

Las células destinadas a estos cultivos fueron resuspendidas en 500 µl de medio de cultivo UltraCULTURE™ (Lonza, Basilea, Suiza) y divididas en volúmenes iguales en 2 fosas de una placa de cultivo de 24 fosas. Se les añadió 250 µl de medio de cultivo UCØ (medio UltraCULTURE™), suplementado con β-mercaptoetanol 50 µM (Sigma, MO, EE.UU.), L-glutamina 2 mM (Lonza, Basilea, Suiza) y antibióticos, en ausencia (control) o presencia de 1 mg/ml PLV (leche en polvo descremada La Serenísima). La concentración final celular fue de 1x10<sup>6</sup> células/ml. Las células se mantuvieron en cultivo entre 4 y 6 días; aquellos cultivos con PLV en donde se observó proliferación (cúmulos de células al microscopio), se les añadió 10 U de IL-2 humana recombinante (Preprotech, NJ, EE.UU.). Luego de 8-12 días luego del aislamiento, las células se lavaron y resuspendieron a una concentración de 1x10<sup>6</sup> células/ml en medio UCØ con 10 U/ml de rhIL-2, 1x10<sup>6</sup> PBMCs

alogénicas irradiadas (50 Gy) por ml y 10% v/v suero humano AB<sup>+</sup> y dispensadas de a 200 µl en placas fondo en U de 96 pocillos (JET BIOFIL, Cantón, China). Dos veces por semana se realizó una amplificación de los LT dividiendo a la mitad el volumen de cada fosa y añadiendo 100 µl del medio de cultivo suplementado. Una vez cada 2 semanas, se sustituyeron las PBMCs irradiadas por linfocitos B inmortalizados e irradiados del mismo paciente, pre-incubadas con leche de vaca 1mg/ml. De esta manera se amplificó la población de LT específicos de PLV y se congeló en nitrógeno líquido hasta su caracterización.

### ***7.2 Aislamiento de células epiteliales de pólipos colorrectales y análisis génico***

Los pólipos fueron lavados durante 30 minutos en HBSS 1X (Hank's Balanced Salt Solution, GIBCO, Thermo Fisher, MA, EE.UU.) suplementado con antibióticos, para luego proceder a la remoción de la capa de células epiteliales mediante agitación vigorosa durante 20 minutos a 37°C en HBSS suplementado con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,5 mM y ditiotreitól (DTT) 1 mM. El sobrenadante enriquecido en células epiteliales fue retirado por aspiración y centrifugado a 500xg. Se descartó el sobrenadante y las células del pellet fueron lavadas y resuspendidas en solución de lisis suplementada con β-mercaptoetanol, correspondiente al primer paso del kit de extracción de ARN total ya mencionado para el aislamiento y se conservaron a -80°C hasta realizar la extracción. Una vez aislado el ARN y obtenido el ADNc como ya se mencionó, se realizó el análisis de los transcritos de interés.

### ***7.3 Aislamiento de células de la lámina propia de pólipos colorrectales***

El tejido remanente del aislamiento de células epiteliales, el estroma o lámina propia, se seccionó en segmentos de 1 mm empleando bisturíes, y se digirió durante 30 minutos a 37 °C con 1 mg/ml de colagenasa tipo I (Roche, IN, EE.UU.) y 10 U/ml de DNasa recombinante de páncreas bovino tipo I (Roche, IN, EE.UU.) en RPMI completo con antibióticos. Posteriormente, se filtró la suspensión celular resultante con un filtro de 80 µm (BD Falcon, NJ, EE.UU.) y se lavaron las células con medio de cultivo. La

suspensión enriquecida en células de la lámina propia fue centrifugada a 500xg y las células fueron resuspendidas en distintos medios dependiendo del procedimiento a realizar.

#### **7.4 Establecimiento de línea de linfocitos T de lámina propia**

El pellet obtenido fue resuspendido en medio UCØ ( $1 \times 10^6$  células/ml) suplementado con 10 U/ml rh IL-2, 10 ng/ml rh IL-7 (Preprotech, NJ, EE.UU.), 10 ng/ml rh IL-15 (Preprotech, NJ, EE.UU.), y 10% v/v suero humano AB<sup>+</sup>. La suspensión se dividió de a 200 µl en placas de 96 fosas fondo en U en dos grupos: control (solo medio de cultivo) o con el agregado de 1mg/ml PLV. Entre los días 6 y 8 luego del aislamiento, las células fueron lavadas y resuspendidas a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en el medio ya mencionado suplementado con  $1 \times 10^6$  PBMCs alogénicas irradiadas por ml. La suspensión fue dispensada de a 200 µl en placas fondo en U y amplificada dos veces por semana dividiendo a la mitad el volumen de cada fosa y añadiendo 100 µl del medio de cultivo con los suplementos recién mencionados. Una vez, cada 2 semanas, las PBMCs irradiadas se sustituyeron por células B inmortalizadas e irradiadas del mismo paciente, pre-incubadas con leche de vaca 1mg/ml.

### **8. Análisis de las células obtenidas por citometría de flujo multiparamétrica**

#### **8.1 Estudio de las poblaciones celulares**

Las células obtenidas en 7.3 (en fresco y sin realizar cultivo previo) se bloquearon con suero humano inactivado y marcaron con anticuerpos conjugados a diferentes fluorocromos durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron y resuspendieron en PBS suplementado con 10% SFB para ser analizadas en un citómetro FACSCalibur (BD Biosciences, NJ, EE.UU.). Los datos se analizaron con el software FlowJo 7.6.2.

Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: anti-CD3 humano conjugado a FITC (1:50, Clon OKT3, eBioscience Invitrogen, CA, EE.UU.), anti-CD4 humano conjugado a PE (1:25, Clon RPA-T4, eBioscience Invitrogen, CA, EE.UU.) y anti-CD8 humano conjugado a APC (1:25, Clon RPA-T8, BD Pharmigen, NJ, EE.UU.). Además, para evaluar

la viabilidad celular se utilizó 7-AAD (BD Pharmingen, NJ, EE.UU.) y los correspondientes controles de isotipo para el resto de las marcas.

### **8.2 Ensayos de proliferación celular y secreción de citoquinas**

El análisis de la proliferación de los linfocitos T frente a PLV fue evaluada utilizando el colorante éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE, por su sigla en inglés de *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*) (Invitrogen, CA, EE.UU.) por citometría de flujo. Para esto, las líneas de LT establecidas fueron incubadas por un período de 10 días, durante el cual no se les agregó ni suplementó el medio de cultivo, con el objeto de detener la proliferación. Al momento del ensayo, primero, se pre-incubaron las EBVs obtenidas con las PLV durante 16 horas y se irradiaron, lo cual detiene su proliferación. Para la marcación con CFSE las células de las líneas T se lavaron con PBS y resuspendieron en PBS con CFSE 1  $\mu$ M a razón de  $1 \times 10^6$  células/ml, luego se incubaron en oscuridad a 37°C durante 15 minutos con agitación cada 5 minutos. Posteriormente, se llevaron al triple de volumen con medio RPMI completo, se incubaron en oscuridad 5 minutos y se realizaron 3 lavados con el mismo medio. Finalmente, las células se resuspendieron en medio AIM-V (Gibco Antibiotic-Antimycotic, Thermo Fisher, MA, EE.UU.) ( $1 \times 10^6$  células/ml). Para evaluar la proliferación específica se utilizaron placas de 96 pocillos fondo en U (Jet Biofil, Cantón, China) en donde se colocaron  $1 \times 10^5$  LT marcadas con CFSE y  $1 \times 10^5$  EBVs singeneicas. Los ensayos se realizaron por triplicado utilizando los siguientes estímulos:

- Control negativo: medio de cultivo AIM-V.
- Control positivo: fitohemaglutinina (PHA por su sigla en inglés de *Phytohaemagglutinin*) 0,5 % (Sigma, MO, EE.UU.) e IL-2 10 U/ml.
- Estímulo: PLV 1  $\mu$ g/ml.

Luego de 72 horas de cultivo a 37°C se colectó el sobrenadante y se almacenó a -80°C para la posterior medida de IL-13, IFN- $\gamma$ , e IL-5 por ELISA de captura comercial como se indicó previamente en 5, para caracterizar el fenotipo T ( $T_H1$  o  $T_H2$ ). Las células se centrifugaron a 300xg durante 10 min, se bloquearon con suero humano y se

incubaron con anti-CD3 humano conjugado a APC (1:50, Clon OKT3, eBioscience Invitrogen, CA, EE.UU.) durante 30 minutos en oscuridad y a 4°C. Se utilizó 7-AAD (BD Pharmingen, NJ, EE.UU.) como marcador de viabilidad celular. Finalmente, las células se lavaron, se resuspendieron en PBS con SFB 5% v/v y se adquirieron en el citómetro de flujo FACSCalibur.

## 9. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.0. Las comparaciones entre los distintos ensayos se hicieron utilizando la prueba *t*-student pareado o no según corresponda. La elección entre paramétrico o no-paramétrico se basó en el resultado de la prueba de D'Agostino-Pearson. Los valores de *p* se detallan en cada gráfico, igualmente se consideró un valor de  $p < 0.05$  como significativo. Cada test se detalló en las figuras correspondientes.

# RESULTADOS



## Capítulo 1

# Evaluación clínica de los pacientes y caracterización de los pólipos juveniles

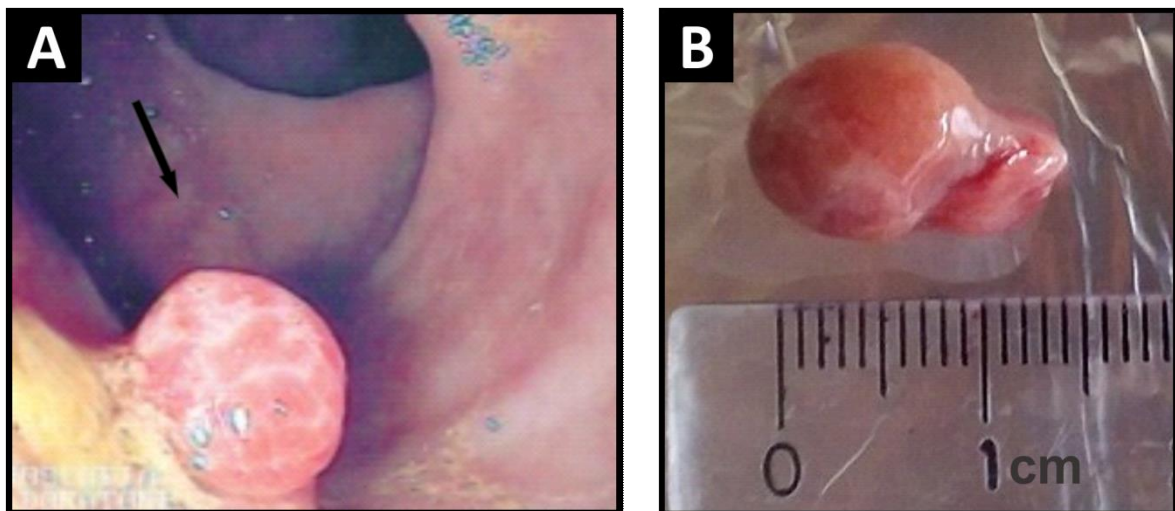
### Objetivos específicos

- Evaluar la condición alérgica de los pacientes que presentan sangrado rectal y pólipos juveniles colorrectales.
- Caracterizar el infiltrado inflamatorio presente en los pólipos juveniles y compararlo con las biopsias del TCP.

### 1. Caracterización de la cohorte de pacientes y resultados hallados

Entre el año 2015 y 2019 asistieron al Hospital de Niños Sor María Ludovica de La Plata 211 pacientes que presentaban sangrado rectal como único síntoma, a excepción de 35 niños que también refirieron dolor abdominal. En todos los pacientes se realizó una video-colonoscopía y en el 47.4% (n=100) se observaron PJs e HNL en el intestino grueso, mientras que en el 45.5% restante (n=96) solo se observó HNL en la misma zona, el 2.8% (n=6) presentó enfermedad inflamatoria intestinal, en el 1.9% (n=4) poliposis adenomatosa familiar y el 1.9% (n=4) no presentó ninguna anormalidad. Cabe destacar que parte de los pacientes que solo presentaban HNL, también mostraron cicatrices compatibles con la formación y probable desprendimiento posterior de un pólipo. Por lo tanto, consideramos que el sangrado se originó por el pólipo colorectal y/o la HNL.

En el presente trabajo se estudiaron 100 PJ, y se encontró que la totalidad de los mismos fueron pedunculados y de un tamaño variable de entre 0.5 a 2.10 cm de diámetro (mediana= 1.20 cm RIC=0.77-1.70 cm) (**Figura 11**). La ubicación predominante de los mismos fue en recto-sigmoideo en el 93.0% de los casos (n=93), mientras que un 5.0% se lo removió del colon transverso, y el 2.0% restante, del colon ascendente. El 76.0% (n=76) de los pólipos se presentaron de forma solitaria, mientras que en el 24.0% restante (n=24) se presentaron de 2 a 5 pólipos. En la totalidad de los pacientes los pólipos fueron extraídos durante la colonoscopia como medida preventiva frente a la posibilidad de desarrollo tumoral, y un fragmento de los mismos fue remitido para realizar los estudios que aquí se presentan. El análisis histopatológico mostró que el 100% de los pólipos fueron negativos para marcadores tumorales, ni mostraron una histología compatible con este tipo de procesos. En la **Figura 11** se muestra un caso representativo de un paciente con pólipos colorrectales.



**Figura 11. Pólipos Juveniles durante una colonoscopia.**

**(A)** Fotografía de un pólipo juvenil. La flecha indica zonas de HNL leve.

**(B)** Imagen representativa del tamaño promedio de un pólipo juvenil.

Con el objetivo de determinar la condición alérgica de los pacientes, a la totalidad de los mismos se confeccionó una historia clínica, pruebas cutáneas, serología para IgE y recuento de eosinófilos periféricos. En la **Tabla 4** se resumen los resultados obtenidos de los pacientes con PJ y en la

Tabla 5 se muestran los resultados de los pacientes únicamente con HNL. La información completa de cada uno de los pacientes se incluyó en la **Tabla 6**. Debido a limitaciones experimentales, ciertas determinaciones fueron realizadas en un número menor de pacientes (información detallada en la tabla, columna n), dado que la cantidad de muestra no fue suficiente.

Tabla 4. Pacientes que presentan PJ e HNL

n	Características	Valor		
100	Edad (años) mediana, (RIC)	5.5 (3.0 – 7.0)		
100	Niños, n (%)	65 (65)		
50	Historia de alergia	Personal	Familiar	Personal o familiar
	Condición atópica, n (%)	20 (40)	19 (38)	30 (60)
	<i>Rinitis alérgica</i>	4 (8)	3 (6)	-
	<i>Dermatitis atópica</i>	6 (12)	2 (4)	-
	<i>Asma</i>	4 (8)	9 (18)	-
	<i>Alergia a leche de vaca</i>	3 (6)	0 (0)	-
	<i>Otras alergias</i>	5 (10)	6 (12)	-
78	Eosinófilos en sangre mediana, (RIC)	5.4 (2 - 8)		
85	IgE total (UI/ml) mediana, (RIC)	204 (51 - 437)		
85	Nivel de IgE total > 60 UI/ml, n (%)	62 (72.9)		
77	IgE específica a PLV, n (%)	<b>62 (80.5)</b>		
		<i>Clase 1*</i>	26 (33.7)	
		<i>Clase 2*</i>	15 (19.5)	
		<i>Clase 3*</i>	15 (19.5)	
		<i>Clase 4*</i>	6 (7.8)	
50	IgE específica a Maní, n (%)	<b>44 (88.0)</b>		
		<i>Clase 1*</i>	18 (36.0)	
		<i>Clase 2*</i>	13 (26.0)	
		<i>Clase 3*</i>	2 (4.0)	
		<i>Clase 4*</i>	11 (22.0)	
56	IgE específica a Soja, n (%)	<b>41 (73.2)</b>		
		<i>Clase 1*</i>	12(21.5)	
		<i>Clase 2*</i>	15 (26.8)	
		<i>Clase 3*</i>	3 (5.3)	
		<i>Clase 4*</i>	11 (19.6)	

UI/ml: Unidades internacionales por mililitro de suero. RIC: Rango Intercuartilo

\* Clase: semicuantificación del nivel de IgE específica en suero. Clase 0 corresponde a un nivel normal de IgE y clase 4 al máximo nivel de IgE específica.

Tabla 5. Pacientes que presentan HNL

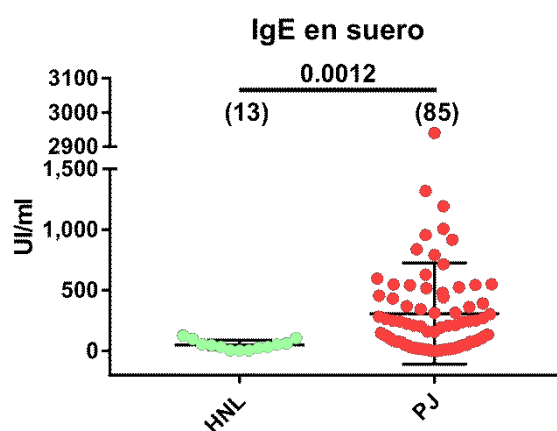
Características, n=13			Valor
Edad (años) mediana, (RIC)			5.0 (3.0 – 9.5)
Niños, n (%)			9 (69)
Historia de alergia	Personal	Familiar	Personal o familiar
Condición atópica, n (%)	1 (8)	1 (8)	2 (15)
<i>Rinitis alérgica</i>	0 (0)	0 (0)	-
<i>Dermatitis atópica</i>	0 (0)	0 (0)	-
<i>Asma</i>	1 (8)	1 (8)	-
<i>Alergia a leche de vaca</i>	0 (0)	0 (0)	-
<i>Otras alergias</i>	0 (0)	0 (0)	-
Eosinófilos en sangre mediana, (RIC)			No medido
IgE total (UI/ml) mediana, (RIC)			45 (22 – 101)
Nivel de IgE total > 60 UI/ml, n (%)			4 (31)
IgE específica a PLV, n (%)			<b>2 (15)</b>
			<i>Clase 1*</i> 1 (8)
			<i>Clase 2*</i> 0 (0)
			<i>Clase 3*</i> 1 (8)
			<i>Clase 4*</i> 0 (0)
IgE específica a Maní, n (%)			<b>3 (23)</b>
			<i>Clase 1*</i> 2 (15)
			<i>Clase 2*</i> 1 (8)
			<i>Clase 3*</i> 0 (0)
			<i>Clase 4*</i> 0 (0)
IgE específica a Soja, n (%)			<b>3 (23)</b>
			<i>Clase 1*</i> 1 (8)
			<i>Clase 2*</i> 0 (0)
			<i>Clase 3*</i> 2 (15)
			<i>Clase 4*</i> 0 (0)

UI/ml: Unidades internacionales por mililitro de suero

RIC: Rango Intercuartilo

\* Clase: semicuantificación del nivel de IgE específica en suero. Clase 0 corresponde a un nivel normal de IgE y clase 4 al máximo nivel de IgE específica.

Considerando los pacientes en los que se pudieron realizar la totalidad de las determinaciones, pudimos observar que el 60% de los mismos presentaron antecedentes familiares o personales de alergia, siendo el asma el trastorno más frecuente, seguido por dermatitis atópica y rinitis alérgica. El diagnóstico de una alergia alimentaria se basó en la anamnesis, prueba cutánea y determinaciones serológicas. Dado que en Argentina no se realiza la prueba diagnóstica confirmatoria por excelencia, desafío oral doble ciego con placebo, la historia clínica es lo que definió básicamente el diagnóstico. La dieta de restricción de lácteos indicada a los pacientes en los que se encontró pólipos constituyó también una herramienta diagnóstica. La prueba cutánea mostró que de 18 pacientes con PJ en los que se pudo realizar, solo el 16.6% (n=3) mostraron una prueba positiva con caseína y/o lactoglobulina y 5.5% (n=1) a trigo. Con respecto a las determinaciones en sangre, sobre 78 pacientes a los que se les realizó un hemograma, encontramos que el 45.3% presentó eosinofilia (valor mayor a 5%); en 85 pacientes se realizó serología para IgE y encontramos que el 88.0% de los pacientes presentó IgE específica a leche de vaca, soja o maní positivas, y un 72.9% presentó IgE total elevada de acuerdo a la edad (mayor a 60 UI/ml). Al comparar estos valores con los presentados por los pacientes con solo HNL, se encontró que éstos muestran una cantidad significativamente menor de IgE total en suero (**Figura 12**), y solo el 23% de los pacientes presentaron IgE específica a leche, soja o maní; la mayoría de estos pacientes solo con HNL no presentó antecedentes personales y/o familiares de alergia o atopía.



**Figura 12. Medida de IgE total en suero.**

Evaluación de IgE total en suero de pacientes con HNL o con PJ e HNL (PJ). Prueba estadística *t*-Student pareado no paramétrico. Los gráficos muestran la media  $\pm$  SEM y el número de mediciones realizadas (n).

Tabla 6. Información completa de los pacientes incluidos en el trabajo.

Paciente	Edad (años)	Sexo	Eosinófilos en sangre (%)	IgE total (UI/ml)	IgE esp. Leche (clase)	IgE esp. soja (clase)	IgE esp. maní (clase)	SPT	Síntomas alérgicos	Antecedentes familiares
PL-01	5	F	17	431	3	-	-	(+)	No	Asma
PL-02	7	F	8	212	3	-	-	(-)	Rinitis	Asma
PL-03	3	M	7	245	2	-	-	(+)	-	-
PL-04	4	M	2	791	3	-	-	-	Dermatitis	Dermatitis
PL-05	-	M	-	243	4	-	-	-	-	-
PL-06	3	M	6	479	1	-	-	-	-	-
PL-07	3	M	14	-	-	-	-	-	-	-
PL-08	2	M	12	1000	3	-	-	-	-	-
PL-09	3	M	-	18	2	-	-	-	Dermatitis	No
PL-10	3	F	9	226	4	-	-	(-)	Dermatitis	Asma
PL-11	3	F	3	0	2	-	-	-	-	-
PL-12	6	F	22	-	-	-	-	-	No	No
PL-13	6	M	-	1000	3	-	-	-	Urticaria	No
PL-14	3	M	3	391	2	-	-	-	Dermatitis	No
PL-15	4	M	3	549	1	2	-	(-)	No	No
PL-16	6	F	0	76	3	4	-	-	No	Atopía
PL-17	6 m	M	3	0	0	-	-	(-)	ALV	No
PL-18	5	F	9	98	3	-	-	-	-	-
PL-19	4	M	2	29	1	-	-	-	-	-
PL-20	3	F	2	51	3	-	-	-	Asma, rinitis	Asma, rinitis
PL-21	6	M	3	20	4	-	-	-	-	-
PL-22	3	M	7	76	2	-	-	-	Dermatitis	Asma
PL-23	-	M	-	51	1	-	-	-	-	-
PL-24	4	F	5	50	2	-	-	(-)	No	Dermatitis
PL-25	5	M	14	304	1	-	-	-	-	-
PL-26	3	M	3	-	-	-	-	-	-	-
PL-27	3	F	2	-	-	-	-	-	-	-
PL-28	11	M	-	249	-	-	-	-	-	-
PL-29	6	M	6	0	0	-	-	(-)	No	No
PL-30	4	M	2	19	0	-	-	-	-	-
PL-31	3	M	2	517	-	-	-	-	-	-
PL-32	10	M	2	457	0	-	-	-	No	No
PL-33	10	F	3	-	-	-	-	-	No	No
PL-34	4	M	3	-	-	-	-	-	-	-
PL-35	7	M	3	-	-	-	-	-	-	-
PL-36	8	F	3	-	-	-	-	-	-	-
PL-37	14	F	3	-	-	-	-	-	-	-



PL-38	5	M	2	-	-	-	-	-	-	-
PL-39	10	M	3	70	0	-	-	-	-	-
PL-40	1	F	12	597	1	-	-	-	-	-
PL-41	6m	M	1	11	-	-	-	(-)	Dermatitis	No
PL-42	7	M	8	125	-	-	-	-	Urticaria	No
PL-43	5	M	3	-	-	-	-	-	Asma	Asma
PL-44	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-
PL-45	7	M	-	23	0	-	-	-	-	-
PL-46	-	M	-	195	-	-	-	-	-	-
PL-47	9	F	2	-	-	-	-	-	-	-
PL-48	3	M	5	543	-	-	-	-	-	-
PL-49	3	M	2	78	0	-	-	-	No	No
PL-50	-	F	-	204	-	-	-	-	-	-
PL-51	4	F	2	252	-	-	-	(-)	No	No
PL-52	4	M	2	148	-	-	-	(-)	No	No
PL-53	6	F	4	213	1	-	-	(-)	No	No
PL-54	3	M	9	525	1	-	-	-	No	Atopía
PL-55	5	M	2	107	2	-	-	(-)	No	No
PL-56	6	F	2	239	1	-	-	(-)	No	No
PL-57	3	M	6	210	3	-	-	-	Rinitis	Atopía
PL-58	8	F	2	271	2	-	-	-	No	No
PL-59	4	F	5	11	2	-	-	-	Atopía	No
PL-60	-	M	-	158	2	-	-	-	-	-
PL-61	5	M	2	25	0	-	-	-	No	No
PL-62	5	F	2	32	1	-	-	-	No	No
PL-63	5	M	6	282	0	0	0	-	No	No
PL-64	4	M	12	313	0	0	0	-	No	No
PL-65	5	M	5	86	1	1	1	-	Alergia a hormigas	No
PL-66	4	F	5	628	1	2	2	-	No	Atopía
PL-67	3	M	3	716	2	4	4	-	No	No
PL-68	3	F	2	918	3	4	4	-	No	No
PL-69	-	F	-	46	1	-	-	-	-	-
PL-70	-	F	-	104	4	0	0	-	-	-
PL-71	4	M	2	82	1	1	0	-	No	Asma
PL-72	4	M	2	15	4	2	0	(-)	No	No
PL-73	7	M	2	-	-	-	-	-	No	No
PL-74	4	M	8	369	4	4	4	-	ALV	No
PL-75	4	M	22	363	1	3	4	-	-	-
PL-76	3	F	3	3	0	0	0	-	-	-
PL-77	7	M	12	2940	2	3	4	-	-	-
PL-78	5	F	2	14	1	1	-	-	-	-
PL-79	3	M	2	15	2	1	3	-	-	-
PL-80	8	M	13	1318	0	1	1	-	-	-
PL-81	6	M	-	315	1	-	-	-	-	-

PL-82	4	M	12	838	1	2	2	-	Alergia a hormigas	No
PL-83	6	M	10	264	1	1	2	-	-	-
PL-84	6	M	5	9	1	1	2	-	-	-
PL-85	5	M	-	544	2	2	3	-	-	-
PL-86	-	F	3	161	1	1	2	-	ALV	Urticaria
PL-87	-	F	-	75	1	2	2	-	-	-
PL-88	9	M	-	443	0	0	0	-	-	-
PL-89	14	F	8	-	-	-	-	-	Asma	No
PL-90	9	F	-	10	1	1	1	-	No	Rinitis
PL-91	4	M	4	43	1	1	1	-	-	-
PL-92	6	F	-	120.9	1	1	1	-	-	-
PL-93	8	F	2	1193	1	1	1	-	-	-
PL-94	4	M	-	344	1	1	2	-	No	Asma, penicilina
PL-95	8	M	-	133	1	1	2	-	-	-
PL-96	9	F	2	132	1	0	0	(-)	No	Rinitis
PL-97	-	M	22	2500	1	1	0	-	-	-
PL-98	12	M	-	1007	1	1	1	-	-	-
PL-99	10	M	9	957	1	1	3	(-)	Asma, rinitis	Asma
PL-100	4	M	-	547	0	1	1	(-)	No	No
C-01	11	F	-	33	0	1	3	(-)	No	No
C-02	6	M	-	107	0	0	0	(-)	No	No
C-03	5	M	-	53	3	0	0	(-)	No	No
C-04	12	M	-	124	0	0	0	(-)	No	No
C-05	4	M	-	20	0	0	0	(-)	No	No
C-06	7	M	-	2	1	0	0	(-)	No	No
C-07	10	M	-	98	0	0	0	(-)	No	No
C-08	1	F	-	23	0	0	0	(-)	No	No
C-09	2	F	-	45	0	0	0	(-)	No	No
C-10	9	M	-	59	0	2	3	(-)	No	Asma
C-11	4	M	-	35	0	0	0	(-)	Asma	No
C-12	3	F	-	105	0	0	0	(-)	No	No
C-13	3	M	-	5	0	1	1	(-)	No	No

PL: Paciente con pólipos juveniles.

C: Pacientes con hiperplasia nodular linfoide

M: Masculino. F: Femenino

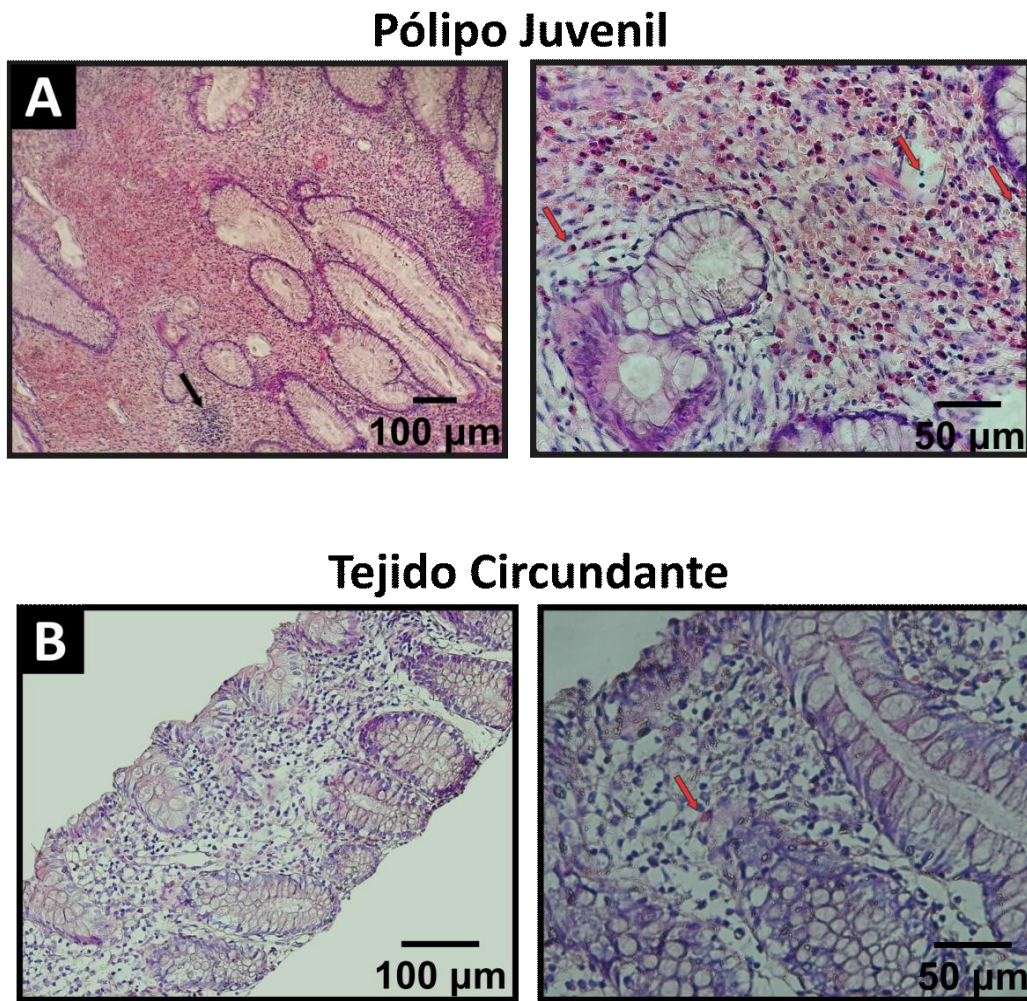
Teniendo en cuenta los resultados mencionados, a 50 de los 100 pacientes incluidos en el trabajo se les indicó una dieta de restricción libre de PLV. Solo 9 pacientes retornaron al control médico 1 año después, y 6 de ellos no presentaron recidiva. Los 3 restantes mostraron recurrencia de pólipos; del interrogatorio surgió que 2 de ellos no siguieron la dieta de forma estricta, mientras que no disponemos de datos del paciente restante.

Con estos resultados, se puede concluir que los pacientes que presentan sangrado rectal, HNL y PJ (n=100) presentaron antecedentes de alergia (60%) y reflejaron una sensibilización a alérgenos alimentarios (80%) que no desencadena una respuesta cutánea (17%). Asimismo, con los muy limitados casos en que no respetaron la dieta de exclusión podríamos inferir que el estímulo alergénico promovió la recidiva de los PJ. Por el contrario, los pacientes que presentaron sangrado rectal y HNL (n=13 pacientes evaluados) no mostraron prácticamente antecedentes de alergia (15%) ni sensibilización a alérgenos alimentarios.

## **2. Caracterización de los pólipos colorectales removidos**

### **2.1. Análisis histológico**

Con el objetivo de realizar un análisis histológico de los tejidos intestinales, una porción de los pólipos y de la biopsia del TCP se incluyeron en parafina y se tiñeron con H&E. Dado que en niños sanos no se indica la colonoscopia de control, la muestra de TCP la empleamos como control interno de cada paciente. En **Figura 13A** se puede observar que los PJ muestran características propias de este tipo de tejidos, tales como una distribución desordenada de las criptas, dilatación quística de las mismas, hemorragia y una lámina propia con un infiltrado inflamatorio denso compuesto por células mononucleares, mastocitos, neutrófilos y eosinófilos (Klos y Dharmarajan, 2016). Por el contrario, el TCP (panel B) presentó una distribución normal de las criptas, escasos acúmulos linfoides y una cantidad reducida de eosinófilos. Asimismo, y como mencionamos anteriormente, no se observaron alteraciones histológicas compatibles con desarrollos tumorales.



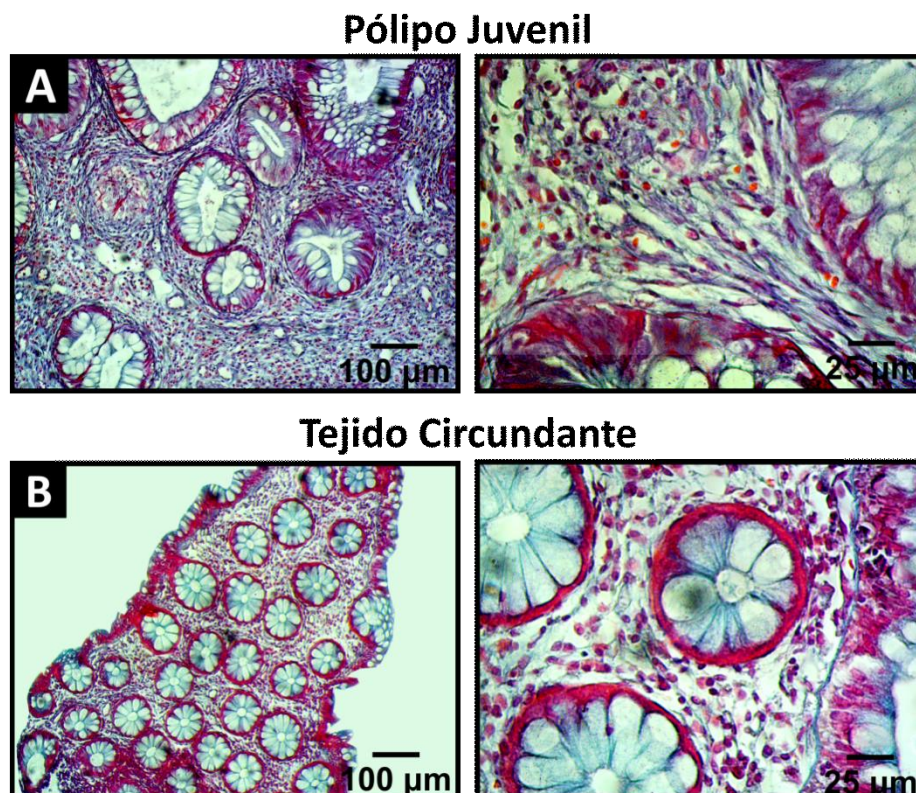
**Figura 13. Análisis histológico mediante la tinción de hematoxilina y eosina.**

Imágenes representativas de PJ (n=50) (A) y TCP (n=20) (B). Las imágenes de la derecha muestran en detalle el infiltrado celular presente en cada tejido.

La flecha negra señala un cúmulo linfoide y las flechas rojas eosinófilos representativos.

Por lo tanto, pudimos observar que el estroma del pólipo presentó un infiltrado celular muy marcado, y diferente del encontrado en el tejido adyacente, en el que la distribución celular corresponde a la de un colon normal o no inflamado.

Es de amplio conocimiento que la inflamación sostenida en el tiempo, inflamación crónica, puede desencadenar un proceso de fibrosis, la cual, una vez establecida, puede progresar de forma independiente con la consecuente pérdida de la función del tejido (Speca et al., 2012). Dada la consistencia de los pólipos, que observamos durante su procesamiento, estudiamos la fibrosis mediante la tinción tricrómica de Masson y encontramos una marcada fibrosis en la gran mayoría de los PJ. Imágenes representativas de PJ y TCP se muestran en la **Figura 14**. Podemos observar que en el tejido colónico del TCP, el colágeno (color azul), se distribuye alrededor del tejido vascular o por debajo de las criptas, mientras que en el pólipo se observa una distribución amplia en toda la lámina propia y en cantidades marcadamente incrementadas. Asimismo, el estroma de los PJ muestra expresión de queratina (rojo o café), tanto en la lámina propia, como en el compartimento epitelial, específicamente en los colonocitos.



**Figura 14. Análisis de fibrosis mediante la tinción tricrómica de Masson**

Imágenes representativas de PJ (n=5) (A) y TCP (n=5) (B).

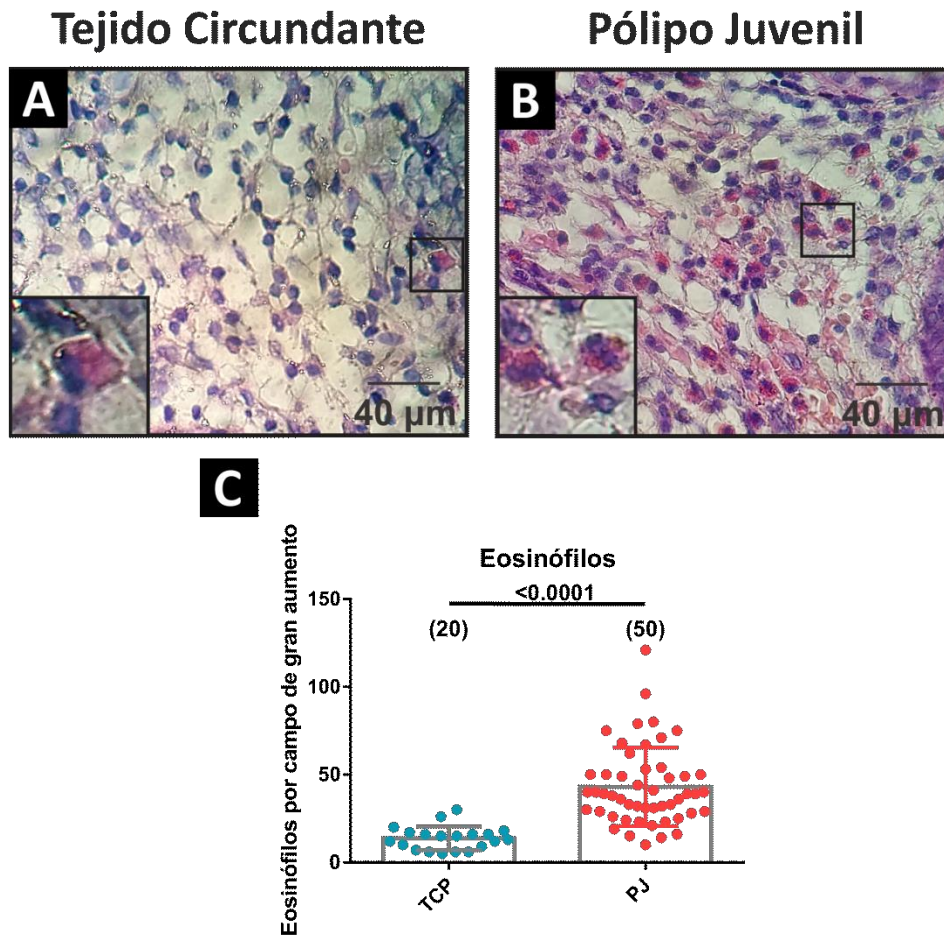
Las fibras de colágeno se observan de color azul, los núcleos marrones y los citoplasmas, la queratina y las fibras musculares de color rojo o café.

Con los resultados obtenidos hasta el momento se puede concluir que los PJs, a diferencia del TCP, muestran un denso infiltrado inflamatorio caracterizado principalmente por células mononucleares y una extensa y pronunciada acumulación de fibras de colágeno.

## **2.2. Estudio del infiltrado eosinofílico**

Los eosinófilos son células de la inmunidad innata que se encuentran en la lámina propia intestinal en homeostasis y en procesos inflamatorios (infecciones, tumores y enfermedades alérgicas). En reacciones alérgicas IgE-dependientes e IgE-independientes el número de eosinófilos en el tejido blanco aumenta significativamente (Weller y Spencer, 2017). En particular, en el colon sigmoideo y recto, la frecuencia de eosinófilos es mayor que en el resto de las porciones del tracto intestinal. Un valor de 32 eosinófilos por campo de gran aumento se utiliza como valor límite para definir un infiltrado eosinofílico en intestino (DiTommaso et al., 2019). Sin embargo, este valor debe validarse para cada patología. Con el objetivo de cuantificar el número de eosinófilos en los PJ y en el TCP, se cuantificó mediante la tinción con H&E el número de células con citoplasma de color rosa y núcleo bilobulado, correspondiente a los eosinófilos. En la **Figura 15** se muestran las tinciones representativas de PJ y TCP, y el análisis de 50 y 20 muestras, respectivamente, que nos permitió concluir que los PJ presentan un infiltrado eosinofílico con una media de  $43.06 \pm 3.16$  eosinófilos por campo de gran aumento. Este valor se encontró significativamente mayor al hallado en el TCP ( $13.75 \pm 1.49$  eosinófilos por campo de gran aumento).





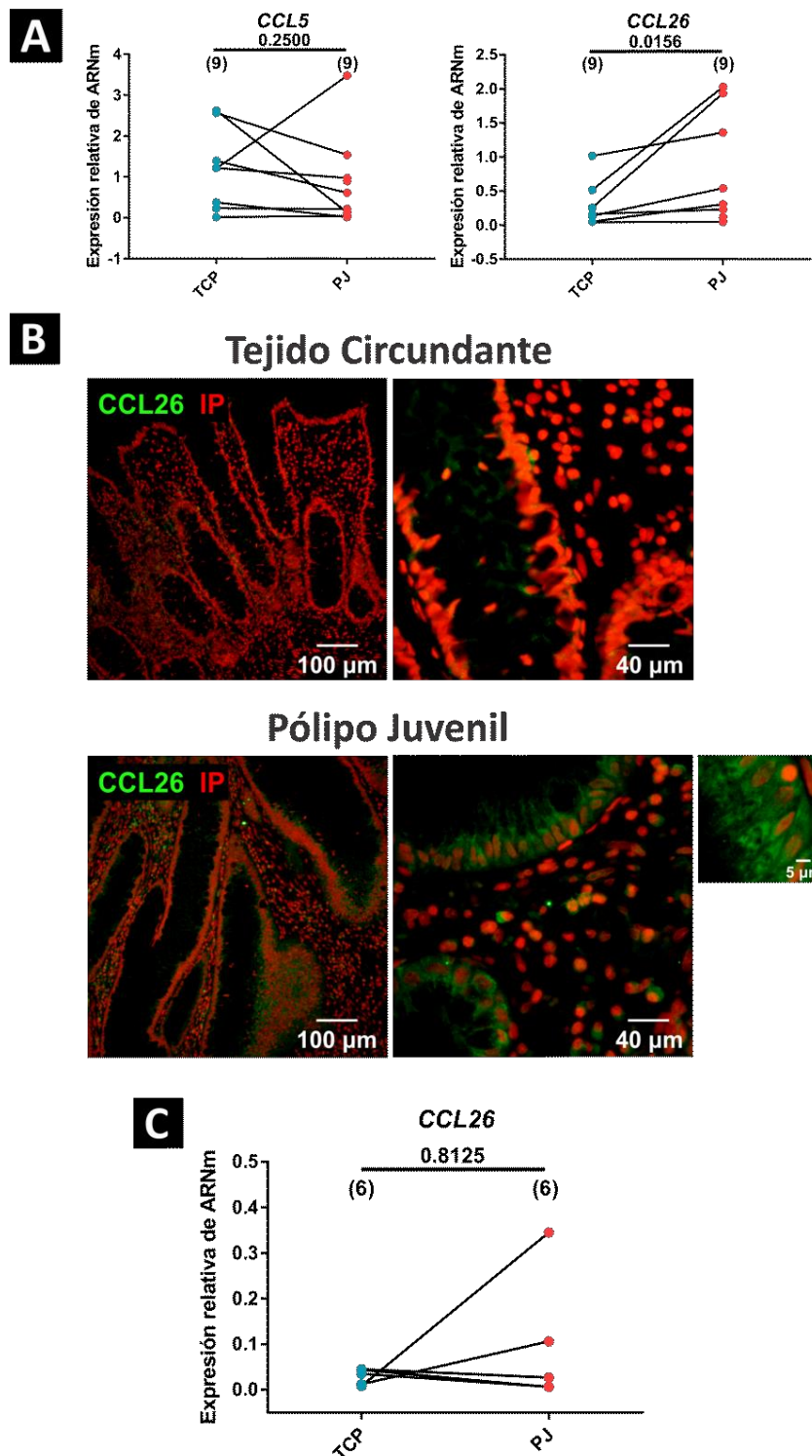
**Figura 15. Análisis del infiltrado de eosinófilos en los pólipos juveniles**

Imágenes representativas de una tinción con H&E de PJ (n=50) (A) y TCP (n=20) (B). Se muestran en recuadros los eosinófilos con un núcleo bilobulado y un citoplasma rosado. El recuento de los mismos se presenta en el gráfico (C). Prueba estadística *t*-Student no pareado para distribuciones no paramétricas. El gráfico muestra la media  $\pm$  SEM y el número de mediciones realizadas(n).

Por lo tanto, este análisis nos permitió caracterizar el infiltrado eosinofílico exclusivamente en los PJ. Sobre la base de este hallazgo estudiamos la expresión de quimioquinas. Existe una gran variedad de quimioquinas responsables de la atracción de los eosinófilos desde la médula ósea o desde sangre periférica a los tejidos, sin embargo solo algunas de ellas han sido asociadas a respuestas alérgicas. Entre ellas se destaca CCL5 o RANTES, una quimioquina que es expresada de forma constitutiva en pacientes con asma y constituye un potente quimioattractante de eosinófilos durante la inflamación alérgica de las vías respiratorias (Koya et al., 2006). Por otro lado, también se ha encontrado que CCL26 o eotaxina-3, principal quimioquina atrayente de eosinófilos a los tejidos, se expresa en cantidades significativamente elevadas en

esofagitis eosinofílica alérgica y su nivel de expresión se correlaciona con la hiper-eosinofilia del tejido. Basándonos en estos datos, el primer paso fue evaluar la expresión de CCL5 y de CCL26 por PCR en tiempo real, y encontramos que la expresión relativa de transcritos que codifican para CCL5 no presentó diferencias significativas entre PJ y TCP del mismo paciente; en cambio, la expresión de CCL26 fue significativamente mayor en los PJ comparado al hallado en TCP de cada paciente (**Figura 16A**). Posteriormente, y para confirmar este hallazgo, analizamos por microscopía confocal la producción y distribución de CCL26 en los tejidos. Como se puede observar en la **Figura 16B**, la expresión de esta quimioquina se encuentra incrementada en el epitelio de las criptas de los pólipos, y en determinadas zonas de la lámina propia de PJ. Por el contrario, el análisis del TCP no reveló niveles aumentados de CCL26. Contrariamente a lo observado en la microscopía confocal, la evaluación de CCL26 en el tejido epitelial proveniente de TCP o PJ no mostró diferencias significativas en la expresión de ARNm (**Figura 16C**). Estos resultados podrían estar reflejando una regulación a nivel transcripcional de CCL26.

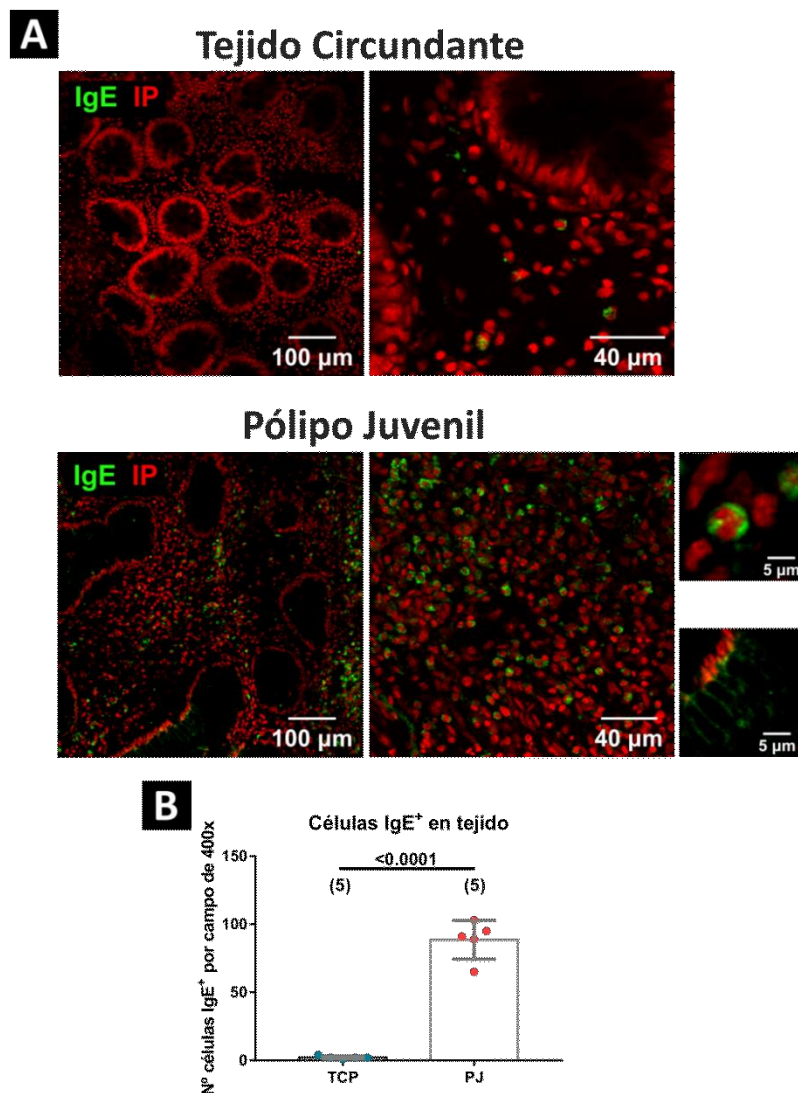




**Figura 16. Expresión de quimioquinas atrayentes de eosinófilos**

(A) PCR en tiempo real de las quimioquinas de eosinófilos CCL5 y CCL26 en TCP y PJ. (B) Imágenes representativas de una microscopía confocal de fluorescencia de CCL26 en tejido de PJ. Los núcleos se tiñeron con ioduro de propidio. La magnificación de la derecha muestra células epiteliales CCL26<sup>+</sup>. (C) PCR en tiempo real de CCL26 en células epiteliales de TCP y PJ. Prueba estadística *t*-Student pareado no paramétrico. Los gráficos muestran el número de mediciones realizadas (n).

Dado que el número de eosinófilos se encuentra elevado en PJ y eotaxina-3 se produce localmente, estudiamos si estas células tienen en su superficie moléculas de IgE. En la **Figura 17A** se muestran células IgE<sup>+</sup> por microscopía confocal y encontramos que su frecuencia está incrementada en PJ, en comparación con TCP. En los recuadros de la derecha puede observarse una célula sensibilizada compatible con la morfología de los eosinófilos, y células epiteliales de la cripta con IgE en la superficie. El recuento de células IgE<sup>+</sup> reveló un valor de  $88.00 \pm 15.95$  vs  $2.75 \pm 0.85$  células IgE<sup>+</sup> por campo de 400x para los PJ y los TCPs respectivamente (**Figura 17B**).



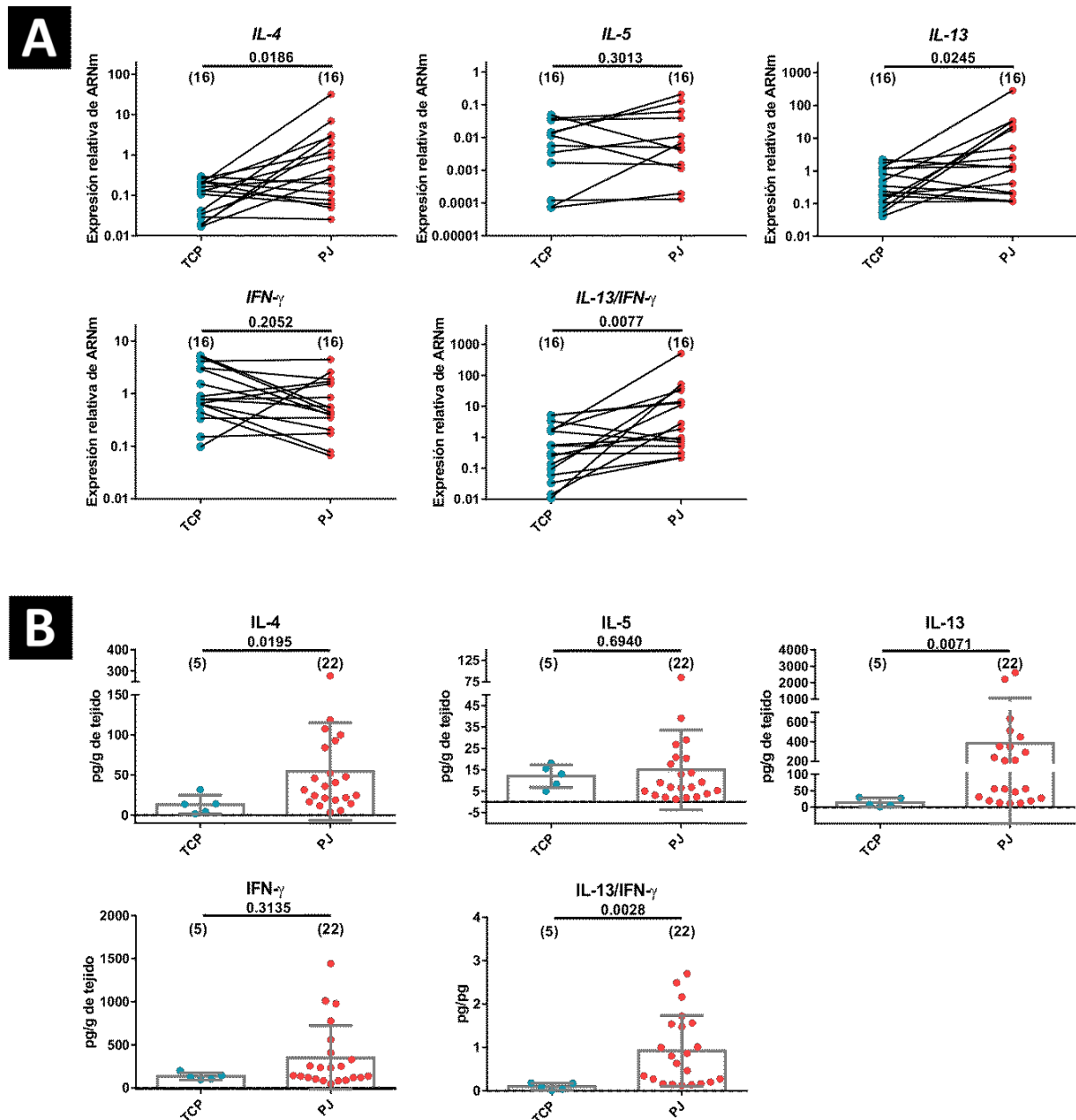
**Figura 17. Análisis de células que expresan IgE**

(A) Imágenes representativas de una inmunofluorescencia por microscopía confocal de PJ y TCP. Los núcleos se tiñeron con yoduro de propidio (IP). Las magnificaciones en el panel inferior muestran una célula con morfología compatible con un eosinófilo y células del epitelio de la cripta. (B) Recuento de células IgE<sup>+</sup> en TCP y PJ. Prueba estadística *t*-Student no pareado paramétrico. Los gráficos muestran la media ± SEM y el número de mediciones realizadas (n).

Por lo tanto, estos resultados indicarían que los eosinófilos son atraídos por el estroma del pólipo, y aquí se sensibilizarían con IgE. En el TCP al no secretarse CCL26 los eosinófilos no son atraídos y por lo tanto su recuento es significativamente menor.

### **2.3. Estudio de citoquinas en los tejidos**

Con el objetivo de caracterizar más profundamente el infiltrado inflamatorio hallado analizamos la expresión y producción de diferentes citoquinas  $T_H1$  y  $T_H2$  por PCR en tiempo real y ELISA de captura. Como puede observarse en la **Figura 18**, el análisis de los transcritos que codifican para IL-4 e IL-13 muestra que se encuentran significativamente incrementados en PJ en comparación con TCP del mismo paciente (panel A). La expresión de IL-5 muestra valores aumentados en PJ con respecto al TCP de cada paciente, aunque no alcanza significancia estadística; los niveles de los transcritos correspondientes a IFN- $\gamma$  no muestran diferencias entre PJ y TCP. Sin embargo, la relación IL-13/IFN- $\gamma$  está incrementada en PJ en comparación a TCP, lo cual refleja una mayor expresión de citoquinas tipo 2 en los pólipos. En la **Figura 18B** se muestran las concentraciones de las citoquinas en los tejidos y aquí nuevamente observamos niveles elevados de IL-4 e IL-13, con una tendencia al incremento para IL-5 y valores de IFN- $\gamma$  similares entre PJ y TCP. Nuevamente, a nivel de proteínas observamos una relación IL-13/IFN- $\gamma$  incrementada en el estroma de los pólipos con respecto al TCP de cada paciente.

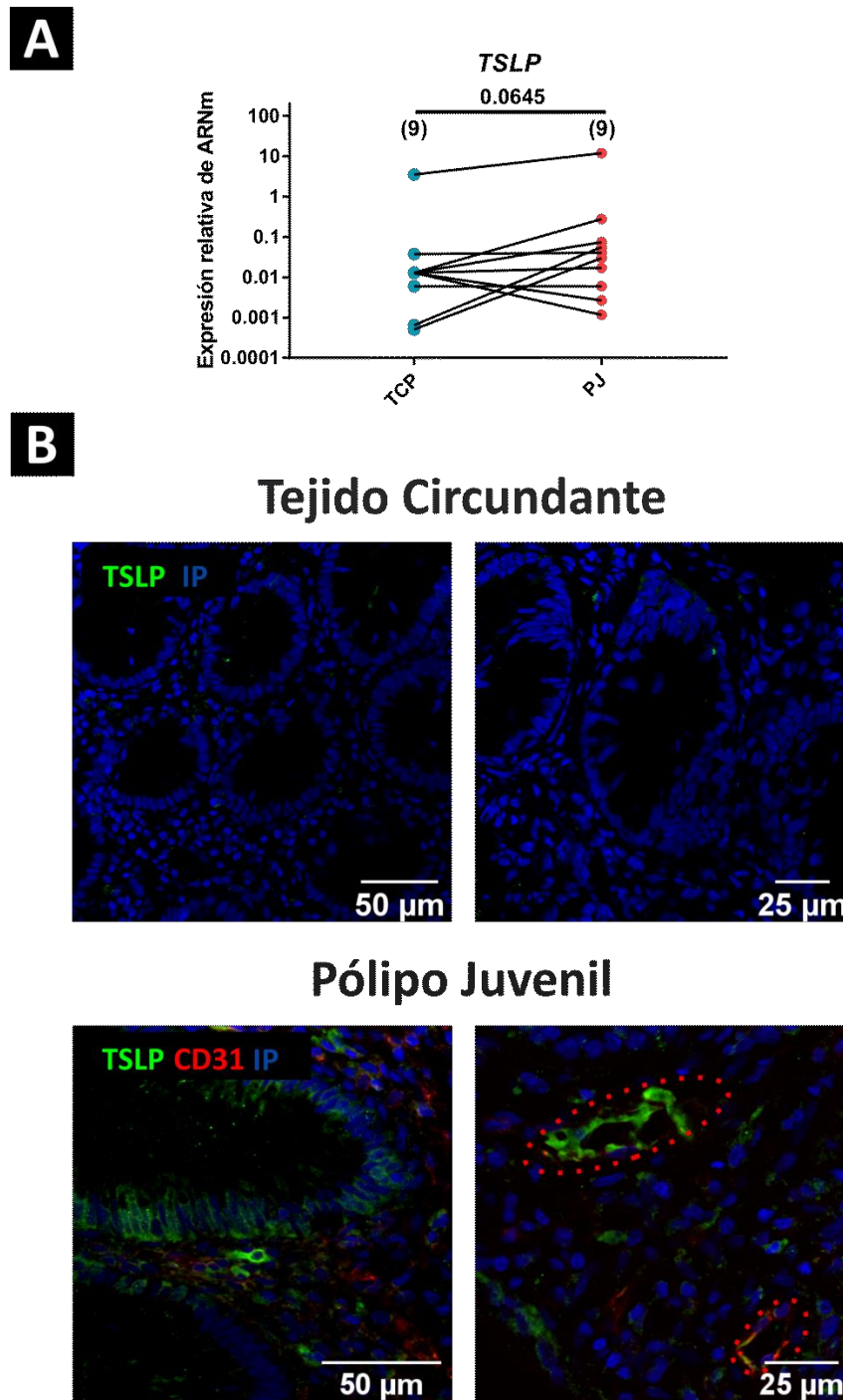


**Figura 18. Estudio de la expresión y producción citoquinas en los tejidos**

**(A)** Expresión relativa de ARNm de IL-4, IL-5, IL-13 e IFN- $\gamma$  mediante PCR en tiempo real. Análisis estadístico pareado por *t*-Student para distribuciones no paramétricas. **(B)** Expresión proteica de IL-4, IL-5, IL-13 e IFN- $\gamma$  evaluados por ELISA de captura. Análisis estadístico no pareado por *t*-Student para distribuciones no paramétricas. Los gráficos muestran el número de mediciones realizadas (n).

En conjunto, estos resultados muestran que los pólipos presentaron un microentorno tisular con predominio de citoquinas tipo 2 (IL-4, IL-5 e IL-13), que podría explicar el infiltrado de eosinófilos y la producción local de eotaxina-3.

Para comprender más profundamente los mecanismos inmunopatogénicos subyacentes analizamos otras quimioquinas y citoquinas en PJ y TCP. El análisis de la expresión y producción de TSLP por qPCR e inmunofluorescencia, respectivamente, mostró que esta alarmina se expresa en cantidades mayores en los pólipos en comparación con TCP, como se muestra en la **Figura 19A**. Al analizar la expresión y localización de TSLP a nivel proteico, se encontró que esta alarmina se expresa mayoritariamente en el compartimento epitelial y en zonas con morfología compatibles con vasos sanguíneos, por lo cual se analizó la co-localización de TSLP y CD31 (marcador de células endoteliales). Como se muestra en la **Figura 19B**, en ciertas estructuras de los pólipos se observa co-localización de estos marcadores, mientras que en otras no. En TCP no se observó expresión de TSLP.

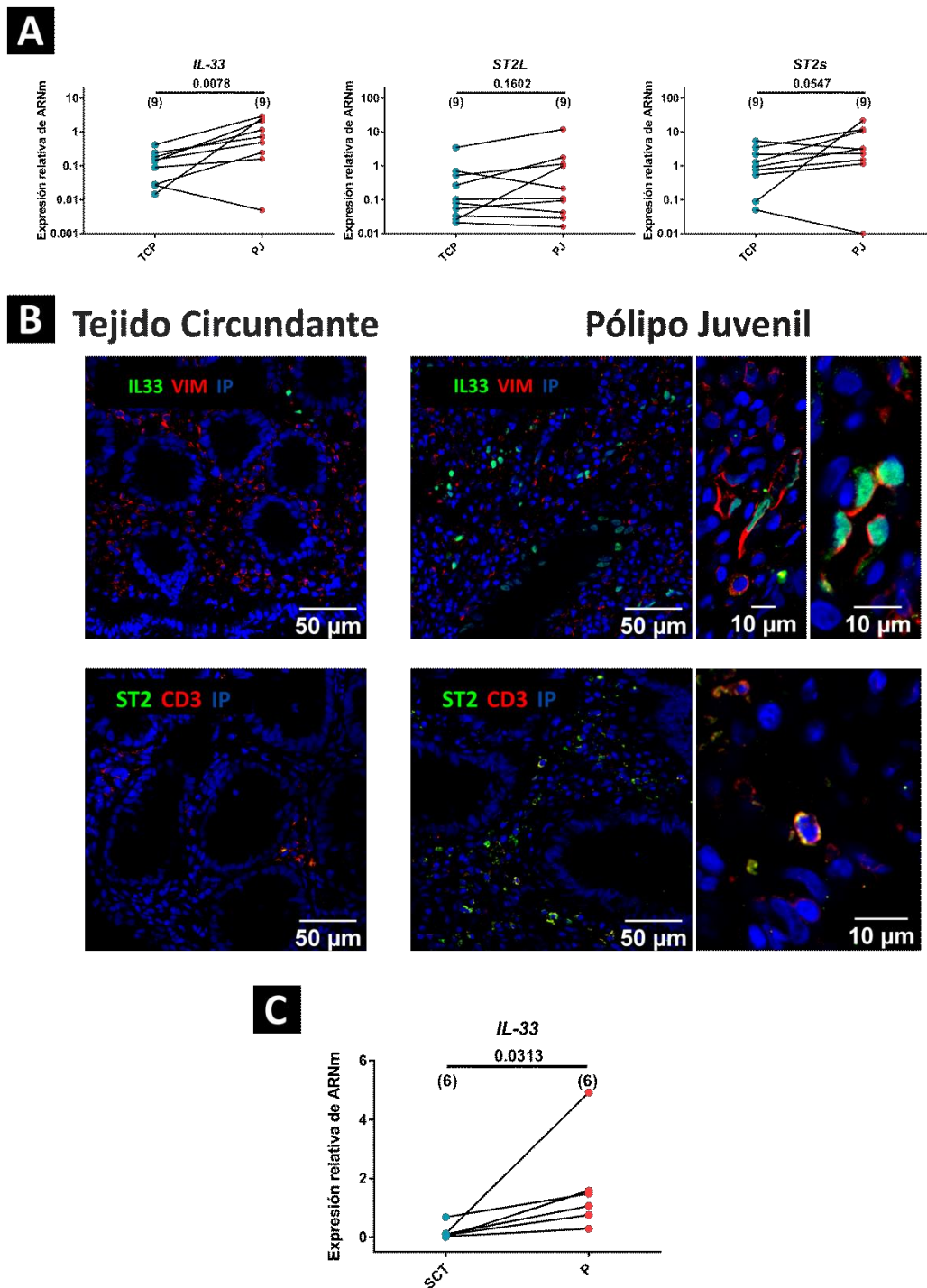


**Figura 19. Evaluación de la expresión de TSLP en tejidos**

(A) Expresión relativa del ARNm de TSLP por PCR en tiempo real. Análisis estadístico pareado por *t*-Student. El gráfico muestra el número de mediciones realizadas (*n*). (B) Inmunofluorescencia por microscopía confocal de TSLP y CD31. Los núcleos fueron teñidos con ioduro de propidio (IP). La línea punteada roja denota los vasos sanguíneos.

Por otro lado estudiamos la expresión de IL-33 y dos isoformas de su receptor ST2 (ST2s o receptor soluble y ST2L o anclado a membrana) por qPCR y microscopía confocal de fluorescencia. Se observó que la expresión génica de IL-33 fue significativamente mayor en los PJ en comparación al TCP (**Figura 20A**). La expresión de la versión soluble de ST2 se encontró significativamente aumentada en los PJ, pero no así la de ST2L, la cual solo la presentaron elevada 4 de 9 pacientes. Por otro lado, por inmunofluorescencia se observó una distribución de IL-33 en el tejido similar a la hallada para TSLP, con la distinción de que además de ser expresada por células endoteliales y epiteliales también se observa en células con morfología fusiforme, compatible con fibroblastos. Realizamos una co-tinción con vimentina y observamos que las células alargadas son fibroblastos que expresan IL-33 (**Figura 20B**). Este resultado coincidió con el obtenido en células epiteliales, las cuales mostraron mayor expresión del ARNm de IL-33 en PJ que en el TCP (**Figura 20C**). La expresión de ST2 fue similar en PJ y TCP, excepto que en PJ también se encontraron linfocitos T CD3<sup>+</sup>ST2<sup>+</sup>.





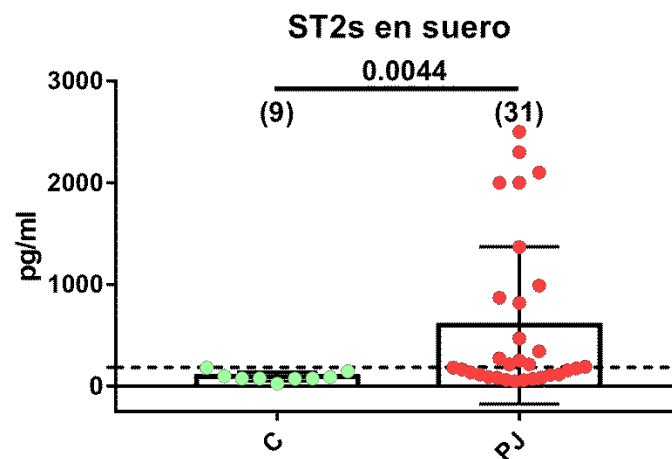
**Figura 20. Evaluación de la expresión de IL33 y de su receptor ST2**

(A) Expresión relativa del ARNm de IL33, ST2 soluble (ST2s) y ST2 ligando (ST2L) en tejido circundante y en pólipo. Análisis estadístico pareado por *t*-Student. El gráfico refiere el número de mediciones realizadas (*n*). (B) Inmunofluorescencia por microscopía confocal. En el panel superior se muestra una imagen representativa de la distribución de IL33 y el marcador de células endoteliales y fibroblastos vimentina (VIM). El panel inferior muestra la expresión de ST2 transmembrana y CD3. Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (IP).



Por lo tanto observamos una mayor expresión de IL-33 y ST2 en pólipos en comparación con el TCP de cada paciente, característico de procesos inflamatorios tipo 2.

Yagami *et al.* demostraron que IL-13 e IL-4 inducen la producción de ST2s en células endoteliales de la microvasculatura pulmonar (Yagami *et al.*, 2010). Dado que en otras patologías inflamatorias intestinales con producción de IL-13, como la colitis ulcerosa, reflejaron niveles incrementados de ST2s en el suero, aquí evaluamos la concentración del receptor soluble en el suero de los pacientes con PJ colónicos y proctorragia, en comparación con sueros de pacientes pediátricos normales (sin inflamación) como controles. En la **Figura 21** se puede observar que los pacientes con PJ presentaron concentraciones significativamente elevadas de ST2s en suero, en comparación con los sueros control. Esto permite suponer que la inflamación intestinal se refleja en los niveles periféricos de ST2s.



**Figura 21. Evaluación de la expresión de ST2 soluble en suero de pacientes.**

Se cuantificó por ELISA los niveles de ST2s en el suero de pacientes con PJ y de pacientes controles o sanos (C). Análisis estadístico no-pareado por *t*-Student para distribuciones no paramétricas. El gráfico muestra la media  $\pm$  SD y el número de mediciones realizadas (n). La línea puntuada corresponde a la media de ST2 en suero de pacientes sanos más 2 desviaciones estándar.

Con los resultados obtenidos hasta aquí podemos concluir que la expresión de TSLP e IL-33 en el compartimento epitelial de los PJ podrían estar asociadas a la expresión de citoquinas tipo 2 observada en los tejidos. Este entorno inflamatorio T<sub>H</sub>2 podría ser el responsable de inducir la producción de ST2 y de CCL26. Además, los niveles elevados de ST2s que se producen para compensar el incremento de IL-33 constituyen un parámetro periférico que refleja la inflamación intestinal. Debido a limitaciones experimentales, la expresión de IL-25 no pudo ser evaluada.

## Capítulo 2

### Linfocitos B

## y estudio de la producción local de IgE

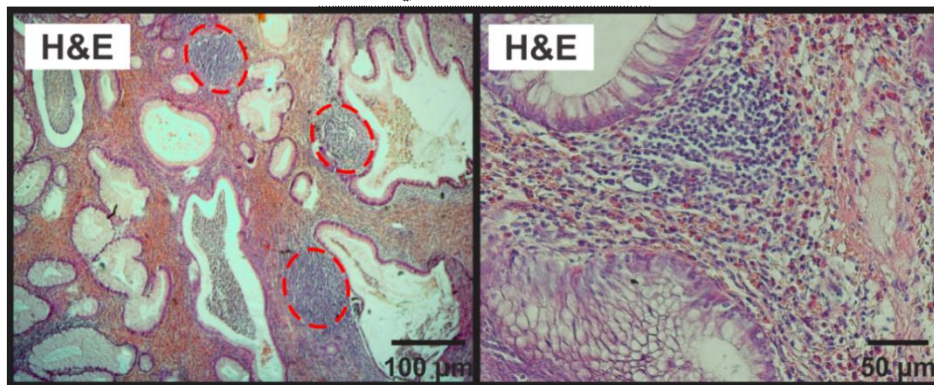
#### Objetivos específicos

- Estudiar la presencia de centros germinales en los pólipos colorrectales y la producción local de IgE.

#### 1. Estudio de la presencia de centros germinales en pólipos juveniles

Los análisis histológicos realizados en la primera parte de este trabajo revelaron la presencia de cúmulos de células mononucleares en los PJ. Los mismos se pueden observar en la **Figura 22**. Estas estructuras se caracterizan por la presencia de un gran número de células con reducido citoplasma, reunidas en estructuras circulares de tamaño variable (entre 400 a 600  $\mu\text{m}$  de diámetro) morfológicamente compatibles con centros germinales. En las biopsias analizadas no observamos estructuras de este tipo.

## Pólipo Juvenil

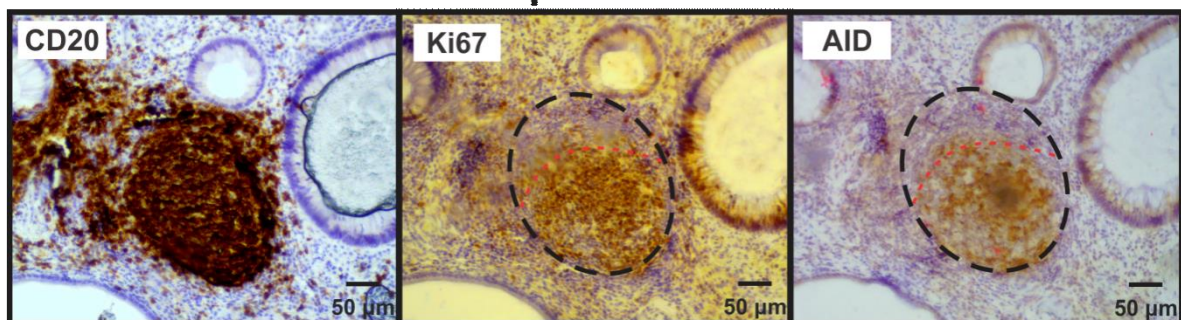


**Figura 22. Análisis histológico de pólipos juveniles.**

Imágenes representativas de cortes de pólipos juveniles teñidos con H&E, mostrando cúmulos linfoides (línea discontinua roja).

Con el objetivo de caracterizar los acúmulos celulares observados, se realizó una inmunohistoquímica con diferentes marcadores moleculares que expresan los CG (Figura 23). Hallamos que en estos aglomerados celulares hay células CD20<sup>+</sup>, una proteína expresada únicamente por linfocitos B; Ki-67<sup>+</sup>, un marcador de proliferación celular activa, y AID<sup>+</sup>, la deaminasa de citidina involucrada en los mecanismos de recombinación que generan el cambio de isotipo de las cadena pesada y liviana de las inmunoglobulinas e interviene en la maduración de la afinidad.

## Pólipo Juvenil



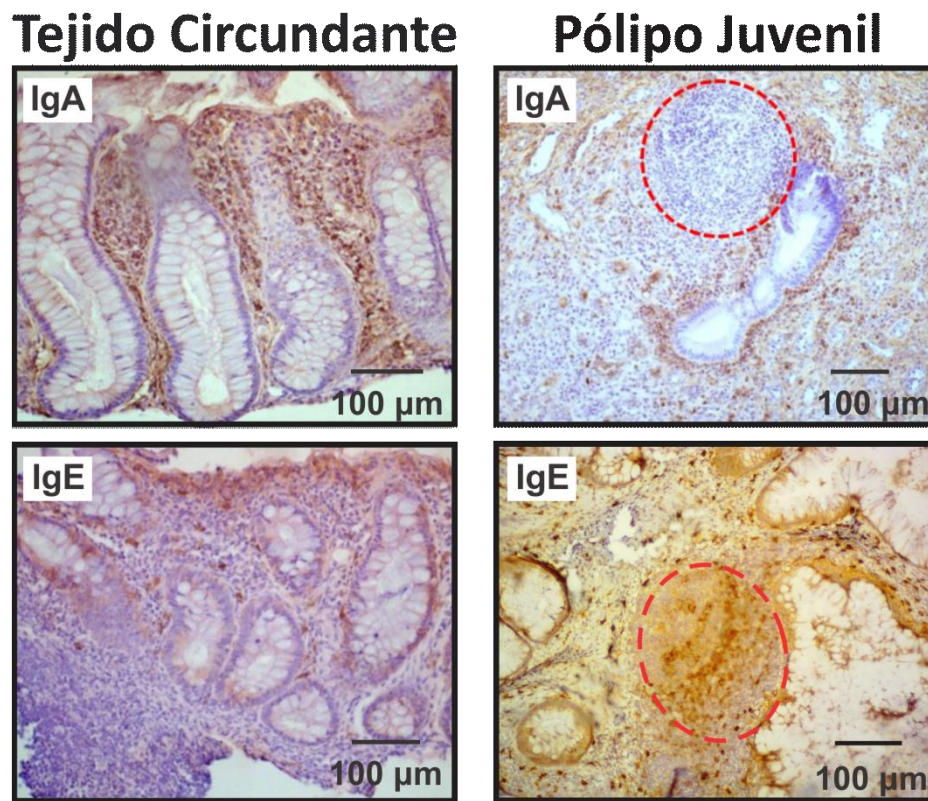
**Figura 23. Inmunohistoquímica de folículos linfoides de cortes histológicos de pólipos.**

Inmunohistoquímica de secciones seriadas de pólipos juveniles incluidos en parafina con anticuerpos específicos contra CD20 (linfocitos B), Ki67 (proliferación activa) y AID (deaminasa de citidina inducida por activación). Las elipses de línea discontinua muestran los límites del centro germinal.

En conjunto, estos resultados indican que los pólipos presentan centros germinales, con una activa proliferación de linfocitos B en donde se desarrollan mecanismos de hipermutación somática y/o CSR. Estos hallazgos indican que el tejido de los pólipos constituye un tejido linfoide en los que se produce la maduración de la respuesta inmune humoral.

## **2. Análisis de la expresión de diferentes isotipos**

Con la finalidad de evaluar la producción de IgA, principal isotipo de un intestino en homeostasis, e IgE, isotipo predominante en las reacciones alérgicas, y su distribución en el tejido colónico, analizamos por inmunohistoquímica la presencia y distribución de ambas inmunoglobulinas. Los resultados de la microscopía se muestran en la **Figura 24**. En el panel superior mostramos la expresión de IgA, la cual se encuentra disminuida en los PJ, en comparación con el TCP. Esta situación se invierte en el caso del análisis de la IgE, la cual predomina en los pólipos y presenta una baja expresión en los TCPs. Asimismo, se observó presencia de células IgE<sup>+</sup> en el interior de los centros germinales, pero no así de células IgA<sup>+</sup>; y tinción positiva para IgE en el compartimento epitelial (podría tratarse de IgE unida a CD23).

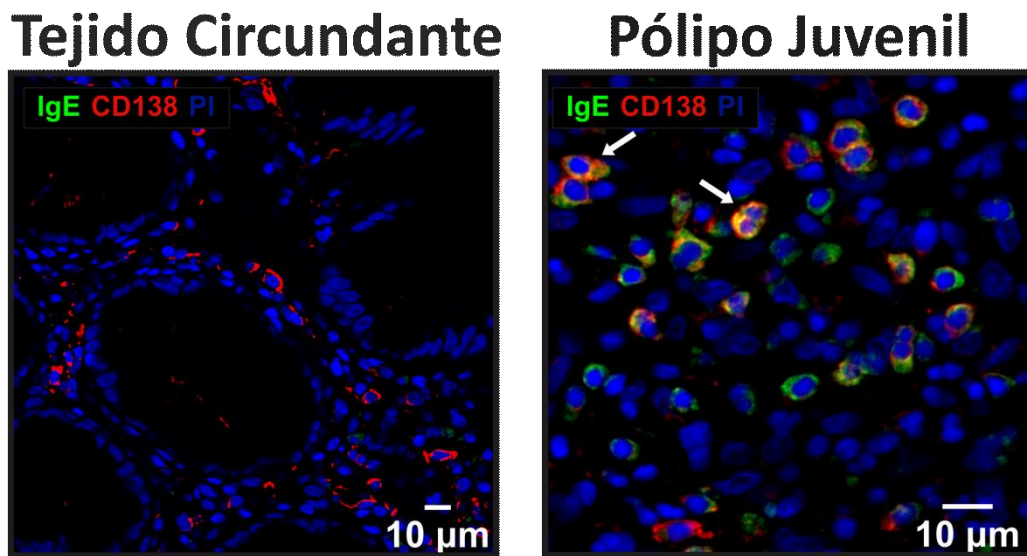


**Figura 24. Análisis de la expresión y distribución de IgA e IgE.**

Imágenes representativas de las inmunohistoquímica correspondientes a IgA e IgE en cortes histológicos de tejido colónico circundante y pólipos juveniles. La línea punteada roja denota los centros germinales.

Con el objetivo de determinar la presencia de células plasmáticas (CD138<sup>+</sup>) productoras de IgE, se realizó una inmunofluorescencia por microscopía confocal (**Figura 25**). En los pólipos se observó una cantidad significativa de células plasmáticas IgE<sup>+</sup> ( $40.5 \pm 6.71\%$  células IgE<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> con respecto al número de células plasmáticas totales), mientras que la mucosa circundante mostró células plasmáticas en su gran mayoría IgE negativas ( $2.05 \pm 0.50\%$  células IgE<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> con respecto al número de células plasmáticas totales). Estos resultados indicarían indirectamente que la IgE se produce en los pólipos, mientras que en el TCP predomina la IgA, característica de un tejido en homeostasis. Si la IgE que observamos en los pólipos fuera de otro origen y llegara por sangre, en el TCP habría células IgE<sup>+</sup>.

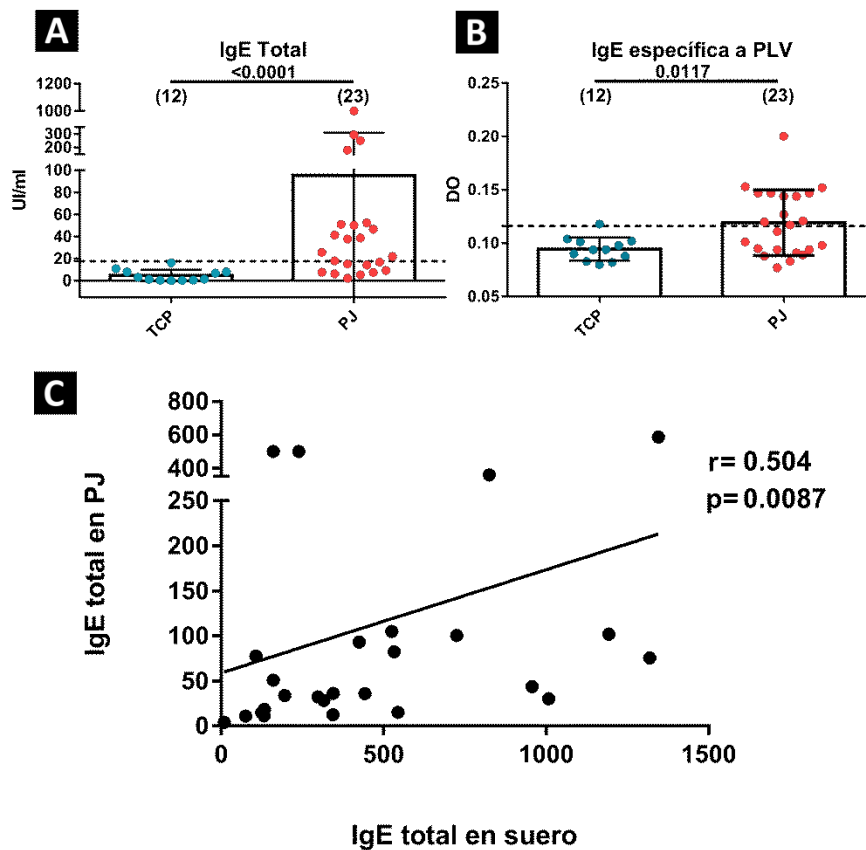




**Figura 25. Análisis de células plasmáticas IgE<sup>+</sup>.**

Imágenes representativas de tinciones por inmunofluorescencia, obtenidas por microscopía confocal, de células IgE<sup>+</sup> y CD138<sup>+</sup> en cortes histológicos de tejido circundante y pólipos juveniles. Los núcleos se tiñeron con yoduro de propidio (IP).

Estos resultados, fueron luego corroborados mediante la cuantificación de IgE total en el lisado de ambos tejidos (PJ y TCP) mediante ELISA de captura. En la **Figura 26** se puede observar que los PJ presentan una cantidad significativamente mayor de IgE comparada a la de los TCPs ( $120.40 \pm 35.41$  vs  $11.11 \pm 3.23$  UI/ml de IgE, respectivamente). Asimismo, en base a las historias clínicas de los pacientes y la presencia de IgE específica a PLV detectada en el plasma, se realizó la medida de IgE específica en el lisado de los tejidos. Para poder definir un valor de corte por encima del cual se pueda considerar positivo el valor hallado, tomamos como umbral la media de la población más dos desviaciones estándares. Observamos que 8 de los 24 pólipos evaluados presentaron IgE específica a PLV, y solo 1 de las 14 biopsias de TCP analizadas dio como resultado una absorbancia cercana al valor de corte (**Figura 26A y B**).



**Figura 26. Evaluación de IgE total y específica en los tejidos.**

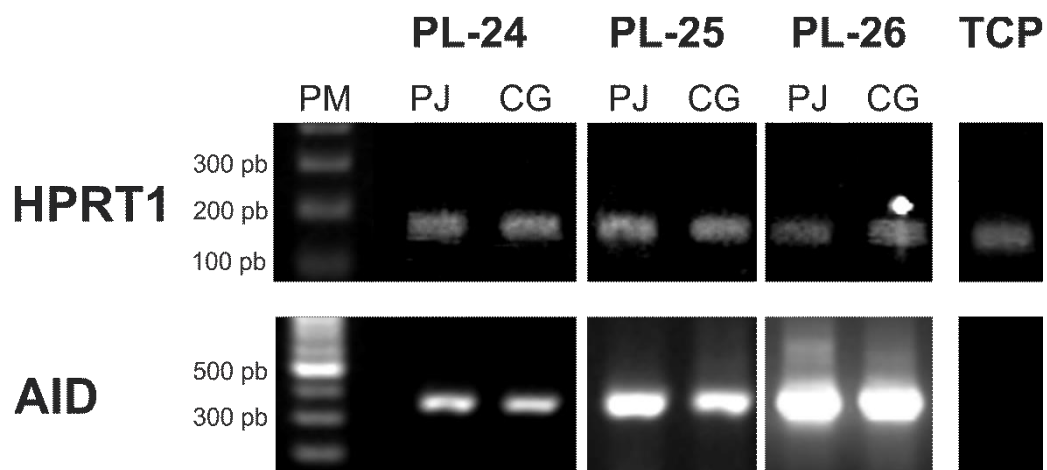
ELISA cuantitativo de IgE total (A) y específica a leche de vaca (B) TCP y PJ. Se realizó un análisis *t*-Student no pareado. El gráfico muestra la media  $\pm$  SD y el número de mediciones realizadas (n) (C) Análisis de correlación entre los niveles de IgE en el pólipo y los encontrados en el plasma de los pacientes. Test de correlación de Pearson.

Es interesante resaltar además, que los niveles de IgE presentes en los pólipos se correlacionan positivamente con los encontrados en el plasma de los pacientes (Figura 26C). Por lo tanto los mayores niveles de IgE en el interior de los pólipos, en comparación con el TCP, indicarían, nuevamente, que este isotipo se produce en este tejido, constituyendo así un tejido linfoide terciario, o bien, los LB se diferencian a células productoras de IgE en los ganglios mesentéricos drenantes y migran diferencialmente a la lámina propia de los PJ. Sin embargo, no podemos descartar un aporte de inmunoglobulinas que llegan por sangre, y que determinaría los niveles basales observados en el tejido adyacente.



### 3. Estudio del cambio de isotipo en los pólipos juveniles

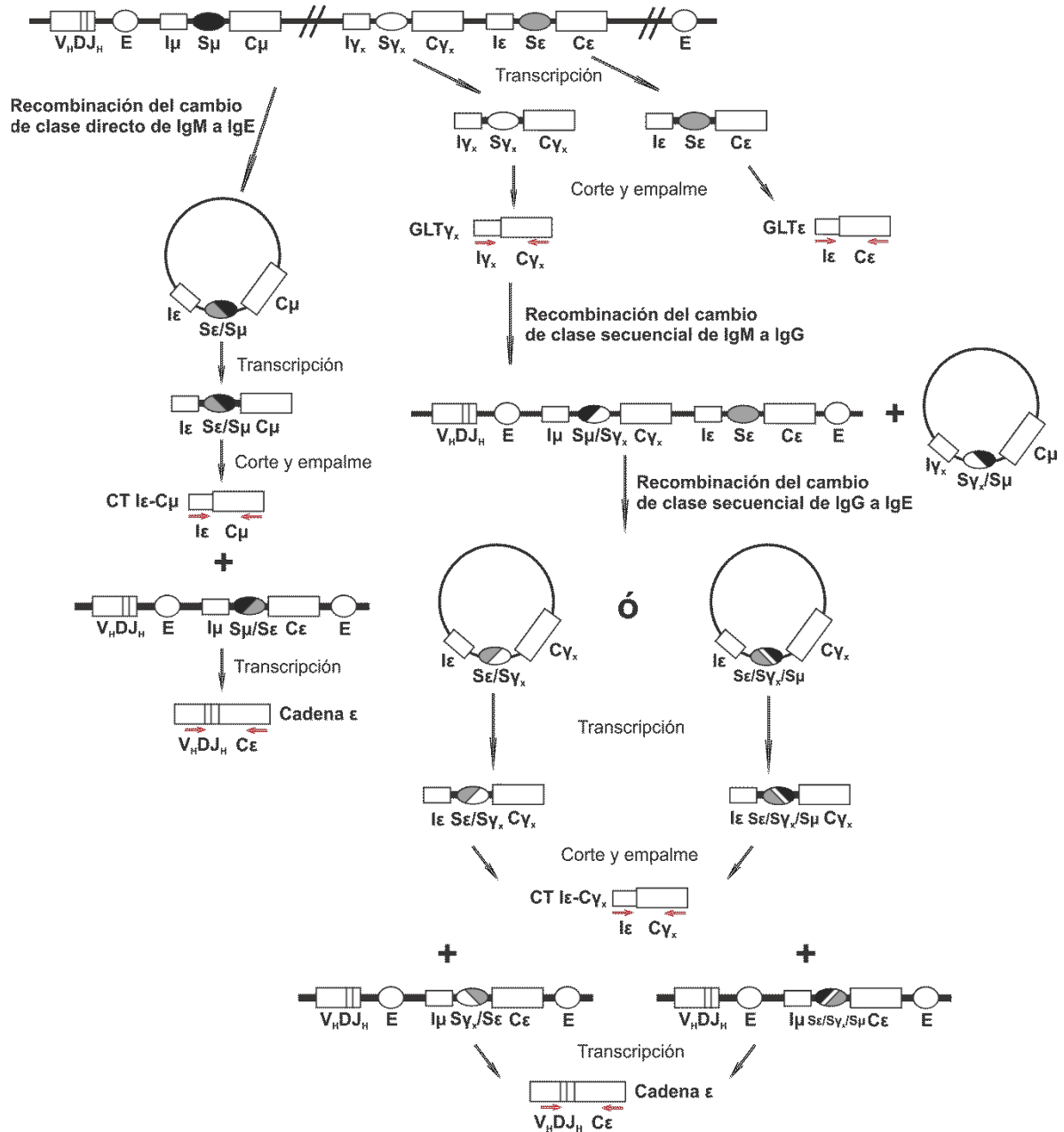
La presencia de centros germinales activos y de células plasmáticas IgE<sup>+</sup> en los PJ, además de la correlación entre los niveles de IgE en plasma y en el tejido, nos llevó a evaluar si los centros germinales caracterizados podrían ser la fuente de generación de IgE. Para ello se evaluó en primera instancia la expresión de AID en estas estructuras para confirmar que se trata de CG. Se aislaron CG de los pólipos mediante tinción de criocortes y posterior disección láser por microscopía; se purificó el ARN de las regiones aisladas y se evaluó la transcripción de AID por RT-PCR. Se utilizó el gen constitutivo HPRT1 como control de la cantidad de ARN. La **Figura 27** muestra el resultado de las corridas electroforéticas en agarosa luego de la amplificación. En total se aislaron 6 cúmulos linfoides procedentes de 6 pólipos de distintos pacientes, de los cuales 3 mostraron una banda de 339 pb que corresponde al peso molecular del amplicón de AID. Como era esperable, el análisis de los transcritos de AID en el pólipo entero mostró expresión de esta enzima en los 6 pólipos evaluados, y no hallamos resultados positivos en las respectivas biopsias de TCP. Luego de confirmada la presencia de AID en los cortes de los pólipos de los 3 pacientes, se continuó con el análisis de los CG.



**Figura 27. Expresión de AID en pólipos y tejido circundante.**

Electroforesis en gel de agarosa que muestra el resultado de amplificación del ARNm del gen constitutivo HPRT1 (142pb) y de AID (339pb) en material aislado de pólipos juveniles (PJ), centros germinales (CG) y tejido circundante (TCP) por microscopía de disección láser. Se analizaron 3 muestras procedentes de 3 pacientes (PL-24, PL-25 y PL-26). PM: marcador de peso molecular de 100pb.

A partir de la confirmación que el ARN aislado proviene de CG, se procedió a estudiar el primer intermediario de ARN que induce el proceso de recombinación que da origen al cambio de isotipo, el GLT. Las enzimas presentes en el tejido en el cual se encuentran los CG, junto a otras señales que recibe el linfocito B (CD40), son las que inducen la expresión de AID y de GLT. Como se explicó anteriormente, el GLT se encarga de dirigir la enzima AID a una región de cambio S o de cambio específica y permite su unión a la cadena de ADN. Este transcripto induce la recombinación y posterior formación del ADN circular, que también es transcripto en forma transitoria (CT) (**Figura 10**). Por lo tanto, y como mencionamos anteriormente, el estudio de la inducción del proceso de CSR lo evaluamos en base al análisis de la presencia de los transcriptos GLT y CT como marcadores de cada proceso de recombinación en particular.



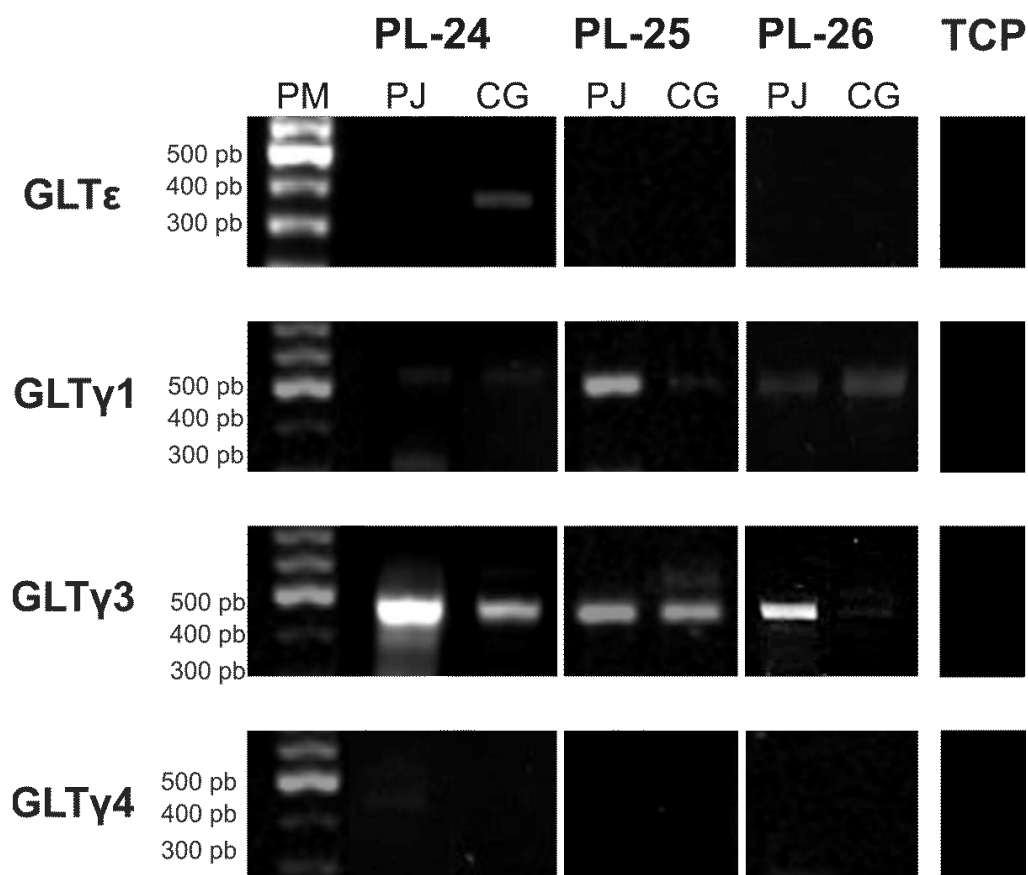
**Figura 10. Recombinación del cambio de clase directo y secuencial a IgE.**

Mecanismos involucrados en la CSR directa y secuencial en la producción de IgE. En rojo se muestran la región de unión de los cebadores utilizados para evidenciar la recombinación.

C: Región constante, I: exón I del gen de línea germinal, S: región de recombinación.

*Imagen presentada en materiales y métodos.*

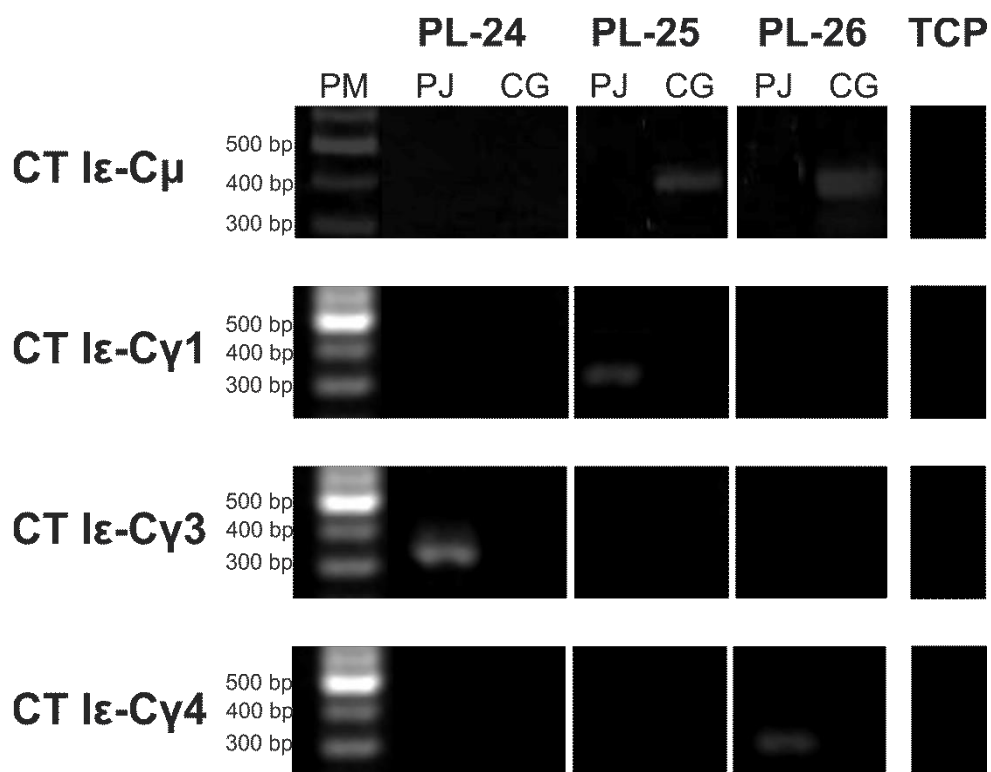
En la **Figura 28** se muestra el resultado de la amplificación por PCR correspondiente a cada GLT que inicia la recombinación para el cambio de cada isotipo de cadena pesada. En el panel superior mostramos el GLT para generar el cambio a cadena  $\epsilon$  (GLT $\epsilon$ ), en los otros paneles mostramos el GLT para las recombinaciones a las cadenas  $\gamma$ . De los 3 centros germinales estudiados solo detectamos GLT $\epsilon$  en el CG aislado de PL-24. Este transcrito transitorio no se detectó en los tejidos completos de PJ, ni en los TCP analizados. Resultados similares se observaron con GLT $\gamma_4$ , el cual solamente pudo ser detectado en PJ de PL-24 (banda muy tenue). Por el contrario, GLT $\gamma_1$  y GLT $\gamma_3$  fueron expresados tanto en tejido entero como en CG de los 3 pólipos. Los tejidos circundantes no mostraron expresión de GLT en ningún caso. Los resultados negativos podrían deberse a la no inducción de estos transcritos, o a la desaparición de los mismos al momento del análisis (son transcritos transitorios).



**Figura 28. Amplificación de transcritos de la línea germinal.**

Resultado de la amplificación por PCR de transcritos de la línea germinal específicos de un cambio de isotipo a  $\epsilon$  (GLT $\epsilon$ ),  $\gamma_1$  (GLT $\gamma_1$ ),  $\gamma_3$  (GLT $\gamma_3$ ) y  $\gamma_4$  (GLT $\gamma_4$ ) en pólipos juveniles (PJ) y en centros germinales (CG) aislados por microscopía de disección láser de tres pacientes. El tejido circundante al pólipo (TCP) se utilizó como control. PM: marcador de peso molecular de 100pb.

A continuación se evaluó la expresión de los transcritos circulares CT, los cuales se transcriben a partir del ADN circular producido luego de la CSR. En la **Figura 29** se muestran las corridas electroforéticas de los distintos productos de PCR, y como puede observarse detectamos que 2 de los 3 centros germinales habían realizado una recombinación directa entre  $C\mu$  y  $C\epsilon$ , evidenciada por el CT  $I\epsilon-C\mu$  (PL-25 y PL-26). Este transcripto no fue detectado en el tejido entero ni en el TCP. Por otro lado, los CT correspondientes a cambios secuenciales de  $\gamma$  a  $\epsilon$  solo pudieron ser revelados en el tejido completo del pólipo:  $C\gamma_1$  a  $C\epsilon$  (CT  $I\epsilon-C\gamma_1$ ) en PL-25,  $C\gamma_3$  a  $C\epsilon$  (CT  $I\epsilon-C\gamma_3$ ) en PL-24 y  $C\gamma_4$  a  $C\epsilon$  (CT  $I\epsilon-C\gamma_4$ ) en PL-26. Cabe mencionar que el TCP no mostró expresión de ningún CT. Nuevamente que no se observe un transcripto CT puede deberse a que no se sintetizó, o lo hizo y se degradó al momento del aislamiento.

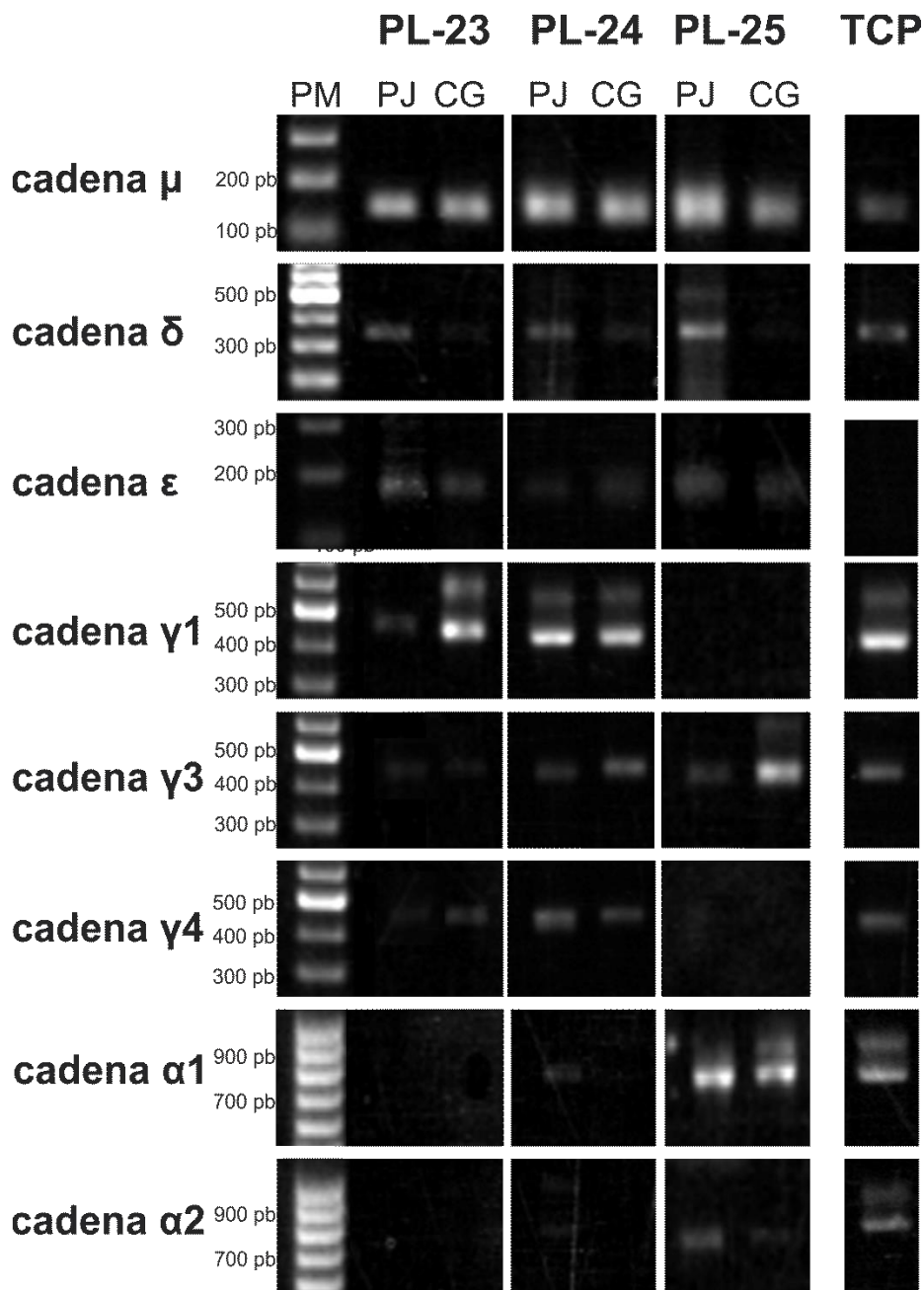


**Figura 29. Análisis de la expresión de transcritos circulares**

Electroforesis en gel de una amplificación por PCR de transcritos circulares específicos de un cambio de isotipo directo a  $\epsilon$  ( $CT\mu-\epsilon$ ) o indirecto vía  $\gamma_1$  ( $CT\epsilon-\gamma_1$ ),  $\gamma_3$  ( $CT\epsilon-\gamma_3$ ) o  $\gamma_4$  ( $CT\epsilon-\gamma_4$ ) en pólipos juveniles (PJ), centros germinales (CG) o tejido circundante de cada paciente (TCP) aislados por microscopía de disección láser. PM: marcador de peso molecular de 100pb.

Estos resultados en su conjunto indican que en los PJ se estaría induciendo la recombinación para un cambio de isotipo a la cadena  $\epsilon$  mediante mecanismos directos ( $\mu$  a  $\epsilon$ ) y secuenciales ( $\mu$  a  $\gamma 1/3/4$  y luego a  $\epsilon$ ).

A continuación, y con el objetivo de verificar si efectivamente los tejidos estudiados expresan inmunoglobulinas maduras, se decidió realizar una amplificación por PCR del ARNm correspondiente a cada isotipo de cadenas pesadas y livianas (**Figura 30**). Como puede observarse, los tejidos enteros y los centros germinales expresaron tanto IgE, como IgG3 o IgM maduras. Sin embargo, la expresión del resto de las inmunoglobulinas en los tejidos dependió de la muestra de cada paciente analizado: PL-24 expresó todas las inmunoglobulinas, mientras que PL-23 no expresó IgA1 e IgA2 y a diferencia del tejido de los otros dos pacientes PL-25 no expresó ARNm de IgG1 o IgG4. Si bien hubo diferencias entre las muestras, es importante destacar que todos los pólipos expresaron IgE madura, hecho que lo diferencia ampliamente con el TCP, el cual reveló los transcritos codificantes para todas las inmunoglobulinas a excepción de IgE, confirmando lo ya observado por técnicas inmunohistoquímicas.

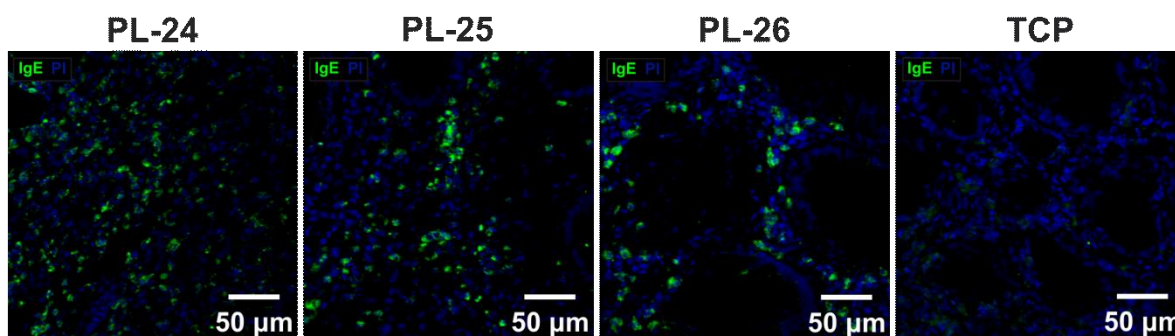


**Figura 30. Expresión génica de los exones que codifican para los isotipos de cadena pesada de inmunoglobulinas.**

Resultado de la amplificación por PCR de los transcritos maduros correspondientes a las cadenas pesadas de IgE, IgG1, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2 en pólipo juvenil (PJ) y en centros germinales (CG) de tres pacientes distintos (PL-23, 24 y 25) aislados por microscopía de disección láser. El tejido circundante al pólipo (TCP) se utilizó como control. PM: marcador de peso molecular de 100pb.

Es importante destacar que observamos que un mismo CG es capaz de dar origen a distintas inmunoglobulinas, como es el caso del CG analizado del paciente PL-24 que expresa los transcritos que codifican para las cadenas  $\mu$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 3$ , y  $\gamma 4$ .

Dado que la expresión génica no siempre se correlaciona con la expresión proteica, y para confirmar que los transcritos observados para la cadena  $\epsilon$  se tradujeron en IgE, estudiamos por microscopía confocal de fluorescencia la presencia de IgE en los cortes correspondientes a los pólipos de los cuales se aisló el material para estudiar los centros germinales (**Figura 31**). Este análisis permitió confirmar que en los 3 pólipos analizados se evidenció la presencia de IgE, mientras que en los TCP respectivos no observamos fluorescencia correspondiente a IgE.



**Figura 31. Expresión proteica de IgE en los pólipos evaluados**

Inmunofluorescencia por microscopía confocal de IgE (verde) en el tejido circundante y en los pólipos de los cuales se aislaron los centros germinales estudiados previamente (se muestra uno solo en forma representativa).

A continuación se decidió evaluar la cadena liviana de las inmunoglobulinas. Es sabido que ciertos linfomas de células B y enfermedades autoinmunes presentan una expresión alterada de las cadenas livianas  $\kappa$  y  $\lambda$ , por lo que la relación entre ellas ha sido de utilidad en el diagnóstico (Chizuka et al., 2002; Low et al., 2007). Basándonos en estos datos, estudiamos la relación  $\kappa:\lambda$  en los pólipos y centros germinales por PCR cuantitativa.



**Tabla 7.** Relación  $\kappa:\lambda$  por PCR en diferentes tejidos

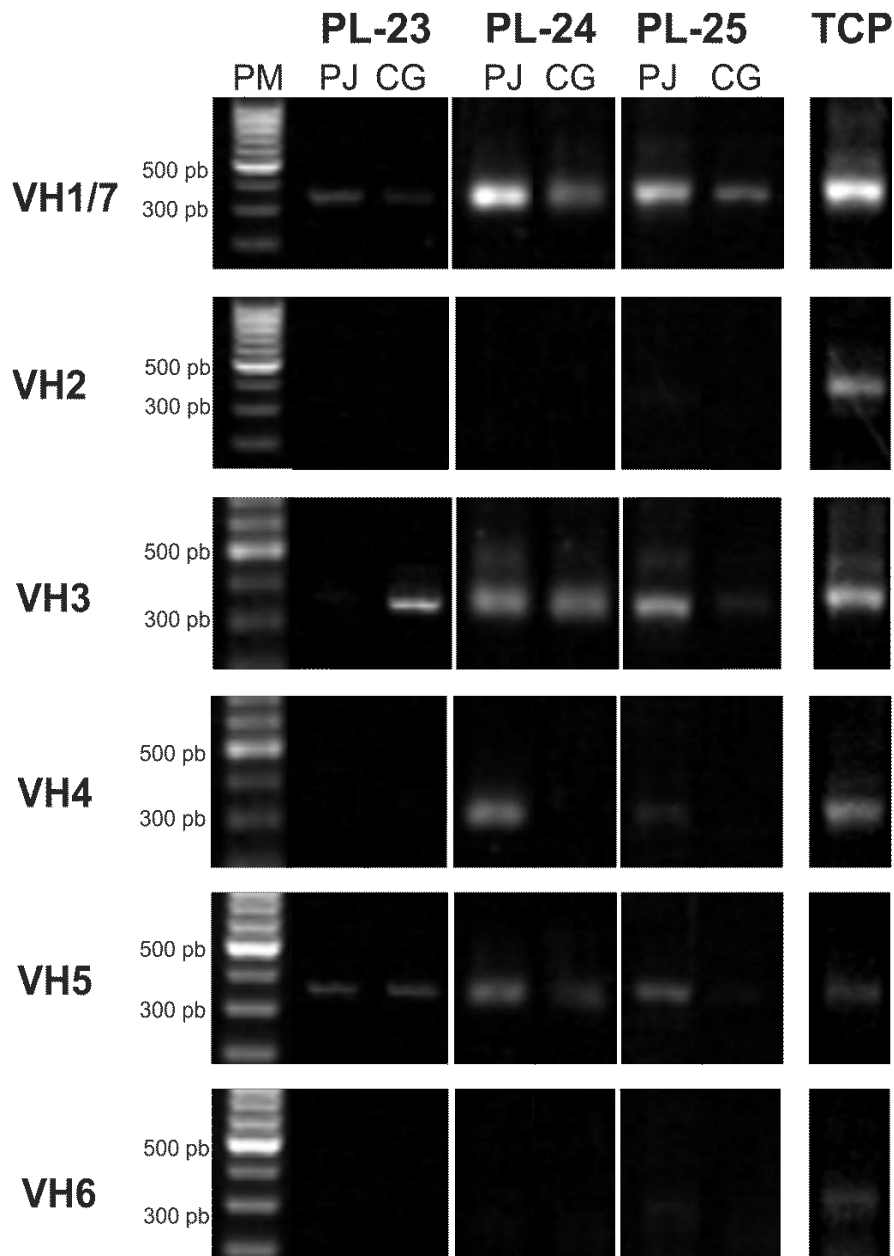
	PL-23	PL-24	PL-25	Promedio
TCP	1.66	0.82	0.59	<b>1.02</b>
CG	1.05	1.93	1.39	<b>1.46</b>
PJ	2.05	3.70	1.87	<b>2.54</b>

Los resultados se detallan en la **Tabla 7**. Aquellos valores de la relación  $\kappa:\lambda$  comprendidos entre 0.59 y 4 son considerados normales en células plasmáticas (Nakayama et al., 2012). En todos los tejidos aquí evaluados hallamos una relación  $\kappa:\lambda$  normal. Aunque cabe destacar que los PJ presentaron mayor expresión de inmunoglobulinas con cadenas livianas  $\kappa$  en comparación con el TCP.

#### 4. Estudio de las regiones variables de las inmunoglobulinas

Se conoce que diferentes patologías presentan un sesgo en la expresión de determinadas familias de genes que codifican para la región variable de las inmunoglobulinas, como en el caso del asma y rinitis alérgica, enfermedades autoinmunes, etc. Se ha observado que en las enfermedades alérgicas existe un reordenamiento preferencial que selecciona genes de la familia VH5 (Coker et al., 2005). Asimismo se ha visto en modelos animales que clones de linfocitos B reordenan en forma preferencial para ciertas familias de genes VH en la generación de inmunoglobulinas IgA específicas de componentes de la microbiota intestinal (Bergqvist et al., 2013). Teniendo en cuenta esto, a continuación decidimos estudiar las familias de genes de la región VH en los centros germinales mediante PCR. El estudio se realizó a partir de los ARN totales aislados, por lo cual no se diferenciaron VH por isotipo. El resultado de la electroforesis en gel de agarosa se muestra en la **Figura 32**. Los CG analizados mostraron la expresión preferencial de solo 3 familias de genes V: VH1/7, 3 y 5, mientras que el tejido entero también expresó VH4. Sin embargo, el TCP mostró una expresión normal de todas las familias VH indicando que los PJ durante la maduración de los linfocitos B presentan una selección de determinadas familias de

genes que codifican para las regiones variables, lo cual indica que en esta circunstancia existe un uso preferencial de genes VH.



**Figura 32. Análisis de las regiones variables (VH) de la cadena pesada.**

Resultado de amplificación de las diferentes familias de regiones variables (VH) en pólipo juvenil (PJ) y en centros germinales (CG) aislados por microscopía de disección laser de tres pacientes distintos (PL-23, 24 y 25). El tejido circundante al pólipo (TCP) se utilizó como control. PM: marcador de peso molecular de 100pb.

En conjunto estos resultados indican que la IgE se produce localmente en la mucosa colónica de pacientes sensibilizados a alérgenos alimentarios a través de un cambio de clase directo y secuencial, con un sesgo hacia el uso de las familias de genes VH1/7, VH3 y VH5. El microambiente dominante T<sub>H</sub>2 en el estroma del pólipo que describimos anteriormente permite que el tejido sea apropiado para la promoción de la CSR del gen que codifica para la cadena  $\epsilon$ . En concordancia, los pólipos presentan niveles significativamente más altos de anticuerpos IgE en comparación con el tejido colónico de control circundante, mientras que la IgA predomina en el tejido adyacente.

## Capítulo 3

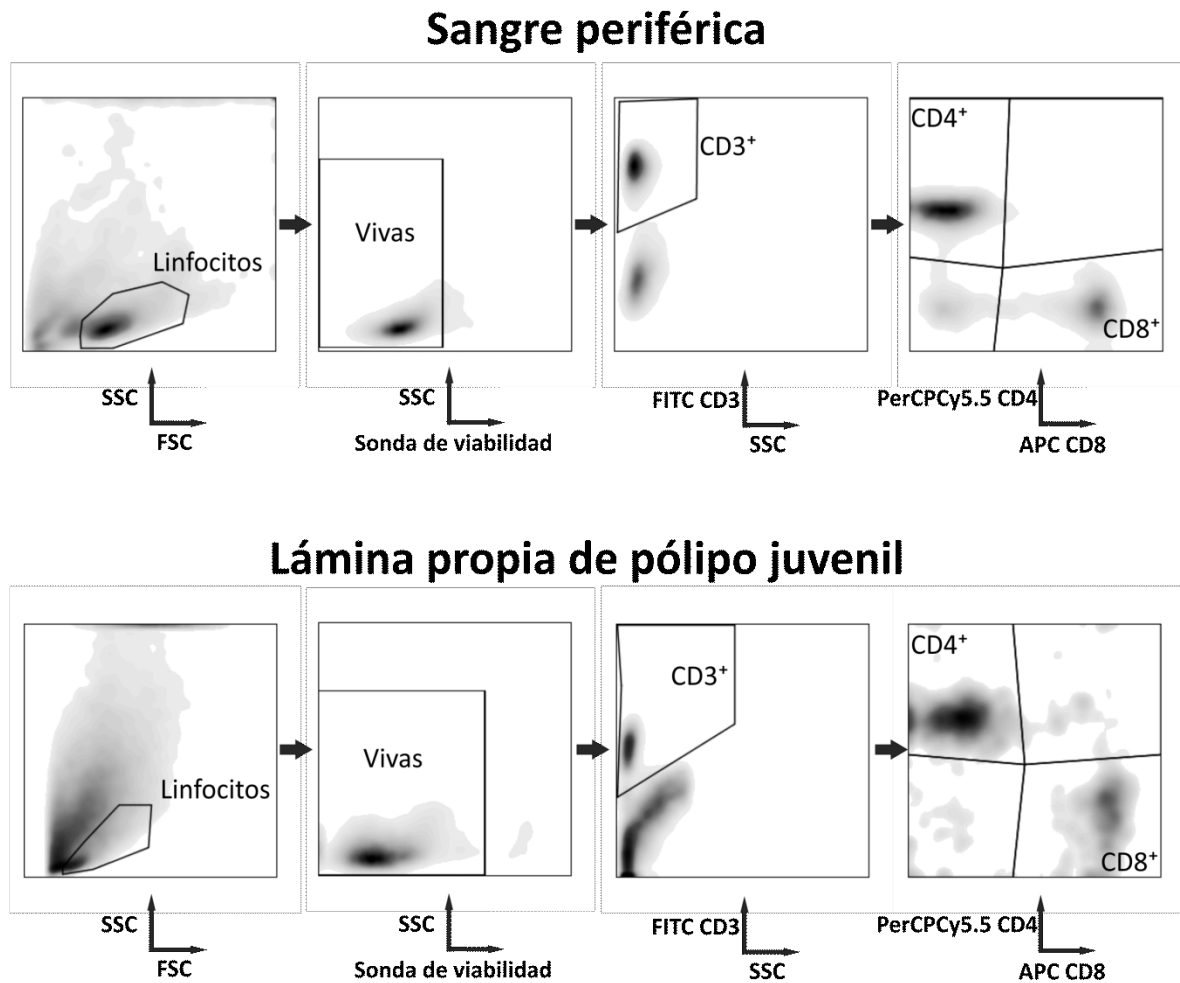
# Linfocitos T, cultivos celulares y estudio de su especificidad

### Objetivos específicos

Aislar y caracterizar linfocitos T de sangre periférica y de la mucosa intestinal de los pacientes con pólipos colorrectales.

#### 1. Cultivo de linfocitos T de sangre periférica y de pólipos juveniles

A partir de los resultados en los que describimos un entorno dominado por citoquinas  $T_H2$  en el estroma de los pólipos, las evidencias de cambio de isotipo con la producción local de IgE, y niveles elevados de IgE total y específica de PLV, decidimos estudiar la presencia de linfocitos T específicos de proteínas de la leche de vaca en los mismos. Primeramente, caracterizamos las poblaciones de linfocitos T presentes en la lámina propia de PJ, por citometría de flujo empleando los marcadores CD3, CD4 y CD8. En la **Figura 33** se muestra la estrategia de selección para la identificación de poblaciones linfocitarias T. Encontramos en la lámina propia de los PJ una relación de 2:1 en la proporción de linfocitos T  $CD3^+CD4^+ : CD3^+CD8^+$  ( $2.01 \pm 0.53\%$ ), con una baja frecuencia variable de células  $CD4^-CD8^-$  que van desde 3 a 20% y un porcentaje medio de 4% para los  $CD4^+CD8^+$ . En sangre periférica encontramos una relación 3:1 de linfocitos T  $CD3^+CD4^+ : CD3^+CD8^+$  ( $2.95 \pm 0.32\%$ ), y una frecuencia baja de células  $CD4^-CD8^-$  y  $CD4^+CD8^+$ .



**Figura 33. Poblaciones de linfocitos T presentes en sangre periférica y en lámina propia del pólipo juvenil.**

Análisis representativo de células de sangre periférica y de lámina propia aisladas de pólipos juveniles, evaluadas por citometría de flujo. Se muestra la estrategia de selección de poblaciones para un caso representativo.

Una vez identificadas las poblaciones  $CD4^+CD8^-$  y  $CD8^+CD4^-$  de linfocitos T en el estroma de los PJ, se procedió a su aislamiento y establecimiento de líneas celulares. El mismo procedimiento se aplicó para obtener cultivos primarios de linfocitos T específicos de sangre periférica. Se obtuvieron suspensiones celulares a partir de células mononucleares de sangre periférica y de lámina propia de PJ, y se expandieron con PLV en presencia de suero humano  $AB^+$ , IL-2 IL-7 e IL-15. Luego de 3 semanas de cultivo y alimentaciones periódicas con medio de cultivo suplementado, se analizaron los marcadores CD3, CD4 y CD8. Los resultados para 3 pacientes se muestran en la **Tabla 8**. El rendimiento en el establecimiento del cultivo celular de linfocitos T de

lámina propia fue mayor que en sangre periférica. Sin embargo, en ambos casos se observó un cambio en las proporciones de las sub-poblaciones de linfocitos T. La relación CD4:CD8 se modificó pasando a ser de 1:2 en la mayoría de los casos, a excepción de un cultivo donde la población CD8<sup>+</sup> pasó a ser predominante.

**Tabla 8.** Frecuencia de subpoblaciones celulares aisladas de sangre periférica y de lámina propia de pólipos colorrectales.

Paciente	Muestra	CD3 <sup>+</sup>		
		CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
PL-76	<i>SP</i>		<b>52.8</b>	
		22.3	55.3	3.1
PL-77	<i>LP</i>		<b>77.3</b>	
		1.2	70.5	0.4
PL-77	<i>SP</i>		<b>48.2</b>	
		24.8	49.3	3.9
PL-78	<i>LP</i>		<b>52.1</b>	
		23.6	53.6	6.3
PL-78	<i>SP</i>		<b>55.6</b>	
		31.3	45.5	2.6
	<i>LP</i>		<b>69.2</b>	
		58.7	20.8	8.8

SP: sangre periférica

LP: lámina propia de pólipos

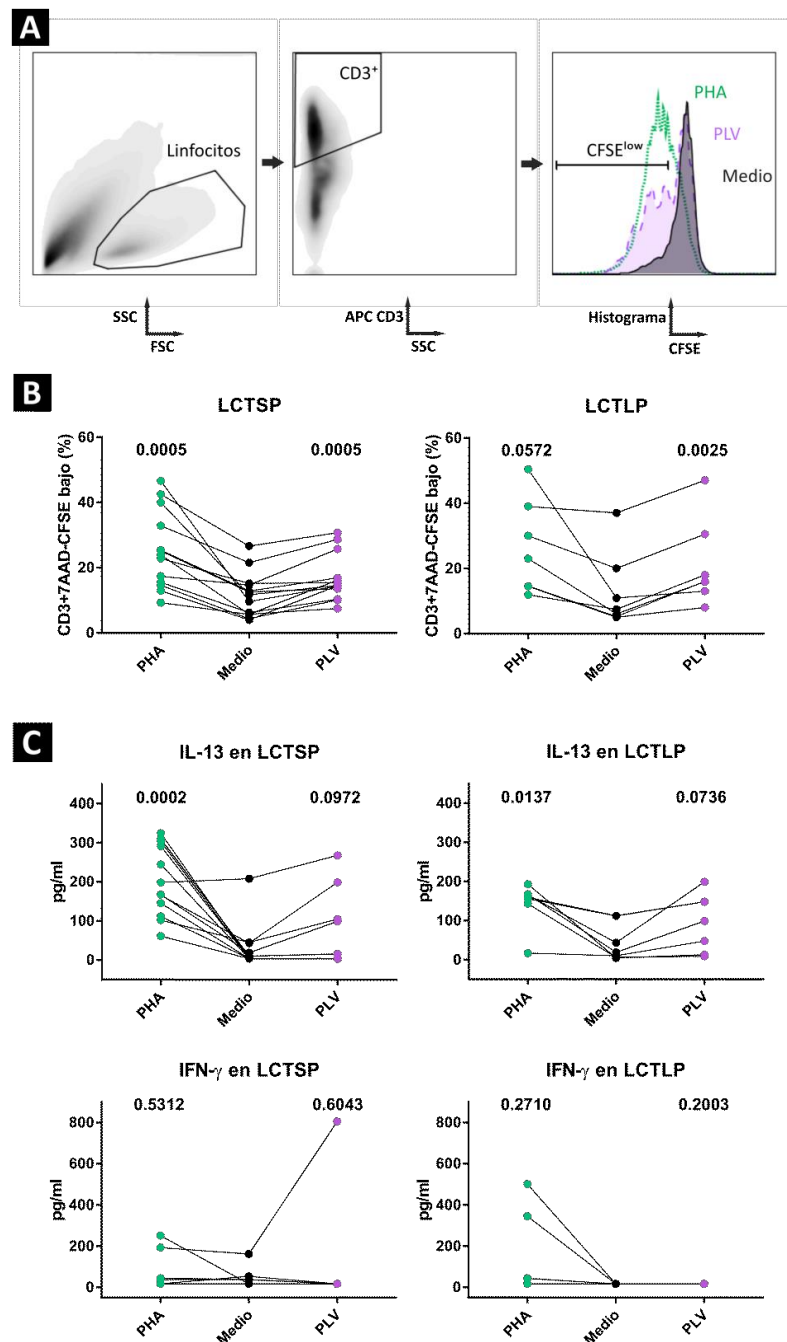
Células CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>: linfocitos T CD4; células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>: linfocitos T CD8; células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>: linfocitos T doble positivos

Estos resultados indican que los métodos de cultivos empleados, si bien modifican la proporción CD4:CD8, permiten la expansión de linfocitos T de lámina propia y sangre periférica en presencia de PLV.

## 2. Estudio de la especificidad de las líneas celulares T generadas a partir de sangre periférica y lámina propia

Una vez establecidas las líneas celulares, se realizaron ensayos de proliferación con CFSE por citometría de flujo con el objetivo de estudiar la especificidad de los linfocitos T. El ensayo se realizó en presencia de células B autólogas de cada paciente (CPA), inmortalizadas con el virus de Epstein-Bar (**Figura 34A**).

En la **Figura 34 B y C** se pueden observar los resultados obtenidos de 13 líneas celulares T obtenidas de sangre periférica (LCTSP) y de 7 líneas celulares T provenientes de lámina propia de los pólipos juveniles (LCTLP). Podemos observar que tanto en SP como en LP de estos pacientes se encuentran linfocitos T específicos de PLV, y obviamente no podemos concluir si se trata de células del mismo clon que se generan en intestino, y luego migran a otro tejido por sangre. A partir del cultivo de estas líneas celulares cuantificamos citoquinas en el sobrenadante de cultivo. Encontramos que IL-13 está elevada y que IFN- $\gamma$  no se modifica al estimular las células con el Ag. Sólo observamos una sola línea celular de sangre periférica que secretó IFN- $\gamma$  post-estímulo con PLV, en comparación con células cultivadas solo con medio de cultivo. Empleamos además como control de proliferación PHA y observamos que indujo la secreción de IL-13; solo 2 LCTSP y 2 LCTLP produjeron IFN- $\gamma$ . Estos resultados indicarían la presencia de más de un clon en las líneas celulares producidas. Asimismo se midió las concentraciones de IL-4 e IL-5 secretadas y no se encontraron valores detectables.



**Figura 34. Ensayos de proliferación de linfocitos T y cuantificación de citoquinas en el sobrenadante de cultivo.**

(A) Estrategia de selección de poblaciones de linfocitos. (B) Ensayos de proliferación con CFSE mediante citometría de flujo de líneas celulares de linfocitos T de sangre periférica (LCTSP) y lámina propia de pólipos juveniles (LCTLP). Las células se incubaron con medio de cultivo (control negativo), fitohematoglutina (PHA) (control positivo) y proteínas de leche de vaca (PLV). Se utilizó CD3 como marcador de linfocitos T (C) Cuantificación por ELISA de IL-13 e IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de proliferación.

Se realizó un análisis *t*-Student pareado con respecto al medio. Los valores de *p* se muestran en el gráfico



Estos resultados en conjunto indican que los pacientes con PJ presentan linfocitos T, tanto en sangre periférica como en la lámina propia, que responden a PLV proliferando y secretando en su mayoría IL-13. Por lo tanto, se trataría de linfocitos T<sub>H</sub>2 específicos de PLV que probablemente se indujeron o generaron en la mucosa intestinal para cumplir algún rol en la patogenia de la enfermedad.

# DISCUSIÓN

En el presente trabajo de Tesis estudiamos la respuesta inflamatoria desarrollada en PJ colorrectales de pacientes pediátricos con sangrado rectal y su asociación con la ALV. Como hemos mencionado anteriormente, la literatura publicada acerca del desarrollo de PJ, y de los efectos de la alergia alimentaria en el intestino grueso humano, es muy limitada. Si bien existen trabajos previos que han documentado la presencia de eosinófilos en el estroma de los PJ, y han sugerido una asociación con la alergia alimentaria (Alexander et al., 1970; Roma-Giannikou et al., 2008), muestran ciertas limitaciones. El estudio retrospectivo de Alexander et al. mostró una correlación estadística entre PJ y las historias clínicas, personal o familiar, de alergia de los pacientes. Este trabajo, con un bajo número de pacientes (n=15), no incluyó un análisis histológico de los tejidos. Por otro lado, el trabajo de Roma-Giannikou et al. analizó la histología de 128 PJ, y tejidos colónicos circundantes, independientemente de la condición atópica de los pacientes y reveló, a diferencia de nuestros resultados, que ambos tejidos presentaban un infiltrado celular dominado por eosinófilos. Estos trabajos son los únicos en los que la literatura refleja una correlación entre atopía, eosinófilos y la presencia de pólipos colónicos en pacientes pediátricos. La ventaja del presente estudio es que hemos analizado las condiciones atópicas. En nuestro trabajo empleamos diferentes técnicas para describir una asociación entre la condición atópica de los pacientes, la presencia de pólipos colorrectales en 100 pacientes y diferentes parámetros inmunológicos. Para esto, en primera instancia nos centramos en la evaluación clínica de los pacientes. Por medio de pruebas cutáneas, anamnesis y determinaciones serológicas, pudimos determinar que los pacientes con PJ colorrectales y HNL presentan niveles elevados de IgE total y específica a PLV en plasma y antecedentes personales y/o familiares de alergia. Sin embargo, encontramos que la prueba cutánea fue negativa en la mayoría de los pacientes, reflejando que no hay sensibilización de los mastocitos cutáneos. Cabe destacar que al evaluar aquellos pacientes que solo presentaron HNL en el colon, sin pólipos, encontramos que los niveles de IgE total y específica eran significativamente menores, lo cual ya ha sido reportado en trabajos previos (Iacono et al., 2007). La alergia alimentaria en estos pacientes no fue confirmada por desafío oral ya que en nuestro país no se utiliza como herramienta de diagnóstico. Por lo tanto el diagnóstico es básicamente clínico y se

confirma que es mediado por IgE a través de las pruebas cutáneas y la serología para IgE. Dado que la evaluación clínica determinó que los pacientes únicamente con sangrado rectal y HNL no presentaron signos clínicos de atopía, es posible afirmar que la sensibilización a alérgenos alimentarios encontrada en los pacientes con PJ está asociada con la presencia de los pólipos en el colon. No podemos confirmar con estos estudios una relación causal entre la alergia alimentaria y la formación de los pólipos.

Caracterizamos el infiltrado celular presente en los pólipos y detectamos un estroma claramente inflamatorio, dominado por eosinófilos, fibrosis y citoquinas TH2. Todos estos hallazgos confirman en su conjunto que se trata de una inflamación tipo 2 exclusivamente en el interior de los pólipos. Este tipo de entorno inflamatorio sería el responsable de generar las condiciones para que se induzcan los mecanismos que llevan a la síntesis de IgE local. Por fuera de estos pólipos no observamos presencia de eosinófilos, ni fibrosis ni síntesis de IgE. Asimismo, aislamos y expandimos linfocitos TH2 específicos de PLV secretores de IL-13.

Se ha descrito que en el TGI humano el número de eosinófilos se incrementa a medida que nos acercamos al colon. Cuando su frecuencia supera un determinado valor umbral, se define el tejido como hiper-eosinofílico. En situaciones patológicas en las que diferentes secciones del TGI contienen un elevado número de eosinófilos, se ha observado un remodelamiento tisular mediado por la activación de los fibroblastos (Loktionov, 2019; Travers y Rothenberg, 2015). Es interesante destacar que si bien en nuestro trabajo observamos este tipo de proceso inflamatorio en el interior del pólipo, el TCP solo muestra cúmulos linfoides aislados, con un número normal y reducido de eosinófilos, ambos propios de este tipo de tejido en homeostasis. Por lo tanto, en estos pacientes se trataría de un trastorno eosinofílico, IgE-mediado, circunscripto exclusivamente al tejido del pólipo. De la misma forma, el análisis de citoquinas del estroma de los pólipos reveló un patrón TH2 definido, con niveles elevados de IL-4 e IL-13, y una relación IL-13/IFN- $\gamma$  significativamente mayor al TCP. Desconocemos con estos resultados si existe una relación causal entre la atopía y la presencia del pólipo, o se trata únicamente de una asociación. El hecho que un número ínfimo de pacientes no hayan respetado la dieta de restricción, y se haya observado recurrencia en la poliposis, sugeriría que el proceso inflamatorio inducido por la exposición a un

alimento alergénico podría ser determinante en la inducción de los pólipos. En forma similar, otros grupos han descrito que los pólipos nasales muestran una asociación con la exposición a aeroalérgenos. Pólipos nasales de pacientes con rinosinusitis crónica muestran un infiltrado celular con una elevada frecuencia de eosinófilos o de neutrófilos, dependiendo del origen de los pacientes (Van Zele et al., 2006; Zhang et al., 2008). Pacientes que viven en países occidentales muestran pólipos nasales ricos en eosinófilos y con un perfil tisular tipo 2 (Bachert et al., 1997), mientras que en los pólipos de los pacientes que viven en Asia, predominan los neutrófilos con un entorno mixto TH1/TH17 (Nagarkar et al., 2013; Zhao et al., 2013). Los resultados aquí hallados sugieren que los pólipos colorrectales en nuestra población se parecen a los pólipos nasales presentes en pacientes provenientes de países occidentales.

La etiología y patogénesis de los pólipos nasales sigue siendo motivo de controversia, no obstante, recientes estudios han propuesto que los aeroalérgenos y/o un aumento de toxinas determinado por un desbalance de la microbiota nasal podrían dañar la barrera epitelial e inducir la secreción de TSLP, IL-33 e IL-25 por parte de las células epiteliales que recubren la mucosa nasal. Estas citoquinas o alarminas inducirían una respuesta TH2 por su acción sobre las ILC2 (Heffler et al., 2018). Dado el posible paralelismo con los pólipos nasales, decidimos estudiar la producción de citoquinas en las células epiteliales de los pólipos colorectales, y encontramos que tanto IL-33, como TSLP se encuentran incrementadas en el compartimento epitelial, a diferencia del TCP. Estos hallazgos nos llevan a postular que los alérgenos alimentarios, y probablemente la microbiota local, inducen la producción y secreción de estas alarminas por parte de los colonocitos, y éstas inducen un entorno inflamatorio tipo 2 exclusivamente dentro del pólipo. Los colonocitos de los PJ también mostraron una elevada expresión de eotaxina-3/CCL-26, la cual, junto con IL-5, podrían ser las responsables de la quimiotaxis de eosinófilos, y el marcado infiltrado eosinofílico hallado. Incluso, se ha demostrado que la expresión de eotaxina-3 en células intestinales humanas HT-29 (modelo de epiteliales colorrectales) aumenta cuando estas células son incubadas con IL-4 e IL-13 (Blanchard et al., 2005). En nuestro trabajo encontramos que estas citoquinas están en cantidades significativamente elevadas en el estroma del pólipo. De hecho, es conocido que IL-4 puede inducir la expresión de

CD23/FcεRII, el receptor de baja afinidad de IgE, tanto en células epiteliales intestinales de pacientes alérgicos como sanos, lo que explicaría la presencia de IgE que encontramos en el epitelio de los PJ. Se conoce que el complejo CD23/IgE es capaz de traslocar Ags desde la membrana hacia los endosomas en una vía que evita la degradación lisosomal, permitiendo que las proteínas se mantengan nativas, y resultando en una activación de los mastocitos (Yu, 2009). Por otro lado es sabido que IL-4 e IL-13 son determinantes para inducir el cambio de isotipo a IgE (Toellner, 2014), y en nuestro trabajo encontramos síntesis local de IgE con niveles elevados de ambas citoquinas.

Trabajos previos han demostrado la presencia de IgE específica en las heces de pacientes alérgicos y células IgE+ en el TGI humano (Berin et al., 2011; Hoh y Boyd, 2018; Schwab et al., 2001). No obstante, los mecanismos responsables de la generación de IgE y la ubicación microanatómica de estos eventos son en gran medida desconocidos en humanos. En el presente trabajo investigamos la producción local de IgE en la mucosa colónica de pacientes con sangrado rectal, y sensibilizados a alérgenos alimentarios, y como se ha mencionado revelamos la presencia de centros germinales activos con células que expresan CD20, AID y Ki67, y altos niveles de anticuerpos IgE. Además, detectamos células IgE+ y células plasmáticas CD138+IgE+, las cuales no observamos en el tejido sano adyacente. Cabe señalar que otros trabajos han hallado células IgE+ en la mucosa gastrointestinal, pero sin caracterizar el tipo celular (Brown et al., 1975; Tada e Ishizaka, 1970).

La marcada diferencia observada entre los pólipos y el TCP permite descartar que la IgE presente en los pólipos provenga de la circulación sanguínea, sugiriendo que se produce localmente. Nuestro hallazgo del transcripto circular Iε-Cμ en los centros germinales aislados y de los transcriptos Iε-Cy1/3/4 en el pólipo, correspondientes a un cambio directo y secuencial respectivamente, arroja evidencias de la generación de la cadena ε en los mismos por dos mecanismos diferentes. La diferencia en la expresión de estos transcriptos puede ser adjudicada a una degradación del ARN en los centros germinales individuales analizados, o a que el cambio de isotipo secuencial se lleve a cabo fuera de los CGs como ya ha sido sugerido en trabajos previos (Gould y Ramadani, 2015; Roco et al., 2019; Takemori et al., 2014). De forma similar a nuestro trabajo,

Coëffier et al. encontraron una alta expresión de IL-4 y GLT $\epsilon$  en biopsias intestinales de pacientes con alergia alimentaria (Coëffier et al., 2005), no obstante, en este trabajo no se analizaron los transcriptos circulares lo cual permite confirmar la CSR. Nuestros resultados son compatibles con los descritos en la mucosa intestinal de ratones (Curotto de Lafaille et al., 2001) y en pólipos nasales de pacientes con rinitis alérgica (Gevaert et al., 2013), en donde se ha observado tanto la CSR a la cadena  $\epsilon$  de forma directa como secuencial.

Dado que también hemos detectado la transcripción de los exones que codifican para la cadena  $\epsilon$ , podemos asegurar que la IgE se sintetiza en el interior de los pólipos, donde además hemos revelado que la misma se encuentra en la superficie de linfocitos B, células plasmáticas, eosinófilos y células en los centros germinales. Esta es la primera vez que se describe la síntesis de IgE y la producción de células productoras de IgE en intestino humano. Nuestros resultados nos permiten caracterizar a los pólipos como órganos linfoides terciarios, en los que se sintetizan distintos isotipos de inmunoglobulinas, entre ellos la IgE. Esto descarta que las células que se activan en los sitios inductivos del colon deban migrar a los MLN para que se produzca la síntesis de inmunoglobulinas. El tejido colónico presenta por lo tanto todos los elementos necesarios para que se produzca localmente la síntesis de IgE, inclusive con las citoquinas necesarias para inducir el cambio de isotipo. Lo que no podemos confirmar con nuestros estudios es la especificidad de la IgE, ni la afinidad. Se requiere secuenciar las porciones variables de los transcriptos aislados que codifican para las cadenas pesada y liviana de las inmunoglobulinas para poder obtener información sobre las mutaciones presentes y de esta manera estimar si se trata de inmunoglobulinas de alta o baja afinidad. Es de esperar que los mecanismos de cambio de isotipo directo generen moléculas de baja afinidad, mientras que los secuenciales den origen a moléculas de IgE de alta afinidad.

En este estudio también encontramos una correlación entre los niveles de IgE total sérica y tisular, lo que indica que la sensibilización del paciente podría estar reflejada principalmente en los pólipos, y no así en la mucosa adyacente la cual mostró niveles de IgE significativamente menores. Sin embargo, no podemos proporcionar evidencia para demostrar que la producción local de IgE estaría contribuyendo a la

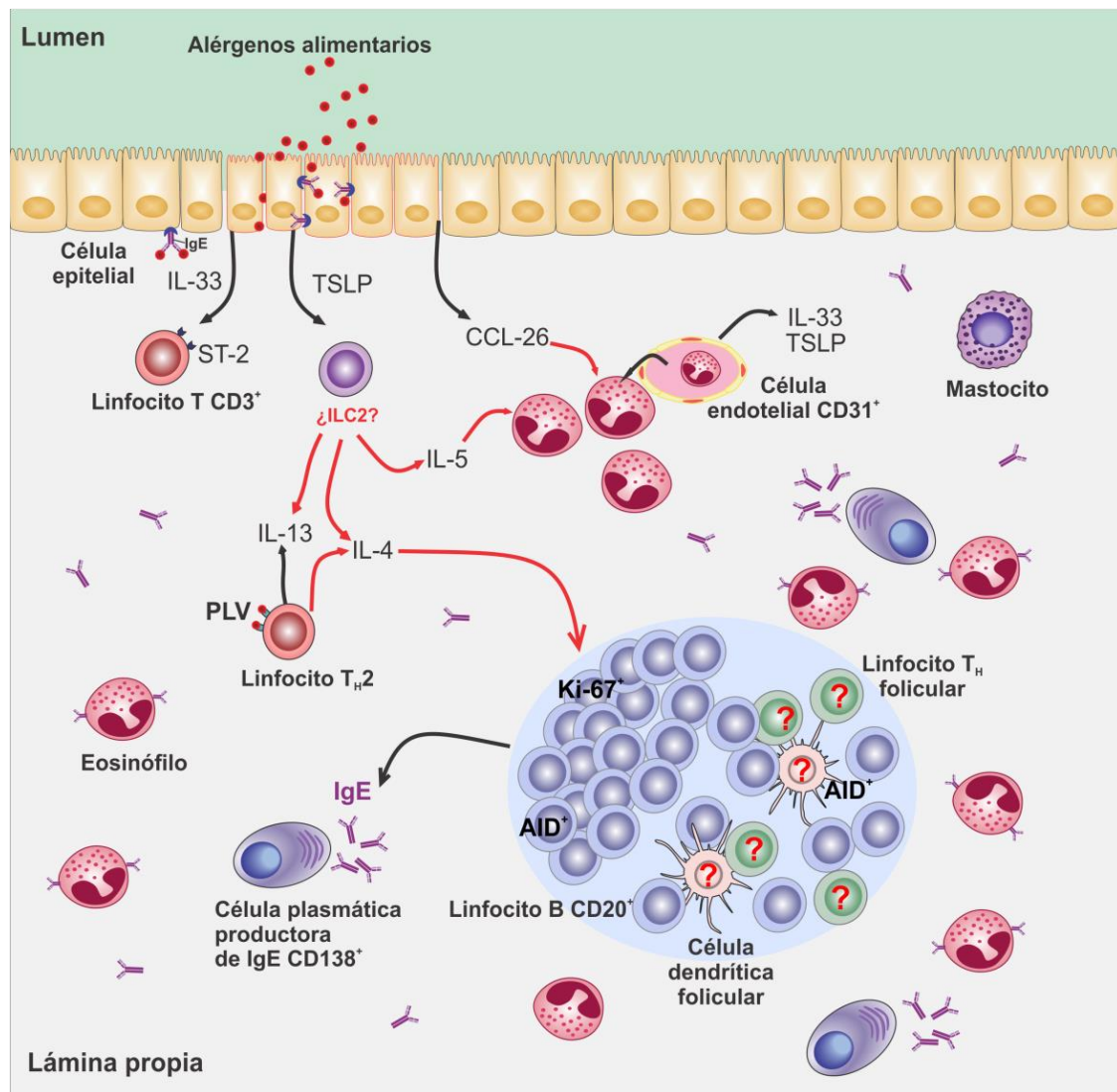
condición atópica de los pacientes, o a la sensibilización a alérgenos alimentarios. A pesar de que los pacientes mostraron niveles elevados de IgE específica en suero, la prueba cutánea resultó negativa en la mayoría de ellos. Esto refleja que la producción de IgE colónica ejerce un bajo impacto sistémico y que la reactividad de los mastocitos y/o eosinófilos mediada por IgE se localiza principalmente en la mucosa intestinal. Sin embargo, dada la evidencia que las células migran entre las mucosas, en particular entre los pulmones y el intestino (Tulic et al., 2016; Wosen et al., 2018), y a que un elevado porcentaje de pacientes presentaron antecedentes de asma y rinitis alérgica, no podemos descartar que la respuesta inflamatoria alérgica desarrollada en los pólipos esté contribuyendo con células que migran al tejido pulmonar y luego dan origen a la sintomatología observada en las vías respiratorias, o viceversa, cuando estas células se exponen a los alérgenos.

También estudiamos la clonalidad de las inmunoglobulinas mediante el análisis de las regiones variables presentes en los transcritos aislados en los centros germinales. Nuestros resultados mostraron un uso restringido de los genes VH1/7, VH3 y VH5, tanto en centros germinales, como en los tejidos totales de los pólipos. Esto indica una oligoclonalidad en la generación de células B. Por el contrario, el tejido colónico circundante analizado mostró la expresión de todas las familias de genes VH. Diferentes estudios han descrito el uso restringido de la familia de los genes VH en pacientes alérgicos. En particular, la familia VH5 se ha encontrado sobrerrepresentada en estos pacientes (Gould y Wu, 2018; Snow et al., 1995; Wu et al., 2014). Sin embargo, a excepción de las familias VH2 y VH7, cada familia VH se halló predominante en al menos un trabajo de alergia (Davies y O’Hehir, 2008). En modelos animales, se ha encontrado una oligoclonalidad similar al analizar la IgA específica producida después de una inmunización oral. Esto sugiere que los linfocitos B intestinales se activan y experimentan una maduración de afinidad de forma sincronizada en los sitios inductivos. Se ha propuesto que un número limitado de clones de células B de alta afinidad se seleccionan y migran de uno a múltiples centros germinales o sitios inductivos tras las sucesivas inmunizaciones (Bergqvist et al., 2013). Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales para determinar si también existe un sesgo en el uso de VH para los isotipos individuales y los genes VL en los PJ.



Finalmente, dado que los trastornos gastrointestinales causados por alergias alimentarias involucran células T que son activadas por Ags alimentarios, en el presente estudio desarrollamos un método para cultivar linfocitos T provenientes de la lámina propia de PJ colorrectales. Con este método, se obtuvieron un número suficiente de células que nos permitieron estudiar directamente los linfocitos T involucrados en la respuesta alérgica en el sitio de la inflamación. Los LT provenientes de la lámina propia de los pólipos mostraron un aumento en la proliferación en presencia de PLV con secreción de IL-13. Resultados similares fueron encontrados en linfocitos T provenientes de biopsias de duodeno de pacientes con gastroenteritis eosinófila alérgica (Beyer et al., 2002). Nuestros resultados indican la presencia de linfocitos TH2 en la lámina propia del pólipo, los cuales podrían ser los responsables de los niveles de IL-13 observados en el tejido. No podemos descartar la presencia de ILC2, fuente importante de IL-13. Dado que los LT provenientes de sangre periférica presentan también una respuesta frente a las PLV, estudios de tráfico celular son necesarios para determinar si los LT específicos se están generando en el estroma de los pólipos o migran desde un sitio inductivo ubicado en otro tejido a través de la circulación sanguínea.

En resumen, en este trabajo de Tesis determinamos una asociación entre la presencia de PJ colorrectales y el estado atópico de los pacientes. Describimos un microambiente dominante TH2 dentro de los pólipos con altos niveles de IL-4, IL-5 e IL-13, que podrían ser responsables de la inducción de quimiotaxis de eosinófilos y la producción de IgE. También demostramos por primera vez la producción de IgE, a través de un cambio de isotipo directo y secuencial en la mucosa colónica de los pacientes sensibilizados a alérgenos alimentarios, y determinamos que las inmunoglobulinas presentan un sesgo hacia el uso las familias de regiones variables VH1/7, VH3 y VH5. El mecanismo propuesto se representa en la **Figura 35**.



**Figura 35. Respuesta inflamatoria desarrollada en los pólipos juveniles.**

La ilustración representa el conjunto de resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis. Las líneas color rojas representan los mecanismos supuestos que aún no han sido comprobados.

Nuestro estudio proporciona por lo tanto información que permite una comprensión más profunda de la patología y de los mecanismos de síntesis de IgE en la mucosa humana, lo que puede conducir al desarrollo de nuevas inmunoterapias. Los anticuerpos monoclonales anti-IgE se han utilizado con éxito para varias enfermedades alérgicas al bloquear la unión de la IgE libre a las células. Aunque esta terapia no controla la producción de IgE, se han demostrado los beneficios clínicos para los pacientes que padecen enfermedades alérgicas mediadas por esta inmunoglobulina (Stokes, 2017). Además, es conocido que el tratamiento con Omalizumab (anticuerpo monoclonal humano anti-IgE) de pacientes con asma y pólipos nasales ha logrado controlarlos síntomas nasales y bronquiales (Gevaert et al., 2013). Dado que existe una creciente sospecha sobre el riesgo de desarrollo de tumores a partir de los PJ (Ibrahimi et al., 2019) y que un porcentaje significativo de pacientes tienen recurrencia (Fox et al., 2010), se deben considerar nuevas estrategias para controlar el desarrollo de PJ, además de la polipectomía que se emplea actualmente. El control del proceso inflamatorio mucosal y de la síntesis de la IgE, no solo permitiría modular el proceso alérgico en pacientes sensibilizados, sino también el proceso de poliposis juvenil.

# CONCLUSIONES GENERALES

A partir de los resultados presentados en el presente trabajo de Tesis se desprenden las siguientes conclusiones:

- Los pacientes con proctorragia en los que se detectaron y removieron PJ presentaron antecedentes personales o familiares de alergia y sensibilización a proteínas de la leche de vaca, maní o soja.

- Los pacientes con proctorragia en los que no se detectaron pólipos juveniles, tenían hiperplasia nodular linfoide (que pudo generar el sangrado intestinal) en alguna porción del intestino grueso. Un reducido porcentaje de ellos tuvo antecedentes de alergia, y niveles de IgE total y específica en plasma reducidos.

- Los pólipos juveniles mostraron un marcado infiltrado celular, compuesto por células mononucleares, neutrófilos, mastocitos y eosinófilos sensibilizados con IgE, a diferencia de la mucosa circundante que mostró una histología normal. La histología de los pólipos mostró además una criptitis con estructuras alteradas.

- El estroma de los pólipos mostró una intensa fibrosis con abundante depósito de colágeno y elevada frecuencia de fibroblastos.

- Las células epiteliales aisladas de los pólipos expresaron cantidades significativamente mayores de CCL26 (eotaxina-3), en comparación con la mucosa circundante, que podría explicar los elevados recuentos de eosinófilos detectados en el interior de los pólipos.

- El estroma de los pólipos presentó un predominio de citoquinas  $T_H2$ , con niveles elevados de IL-4 e IL-13 y una relación IL-13/IFN- $\gamma$  significativamente mayor a la presentada por la mucosa circundante. Los niveles de IFN- $\gamma$  no mostraron diferencias significativas al comparar las concentraciones halladas en el interior de los pólipos y en el tejido circundante.

- Se hallaron niveles significativamente elevados de IL-33 y TSLP en los pólipos, en comparación con el tejido colónico circundante, con expresión principalmente en células epiteliales y endoteliales del pólipo, no así por la mucosa circundante.

• Encontramos que el receptor de IL-33, ST2, se expresa en ambos tejidos y la versión soluble del mismo se encuentra elevada en el plasma de los pacientes con pólipos juveniles. Hallamos expresión de ST2 en linfocitos T principalmente del estroma de los pólipos.

• El tejido de los pólipos mostró niveles elevados de IgE total y específica a leche, en comparación con niveles bajos en el tejido circundante al pólipo, lo cual correlaciona con los niveles de IgE sérica total de los pacientes.

• Los pólipos juveniles presentan numerosos centros germinales activos caracterizados por la expresión de CD20, Ki67 y AID, y un número significativo de células plasmáticas IgE<sup>+</sup>, por lo cual podría considerarse a este tejido como un órgano linfoide terciario donde se induce la respuesta humoral.

• Se encontró en los centros germinales de los pólipos juveniles ARN correspondiente a los transcritos de línea germinal inducidos para iniciar un cambio de isotipo por acción de la AID, y consiguiente recombinación de  $\mu$  a  $\epsilon$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 3$  o  $\gamma 4$  ( $\epsilon$ GLT,  $\gamma 1$ GLT,  $\gamma 3$ GLT y  $\gamma 4$ GLT). Asimismo, los transcritos circulares transitorios, marcadores de una recombinación del cambio directo de  $\mu$  a  $\epsilon$  ( $I\epsilon$ -C $\mu$  CT) fueron también detectados en el material aislado de CGs individuales. Por otro lado, el cambio de isotipo secuencial de  $\gamma 1$ ,  $\gamma 3$  o  $\gamma 4$  a  $\epsilon$  solo se encontró en el material aislado a partir de los pólipos enteros (CT  $I\epsilon$ -C $\gamma 1$ , CT  $I\epsilon$ -C $\gamma 3$  e CT  $I\epsilon$ -C $\gamma 4$ ).

• La detección de transcritos codificantes para la cadena  $\epsilon$  en los distintos centros germinales analizados confirmó que la recombinación para cambio de clase se produjo en estos centros germinales. Este hallazgo confirma la síntesis local de IgE y la sensibilización de los eosinófilos. En el tejido circundante se detectaron transcritos que codifican para los demás isotipos, excepto para  $\epsilon$ .

• En centros germinales individuales se detectó recombinación para varios isotipos de cadena pesada de inmunoglobulinas.

• El análisis de los transcritos para familias de genes VH reveló que en los diferentes centros germinales donde se sintetiza IgE se emplean en forma

preferencial genes de las familias VH1/7, VH3 y VH5 para generar la porción variable de estas proteínas.

- Los pólipos juveniles presentaron linfocitos T en el estroma capaces de reconocer Ags de proteínas de leche de vaca y de proliferar frente a estos. Estos linfocitos T específicos secretaron IL-13 al expandirlos en forma Ag-específico. Esto indica que en los pólipos se expanden linfocitos T<sub>H2</sub> específicos de los alérgenos alimentarios.

- Los resultados negativos de las pruebas cutáneas en un elevado porcentaje de pacientes con pólipos podría deberse a que los mastocitos cutáneos no se sensibilizaron y solo hay sensibilización de las células que se encuentran en la mucosa donde se produce la IgE.

En conclusión, en el presente trabajo de Tesis encontramos que la respuesta alérgica desarrollada en el estroma de los pólipos juveniles refleja la condición atópica de los pacientes, y está dominada por un entorno tisular inflamatorio tipo 2, responsable de la inducción de la síntesis local de IgE y de linfocitos T<sub>H2</sub> específicos. El tejido que rodea a los pólipos muestra un estroma similar al de un colon en homeostasis lo cual confirma que el estroma del pólipo es un tejido linfoide terciario. Finalmente, estos resultados nos permiten concluir que los linfocitos B no necesariamente necesitan migrar a los ganglios mesentéricos para diferenciarse y producir IgE.

# BIBLIOGRAFÍA



- Abernathy-Carver, K.J., Sampson, H.A., Picker, L.J., Leung, D.Y., 1995. Milk-induced eczema is associated with the expansion of T cells expressing cutaneous lymphocyte antigen. *J. Clin. Invest.* 95, 913–918. <https://doi.org/10.1172/JCI117743>
- Agyemang, A., Nowak-Wegrzyn, A., 2019. Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome: a Comprehensive Review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 57, 261–271. <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8722-z>
- Ahluwalia, B., Magnusson, M.K., Öhman, L., 2017. Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad. *Scand. J. Gastroenterol.* 52, 1185–1193. <https://doi.org/10.1080/00365521.2017.1349173>
- Alexander, M.R.H., Beckwith, J.B., Morgan, A., Bill, A.H., 1970. Juvenile polyps of the colon and their relationship to allergy. *Am. J. Surg.* 120, 222–225. [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(70\)80115-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(70)80115-5)
- Allaire, J.M., Crowley, S.M., Law, H.T., Chang, S.-Y., Ko, H.-J., Vallance, B.A., 2018. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol.* 39, 677–696. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.04.002>
- Anvari, S., Miller, J., Yeh, C.-Y., Davis, C.M., 2019. IgE-Mediated Food Allergy. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 57, 244–260. <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8710-3>
- Asher, M.I., Montefort, S., Björkstén, B., Lai, C.K.W., Strachan, D.P., Weiland, S.K., Williams, H., ISAAC Phase Three Study Group, 2006. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet Lond. Engl.* 368, 733–743. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69283-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69283-0)
- Bachert, C., Wagenmann, M., Hauser, U., Rudack, C., 1997. IL-5 synthesis is upregulated in human nasal polyp tissue. *J. Allergy Clin. Immunol.* 99, 837–842. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(97\)80019-X](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(97)80019-X)
- Bao, Z., Zhang, P., Yao, Y., Lu, G., Tong, Z., Yan, B., Tu, L., Yang, G., Zhou, J., 2017. Deguelin Attenuates Allergic Airway Inflammation via Inhibition of NF- $\kappa$ B Pathway in Mice. *Int. J. Biol. Sci.* 13, 492–504. <https://doi.org/10.7150/ijbs.17238>
- Baptista, A.P., Olivier, B.J., Goverse, G., Greuter, M., Knippenberg, M., Kusser, K., Domingues, R.G., Veiga-Fernandes, H., Luster, A.D., Luger, A., Randall, T.D., Cupedo, T., Mebius, R.E., 2013. Colonic patch and colonic SILT development are independent and differentially regulated events. *Mucosal Immunol.* 6, 511–521. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.90>
- Bergqvist, P., Stensson, A., Hazanov, L., Holmberg, A., Mattsson, J., Mehr, R., Bemark, M., Lycke, N.Y., 2013. Re-utilization of germinal centers in multiple Peyer's patches results in highly synchronized, oligoclonal, and affinity-matured gut IgA responses. *Mucosal Immunol.* 6, 122–135. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.56>
- Berin, C., Wood, S., Lopez-Exposito, I., Sampson, H., Nowak-Wegrzyn, A., 2011. Detection Of Milk-specific IgE And IgA In Stool Samples From Children With Food Allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, AB181–AB181. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.12.720>
- Berin, M.C., Sampson, H.A., 2013. Mucosal immunology of food allergy. *Curr. Biol.* CB 23, R389–400. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.02.043>
- Beyer, K., Castro, R., Birnbaum, A., Benkov, K., Pittman, N., Sampson, H.A., 2002. Human milk-specific mucosal lymphocytes of the gastrointestinal tract display a TH2 cytokine profile. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109, 707–713. <https://doi.org/10.1067/mai.2002.122503>
- Blanchard, C., Durual, S., Estienne, M., Emami, S., Vasseur, S., Cuber, J.C., 2005. Eotaxin-3/CCL26 gene expression in intestinal epithelial cells is up-regulated by interleukin-4 and interleukin-13 via the signal transducer and activator of transcription 6. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 2559–2573. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.06.010>

- Brandtzaeg, P., Johansen, F.-E., 2005. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol. Rev.* 206, 32–63. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00283.x>
- Brown, W.R., Borthistle, B.K., Chen, S.T., 1975. Immunoglobulin E (IgE) and IgE-containing cells in human gastrointestinal fluids and tissues. *Clin. Exp. Immunol.* 20, 227–237.
- Buettner, M., Lochner, M., 2016. Development and Function of Secondary and Tertiary Lymphoid Organs in the Small Intestine and the Colon. *Front. Immunol.* 7, 342. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00342>
- Cerecedo, I., Zamora, J., Shreffler, W.G., Lin, J., Bardina, L., Dieguez, M.C., Wang, J., Muriel, A., de la Hoz, B., Sampson, H.A., 2008. Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122, 589–594. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.06.040>
- Chan, T.D., Gatto, D., Wood, K., Camidge, T., Basten, A., Brink, R., 2009. Antigen affinity controls rapid T-dependent antibody production by driving the expansion rather than the differentiation or extrafollicular migration of early plasmablasts. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 3139–3149. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901690>
- Chinthrajah, R.S., Hernandez, J.D., Boyd, S.D., Galli, S.J., Nadeau, K.C., 2016. Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 984–997. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.02.004>
- Chizuka, A., Kanda, Y., Nannya, Y., Oshima, K., Kaneko, M., Yamamoto, R., Suguro, M., Hamaki, T., Matsuyama, T., Takezako, N., Miwa, A., Togawa, A., 2002. The diagnostic value of kappa/lambda ratios determined by flow cytometric analysis of biopsy specimens in B-cell lymphoma. *Clin. Lab. Haematol.* 24, 33–36. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2257.2002.00175.x>
- Coker, H.A., Harries, H.E., Banfield, G.K., Carr, V.A., Durham, S.R., Chevetton, E., Hobby, P., Sutton, B.J., Gould, H.J., 2005. Biased use of VH5 IgE-positive B cells in the nasal mucosa in allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 445–452. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.04.032>
- Connors, L., O’Keefe, A., Rosenfield, L., Kim, H., 2018. Non-IgE-mediated food hypersensitivity. *Allergy Asthma Clin. Immunol. Off. J. Can. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 14, 56. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0285-2>
- Curotto de Lafaille, M.A., Muriglan, S., Sunshine, M.J., Lei, Y., Kutchukhidze, N., Furtado, G.C., Wensky, A.K., Olivares-Villagómez, D., Lafaille, J.J., 2001. Hyper immunoglobulin E response in mice with monoclonal populations of B and T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 194, 1349–1359. <https://doi.org/10.1084/jem.194.9.1349>
- Davies, J.M., O’Hehir, R.E., 2008. Immunogenetic characteristics of immunoglobulin E in allergic disease. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 38, 566–578. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.02941.x>
- DiTommaso, L.A., Rosenberg, C.E., Eby, M.D., Tasco, A., Collins, M.H., Lyles, J.L., Putnam, P.E., Mukkada, V.A., Rothenberg, M.E., 2019. Prevalence of eosinophilic colitis and the diagnoses associated with colonic eosinophilia. *J. Allergy Clin. Immunol.* 143, 1928–1930.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.12.1002>
- Durno, C.A., 2007. Colonic polyps in children and adolescents. *Can J Gastroenterol* 21, 233–239. <https://doi.org/10.1155/2007/401674>
- Erazo, A., Kutchukhidze, N., Leung, M., Christ, A.P.G., Urban, J.F., Curotto de Lafaille, M. a., Lafaille, J.J., 2007. Unique Maturation Program of the IgE Response In Vivo. *Immunity* 26, 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.12.006>
- Fear, D.J., McCloskey, N., O’Connor, B., Felsenfeld, G., Gould, H.J., 2004. Transcription of Ig germline genes in single human B cells and the role of cytokines in isotype determination. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 173, 4529–4538. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.7.4529>

- Fiocchi, A., Brozek, J., Schünemann, H., Bahna, S.L., von Berg, A., Beyer, K., Bozzola, M., Bradsher, J., Compalati, E., Ebisawa, M., Guzmán, M.A., Li, H., Heine, R.G., Keith, P., Lack, G., Landi, M., Martelli, A., Rancé, F., Sampson, H., Stein, A., Terracciano, L., Vieths, S., 2010. World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. *Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol.* 21 Suppl 2, 1–125. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2010.01068.x>
- Flom, J.D., Sicherer, S.H., 2019. Epidemiology of Cow's Milk Allergy. *Nutrients* 11. <https://doi.org/10.3390/nu11051051>
- Fox, V.L., Perros, S., Jiang, H., Goldsmith, J.D., 2010. Juvenile polyps: recurrence in patients with multiple and solitary polyps. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 8, 795–799. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2010.05.010>
- Fujieda, S., Zhang, K., Saxon, A., 1995. IL-4 plus CD40 monoclonal antibody induces human B cells gamma subclass-specific isotype switch: switching to gamma 1, gamma 3, and gamma 4, but not gamma 2. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 155, 2318–2328.
- Galand, C., Leyva-Castillo, J.M., Yoon, J., Han, A., Lee, M.S., McKenzie, A.N.J., Stassen, M., Oyoshi, M.K., Finkelman, F.D., Geha, R.S., 2016. IL-33 promotes food anaphylaxis in epicutaneously sensitized mice by targeting mast cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138, 1356–1366. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.03.056>
- García-Miguel, M., González, M.J., Quera, R., Hermoso, M.A., 2013. Innate immunity modulation by the IL-33/ST2 system in intestinal mucosa. *BioMed Res. Int.* 2013, 142492. <https://doi.org/10.1155/2013/142492>
- Gassler, N., 2017. Paneth cells in intestinal physiology and pathophysiology. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 8, 150–160. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v8.i4.150>
- Gevaert, Philippe, Calus, L., Van Zele, T., Blomme, K., De Ruyck, N., Bauters, W., Hellings, P., Brusselle, G., De Bacquer, D., van Cauwenberge, P., Bachert, C., 2013. Omalizumab is effective in allergic and nonallergic patients with nasal polyps and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 110-116.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.07.047>
- Gevaert, P., Nouri-Aria, K.T., Wu, H., Harper, C.E., Takhar, P., Fear, D.J., Acke, F., De Ruyck, N., Banfield, G., Kariyawasam, H.H., Bachert, C., Durham, S.R., Gould, H.J., 2013. Local receptor revision and class switching to IgE in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Allergy* 68, 55–63. <https://doi.org/10.1111/all.12054>
- Gould, H.J., Ramadani, F., 2015. IgE responses in mouse and man and the persistence of IgE memory. *Trends Immunol.* 36, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.11.002>
- Gould, H.J., Wu, Y.-C.B., 2018. IgE repertoire and immunological memory: compartmental regulation and antibody function. *Int. Immunol.* 30, 403–412. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy048>
- Grabhenrich, L.B., Dölle, S., Moneret-Vautrin, A., Köhli, A., Lange, L., Spindler, T., Ruëff, F., Nemat, K., Maris, I., Roumpedaki, E., Scherer, K., Ott, H., Reese, T., Mustakov, T., Lang, R., Fernandez-Rivas, M., Kowalski, M.L., Bilò, M.B., Hourihane, J.O., Papadopoulos, N.G., Beyer, K., Muraro, A., Worm, M., 2016. Anaphylaxis in children and adolescents: The European Anaphylaxis Registry. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 1128-1137.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.11.015>
- Grotenboer, N.S., Ketelaar, M.E., Koppelman, G.H., Nawijn, M.C., 2013. Decoding asthma: translating genetic variation in IL33 and IL1RL1 into disease pathophysiology. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 856–865. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.11.028>
- Hammad, H., Lambrecht, B.N., 2015. Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. *Immunity* 43, 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.007>
- Hammerschmidt, S.I., Friedrichsen, M., Boelter, J., Lyszkiewicz, M., Kremmer, E., Pabst, O., Förster, R., 2011. Retinoic acid induces homing of protective T and B cells to the gut

- after subcutaneous immunization in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 3051–3061. <https://doi.org/10.1172/JCI44262>
- He, J.-S., Subramaniam, S., Narang, V., Srinivasan, K., Saunders, S.P., Carbajo, D., Wen-Shan, T., Hidayah Hamadee, N., Lum, J., Lee, A., Chen, J., Poidinger, M., Zolezzi, F., Lafaille, J.J., Curotto de Lafaille, M.A., 2017. IgG1 memory B cells keep the memory of IgE responses. *Nat. Commun.* 8, 641. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00723-0>
- Heeringa, J.J., Rijvers, L., Arends, N.J., Driessen, G.J., Pasmans, S.G., van Dongen, J.J.M., de Jongste, J.C., van Zelm, M.C., 2018. IgE-expressing memory B cells and plasmablasts are increased in blood of children with asthma, food allergy, and atopic dermatitis. *Allergy* 73, 1331–1336. <https://doi.org/10.1111/all.13421>
- Heffler, E., Malvezzi, L., Boita, M., Brussino, L., De Virgilio, A., Ferrando, M., Puggioni, F., Racca, F., Stomeo, N., Spriano, G., Canonica, G.W., 2018. Immunological mechanisms underlying chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 14, 731–737. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2018.1512407>
- Hershberg, R.M., Cho, D.H., Youakim, A., Bradley, M.B., Lee, J.S., Framson, P.E., Nepom, G.T., 1998. Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 102, 792–803. <https://doi.org/10.1172/JCI3201>
- Hoh, R.A., Boyd, S.D., 2018. Gut Mucosal Antibody Responses and Implications for Food Allergy. *Front. Immunol.* 9, 2221. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02221>
- Iacono, G., Ravelli, A., Di Prima, L., Scalici, C., Bolognini, S., Chiappa, S., Pirrone, G., Licastri, G., Carroccio, A., 2007. Colonic lymphoid nodular hyperplasia in children: relationship to food hypersensitivity. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 5, 361–6. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2006.12.010>
- Ibrahimi, N., Septer, S.S., Lee, B.R., Garola, R., Shah, R., Attard, T.M., 2019. Polyp Characteristics of Non-Syndromic and Potentially Syndromic Juvenile Polyps: A Retrospective Cohort Analysis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002477>
- Ito, T., Wang, Y.-H., Duramad, O., Hori, T., Delespesse, G.J., Watanabe, N., Qin, F.X.-F., Yao, Z., Cao, W., Liu, Y.-J., 2005. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J. Exp. Med.* 202, 1213–1223. <https://doi.org/10.1084/jem.20051135>
- Kinoshita, K., Harigai, M., Fagarasan, S., Muramatsu, M., Honjo, T., 2001. A hallmark of active class switch recombination: transcripts directed by I promoters on looped-out circular DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12620–12623. <https://doi.org/10.1073/pnas.221454398>
- Klos, C.L., Dharmarajan, S., 2016. Polyp Genetics. *Clin. Colon Rectal Surg.* 29, 289–295. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1582442>
- Klose, C.S.N., Artis, D., 2016. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat. Immunol.* 17, 765–774. <https://doi.org/10.1038/ni.3489>
- Knoop, K.A., Newberry, R.D., 2012. Isolated Lymphoid Follicles are Dynamic Reservoirs for the Induction of Intestinal IgA. *Front. Immunol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00084>
- Komban, R.J., Strömberg, A., Biram, A., Cervin, J., Lebrero-Fernández, C., Mabbott, N., Yrlid, U., Shulman, Z., Bemark, M., Lycke, N., 2019. Activated Peyer's patch B cells sample antigen directly from M cells in the subepithelial dome. *Nat. Commun.* 10, 2423. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10144-w>
- Koya, T., Takeda, K., Kodama, T., Miyahara, N., Matsubara, S., Balhorn, A., Joetham, A., Dakhama, A., Gelfand, E.W., 2006. RANTES (CCL5) regulates airway responsiveness after repeated allergen challenge. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 35, 147–154. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0394OC>

- Krauss, E., Konturek, P., Maiss, J., Kressel, J., Schulz, U., Hahn, E.G., Neurath, M.F., Raithel, M., 2010. Clinical significance of lymphoid hyperplasia of the lower gastrointestinal tract. *Endoscopy* 42, 334–337. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1243936>
- Latorre, R., Sternini, C., De Giorgio, R., Greenwood-Van Meerveld, B., 2016. Enteroendocrine cells: a review of their role in brain-gut communication. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 28, 620–630. <https://doi.org/10.1111/nmo.12754>
- Liew, W.K., Williamson, E., Tang, M.L.K., 2009. Anaphylaxis fatalities and admissions in Australia. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 434–442. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.10.049>
- Loh, W., Tang, M.L.K., 2018. The Epidemiology of Food Allergy in the Global Context. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 15. <https://doi.org/10.3390/ijerph15092043>
- Loktionov, A., 2019. Eosinophils in the gastrointestinal tract and their role in the pathogenesis of major colorectal disorders. *World J. Gastroenterol.* 25, 3503–3526. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i27.3503>
- Low, J.M., Chauhan, A.K., Moore, T.L., 2007. Abnormal  $\kappa:\lambda$  Light Chain Ratio in Circulating Immune Complexes as a Marker for B Cell Activity in Juvenile Idiopathic Arthritis. *Scand. J. Immunol.* 65, 76–83. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2006.01859.x>
- Lucarelli, S., Lastrucci, G., Di Nardo, G., D'Alfonso, Y., Aloï, M., Oliva, S., Frediani, S., Rossetti, D., Frediani, T., 2015. Intestinal lymphoid nodular hyperplasia in children: the relationship to food allergy. *Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol.* 26, 18–24. <https://doi.org/10.1111/pai.12328>
- Manea, I., Ailenei, E., Deleanu, D., 2016. Overview of food allergy diagnosis. *Clujul Med.* 1957 89, 5–10. <https://doi.org/10.15386/cjmed-513>
- Marichal, T., Mesnil, C., Bureau, F., 2017. Homeostatic Eosinophils: Characteristics and Functions. *Front. Med.* 4, 101. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00101>
- Martin, P.E., Eckert, J.K., Koplin, J.J., Lowe, A.J., Gurrin, L.C., Dharmage, S.C., Vuillermin, P., Tang, M.L.K., Ponsonby, A.-L., Matheson, M., Hill, D.J., Allen, K.J., HealthNuts Study Investigators, 2015. Which infants with eczema are at risk of food allergy? Results from a population-based cohort. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 45, 255–264. <https://doi.org/10.1111/cea.12406>
- Masahata, K., Umemoto, E., Kayama, H., Kotani, M., Nakamura, S., Kurakawa, T., Kikuta, J., Gotoh, K., Motooka, D., Sato, S., Higuchi, T., Baba, Y., Kurosaki, T., Kinoshita, M., Shimada, Y., Kimura, T., Okumura, R., Takeda, A., Tajima, M., Yoshie, O., Fukuzawa, M., Kiyono, H., Fagarasan, S., Iida, T., Ishii, M., Takeda, K., 2014. Generation of colonic IgA-secreting cells in the caecal patch. *Nat. Commun.* 5, 3704. <https://doi.org/10.1038/ncomms4704>
- Matucci, A., Vultaggio, A., Maggi, E., Kasujee, I., 2018. Is IgE or eosinophils the key player in allergic asthma pathogenesis? Are we asking the right question? *Respir. Res.* 19, 113. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0813-0>
- Ménard, S., Cerf-Bensussan, N., Heyman, M., 2010. Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunol.* 3, 247–259. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.5>
- Mildner, M., Storka, A., Lichtenauer, M., Mlitz, V., Ghannadan, M., Hoetzenecker, K., Nickl, S., Dome, B., Tschachler, E., Ankersmit, H.J., 2010. Primary sources and immunological prerequisites for sST2 secretion in humans. *Cardiovasc. Res.* 87, 769–777. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq104>
- Mirchandani, A.S., Besnard, A.-G., Yip, E., Scott, C., Bain, C.C., Cerovic, V., Salmond, R.J., Liew, F.Y., 2014. Type 2 innate lymphoid cells drive CD4<sup>+</sup> Th2 cell responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 192, 2442–2448. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300974>
- Mowat, A.M., Agace, W.W., 2014. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 667–685. <https://doi.org/10.1038/nri3738>

- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., Honjo, T., 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553–563. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00078-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00078-7)
- Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., Honjo, T., 1999. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J. Biol. Chem.* 274, 18470–18476. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.26.18470>
- Muraro, A., Werfel, T., Hoffmann-Sommergruber, K., Roberts, G., Beyer, K., Bindslev-Jensen, C., Cardona, V., Dubois, A., duToit, G., Eigenmann, P., Fernandez Rivas, M., Halcken, S., Hickstein, L., Høst, A., Knol, E., Lack, G., Marchisotto, M.J., Niggemann, B., Nwaru, B.I., Papadopoulos, N.G., Poulsen, L.K., Santos, A.F., Skypala, I., Schoepfer, A., Van Ree, R., Venter, C., Worm, M., Vlieg-Boerstra, B., Panesar, S., de Silva, D., Soares-Weiser, K., Sheikh, A., Ballmer-Weber, B.K., Nilsson, C., de Jong, N.W., Akdis, C.A., the EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group, 2014. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines: diagnosis and management of food allergy. *Allergy* 69, 1008–1025. <https://doi.org/10.1111/all.12429>
- Nagarkar, D.R., Poposki, J.A., Tan, B.K., Comeau, M.R., Peters, A.T., Hulse, K.E., Suh, L.A., Norton, J., Harris, K.E., Grammer, L.C., Chandra, R.K., Conley, D.B., Kern, R.C., Schleimer, R.P., Kato, A., 2013. Thymic stromal lymphopoietin activity is increased in nasal polyps of patients with chronic rhinosinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 132, 593-600.e12. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.04.005>
- Nakayama, S., Yokote, T., Hirata, Y., Iwaki, K., Akioka, T., Miyoshi, T., Nishiwaki, U., Masuda, Y., Hiraoka, N., Takayama, A., Nishimura, Y., Tsuji, M., Hanafusa, T., 2012. Immunohistological analysis in diagnosis of plasma cell myeloma based on cytoplasmic kappa/lambda ratio of CD38-positive plasma cells. *Hematol. Amst. Neth.* 17, 317–320. <https://doi.org/10.1179/1024533212Z.000000000146>
- NIAID-Sponsored Expert Panel, Boyce, J.A., Assa'ad, A., Burks, A.W., Jones, S.M., Sampson, H.A., Wood, R.A., Plaut, M., Cooper, S.F., Fenton, M.J., Arshad, S.H., Bahna, S.L., Beck, L.A., Byrd-Bredbenner, C., Camargo, C.A., Eichenfield, L., Furuta, G.T., Hanifin, J.M., Jones, C., Kraft, M., Levy, B.D., Lieberman, P., Lucciolli, S., McCall, K.M., Schneider, L.C., Simon, R.A., Simons, F.E.R., Teach, S.J., Yawn, B.P., Schwaninger, J.M., 2010. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126, S1-58. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.10.007>
- Niess, J.H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B.A., Vyas, J.M., Boes, M., Ploegh, H.L., Fox, J.G., Littman, D.R., Reinecker, H.-C., 2005. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307, 254–258. <https://doi.org/10.1126/science.1102901>
- Noti, M., Kim, B.S., Siracusa, M.C., Rak, G.D., Kubo, M., Moghaddam, A.E., Sattentau, Q.A., Comeau, M.R., Spergel, J.M., Artis, D., 2014. Exposure to food allergens through inflamed skin promotes intestinal food allergy through the thymic stromal lymphopoietin-basophil axis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133, 1390–1399, 1399.e1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.01.021>
- Noval Rivas, M., Burton, O.T., Oettgen, H.C., Chatila, T., 2016. IL-4 production by group 2 innate lymphoid cells promotes food allergy by blocking regulatory T-cell function. *J. Allergy Clin. Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.02.030>
- Nowak-Węgrzyn, A., Katz, Y., Mehr, S.S., Koletzko, S., 2015. Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 135, 1114–1124. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.03.025>

- Nowak-Węgrzyn, A., Sampson, H.A., 2011. Future therapies for food allergies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 558–573; quiz 574–575. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.12.1098>
- Nugent, K.P., Talbot, I.C., Hodgson, S.V., 1993. Solitary juvenile polyps: not a marker for subsequent malignancy. *Gastroenterology* 105, 698–700.
- Okada, T., Miller, M.J., Parker, I., Krummel, M.F., Neighbors, M., Hartley, S.B., O'Garra, A., Cahalan, M.D., Cyster, J.G., 2005. Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. *PLoS Biol.* 3, e150. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030150>
- Pabst, O., Mowat, A.M., 2012. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol.* 5, 232–239. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.4>
- Patel, B.Y., Volcheck, G.W., 2015. Food Allergy: Common Causes, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin. Proc.* 90, 1411–1419. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.07.012>
- Pensabene, L., Salvatore, S., D'Auria, E., Parisi, F., Concolino, D., Borrelli, O., Thapar, N., Staiano, A., Vandenplas, Y., Saps, M., 2018. Cow's Milk Protein Allergy in Infancy: A Risk Factor for Functional Gastrointestinal Disorders in Children? *Nutrients* 10. <https://doi.org/10.3390/nu10111716>
- Perrier, C., Corthésy, B., 2011. Gut permeability and food allergies. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 41, 20–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03639.x>
- Peters, R.L., Koplin, J.J., Gurrin, L.C., Dharmage, S.C., Wake, M., Ponsonby, A.-L., Tang, M.L.K., Lowe, A.J., Matheson, M., Dwyer, T., Allen, K.J., HealthNuts Study, 2017. The prevalence of food allergy and other allergic diseases in early childhood in a population-based study: HealthNuts age 4-year follow-up. *J. Allergy Clin. Immunol.* 140, 145-153.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.02.019>
- Povoleri, G.A.M., Nova-Lamperti, E., Scottà, C., Fanelli, G., Chen, Y.-C., Becker, P.D., Boardman, D., Costantini, B., Romano, M., Pavlidis, P., McGregor, R., Pantazi, E., Chauss, D., Sun, H.-W., Shih, H.-Y., Cousins, D.J., Cooper, N., Powell, N., Kemper, C., Pirooznia, M., Laurence, A., Kordasti, S., Kazemian, M., Lombardi, G., Afzali, B., 2018. Human retinoic acid-regulated CD161+ regulatory T cells support wound repair in intestinal mucosa. *Nat. Immunol.* 19, 1403–1414. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0230-z>
- Prescott, S., Allen, K.J., 2011. Food allergy: riding the second wave of the allergy epidemic. *Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol.* 22, 155–160. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2011.01145.x>
- Prescott, S.L., Pawankar, R., Allen, K.J., Campbell, D.E., Sinn, J.K., Fiocchi, A., Ebisawa, M., Sampson, H.A., Beyer, K., Lee, B.-W., 2013. A global survey of changing patterns of food allergy burden in children. *World Allergy Organ. J.* 6, 21. <https://doi.org/10.1186/1939-4551-6-21>
- Robertson, C.F., Roberts, M.F., Kappers, J.H., 2004. Asthma prevalence in Melbourne schoolchildren: have we reached the peak? *Med. J. Aust.* 180, 273–276.
- Roco, J.A., Mesin, L., Binder, S.C., Nefzger, C., Gonzalez-Figueroa, P., Canete, P.F., Ellyard, J., Shen, Q., Robert, P.A., Cappello, J., Vohra, H., Zhang, Y., Nowosad, C.R., Schiepers, A., Corcoran, L.M., Toellner, K.-M., Polo, J.M., Meyer-Hermann, M., Victora, G.D., Vinuesa, C.G., 2019. Class-Switch Recombination Occurs Infrequently in Germinal Centers. *Immunity* 51, 337-350.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.07.001>
- Roma-Giannikou, E.S., Papazoglou, Th.A., Panayiotou, J.V., van Vliet, C.P., Kitsiou, S., Syriopoulou, V., Geroulanos, G.C., 2008. Colon polyps in childhood: Increased mucosal eosinophilia in juvenile polyps. *Ann. Gastroenterol.* 21, 229–232.
- Sampson, H.A., 2016. Food allergy: Past, present and future. *Allergol. Int. Off. J. Jpn. Soc. Allergol.* 65, 363–369. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2016.08.006>
- Sampson, H.A., Gerth van Wijk, R., Bindslev-Jensen, C., Sicherer, S., Teuber, S.S., Burks, A.W., Dubois, A.E.J., Beyer, K., Eigenmann, P.A., Spergel, J.M., Werfel, T., Chinchilli, V.M., 2012. Standardizing double-blind, placebo-controlled oral food challenges: American

- Academy of Allergy, Asthma & Immunology-European Academy of Allergy and Clinical Immunology PRACTALL consensus report. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130, 1260–1274. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.10.017>
- Saunders, S.P., Ma, E.G.M., Aranda, C.J., Curotto de Lafaille, M.A., 2019. Non-classical B Cell Memory of Allergic IgE Responses. *Front. Immunol.* 10, 715. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00715>
- SEAIC. 2009. Metodología diagnóstica en la alergia a los alimentos. Comité de reacciones adversas a alimentos. <http://www.seaic.org/>
- Schwab, D., Raithel, M., Klein, P., Winterkamp, S., Weidenhiller, M., Radespiel-Troeger, M., Hochberger, J., Hahn, E.G., 2001. Immunoglobulin E and eosinophilic cationic protein in segmental lavage fluid of the small and large bowel identify patients with food allergy. *Am. J. Gastroenterol.* 96, 508–514. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2001.03467.x>
- Shakhar, G., Kolesnikov, M., 2014. Intestinal macrophages and DCs close the gap on tolerance. *Immunity* 40, 171–173. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.01.008>
- Shussman, N., Wexner, S.D., 2014. Colorectal polyps and polyposis syndromes. *Gastroenterol. Rep.* 2, 1–15. <https://doi.org/10.1093/gastro/got041>
- Sicherer, S.H., Sampson, H. a, 2010. Food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S116-25. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.08.028>
- Sicherer, S.H., Sampson, H.A., 2018. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *J. Allergy Clin. Immunol.* 141, 41–58. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.003>
- Snoeck, V., Goddeeris, B., Cox, E., 2005. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect.* 7, 997–1004. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.04.003>
- Snow, R.E., Chapman, C.J., Frew, A.J., Holgate, S.T., Stevenson, F.K., 1995. Analysis of Ig VH region genes encoding IgE antibodies in splenic B lymphocytes of a patient with asthma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 154, 5576–5581.
- Soares-Weiser, K., Takwoingi, Y., Panesar, S.S., Muraro, A., Werfel, T., Hoffmann-Sommergruber, K., Roberts, G., Halken, S., Poulsen, L., van Ree, R., Vlieg-Boerstra, B.J., Sheikh, A., EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group, 2014. The diagnosis of food allergy: a systematic review and meta-analysis. *Allergy* 69, 76–86. <https://doi.org/10.1111/all.12333>
- Specia, S., Giusti, I., Rieder, F., Latella, G., 2012. Cellular and molecular mechanisms of intestinal fibrosis. *World J. Gastroenterol.* 18, 3635–3661. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i28.3635>
- Spergel, J.M., 2006. Nonimmunoglobulin e-mediated immune reactions to foods. *Allergy Asthma Clin. Immunol. Off. J. Can. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 2, 78–85. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-2-2-78>
- Stavnezer, J., 2000. Molecular processes that regulate class switching. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 245, 127–168. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-59641-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-59641-4_6)
- Stavnezer, J., Guikema, J.E.J., Schrader, C.E., 2008. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 261–292. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090248>
- Stokes, J., 2017. Anti-IgE Treatment for Disorders Other Than Asthma. *Front. Med.* 4, 152. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00152>
- Stubbs, V.E.L., Power, C., Patel, K.D., 2010. Regulation of eotaxin-3/CCL26 expression in human monocytic cells. *Immunology* 130, 74–82. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03214.x>
- Tada, T., Ishizaka, K., 1970. Distribution of gamma E-forming cells in lymphoid tissues of the human and monkey. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 104, 377–387.



- Takemori, T., Kaji, T., Takahashi, Y., Shimoda, M., Rajewsky, K., 2014. Generation of memory B cells inside and outside germinal centers. *Eur. J. Immunol.* 44, 1258–1264. <https://doi.org/10.1002/eji.201343716>
- Takhar, P., Corrigan, C.J., Smurthwaite, L., O'Connor, B.J., Durham, S.R., Lee, T.H., Gould, H.J., 2007. Class switch recombination to IgE in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119, 213–8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.09.045>
- Tezuka, H., Ohteki, T., 2019. Regulation of IgA Production by Intestinal Dendritic Cells and Related Cells. *Front. Immunol.* 10, 1891. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01891>
- Toellner, K.-M., 2014. Cognate interactions: extrafollicular IL-4 drives germinal-center reactions, a new role for an old cytokine. *Eur. J. Immunol.* 44, 1917–1920. <https://doi.org/10.1002/eji.201444825>
- Tokuhara, D., Kurashima, Y., Kamioka, M., Nakayama, T., Ernst, P., Kiyono, H., 2019. A comprehensive understanding of the gut mucosal immune system in allergic inflammation. *Allergol. Int. Off. J. Jpn. Soc. Allergol.* 68, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2018.09.004>
- Tordesillas, L., Berin, M.C., Sampson, H.A., 2017. Immunology of Food Allergy. *Immunity* 47, 32–50. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.07.004>
- Trakultivakorn, M., Sangsupawanich, P., Vichyanond, P., 2007. Time trends of the prevalence of asthma, rhinitis and eczema in Thai children-ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) Phase Three. *J. Asthma Off. J. Assoc. Care Asthma* 44, 609–611. <https://doi.org/10.1080/02770900701540119>
- Travers, J., Rothenberg, M.E., 2015. Eosinophils in mucosal immune responses. *Mucosal Immunol.* 8, 464–475. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.2>
- Tu, Y., Perdue, M.H., 2006. CD23-mediated transport of IgE/immune complexes across human intestinal epithelium: role of p38 MAPK. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 291, G532–538. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00524.2005>
- Tulic, M.K., Piche, T., Verhasselt, V., 2016. Lung-gut cross-talk: evidence, mechanisms and implications for the mucosal inflammatory diseases. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 46, 519–528. <https://doi.org/10.1111/cea.12723>
- Turunen, S., Karttunen, T.J., Kokkonen, J., 2004. Lymphoid nodular hyperplasia and cow's milk hypersensitivity in children with chronic constipation. *J. Pediatr.* 145, 606–611. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2004.06.067>
- Umar, S., 2010. Intestinal stem cells. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 12, 340–348. <https://doi.org/10.1007/s11894-010-0130-3>
- Valenta, R., Hochwallner, H., Linhart, B., Pahr, S., 2015. Food Allergies : The Basics. *Gastroenterology* 148, 1120–1131.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.02.006>
- Van Zele, T., Claeys, S., Gevaert, P., Van Maele, G., Holtappels, G., Van Cauwenberge, P., Bachert, C., 2006. Differentiation of chronic sinus diseases by measurement of inflammatory mediators. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 61, 1280–1289. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2006.01225.x>
- Venkataraman, D., Soto-Ramírez, N., Kurukulaaratchy, R.J., Holloway, J.W., Karmaus, W., Ewart, S.L., Arshad, S.H., Erlewyn-Lajeunesse, M., 2014. Filaggrin loss-of-function mutations are associated with food allergy in childhood and adolescence. *J. Allergy Clin. Immunol.* 134, 876–882.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.033>
- Ventura, M.T., Polimeno, L., Amoruso, A.C., Gatti, F., Annoscia, E., Marinaro, M., Di Leo, E., Matino, M.G., Buquicchio, R., Bonini, S., Tursi, A., Francavilla, A., 2006. Intestinal permeability in patients with adverse reactions to food. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* 38, 732–736. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2006.06.012>

- Webb, L.M.C., Linterman, M.A., 2017. Signals that drive T follicular helper cell formation. *Immunology* 152, 185–194. <https://doi.org/10.1111/imm.12778>
- Weller, P.F., Spencer, L.A., 2017. Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 746–760. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.95>
- Wosen, J.E., Mukhopadhyay, D., Macaubas, C., Mellins, E.D., 2018. Epithelial MHC Class II Expression and Its Role in Antigen Presentation in the Gastrointestinal and Respiratory Tracts. *Front. Immunol.* 9, 2144. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02144>
- Wu, Y.-C.B., James, L.K., Vander Heiden, J.A., Uduman, M., Durham, S.R., Kleinstein, S.H., Kipling, D., Gould, H.J., 2014. Influence of seasonal exposure to grass pollen on local and peripheral blood IgE repertoires in patients with allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 134, 604–612. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.010>
- Xiong, H., Dolpady, J., Wabl, M., Curotto de Lafaille, M. a., Lafaille, J.J., 2012. Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies. *J. Exp. Med.* 209, 353–364. <https://doi.org/10.1084/jem.20111941>
- Yagami, A., Orihara, K., Morita, H., Futamura, K., Hashimoto, N., Matsumoto, K., Saito, H., Matsuda, A., 2010. IL-33 mediates inflammatory responses in human lung tissue cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 5743–5750. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903818>
- Yu, L.C.-H., 2009. The epithelial gatekeeper against food allergy. *Pediatr. Neonatol.* 50, 247–254. [https://doi.org/10.1016/S1875-9572\(09\)60072-3](https://doi.org/10.1016/S1875-9572(09)60072-3)
- Zar, H.J., Ehrlich, R.I., Workman, L., Weinberg, E.G., 2007. The changing prevalence of asthma, allergic rhinitis and atopic eczema in African adolescents from 1995 to 2002. *Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol.* 18, 560–565. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2007.00554.x>
- Zhang, K., Clark, E.A., Saxon, A., 1991. CD40 stimulation provides an IFN-gamma-independent and IL-4-dependent differentiation signal directly to human B cells for IgE production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 146, 1836–1842.
- Zhang, K., Mills, F.C., Saxon, A., 1994. Switch circles from IL-4-directed epsilon class switching from human B lymphocytes. Evidence for direct, sequential, and multiple step sequential switch from mu to epsilon Ig heavy chain gene. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 152, 3427–3435.
- Zhang, N., Van Zele, T., Perez-Novo, C., Van Bruaene, N., Holtappels, G., DeRuyck, N., Van Cauwenberge, P., Bachert, C., 2008. Different types of T-effector cells orchestrate mucosal inflammation in chronic sinus disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122, 961–968. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.07.008>
- Zhao, J., Lloyd, C.M., Noble, A., 2013. Th17 responses in chronic allergic airway inflammation abrogate regulatory T-cell-mediated tolerance and contribute to airway remodeling. *Mucosal Immunol.* 6, 335–46. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.76>
- Zhou, C., Saxon, A., Zhang, K., 2003. Human activation-induced cytidine deaminase is induced by IL-4 and negatively regulated by CD45: implication of CD45 as a Janus kinase phosphatase in antibody diversification. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 170, 1887–1893. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.4.1887>