



Universitat Autònoma de Barcelona

**Mecanismos implicados en la alteración de
la actividad mastocitaria y la respuesta motora en
un modelo de exposición oral a ovo-albúmina (OVA)
en rata *Sprague Dawley* (SD)**

Memoria presentada por **Estefanía Traver López**
para optar al grado de Doctora dentro del programa
de Doctorado en Inmunología del **Departamento**
de Biología Celular, Fisiología e Inmunología

Tesis doctoral dirigida por:

PATROCINIO VERGARA ESTERAS

FERNANDO DE MORA PÉREZ

Bellaterra, octubre 2009



FACULTAT DE VETERINÀRIA DE BARCELONA

Patrocinio Vergara Esteras, Catedrática de Fisiología del Departamento de Biología Celular, de Fisiología e Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona y **Fernando de Mora Pérez**, Profesor titular y Director del Departamento de Farmacología, de Terapéutica y de Toxicología de la Universidad Autónoma de Barcelona

HACEN CONSTAR:

Que la memoria titulada **‘Mecanismos implicados en la alteración de la actividad mastocitaria y la respuesta motora en un modelo de exposición oral a ovo-albúmina (OVA) en rata *Sprague Dawley* (SD)’** presentada por ESTEFANIA TRAVER LÓPEZ para optar al grado de Doctora se ha realizado bajo su dirección, y al considerarla concluida, autorizan su presentación para ser evaluada por el Tribunal correspondiente.

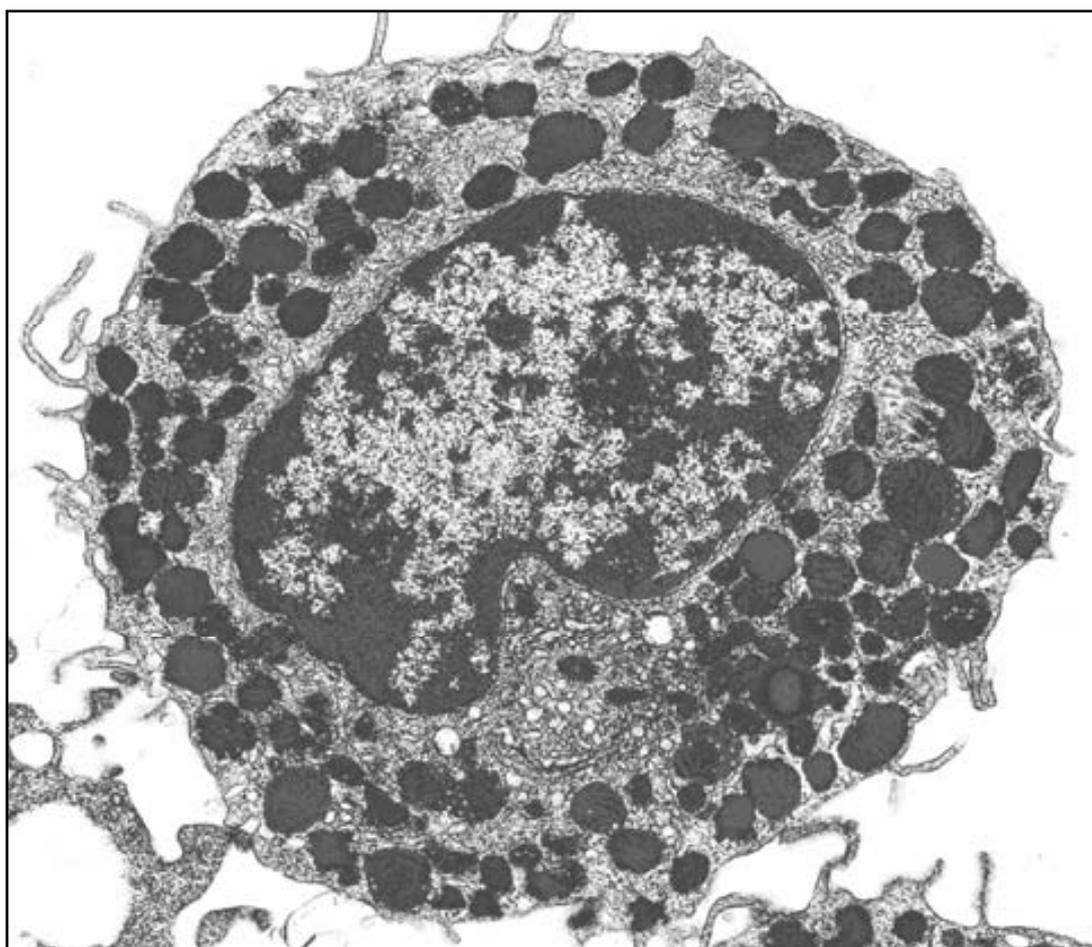
Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente documento.

Bellaterra, julio de 2009

Patrocinio Vergara Esteras

Fernando de Mora Pérez

La imagen de portada es una microfotografía de un mastocito realizada por microscopía electrónica. Esta imagen aparece en la portada de la revista *Laboratory Investigation*, Volumen 87, nº10 (Octubre 2007).



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera dar las gracias a mis directores:

A Patri por brindarme esta oportunidad e introducirme en el mundo de la investigación. A Fernando por estar siempre disponible y resultar de gran apoyo en el desarrollo de esta tesis.

Gràcies als altres directors del Departament, Marcel Jiménez, Ester Fernández i Maite Martín per aconsellar-me durant tot el procès.

A los que me recibieron cuando llegué pero ya no están en el Departamento:

Gracias, Yoli, por cederme tu legado y enseñarme tantas cosas cuando empecé, aunque aún no sé de donde sacabas el tiempo. Gràcies, Mariona, porque sempre és un plaer treballar amb tu, tant dins com fora de la Universitat. Gràcies, Ricard, pels teus consells. Gracias, Hernán, Mónica, Elena y Ana Alcántara, por todo lo que compartí con vosotros durante el tiempo que coincidimos en Becarios.

A la gente del 115:

Gracias, Emma, por tu soporte moral y técnico con el baño de órganos. Bego, gracias por poner buena música a tantos días de experimentos y por tus buenos consejos. Gracias, Álvaro, por tu buen humor.

Gracias, Diana, por guiarme con todos los trámites y ser mi compañera desde el principio hasta el final de la tesis. Gràcies, Victor, pel teus acudits malgrat que sovint no hagi captat del tot el teu sentit del humor. Gràcies, Jordi, pel teu recolzament, fins i tot fora del Departament. Gràcies, Anna, pel teu infatigable esperit de treball.

Als meus companys de laboratori:

Gràcies, Esther, per animar-me quan més ho he necessitat i ajudar-me a tirar endavant. Gracias, Carol, por tu humor y frescura. Gràcies, Joan, per fer-me riure dins i fora del laboratorio 127, sobretot quan t'ajuntaves amb la Carol. Gràcies, Joan Antoni, per la teva "alegría a la feina". Gracias, Gloria, por tu

optimismo. Gracias, Lina, por tu paciencia. Gràcies, Ferran, perquè sento com si portessis tota la vida al grup. Gracias a los residentes SIAL, Alicia, Javier y Paco, por aportar aire fresco al Departamento.

Gràcies, Ester, per estar sempre disponible i per totes les confidències que hem compartit durant aquests anys.

Gracias, Antonio, por tu buen humor y tu inestimable ayuda con el cuidado de los animales. Gracias, David, por tu disponibilidad siempre que he aparecido por Secretaria.

A la gent del Departament de Farmacologia:

Gràcies, Aida, pel teu recolzament a tots els nivells. Gràcies, Rosa, per la teva ajuda inestimable amb les PCRs, entre d'altres. Gràcies, Pere, per la teva amabilitat i eficàcia sempre que he treballat als vostres laboratoris.

També vull donar les gràcies a les companyes d'Almirall, la Carla, l'Elena, l'Encarna, la Judith, la Laia, la Núria i la Raquel, per acollir-me des del primer moment i introduir-me al món de la recerca a l'empresa farmacèutica.

Moltíssimes gràcies, Artur, per ajudar-me amb el disseny de la tesi i, sobretot, pel teu suport incondicional durant el procés d'escriptura, fins i tot quan m'he posat "pesadeta".

Finalmente, quisiera dedicar este trabajo a mi familia y muy especialmente a mis abuelos, Bernardo y Paquita, a mi hermana Estela y a mi prima Natalia, que han resultado de gran ayuda en los momentos en los que no veía la salida.

Gracias a todos y todas / Gràcies a tothom,

Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano.

Isaac Newton (1642-1727), Matemático y físico británico

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	9
1. Enfermedades intestinales: El Síndrome del Intestino Irritable (IBS) y la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (IBD)	11
1.1. El Síndrome del Intestino Irritable (IBS): Síntomas e incidencia	11
1.2. El Síndrome del Intestino Irritable (IBS): Etiopatogenia	12
2. Alergia alimentaria como posible causa del Síndrome del Intestino Irritable (IBS)	15
2.1. Captación de antígenos	15
2.2. Respuesta alérgica (mediada por IgE)	16
2.3. Tolerancia oral	18
3. Mastocitos intestinales: función fisiológica y patológica	20
3.1. Los mastocitos en la etiopatogenia de enfermedades intestinales	20
3.2. Características de los mastocitos	20
3.3. Mecanismos de activación	22
3.4. Función de los mastocitos intestinales	24
3.5. Interacción entre el sistema nervioso y los mastocitos	25
3.6. Estabilizadores mastocitarios	25
4. Modelos para el estudio de procesos patológicos intestinales	27
4.1. Métodos <i>in vitro</i>	27
4.2. Modelos <i>in vivo</i>	28
HIPÓTESIS	35
OBJETIVOS	37
ESTUDIO 1	
Caracterización de la respuesta inmune a la exposición oral a ovo-albúmina (OVA) en ratas <i>Sprague Dawley</i> (SD)	39
1. Antecedentes	41
2. Objetivos	42
3. Material y Métodos	43
3.1. Diseño experimental	43
3.2. Valoración de la respuesta IgE	45
3.3. Determinación del título de IgG específica anti-OVA en suero	48
3.4. Valoración de la respuesta Th ₂	48
3.5. Análisis estadístico	49
4. Resultados	50
4.1. Valoración de la presencia de IgE en ratas expuestas a OVA	50
4.2. Titulación de IgG específica anti-OVA en suero portal	52
4.3. Parámetros relacionados con la respuesta Th ₂	53
5. Discusión	56

ESTUDIO 2	
Efecto de la exposición a ovo-albúmina (OVA) sobre la actividad mastocitaria	59
1. Antecedentes	61
2. Objetivos	62
3. Material y Métodos	63
3.1. Diseño experimental	63
3.2. Valoración de la actividad mastocitaria	65
3.3. Estimulación <i>in vitro</i> de un cultivo celular de mastocitos	66
3.4. Análisis estadístico	67
4. Resultados	68
4.1. Efecto de la exposición oral a OVA en la actividad mastocitaria	68
4.2. Caracterización de la respuesta local y sistémica generada por la exposición oral a OVA	73
5. Discusión	76
ESTUDIO 3	
Implicación de los mastocitos en la hipermotilidad generada por la exposición oral a ovo-albúmina (OVA)	81
1. Antecedentes	83
2. Objetivos	85
3. Material y Métodos	86
3.1. Diseño experimental	86
3.2. Valoración de la actividad mastocitaria	88
3.3. Valoración de la contractilidad intestinal	88
3.4. Valoración de la expresión del <i>mRNA</i> de NGF	89
3.5. Análisis estadístico	90
4. Resultados	91
4.1. Efecto del tratamiento con ketotifeno sobre la actividad mastocitaria inducida por la exposición oral a OVA	91
4.2. Efecto de la exposición oral a OVA y del tratamiento con ketotifeno sobre la motilidad intestinal	94
4.3. Efecto de la exposición oral a OVA y del tratamiento con ketotifeno sobre la expresión de NGF	100
5. Discusión	105
DISCUSIÓN GENERAL	111
CONCLUSIONES	119
BIBLIOGRAFIA	123
ANEXO	149

ABREVIATURAS

- ANOVA:** Análisis de varianza
- APC:** Célula presentadora de antígeno, *antigen presenting cell*
- AUC:** Área bajo la curva, *area under curve*
- BN:** Cepa de rata *Brown Norway*
- BSA:** Albúmina de suero bovino, *bovine serum albumin*
- CCH:** Carbacol, *carbachol*
- CCK:** Colecistoquinina, *cholecystokinin*
- CD:** Enfermedad de Crohn, *Crohn's disease*
- cDNA:** DNA complementario
- c-kit:** Receptor transmembrana tirosina quinasa del SCF
- DMSO:** Dimetil sulfóxido, *dimethyl sulphoxide*
- DNP:** Dinitrofenol, *dinitrophenol*
- DSCG:** Cromoglicato disódico, *disodium cromoglycate*
- ELISA:** *Enzyme-linked immunosorbent assay*
- FBS:** Suero bovino fetal, *fetal bovine serum*
- FcεRI:** Receptor de alta afinidad para IgE
- GAPDH:** Gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa, *glyceraldehyde 3-P-dehydrogenase*
- HEPES:** Ácido hidroxietil-piperacino-etano-sulfónico, *hydroxy-ethyl piperazine ethane sulfonic acid*
- HSA:** Albúmina de suero humano, *human serum albumin*
- IBD:** Enfermedad Inflamatoria Intestinal, *Inflammatory Bowel Disease*
- IBS:** Síndrome del Intestino irritable, *Irritable Bowel Syndrome*
- **IBS-D:** IBS con predominancia de diarrea, *diarrhea-predominant*
 - **IBS-C:** IBS con predominancia de estreñimiento, *constipation-predominant*
 - **IBS-A:** IBS con patrón alternante, *alternating pattern*
- IFNγ:** Interferón gamma
- IgE:** Inmunoglobulina E
- IgG:** Inmunoglobulina G
- IL:** Interleucina
- IMMC:** Mastocito de mucosa intestinal, *intestinal mucosal mast cell*
- mRNA:** RNA mensajero
- NGF:** Factor de crecimiento nervioso, *nerve growth factor*
- OVA:** Ovo-albúmina
- OVH:** Hidrolizado de OVA
- PBS:** Tampón salino fosfato, *phosphate buffer saline*
- PCA:** Ensayo de anafilaxis cutánea pasiva, *passive cutaneous anaphylaxis assay*
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa, *polymerase chain reaction*

PMSF: Fenilmetilsulfonil fluorado, *phenylmethanesulphonyl fluoride*

RMCP: Proteasa de mastocito de rata, *rat mast cell protease*

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa inversa, *Reverse transcriptase-polymerase chain reaction*

SBI: Sobrecrecimiento bacteriano intestinal

SCF: Factor de células madre, *stem cell factor*

SD: Cepa de rata *Sprague Dawley*

SEM: Error estándar de la media, *standard error mean*

SPF: Libre de patógenos específicos, *specific pathogen free*

SPT: Prueba cutánea por punción, *skin prick test*

SS: Solución salina

TGF β : Factor transformador del crecimiento beta, *transforming growth factor β*

Th₁: Linfocito del subtipo *helper 1*

Th₂: Linfocito del subtipo *helper 2*

TMB: Tetrametilbencidina, *tetramethylbenzidine*

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa, *tumor necrosis factor α*

TRPV1: Receptor para la capsaicina, *transient receptor potential vanilloid type-1*

UC: Colitis Ulcerosa, *Ulcerative Colitis*

RESUMEN

Introducción: El Síndrome del Intestino Irritable (IBS) se define como una alteración de la función gastrointestinal caracterizada por dismotilidad e hipersensibilidad visceral. En la mayoría de pacientes con este síndrome el número de mastocitos de mucosa intestinal (IMMC) y su actividad están aumentados. Este hecho podría jugar un papel central en las alteraciones funcionales, sensitivas y motoras del IBS ya que la activación de esta población celular provocaría la liberación de mediadores que podrían afectar a la excitabilidad de las neuronas entéricas y a la de las aferentes primarias, así como a la contractilidad del músculo liso intestinal. No obstante, este síndrome presenta un diagnóstico difícil y un tratamiento poco efectivo ya que los factores que lo causan aún no están claros. Recientemente los procesos alérgicos no diagnosticados hacia componentes de la dieta se han propuesto como posible factor desencadenante del IBS. Se requiere sin embargo disponer de modelos *in vivo* para estudiar los mecanismos implicados e identificar nuevas dianas terapéuticas. El modelo experimental inducido en rata *Sprague Dawley* (SD) a la que se expone a ovo-albúmina (OVA) por vía oral reproduce algunos de los hallazgos observados en pacientes con IBS: un aumento de la actividad mastocitaria y una alteración en la motilidad.

Objetivo: El objetivo de esta tesis doctoral ha sido contribuir a caracterizar el modelo de exposición oral a OVA en rata SD; determinar el tipo de respuesta inmune inducida por el antígeno, evaluar la actividad mastocitaria y su implicación en la dismotilidad inducida por OVA y valorar la participación del factor de crecimiento nervioso (NGF) en el proceso.

Material y Métodos: En el primer estudio de esta tesis, se determinó si la respuesta estaba mediada por IgG o por IgE en suero y por IgE en tejido intestinal, también se valoró la existencia de signos de respuesta inmunitaria Th₂ como son la producción de IL4 y la presencia de eosinófilos intestinales. En el segundo estudio, se caracterizó el efecto de la exposición oral continuada de OVA sobre la actividad mastocitaria. Asimismo se analizó *in vitro* si el efecto de OVA sobre el mastocito podría deberse a una interacción directa y si además se debía a características proteicas específicas, que otras proteínas como la gelatina no poseían. En el tercer estudio, se investigó la implicación de los mastocitos en la alteración de la respuesta motora inducida por la exposición oral a OVA. Se evaluó el efecto del tratamiento con ketotifeno, un estabilizador

mastocitario, sobre la actividad mastocitaria y sobre la alteración en la motilidad intestinal inducidas por OVA. Finalmente, se analizó si existía una correlación entre el efecto sobre la actividad mastocitaria y la respuesta motora, así como la implicación de NGF en el proceso.

Resultados / Discusión: La exposición oral a OVA, a diferencia de otras proteínas como la gelatina, produjo un aumento en la actividad mastocitaria en el intestino delgado y el colon, como reflejan el aumento del número de IMMC y el incremento de la concentración intestinal de RMCP II. Sin embargo, parámetros como la concentración de IgE o IgG específicas anti-OVA, IL4 o la presencia de eosinófilos y células IgE+ en tejido intestinal no se vieron afectados por la exposición a OVA. Estos resultados, junto con el aumento de liberación de histamina tras la estimulación directa de mastocitos con OVA *in Vitro*, sugirieron que el efecto de esta proteína podría deberse a una interacción directa, no mediada por anticuerpos, entre OVA y el mastocito. La exposición oral a OVA también produjo un incremento en parámetros relacionados con la respuesta motora principalmente en colon, así como en la expresión de NGF en tejido intestinal. Finalmente, el tratamiento con ketotifeno disminuyó significativamente el aumento inducido por OVA sobre la actividad mastocitaria y la respuesta motora y la expresión de NGF. Además se observó una correlación entre el efecto de OVA sobre la actividad mastocitaria y la respuesta motora especialmente en colon, que contribuye a proponer la hipótesis de que los mastocitos están implicados en la alteración de la motilidad intestinal.

Conclusión: La exposición de ratas SD a OVA por vía oral induce una alteración de la motilidad intestinal que no es mediada por una reacción de naturaleza alérgica. A la disfunción motora provocada por la OVA contribuyen sin embargo los mastocitos, probablemente mediante la interacción directa entre esta población celular y la proteína que puede generar, entre otros mediadores, la liberación de NGF. Este mecanismo no alérgico que implica a los mastocitos puede ser relevante en ciertos tipos de pacientes con IBS, cuyo abordaje terapéutico quizás requiera de un replanteamiento. Este trabajo ha apuntado el camino para una caracterización más profunda del modelo con el objetivo de identificar nuevas dianas terapéuticas.

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades intestinales: El Síndrome del Intestino Irritable (IBS) y la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (IBD)

El Síndrome del Intestino Irritable (*Irritable Bowel Syndrome*, IBS) y la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (*Inflammatory Bowel Disease*, IBD) son las enfermedades gastrointestinales que se diagnostican con mayor frecuencia en la práctica médica. Básicamente hay dos tipos de IBD: la Enfermedad de Crohn (*Crohn's Disease*, CD) y la Colitis Ulcerosa (*Ulcerative Colitis*, UC). En los países occidentales cada año la incidencia de CD aumenta entre 4 y 7 casos por cada 100.000 habitantes mientras que la de UC aumenta entre 9 y 12 casos / 100.000 habitantes (Gismera & Aladren, 2008). La diferencia principal entre estos dos procesos patológicos es la localización y el tipo de alteración inflamatoria. En la CD se puede ver afectada cualquier parte del tracto gastrointestinal desde la boca hasta el recto, aunque en la mayoría de los casos afecta al ileon terminal. En cambio, en la UC la afectación se limita al colon y el recto (Baumgart & Carding, 2007). Además microscópicamente la UC está restringida a la mucosa intestinal mientras que la CD afecta a todas las capas intestinales. El IBS, a diferencia del IBD, no presenta ni respuesta inflamatoria ni daño tisular si no que se trata de una alteración funcional en la que el intestino no muestra ninguna lesión histopatológica evidente.

1.1. El Síndrome del Intestino Irritable (IBS): Síntomas e incidencia

El IBS se define como una alteración de la función gastrointestinal sensitiva y motora. Los síntomas asociados son hipersensibilidad visceral a estímulos mecánicos y químicos, dolor abdominal y alteraciones en la defecación, que pueden manifestarse como diarrea o estreñimiento crónicos conjunta o individualmente (Holten *et al.*, 2003).

De este modo, podemos hablar de 3 tipos de IBS:

- IBS-D (con predominancia de diarrea, *Diarrhea-predominant*)
- IBS-C (con predominancia de estreñimiento, *Constipation-predominant*)
- IBS-A (*con patrón alternante, Alternating pattern*)

La prevalencia del IBS en los países occidentales oscila entre el 10 y el 20% y afecta más frecuentemente al sexo femenino (2:1), presentándose sobre todo entre los 20 y los 50 años (Ringel & Drossman, 2002). Según el criterio de diagnóstico la incidencia varía ya que cada año se diagnostican por el criterio de Manning entre 87 y 170 casos por cada 100.000 habitantes, entre 8 y 34 por el criterio de Roma I y entre 3 y 16 por el de Roma II (Yale *et al.*, 2008).

En la mayoría de casos en el IBS no llega a peligrar la vida del paciente pero sí se llega a producir dolor crónico y fatiga (Simren *et al.*, 2002). Esta enfermedad es de difícil diagnóstico y presenta un tratamiento poco efectivo ya que los factores que la desencadenan aún no están del todo claros, por lo que provoca un notable gasto sanitario (Nyrop *et al.*, 2007). El diagnóstico de la enfermedad se basa en la sintomatología ya que no existe ningún signo patognomónico o alteración sugestiva de la enfermedad a pesar de que recientemente se ha descrito que en el colon de los pacientes con IBS se observan pequeñas alteraciones morfológicas que podrían ayudar a su diagnóstico (Kirsch & Riddell, 2006). Del mismo modo el tratamiento se enfoca hacia la disminución de los síntomas pero no se alcanza la curación (Mayer, 2008).

1.2. El Síndrome del Intestino Irritable (IBS): Etiopatogenia

La etiología del IBS aún no está clara y esto en parte dificulta la identificación de nuevas dianas terapéuticas. Aún así se ha descrito que algunos de los desencadenantes de esta enfermedad incluirían factores ambientales, factores genéticos, infecciones previas, sobrecrecimiento bacteriano intestinal y alergias alimentarias.

1.2.1. Factores ambientales

A pesar de que el estado psicológico del paciente puede influir en la forma en que se enfrenta a la enfermedad o responde al tratamiento, no hay evidencia de que los trastornos psicológicos sean una causa de IBS (Barbara *et al.*, 2004a).

Sin embargo, en estudios en los que se ha evaluado el papel del estrés en la etiopatogenia del IBS, se ha demostrado que el estrés agudo puede causar la liberación de hormonas que afectan a la función motora y sensitiva del colon tales como el factor de liberación de la corticotropina (*corticotropin-releasing*

factor, CRF) o mediadores inflamatorios tales como la interleucina 1 (IL1) provocando la alteración de la motilidad intestinal y de la sensibilidad visceral (Eutamene *et al.*, 2003). En situaciones estresantes los síntomas pueden aumentar en intensidad y duración (Talley & Spiller, 2002), ya que el estrés por sí mismo altera la motilidad intestinal y aumenta la sensibilidad visceral (Murray *et al.*, 2004). No obstante, el nexo de unión entre el estrés y la fisiopatología del IBS no está claramente caracterizado aunque se ha propuesto que el mastocito estaría implicado (Guilarte *et al.*, 2007).

1.2.2. Factores genéticos

Investigaciones realizadas para averiguar un posible nexo entre la relación familiar y el IBS han demostrado que individuos con un miembro de la familia con historial de dolor abdominal o alteración en la motilidad intestinal tienen el doble de probabilidades de sufrir IBS (Locke, III *et al.*, 2000a). Además, algunos estudios sugieren que el IBS podría estar asociado a ciertos polimorfismos génicos como el de la IL10 (Barbara *et al.*, 2002), la proteína G GNB3 (Holtmann *et al.*, 2004), receptores adrenérgicos α (Kim *et al.*, 2004) y el transportador de serotonina (*serotonin reuptake transporter*, SERT) (Camilleri, 2004).

1.2.3. Infecciones intestinales

En algunos pacientes el IBS puede desarrollarse después de una infección intestinal, por lo que a este subtipo de enfermedad se le ha denominado IBS post-infeccioso. Se cree que el IBS post-infeccioso podría ser causado por una deficiente recuperación de los mecanismos de control de la funcionalidad intestinal a la hora de reducir la inflamación intestinal en la mucosa colónica después de un proceso infeccioso (Barbara *et al.*, 2002). También se ha descrito que un posible mecanismo implicado en la aparición de IBS es el incremento en la permeabilidad intestinal así como un mayor número de células enterocromafines y mastocitos en el colon de estos pacientes (Barbara *et al.*, 2004b; Dunlop *et al.*, 2003).

1.2.4. Sobrecrecimiento Bacteriano Intestinal (SBI)

El sobrecrecimiento bacteriano intestinal (SBI) podría ser un factor desencadenante del IBS. Se ha observado que este sobrecrecimiento provoca

la fermentación parcial de féculas digeridas y la subsiguiente producción de gas (Pimentel *et al.*, 2000), lo que podría producir la sintomatología característica del IBS con hipersensibilidad visceral, dolor abdominal y alteraciones en la defecación.

Según el método utilizado para medir este sobrecrecimiento, el porcentaje de pacientes con IBS en los que se detecta la presencia de este sobrecrecimiento es variable. Si se utiliza la prueba de hidrógeno en aliento para lactosa (*lactose hydrogen breath test*, LHBT) el porcentaje es del 80% (Pimentel *et al.*, 2003). En cambio, si se utiliza la prueba de hidrógeno en aliento para glucosa (*glucose hydrogen breath test*, GHBT) el porcentaje pasa a ser del 11%. A pesar de esta discrepancia en los resultados, se ha visto que el uso de ciertos antibióticos durante periodos cortos mejora la sintomatología en subgrupos de pacientes con IBS en los que el SBI contribuye a estos síntomas (Pimentel, 2009). No obstante, cabe remarcar que el IBS requiere de un tratamiento a largo plazo por lo que el uso de antibióticos no es muy recomendable (Parisi *et al.*, 2003).

1.2.5. Alergia alimentaria

Si bien los factores apuntados sin duda influyen o coadyuvan al desarrollo de IBS, también se ha propuesto que la enfermedad tiene un componente alérgico y, por lo tanto, se ha clasificado en ocasiones como alergia alimentaria (Locke, III *et al.*, 2000b). La naturaleza alérgica de un proceso patológico lleva inmediatamente a plantearse la posible función de los mastocitos en la inducción o agravamiento del proceso. En los siguientes apartados se recogerán las pruebas científicas que avalan la relevancia de la reacción alérgica en la aparición de IBS y se repasará el conocimiento sobre la biología de los mastocitos intestinales y su vinculación con el IBS.

2. Alergia alimentaria como causa del Síndrome del Intestino Irritable (IBS)

En pacientes con IBS, el empeoramiento post-pandrial de los síntomas así como reacciones relacionadas con la ingesta de alimentos son muy comunes (Ragnarsson & Bodemar, 1998) y, por lo tanto, el diagnóstico diferencial respecto a la alergia alimentaria es complicado. Por este motivo, se piensa que esta similitud no sería casual y se podría deber a una relación causal entre la hipersensibilidad intestinal y este tipo de enfermedades (Bischoff *et al.*, 2000). Por una parte, se ha descrito que la alergia alimentaria se suele presentar en individuos atópicos como una respuesta mediada por IgE (Libeer *et al.*, 2007) y, en cambio, se ha observado que en pacientes con IBS generalmente no se produce un aumento de IgEs específicas contra componentes de la dieta (Zar *et al.*, 2005; Zuo *et al.*, 2007). En contraposición, se ha observado que estos pacientes presentan un mayor número de resultados positivos con la prueba cutánea por punción (*Skin Prick Test*, SPT) que los controles (Jun *et al.*, 2006). También se ha descrito que los pacientes con IBS sufren un incremento de las IgGs específicas aunque este hecho no se correlaciona con un empeoramiento de los síntomas, por lo que su relevancia clínica parece ser escasa (Drisko *et al.*, 2006; Zar *et al.*, 2005; Zuo *et al.*, 2007). Este hecho se corrobora con la controversia sobre la efectividad de la exclusión de la dieta los alimentos para los cuales los pacientes presentarían altas concentraciones de inmunoglobulina G (IgG) (Hunter, 2005; Mawdsley *et al.*, 2005; Whorwell *et al.*, 2005), a pesar de que en un estudio se ha observado que este tratamiento provoca una mejoría de los síntomas (Atkinson *et al.*, 2004).

A continuación se detallan los procesos necesarios para que se produzca la alergia alimentaria.

2.1. Captación de antígenos

Las proteínas que se introducen en el tubo digestivo pueden permanecer intactas, parcialmente hidrolizadas o degradadas hasta aminoácidos. Algunas moléculas ingresan a través de las células M (en las placas de Peyer) o de células especializadas que se encuentran en las vellosidades. Varios estudios

indican que macromoléculas como la ovo-albúmina (OVA) son captadas por la mucosa intestinal y pueden ser detectadas en sangre periférica (Beier & Gebert, 1998; Sanderson & Walker, 1993). Este proceso se conoce como “persopción” y en condiciones fisiológicas se produce infrecuentemente. Sin embargo cuando la barrera intestinal está dañada o inmadura, se produce una mayor captación de macromoléculas que pueden llevar a una sintomatología clínica. Se ha visto también que la permeabilidad intestinal está aumentada en pacientes de alergia alimentaria, sugiriendo que la captación de antígenos de la dieta es importante en estos pacientes (Crowe & Perdue, 1992; Troncone *et al.*, 1994).

2.2. Respuesta alérgica (mediada por IgE)

Las respuestas alérgicas mediadas por IgE pueden ser divididas en 2 fases:

- Fase de sensibilización
- Fase efectora (o *challenge*)

La fase de sensibilización depende de la captación y procesamiento del antígeno por parte de las células presentadoras de antígeno (*Antigen presenting cell*, APC), tales como las células dendríticas, los macrófagos o las células B, y de la consiguiente presentación a los linfocitos CD4⁺ o T colaboradores (T helpers, Th₀) a través del complejo mayor de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*, MHC–II).

Bajo la influencia de determinadas citocinas tales como IL4 e IL13, las células Th₀ se convierten en células Th₂ necesarias para la transformación de las células B en células plasmáticas, las cuales producen grandes cantidades de IgEs específicas contra antígenos de la dieta. Estas moléculas de IgE se unen a sus receptores de alta afinidad FcεRI que se encuentran en la superficie de mastocitos y los basófilos.

La fase efectora se inducirá cuando se produzca un nuevo contacto con el antígeno, el cual al unirse a las IgEs que se encuentran en la superficie de mastocitos y basófilos provocará la unión cruzada de estas moléculas produciendo la activación de estos tipos celulares y la consiguiente liberación de histamina, leucotrienos y otros mediadores. Además los linfocitos Th₂ liberan IL4, IL5 y IL13, citocinas que regulan la síntesis de IgE (IL4, IL13) y la quimiotaxis de células inflamatorias como los mastocitos (IL4) y los eosinófilos (IL5) (Bischoff *et al.*, 1999; de Vries, 1998; de Vries *et al.*, 1999; Hogan *et al.*,

2002). Esta reacción aguda, que ocurre en un periodo que va de segundos a minutos, puede continuar con una reacción tardía que se inicia entre 2 y 24 horas después del *challenge* con el antígeno y se caracteriza por una infiltración celular de granulocitos (basófilos, eosinófilos) y linfocitos, principalmente de tipo Th₂ (Macfarlane *et al.*, 2000).

Las células Th₀ también se pueden diferenciar en una población efectora funcionalmente distinta a Th₂, las células Th₁ que sintetizan y liberan citocinas como la IL2 y el interferón γ (IFN γ) y activan a los macrófagos para que degraden bacterias y parásitos que se replican en las vesículas (ABBAS A.K., 1997). Las respuestas Th₂ contrarrestan las Th₁ y viceversa, así pues es preciso que haya un equilibrio entre estos dos tipos de respuesta. Concretamente una citocina Th₁ tal como el IFN γ inhibe la acción de las células Th₂ disminuyendo la producción de IgE (de Vries *et al.*, 1999). Por tanto, la enfermedad alérgica se desarrolla cuando predomina la respuesta Th₂ sobre la Th₁. Estos mecanismos han sido ampliamente argumentados en la formulación de la “hipótesis de la higiene” que propone que un ambiente excesivamente limpio de antígenos microbianos podría decantar la respuesta de los linfocitos T hacia una respuesta predominantemente Th₂ favoreciendo la aparición de alergias.

Las reacciones de hipersensibilidad intestinal se producen tras la ingestión de antígenos presentes en la dieta. Las fases de esta respuesta de hipersensibilidad han sido menos estudiadas en el tracto gastrointestinal aunque se ha demostrado que suceden del mismo modo que en otros órganos (Bischoff *et al.*, 1997; Bischoff *et al.*, 2000).. En condiciones fisiológicas, los niveles de IgE són prácticamente indetectables y la concentración de citocinas relacionadas con la respuesta Th₂ como IL4 es baja en sangre, así como la presencia de células inflamatorias tales como los mastocitos y los eosinófilos es leve en la mucosa intestinal (Brandtzaeg, 2002).

En los pacientes genéticamente predispuestos (atópicos), la alergia alimentaria se produce generalmente por una sobreproducción de IgEs (respuesta tipo Th₂) contra proteínas normales de la dieta que suele ser detectable en sangre. Los principales problemas en el diagnóstico de la alergia alimentaria son la dificultad

en la visualización de las manifestaciones y la no existencia de métodos fiables para la confirmación del diagnóstico. En los pacientes no predispuestos (no atópicos) se podría no diagnosticar la alergia alimentaria como tal ya que no se producirían IgEs contra un alérgeno concreto, pero se podría establecer una relación entre los síntomas y la presencia de éste. Estudios clínicos sugieren que, en algunos pacientes, las IgEs pueden ser producidas únicamente en la mucosa gastrointestinal localmente (Schwab *et al.*, 2001) proporcionando una explicación a los casos en que los niveles de IgE séricos no se correlacionan con la reacción alérgica en la mucosa intestinal (Bischoff *et al.*, 2000).

2.3. Tolerancia oral

Se ha observado que la administración continuada por vía oral de un alérgeno puede inducir tolerancia oral en lugar de producir una respuesta de tipo alérgico. Esta tolerancia se define como la supresión de la respuesta inmune humoral y celular debido a la inmunización hacia un antígeno proteico (Husby *et al.*, 1994). Este fenómeno proporciona una tolerancia local y sistémica hacia el antígeno administrado oralmente (Nagler-Anderson, 2000). Se ha observado que mediadores antiinflamatorios tales como la IL10, el IFN γ y el factor transformador del crecimiento β (*transforming growth factor* β , TGF β) estarían implicados en este proceso (Ng *et al.*, 2002; Penttila, 2006).

Para la inducción de tolerancia, es necesario que receptores de antígeno específicos de linfocitos T (receptor TCR) y/o linfocitos B (inmunoglobulinas) reconozcan el antígeno. La supresión de la respuesta inmune que genera la tolerancia oral comprende diferentes mecanismos tanto no específicos (ácido gástrico, mucosidad, barrera epitelial) como específicos, tales como las células plasmáticas secretoras de IgA e IgM, células APC tolerogénicas y células T inmunosupresoras (Chen *et al.*, 1995; Groux *et al.*, 1996).

Básicamente existen tres mecanismos inductores de tolerancia oral que son: la supresión activa, la anergia clonal y la delección clonal, los cuales pueden actuar individualmente o de manera combinada. El mecanismo de supresión activa es favorecido por las dosis bajas de antígeno mientras que las dosis altas favorecen la anergia y la delección clonal (Brandtzaeg, 2002).

En la supresión activa, las dosis bajas de antígeno inducen que las células APC del intestino estimulen a las células regulatorias (Th₂), que posteriormente pasan a la circulación general. Una vez allí comienzan a secretar citocinas inhibitorias, suprimiendo la reacción autoinmune y evitando que se desarrolle la enfermedad alérgica. Por otro lado, la anergia clonal se produce cuando las dosis altas de antígeno inducen una falta de respuesta de los linfocitos Th₁, principales responsables de la autoinmunidad. El tercer mecanismo, la delección clonal, se presenta cuando las altas dosis de antígeno provocan la eliminación del clon responsable de la reacción autoinmune (Burks *et al.*, 2008;Komagata & Weiner, 2000).

Como hemos expuesto anteriormente, se ha descrito que las alergias alimentarias no diagnosticadas podrían ser un posible factor desencadenante del IBS (Locke, III *et al.*, 2000b). Por tanto, es necesario investigar si parte de estos pacientes con IBS en realidad deben sus síntomas a una activación mastocitaria inducida por la ingestión continuada de una cierta proteína que conduciría a una alteración de la motilidad intestinal sin que se produzca necesariamente un proceso alérgico. Este efecto sobre la respuesta motora podría ser el resultado de la combinación de la activación mastocitaria inducida por la proteína ingerida y la producción de mediadores antiinflamatorios tales como la IL10, el IFN γ y el TGF β que inducirían tolerancia oral (Ng *et al.*, 2002;Penttila, 2006).

3. Los mastocitos intestinales: función fisiológica y patológica

3.1. Los mastocitos en la etiopatogenia de enfermedades intestinales

En los últimos años se ha establecido una relación clara entre la actividad mastocitaria y las enfermedades intestinales tales como el IBS o el IBD.

En pacientes con IBS se ha descrito un aumento del número de mastocitos intestinales y de su actividad (Barbara *et al.*, 2004a; Barbara *et al.*, 2004b; O'Sullivan *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2003). Asimismo también se ha encontrado que en la mucosa del colon de pacientes con IBS se produce un aumento en la concentración de mediadores mastocitarios tales como la histamina o la triptasa (Barbara *et al.*, 2004a; Barbara *et al.*, 2004b). Además se ha descrito que esta población celular se localiza próxima a la inervación de la mucosa y que su activación y liberación de mediadores incrementa la excitabilidad de las neuronas entéricas y de las aferentes primarias, tanto en modelos animales como en pacientes con IBS (Reed *et al.*, 2003). Todos estos hechos confirman la implicación de los mastocitos en las alteraciones funcionales, sensitivas y motoras del IBS y, por este motivo, recientemente se ha revisado el potencial de esta población celular como diana terapéutica para el IBS (Santos *et al.*, 2006).

Por otro lado, en el IBD también se observa un aumento del número de mastocitos intestinales y de su estado de activación, reflejado en una mayor concentración de mediadores mastocitarios (Bischoff *et al.*, 1996) que contribuirían a la patogenia del IBD (He, 2004). Otra prueba del papel de los mastocitos en el IBD es la efectividad de las terapias dirigidas hacia ellos o sus mediadores en el tratamiento de este proceso patológico (Lorentz *et al.*, 1999). El tratamiento con infliximab un anticuerpo monoclonal anti-factor de necrosis tumoral α (*tumor necrosis factor α* , TNF α) reduce los síntomas y mantiene esta remisión después del tratamiento (Sands *et al.*, 2004).

3.2. Características de los mastocitos

Los mastocitos son una población celular heterogénea derivada de células precursoras de la médula ósea y que migra a tejidos periféricos como células inmaduras, diferenciándose *in situ* por la acción local del factor de células madre (*stem cell factor*, SCF) y su receptor transmembrana tirosina quinasa (c-

kit) (Kawakami & Galli, 2002; Metcalfe *et al.*, 1997). El crecimiento y proliferación de esta población celular tiene lugar bajo la influencia de IL3, IL4, IL9, IL10 (Bischoff & Sellge, 2002), SCF (Tsai *et al.*, 1991) y el factor de crecimiento nervioso (*nerve growth factor*, NGF) (Tam *et al.*, 1997). Los mastocitos maduros son abundantes en los tejidos en contacto con el medio externo, tales como el tracto respiratorio (Shanahan *et al.*, 1987), el tracto gastrointestinal (Sellge & Bischoff, 2006), la piel (Marshall & Bienenstock, 1994) y el cerebro, aunque en este último en menor medida (Silver *et al.*, 1996). Además en todos estos tejidos los mastocitos están especialmente situados alrededor de los vasos sanguíneos y de las terminales nerviosas (McKay & Bienenstock, 1994).

Los mastocitos tienen una gran cantidad de gránulos en su citoplasma en los que se almacenan los mediadores preformados, de entre los cuales el más estudiado es la histamina. Más del 40% del volumen total del mastocito está ocupado por las membranas de los gránulos de secreción. Los gránulos de los mastocitos se originan en el aparato de Golgi, que es responsable de la síntesis y organización de los mediadores preformados (Schwartz, 1994).

Históricamente los mastocitos se clasificaron según diferencias fenotípicas, básicamente propiedades de tinción (Enerback, 1966a; Enerback, 1966b). Pero además de las diferencias morfológicas e histoquímicas, también pueden distinguirse subpoblaciones en función de su desarrollo, el perfil de activación y bioquímica, en su contenido en mediadores y en sus respuestas a secretagogos mastocitarios y a agentes estabilizadores (Lorentz *et al.*, 2000; Metcalfe *et al.*, 1997).

En los roedores los mastocitos se han clasificado en dos tipos (Enerback, 1966a; Enerback, 1966b):

- Mastocitos de mucosa (*Mucosal mast cell*, MMC): presentes en intestino, bronquios, timo, hígado y submucosa gástrica, los cuales contienen sulfato de condroitina como proteoglicano en los gránulos citoplasmáticos. Son dependientes de citocinas producidas por linfocitos T (Madden *et al.*, 1991).
- Mastocitos de tejido conjuntivo (*Connective tissue mast cell*, CTMC): presentes en piel, pulmón y superficies serosas, los cuales contienen heparina como proteoglicano. Están implicados en la respuesta inmune innata a las bacterias.

Los CTMC y los MMC son histoquímica, ultraestructural y funcionalmente distintos. En los roedores los mastocitos de mucosa intestinal (*Intestinal mucosal mast cell*, IMMC), a diferencia de los CTMC, presentan gránulos con poco contenido en histamina y serotonina. Ambas subpoblaciones son ricas en proteasas granulares de secreción, las cuales son específicas de los mastocitos y difieren según la población específica (Gurish & Austen, 2001). En la rata, los IMMC expresan selectivamente la proteasa de tipo II (*Rat Mast Cell Protease II*, RMCPII), y los CTMC expresan la proteasa de tipo I (*Rat Mast Cell Protease I*, RMCPI). Estas proteasas han sido utilizadas ampliamente como marcadores específicos de la activación de las dos poblaciones mastocitarias (Miller *et al.*, 1983).

Los mastocitos actúan como células efectoras en las respuestas de hipersensibilidad inmediata mediadas por IgE pero también se ha descrito su participación en otros procesos inflamatorios como la hipersensibilidad tardía (*Delayed type hypersensitivity*, DTH) (Van *et al.*, 1983), la artritis reumatoide (Woolley & Tetlow, 2000), la esclerosis múltiple (Zappulla *et al.*, 2002) y patologías intestinales tales como el IBD (He, 2004) o el IBS (Barbara *et al.*, 2004b). Además también tienen funciones fisiológicas múltiples, como la cicatrización de heridas (Iba *et al.*, 2003) y la regulación de la respuesta inmune del organismo, especialmente frente a parásitos y bacterias (De *et al.*, 2003).

3.3. Mecanismos de activación

La activación de los mastocitos provoca su degranulación y posterior liberación de mediadores.

Estos mediadores mastocitarios pueden ser divididos en 3 tipos:

- Mediadores preformados y almacenados en los gránulos citoplasmáticos.
- Mediadores derivados de lípidos.
- Citocinas y quimiocinas

La liberación de los mediadores preformados como la histamina, las proteasas, los proteoglicanos y algunas citocinas como la IL6 y el TNF α ocurre tan solo minutos después de la activación (Shin *et al.*, 2004). Simultáneamente con esta primera respuesta, se inicia la síntesis *de novo* de los mediadores derivados de lípidos como la prostaglandina D2, los leucotrienos C4, D4, E4 y el factor

activador de plaquetas (*Platelet-activating factor*, PAF) (Yamaguchi *et al.*, 1999). Adicionalmente, se induce la producción de citocinas, factores de crecimiento y quimiocinas que incluyen la IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL8, IL13, IFN γ , el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) y el TNF α y su consiguiente secreción por parte de los mastocitos (Galli, 2000). Cabe destacar que el TNF α es una de las pocas citocinas que se encuentra preformada en los gránulos de los mastocitos y también es sintetizado *de novo* por este tipo celular (Gibbs *et al.*, 2001). Las funciones biológicas de los mastocitos dependen de los mediadores que se liberen tras su activación.

3.3.1. Activación mastocitaria mediada por IgE

Tal y como hemos descrito en el apartado sobre la respuesta alérgica, la activación de los mastocitos principalmente se conoce en la reacción de hipersensibilidad inmediata mediante la interacción de un antígeno con la IgE específica unida a su receptor de membrana de alta afinidad Fc ϵ RI. El contacto inicial con un antígeno extraño conduce a la síntesis de IgEs específicas por parte de las células B. Las IgEs secretadas se unen a los receptores Fc ϵ RI de la superficie celular de mastocitos y basófilos. Una nueva exposición al antígeno (*challenge*), que se une cruzadamente a las moléculas de IgE específicas ancladas a la membrana celular, induce la activación de estas células, la exocitosis de los gránulos y la síntesis de nuevos mediadores. Los mediadores liberados son responsables de las manifestaciones clínicas y patológicas de la reacción de hipersensibilidad inmediata, ya que provocan aumento de la permeabilidad vascular, vasodilatación, contracción del músculo liso visceral y bronquial e inflamación local. Como ya hemos apuntado anteriormente, los mastocitos además participan en fases más tardías de la respuesta alérgica.

3.3.2. Activación mastocitaria independiente de IgE

Los mastocitos también pueden ser activados por mecanismos independientes de IgE, es decir, mediados por citocinas, neuropéptidos, compuestos polibásicos, componentes del complemento y determinados fármacos (Gibbs *et al.*, 2001; Metcalfe *et al.*, 1997; Redegeld *et al.*, 2002) pero también por cambios físicos. Uno de los factores que desencadena este tipo de activación es el

estrés (Santos *et al.*, 1999). Además, también se ha descrito que los neurotransmisores o las hormonas pueden activar a esta población celular (Juanola *et al.*, 1998). Recientemente, se ha demostrado que peptonas como el hidrolizado de ovo-albúmina (OVH) pueden activar a los mastocitos mediante complejos reflejos neuroendocrinos, los cuales inducen su degranulación (Saavedra & Vergara, 2003). También los mediadores inflamatorios liberados por eosinófilos pueden estimular los mastocitos sin mediación de IgEs.

3.4. Función de los mastocitos intestinales

Los mastocitos están distribuidos en todas las capas del tracto gastrointestinal constituyendo un 2–3% de las células presentes en la lámina propia y un 1% en la submucosa (Bischoff *et al.*, 1996; Lin T.J., 1999). En la mucosa gastrointestinal son abundantes los mastocitos de mucosa, sobre todo en estómago, duodeno e íleon (Metcalf, 1984). Los mastocitos suelen relacionarse con procesos patológicos pero también tienen un papel destacado en las funciones fisiológicas (Stenton *et al.*, 1998).

Los mastocitos de mucosa intestinal están estratégicamente localizados debajo de la membrana basal y en contacto con fibras nerviosas (Bauer & Razin, 2000), indicando el potencial de estas células como reguladoras de las propiedades de barrera y transporte del epitelio. De hecho, la principal función de las proteasas solubles liberadas por los mastocitos es promover la permeabilidad de la mucosa intestinal (Patrick *et al.*, 1988).

Los mastocitos intestinales al estar localizados próximos a los nervios entéricos y liberar una amplia variedad de mediadores inflamatorios pueden afectar a la función nerviosa del sistema entérico y a la contractibilidad del músculo liso intestinal. Además, se ha demostrado una asociación muy estrecha entre mastocitos de mucosa y aferentes vagales. Se ha visto que la degranulación de los mastocitos está implicada en la disrupción de los complejos motores migratorios por la acción de la colecistoquinina (CCK) endógena, por lo tanto los mastocitos están activamente implicados en el control fisiológico de la motilidad intestinal. Además, la CCK degranula los mastocitos de mucosa actuando sobre receptores de CCK tipo B (Juanola *et al.*, 1998).

3.5. Interacción entre el sistema nervioso y los mastocitos intestinales

La comunicación entre el sistema nervioso y los mastocitos en la mucosa intestinal se puede producir por varias vías que incluyen eferentes parasimpáticas y simpáticas, aferentes extrínsecas (vagales y espinales) y conexiones de segundo orden a través de neuronas entéricas (Berthoud *et al.*, 2004). En varios estudios se ha demostrado que el nervio vago está involucrado en esta interacción entre los mastocitos y el sistema nervioso. Se ha descrito que la estimulación del nervio vago provoca un aumento en el contenido de histamina en los mastocitos de mucosa intestinal que puede prevenirse mediante vagotomía (Gottwald *et al.*, 1995). Además también se ha demostrado que tanto la vagotomía como la depleción de aferentes nerviosas mediante capsaicina provoca una disminución del número de mastocitos intestinales (Gottwald *et al.*, 1997). Todas estas observaciones sugieren que además de una relación anatómica también existe una asociación funcional entre estos dos tipos celulares. Se cree que esta proximidad entre los nervios y los mastocitos se inicia por la liberación de mediadores por parte de los mastocitos, concretamente del NGF (Blennerhassett & Bienenstock, 1998). Por otra parte, también es posible que los mastocitos sean atraídos hacia los nervios mediante la liberación de neuropeptidos por parte de estos últimos (Barbara *et al.*, 2006), ya que se ha demostrado que este tipo celular presenta receptores para diferentes neurotransmisores y neuropéptidos como el péptido intestinal vasoactivo (*Vasoactive intestinal peptide*, VIP), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (*Calcitonin gene related peptide*, CGRP) (Santos *et al.*, 2005), la sustancia P (van der Kleij *et al.*, 2003) y el NGF (Wu *et al.*, 2006). Concretamente, se ha visto que el NGF influye en el crecimiento y supervivencia de los mastocitos además de sobre el desarrollo y supervivencia de neuronas sensitivas (Kassel *et al.*, 2001).

3.6. Estabilizadores mastocitarios

Recientemente se ha revisado el potencial de los mastocitos como diana terapéutica para el IBS (Santos *et al.*, 2006). Una posible aproximación es inhibir la degranulación de los mastocitos mediante el uso de estabilizadores

mastocitarios tales como el ketotifeno, el cromoglicato disódico (*disodium cromoglicate*, DSCG) o el doxantrazol (Crampton, 2003).

El DSCG y el doxantrazol inhiben los cambios en la motilidad inducidos por un antígeno (Perdue & Gall, 1985; Perdue & Gall, 1986). El doxantrazol reduce la hipersensibilidad visceral por distensión rectal en un modelo de IBS inducido por ácido acético (La *et al.*, 2004). El ketotifeno estabiliza los mastocitos de mucosa intestinal y evita que se produzca su activación (Juanola *et al.*, 1998) y disminuye la hipermotilidad intestinal junto con la hiperplasia mastocitaria y la activación de este tipo celular en el modelo de *T.Spiralis* en rata (Serna *et al.*, 2006).

4. Modelos para el estudio de procesos patológicos intestinales

La investigación en pacientes con IBS resulta fundamental para el avance en el conocimiento de la patogenia de esta enfermedad intestinal, pero hay obstáculos metodológicos y éticos que impiden progresar más rápidamente. Por este motivo, se ha hecho necesario el uso de métodos *in vitro* para el estudio de la biología de los mastocitos así como el uso de modelos animales *in vivo* para el estudio de los procesos patológicos intestinales.

4.1. Métodos *in vitro*

La activación de los mastocitos intestinales resultante de una alergia alimentaria puede jugar un papel central en las manifestaciones de la hipersensibilidad intestinal tanto en la respuesta motora como en las alteraciones de la percepción visceral características del IBS. Por este motivo, es importante disponer de un sistema biológico para el estudio de los mastocitos *in vitro*.

Inicialmente se utilizaron cultivos de mastocitos murinos peritoneales ya que era posible obtener un gran número de mastocitos a partir de un simple lavado peritoneal (Cooper & Stanworth, 1976). Sin embargo, este tipo de mastocitos no se suelen encontrar en la cavidad peritoneal en humanos y por tanto su relevancia clínica es escasa.

Por otro lado, cabe destacar que la biología de otras poblaciones mastocitarias como los de mucosa, piel o asociados a vasos no ha sido tan estudiada *in vitro*. Esto se debe a que la cantidad de tejido de la que se puede disponer, especialmente en el ratón, así como que la densidad celular de estos tipos de mastocito es baja en los tejidos, lo que hace difícil establecer cultivos primarios. Debido a esta dificultad en el aislamiento de mastocitos maduros directamente desde tejido, se han utilizado los mastocitos murinos parcialmente maduros obtenidos a partir de sus progenitores, las células inmaduras de médula ósea (Kalesnikoff *et al.*, 2006; Nakae *et al.*, 2007). No obstante, la maduración de este tipo celular no puede ser llevada a cabo por completo actualmente, tal y como indican los estudios funcionales y de la expresión de los antígenos de superficie de este tipo celular (Dahl *et al.*, 2004; Scherthaner *et al.*, 2005). Este hecho limita el uso de estas líneas celulares como herramienta para el estudio de la biología del mastocito *in vitro*.

Por estos motivos, la mayoría de experimentos que se han realizado tanto con mastocitos parcialmente inmaduros como con cultivos primarios de mastocitos murinos peritoneales han tenido una limitada significación funcional (Yamaguchi *et al.*, 1997).

Recientemente, mastocitos humanos han podido ser aislados de tejidos, purificados por complicadas técnicas de selección y cultivados a largo plazo recuperando la funcionalidad perdida por el proceso de aislamiento celular (Galli *et al.*, 2005; Sellge & Bischoff, 2006). La limitación principal de esta metodología es la escasa obtención de mastocitos purificados a partir de tejido, aún así resulta imprescindible disponer de este tipo de cultivos mastocitarios ya que presentarán una respuesta más similar a la que se desarrolla en humanos *in vivo*.

4.2. Modelos *in vivo*

A pesar de la necesidad de métodos *in vitro* adecuados para el estudio de la biología del mastocito, también es indispensable la obtención de modelos experimentales *in vivo*. Probablemente estos mastocitos mantenidos *in vitro* no son idénticos a los que encontramos en los tejidos *in vivo* y por tanto, no reaccionan igual frente a los diferentes estímulos. Por este motivo, es preferible trabajar con modelos animales ya que la respuesta que se puede observar proviene de la interacción entre los diferentes sistemas del organismo.

4.2.1. Modelos experimentales de sensibilización

Los modelos animales son una herramienta valiosa para identificar el potencial de sensibilización de las proteínas. Con esta finalidad se han desarrollado diversos modelos básicamente en roedores como el cobayo, el ratón o la rata.

El modelo ideal de sensibilización a proteínas de la dieta debería cumplir los siguientes requisitos (Knippels & Penninks, 2005; Penninks & Knippels, 2001):

- La sensibilización y el proceso de exposición (*challenge*) deben ser realizados por vía oral ya que se asemeja más a lo que sucede en la alergia alimentaria. Así la proteína se encuentra con las barreras naturales de esta vía como son la digestión enzimática y las capas mucosas y epiteliales, que se ha descrito que reducen o afectan la alergenicidad de las proteínas.

- Frente al *challenge* con el alérgeno, el modelo debe presentar reacciones clínicas similares a las que se observan en pacientes.
- Se debe evitar el uso de adyuvantes para determinar la alérgenicidad propia de la proteína. A pesar de esto, cabe tener en cuenta que en los casos reales de alergia alimentaria los adyuvantes pueden haber jugado un papel en el proceso de sensibilización
- La especie y cepa seleccionadas deben generar frente a la exposición con la proteína una respuesta mediada por IgE o por otros subtipos de anticuerpos relacionados con la respuesta Th₂.
- La respuesta humoral hacia las proteínas (y epítopos alérgicos) generada por la sensibilización debe ser similar a la que se encuentra en el suero de los pacientes de alergia alimentaria.
- La especie y cepa seleccionadas deben tolerar la mayoría de proteínas de la dieta.
- El modelo debe ser fácil de realizar y reproducible en diferentes momentos y laboratorios.

Aunque no es fácil encontrar un único modelo en el que se reúnan todos estos requisitos, se han llevado a cabo diferentes aproximaciones para obtener un buen modelo de sensibilización.

En el cobayo se produce sensibilización por vía oral sin la necesidad de usar adyuvantes por lo que se asemeja a lo que sucede en la alergia alimentaria en humanos. El inconveniente de este modelo es que la respuesta que se genera esta mediada únicamente por IgG (Fritsche, 2003).

En el ratón la cepa más utilizada es la BALB/c ya que está predispuesta a generar una respuesta Th₂. La sensibilización sistémica por vía intraperitoneal se ha utilizado en esta cepa (Dearman *et al.*, 2000; Kimber *et al.*, 2000) a pesar de que la ruta natural de administración de las proteínas de la dieta no se ha tenido en cuenta. No obstante, este modelo parenteral se utiliza ampliamente como aproximación para diferenciar las proteínas alérgicas de las que tan sólo son inmunogénicas (Dearman & Kimber, 2001). Concretamente, las proteínas inmunogénicas inducen la producción de IgGs específicas, pero no IgEs, y las proteínas potencialmente alérgicas inducen producción de IgGs e IgEs específicas.

En esta cepa también se ha realizado sensibilización por vía oral y se ha descrito que se puede inducir una respuesta mediada por IgE siempre y cuando se usen adyuvantes (Fritsche, 2003; von der *et al.*, 2001). Cuando la sensibilización oral se realiza sin la presencia de adyuvantes, se suele desarrollar tolerancia oral. Por tanto, aunque la situación ideal sería evitar el uso de adyuvantes, para obtener un buen modelo de sensibilización en esta cepa se hace necesario su uso.

En la rata la cepa de rata *Brown Norway* (BN) se caracteriza por una propensión a desarrollar respuestas tipo Th₂ y ha sido descrita como la cepa más adecuada para la inducción de síntesis de IgEs específicas comparada con otras cepas de rata (Wistar, PVG, HL) ya que comparte con las personas atópicas la predisposición genética a desarrollar alergias (Knippels *et al.*, 1999b). Inicialmente la sensibilización se realizó por vía parenteral generando una respuesta IgG e IgE específica en presencia de adyuvante (Atkinson & Miller, 1994; Fritsche, 2003). Este modelo es adecuado para estudiar la capacidad alergénica de ciertas proteínas pero, al realizar la sensibilización por vía parenteral, la ruta natural de administración durante el período de sensibilización a proteínas de la dieta no se ha tenido en cuenta. Por este motivo, se desarrolló un modelo en que la sensibilización se realizaba por vía oral aunque en presencia de adyuvante (Atkinson *et al.*, 1996). Como hemos descrito previamente, un buen modelo debería evitar la utilización de adyuvantes para simular mejor la forma en la que el individuo sería expuesto a la proteína

Posteriormente se describió que la cepa BN podía ser un buen modelo animal para inducir este tipo de respuestas IgG e IgE específicas mediante la administración diaria intragástrica sin la utilización de adyuvantes (Knippels *et al.*, 1998). Además, el perfil de alérgenos reconocidos por el sistema inmune de la rata BN parece ser comparable con el perfil de alérgenos reconocidos por los pacientes humanos alérgicos (Knippels & Penninks, 2003; Knippels *et al.*, 2000). Este modelo inicialmente se estableció con la sensibilización oral frente a ovo-albúmina (OVA) que es una proteína del huevo de gallina muy frecuentemente utilizada como alérgeno (Knippels *et al.*, 1998). Más adelante se utilizó para evaluar la capacidad alergénica de otras proteínas, tales como la de la leche de vaca (*cow's milk*, CM) (Knippels & Penninks, 2003). Se ha descrito que esta

sensibilización a la OVA en esta cepa aumenta la permeabilidad intestinal en condiciones basales y en respuesta al *challenge*. En condiciones basales no hay grandes cambios estructurales, pero en cambio, tras el *challenge*, el aumento de permeabilidad está asociado a la activación de mastocitos y a la reducción de la altura de las vellosidades en ratas sensibilizadas (Knippels *et al.*, 1998).

En contraposición, la cepa de rata *Sprague Dawley* (SD), utilizada en todo tipo de estudios, no se caracteriza por estar predispuesta a presentar respuestas tipo Th₂ (Hylkema *et al.*, 2000). Sin embargo, se ha utilizado como modelo de sensibilización a nematodos intestinales y como modelo de sensibilización vía sistémica con utilización de adyuvantes en numerosos estudios sobre la reacción alérgica intestinal (Yang *et al.*, 2001).

4.2.2. Modelos experimentales del Síndrome del Intestino Irritable (IBS)

Se han establecido varias aproximaciones *in vivo* para el estudio de la patología del IBS. Algunos modelos se centran en desarrollar un desorden en la motilidad intestinal, otros en obtener hipersensibilidad visceral, síntomas característicos del IBS y, en algunas ocasiones, se combinan ambas sintomatologías.

En cuanto a los que presentan una alteración en la motilidad intestinal, hay un modelo de IBS-C (con predominancia de estreñimiento) en rata mediante la administración diaria intragástrica de agua fría (0–4 °C) durante 2 semanas (Xu *et al.*, 2006). Asimismo se puede generar un modelo de IBS-D (con predominancia de diarrea) combinando IBS post-inflamación con estrés por limitación de movimiento (Xu *et al.*, 2006).

Los modelos que se centran en conseguir una hipersensibilidad visceral colónica lo realizan como resultado de diversos factores, tales como una infección (IBS post-infeccioso), un proceso tóxico o estresante. El modelo de IBS post-infeccioso más utilizado es el inducido en ratón por *Trichinella Spiralis* en el que a partir del día 18 post-infección ya se produce hiperalgesia visceral, hiperplasia de las células enterocromafines, hipercontractibilidad muscular y dismotilidad intestinal en respuesta a distensiones colorectales (Akiho *et al.*, 2005; Bercik *et al.*, 2004; Wheatcroft *et al.*, 2005). Otro modelo de hipersensibilidad visceral es el de la colitis inducida por ácido trinitro benceno sulfónico (*trinitrobenzenesulphonic acid*, TNBS) combinado con etanol o por

ácido acético (Adam *et al.*, 2006; Distrutti *et al.*, 2006; La *et al.*, 2003) o el modelo de separación maternal (Lackner *et al.*, 2004).

Finalmente, un ejemplo de modelo de IBS relacionado con la dieta se puede encontrar en el inducido por butirato. El butirato es un ácido graso de cadena corta producido por la degradación de la fibra alimentaria. La administración rectal de este ácido graso dos veces al día durante tres días genera hipersensibilidad visceral no asociada a una respuesta inflamatoria (Bourdu *et al.*, 2005).

4.2.3. Modelo de IBS por exposición oral a ovo-albúmina (OVA)

Anteriormente ya se había descrito que la exposición oral a OVA en ratas SD provoca que los mastocitos de la mucosa intestinal presenten un estado de mayor excitación-activación, que se manifiesta en un aumento en la liberación de RMCP II a nivel local y un aumento en el número de IMMC (Saavedra & Vergara, 2005). Este proceso en sí mismo induce cambios en la población mastocitaria y en los circuitos neuronales implicados en la regulación de la motilidad intestinal, y por lo tanto, altera la respuesta intestinal a cualquier estímulo y la actividad motora espontánea del intestino (Saavedra & Vergara, 2005). En este trabajo se escogió precisamente esta última cepa por no producir una respuesta Th₂ ya que el objetivo era estudiar los mecanismos que inducían las alteraciones en el intestino en los pacientes de IBS no atópicos.

Por tanto, el modelo de exposición oral continuada a OVA en ratas SD, en el que se produce una alteración en la motilidad intestinal acompañado por activación mastocitaria, sería una buena aproximación para el estudio del IBS relacionado con la administración de componentes de la dieta.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El proyecto de tesis doctoral se fundamenta en la siguiente hipótesis:

“Los mastocitos de mucosa intestinal se activan durante el proceso de exposición oral a OVA. Este proceso induce cambios en la población mastocitaria y en los circuitos neuronales implicados en la regulación de la motilidad intestinal, y por lo tanto, altera la respuesta intestinal a ciertos estímulos y la actividad motora espontánea del intestino”.

Objetivo general

Caracterizar el modelo de exposición oral a OVA en rata SD determinando el efecto sobre la actividad mastocitaria y sobre parámetros de la respuesta alérgica, así como identificar los mecanismos por los cuales se produce la alteración en la motilidad intestinal.

Objetivos específicos:

- Determinar si la respuesta a la exposición oral a OVA está mediada por IgE o IgG específica en el suero o bien por IgE en tejido intestinal de ratas SD.
- Estudiar la presencia de signos de respuesta inmunitaria Th₂ en ratas SD expuestas a OVA: producción de IL4 y presencia de eosinófilos intestinales.
- Analizar si el efecto de OVA sobre los mastocitos es específico de esta proteína *in vivo*.
- Evaluar si la estimulación con OVA y su hidrolizado (OVH) provoca la degranulación de mastocitos no sensibilizados *in vitro*.
- Estudiar el efecto de la exposición a OVA y el posterior tratamiento con ketotifeno sobre la actividad mastocitaria, valorada por el contenido de RMCPII Intestinal y el número de mastocitos de mucosa intestinal.
- Caracterizar el efecto del ketotifeno sobre la alteración en la motilidad intestinal inducida por OVA y la correlación con la actividad mastocitaria.
- Evaluar el efecto del ketotifeno sobre la expresión de NGF en tejido intestinal y la correlación con la actividad mastocitaria y la subsiguiente alteración en la motilidad intestinal.

ESTUDIO 1

Caracterización de la respuesta inmune
a la exposición oral a ovo-albúmina (OVA)
en ratas *Sprague Dawley* (SD)

1. Antecedentes

Recientemente los procesos alérgicos no diagnosticados se han propuesto como posible factor desencadenante del Síndrome del Intestino Irritable (IBS) (Locke, III *et al.*, 2000b). Esta enfermedad presenta síntomas muy similares a los de la alergia alimentaria, por lo que el diagnóstico diferencial es complicado. Por este motivo, se piensa que esta similitud no sería casual sino que podría deberse a una relación causal entre la hipersensibilidad intestinal y este tipo de procesos (Bischoff *et al.*, 2000).

Para el estudio de la sensibilización del tracto gastrointestinal a proteínas de la dieta se han utilizado diversos modelos animales. En la rata se ha estudiado la sensibilización del intestino a proteínas administradas por vía parenteral o por vía oral en presencia ((Atkinson *et al.*, 1996) o ausencia (Knippels *et al.*, 1998;Knippels *et al.*, 1999b;Knippels *et al.*, 2000) de adyuvantes. En general, para la evaluación del potencial alergénico de las proteínas es preferible su administración oral evitando la utilización de adyuvantes. De esta forma se mimetiza mejor el proceso de exposición al alérgeno de los pacientes con alergia alimentaria.

En cuanto a la selección de la cepa de rata en el modelo de sensibilización, cabe destacar que la cepa *Brown Norway* (BN) dada su tendencia a manifestar un fenotipo atópico se ha propuesto como la más adecuada para inducir respuestas específicas IgG e IgE tras la administración diaria intragástrica de OVA sin la utilización de adyuvantes (Knippels *et al.*, 1998;Knippels *et al.*, 1999b;Knippels & Penninks, 2003), a diferencia de la cepa de rata *Sprague Dawley* (SD), que se caracteriza por no estar predispuesta a presentar este tipo de respuestas (Hylkema *et al.*, 2000). En un estudio anterior de nuestro grupo se escogió precisamente esta última cepa por no presentar un fenotipo atópico ya que el objetivo era estudiar los mecanismos que inducían las alteraciones en el intestino en los pacientes de IBS no atópicos (Saavedra & Vergara, 2005). De este modo, se observó que la exposición oral a OVA en ratas SD provoca la activación de los mastocitos de la mucosa intestinal (IMMC), manifestada en un aumento en el número de IMMC y en la liberación de RMCP II localmente, así como la alteración de la motilidad intestinal espontánea (Saavedra & Vergara, 2005).

2. Objetivos

El objetivo general de este estudio fue analizar si la reacción intestinal frente a la exposición oral a OVA en ratas SD era de naturaleza alérgica.

Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- Determinar la presencia de IgE específica anti-OVA en suero o en tejido intestinal de ratas SD expuestas a OVA por vía oral.
- Determinar si la respuesta a OVA estaba mediada por IgG específica anti-OVA.
- Estudiar la presencia de signos de respuesta inmunitaria Th₂ en ratas SD expuestas a OVA: producción de IL4 y presencia de eosinófilos intestinales.

3. Material y Métodos

3.1. Diseño experimental

3.1.1. Animales

Se utilizaron 20 ratas *Sprague Dawley* (SD) macho de Charles River (Les Oncins, France) que se distribuyeron en 4 grupos de 5 individuos. Los animales tenían libre acceso al agua y a una dieta estándar en forma de pellet que no contenía ningún rastro de OVA ni otro derivado del huevo. Las ratas estaban libres de patógenos específicos (*Specific Pathogen Free*, SPF) cuando fueron adquiridas con 5 semanas de edad. Se estabularon en ambiente controlado (Temperatura: 20-21°C, Humedad: 60%, Foto-periodo:12h luz/12h oscuridad). Antes de iniciar el protocolo de exposición oral, se estableció un período de aclimatación de los animales de una semana desde el momento de su recepción. La noche anterior al experimento se retiró el alimento. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por la Comisión Ética en la Experimentación Animal y Humana (CEEAH) de la Universitat Autònoma de Barcelona.

3.1.2. Exposición oral a OVA

Siguiendo el protocolo previamente descrito por Saavedra y Vergara (Saavedra & Vergara, 2005) ratas de 6 semanas de edad (n=10, 2 subgrupos de n=5) fueron expuestas a OVA (Grade V. Sigma, St Louis, MO, USA) mediante sondaje oral (1 mg de OVA en 1 ml de solución salina 0.9% NaCl, 1 ml/animal) realizado durante 6 semanas. Un grupo de ratas (n=10, 2 subgrupos de n=5) no expuestas a OVA se usó como grupo control en el cual el protocolo de inducción se realizó como se describe anteriormente pero substituyendo la solución de OVA por solución salina.

El término *challenge* (o provocación intestinal) se refiere a la exposición puntual de un alérgeno después de establecerse sensibilización hacia éste. En este trabajo, se usará este término para referirnos a la exposición puntual a OVA después del periodo de exposición oral de 6 semanas. El objetivo de este *challenge* era evaluar la respuesta inmediata a la OVA tanto en el grupo previamente expuesto como en el no expuesto.

Como control positivo de la producción de IgG (Knippels *et al.*, 1999b), se usó un grupo de ratas macho BN (n=2), el cual fue sensibilizado a la OVA siguiendo el protocolo de los 11 días (BN expuesta a OVA 11d), y otro grupo de ratas BN (n=2) se sometió al mismo protocolo pero con solución salina (BN no expuesta 11d) (Saavedra & Vergara, 2005).

3.1.4. Obtención de muestras

Los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis de anestesia compuesta por ketamina (Imalgene®, Merial. Lyon, France) y xilacina (Rompun®, Bayer. Kiel, Germany). Las muestras de sangre fueron extraídas de la vena porta y los sueros se mantuvieron a -30°C hasta el momento de su análisis. Posteriormente, se obtuvieron muestras de duodeno, yeyuno, ileon y colon, que fueron fijadas en formaldehído al 4% e incluidas en parafina.

3.2. Valoración de la respuesta IgE

3.2.1. Determinación de la concentración de IgE total en suero

La concentración de IgE en el suero se determinó mediante un kit comercial de ELISA (BD Biosciences Pharmingen. San Diego, CA, USA). Se incubaron placas de 96 pocillos a 4°C entre 16 y 24h con una solución de un anticuerpo monoclonal producido en ratón contra IgE de rata a una concentración de 2 µg/ml. Después de realizar 3 lavados con tampón fosfato salino (*Phosphate Buffer Saline*, PBS) al 0.05% Tween-20 de 300 µl cada uno, se añadió PBS/0.05% Tween-20/4% BSA (Albúmina de suero bovino, *Bovine Serum Albumin*) durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó una dilución 1/20 de los sueros a testar en PBS/0.05% Tween-20/2% BSA y se incubaron las placas con ellos durante 1 h a 37°C. Se hicieron los lavados como se ha descrito anteriormente y se añadió una solución de un anticuerpo biotinilado producido en ratón contra IgE de rata a una concentración de 2µg/ml durante 1h a 37°C. Tras ello, la placa se reveló durante 15 minutos a temperatura ambiente después de añadir 3, 5, 3', 5'-tetrametilbencidina o TMB (T0440 Sigma, Saint Louis, MO, USA). Finalmente, se añadió una solución de H₂SO₄ 2N y se midió la absorbancia a 405 nm. Todos los análisis se hicieron por duplicado. La variabilidad entre los diferentes ensayos se evitó que afectara

a los resultados añadiendo muestras representativas de todos los grupos en cada placa.

3.2.2. Determinación del título de IgE específica anti-OVA en suero

La determinación del título de IgE anti-OVA se realizó como ya se había descrito (Hylkema *et al.*, 2002) pero con ciertas modificaciones:

Los pocillos fueron recubiertos con 100 µl de una solución del mismo anticuerpo utilizado para la determinación de IgE total a una concentración de 2 µg/ml (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) y la placa se mantuvo a 4°C de 16 a 24h. Después de realizar 3 lavados con PBS/0.05% Tween-20, se incubaron las placas con PBS/0.05% Tween-20/4% BSA durante 2 h a temperatura ambiente. Tras repetir los 3 lavados con PBS/0.05% Tween-20, se añadieron las muestras de suero diluidas a una relación de 1:4 en PBS/0.05% Tween-20/2% BSA. A partir de esta dilución se tituló la muestra haciendo sucesivas diluciones en base dos y se incubó la placa durante 1h a 37°C. Se hicieron los lavados como se ha descrito anteriormente y se añadió OVA biotinilada (10 µg/ml en PBS/0.05% Tween-20/2% BSA) durante 1 h a 37°C. Posteriormente, se repitieron los lavados y se añadió, a fin de marcar la OVA unida a la placa, un polímero altamente sensible de estreptavidina-peroxidasa (S2438 Sigma, Saint Louis, MO, USA) diluido a 1:500 en PBS/0.05% Tween-20 durante 15 minutos a 37°C. Tras ello, el TMB fue añadido y la placa se reveló durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se paró con una solución de H₂SO₄ 2M y se midió la absorbancia a 405 nm. Los sueros de ratas SD control fueron usados como control negativo a una dilución de 1:4, marcando así el valor de referencia para determinar el título de los sueros problema. Cada suero problema fue titulado empezando por la dilución 1:4 y se consideró que el título era aquella dilución que presentaba una absorbancia superior a 0.1 unidades respecto al valor referencia. Como control positivo de la técnica se usó el suero de ratas BN expuestas a OVA..

3.2.3. Ensayo de anafilaxis cutánea pasiva (PCA)

El objetivo de este ensayo de anafilaxis cutánea pasiva (*Passive Cutaneous Anaphylaxis Assay*, PCA) era determinar la presencia de IgE específica anti-

OVA en suero. Se realizó tal y como se había descrito anteriormente (Knippels *et al.*, 1998;OVARY, 1964).

Se usaron ratas SD no expuestas como recipiente, se les afeitó el dorso y se les inyectó 0.1 ml de los sueros a testar en diferentes puntos. 48 horas después se les efectuó una inyección intravenosa de 1 ml de una mezcla 1:1 de solución de OVA y solución de Azul Evans (al 2% en solución salina estéril). Después de 30 minutos, los animales se examinaron para determinar la presencia o ausencia de tinción por Azul Evans en los puntos de inyección de los sueros problema. Si en estos sueros hubiese IgEs anti-OVA, éstas se unirían a OVA y esto provocaría una extravasación del colorante hacia este punto. El suero de ratas BN expuestas a OVA fue usado como control positivo ya que es conocido que presentan una elevada concentración de IgE específicas anti-OVA (Knippels *et al.*, 1998;Knippels *et al.*, 1999b;Knippels *et al.*, 1999a;Knippels *et al.*, 2000).

3.2.4. Inmunohistoquímica anti-IgE y contaje de células IgE+

Con el fin de identificar la localización tisular de la IgE y de cuantificar las células IgE+, se realizó la inmunodetección mediante un anticuerpo monoclonal anti-IgE producido en ratón (Zymed, Carlsbad, CA, USA) a una dilución 1:200 en secciones de duodeno, yeyuno, ileon y colon fijadas en formolaldehido e incluidas en parafina.

El protocolo de inmunohistoquímica se compuso de varios pasos:

- Desparafinado (Xilol) e hidratación (% decreciente de etanol)
- Inhibición de las peroxidasas endógenas (H₂O₂ 5%, 30 minutos)
- Incubación con tampón citrato (pH=6, 95°C, 20 minutos)
- Enfriamiento (2 horas)
- Bloqueo uniones inespecíficas (suero de caballo, 20 minutos)
- Inhibición biotinas (Avidina D/ Biotina, Blocking kit, Vector)
- Incubación anticuerpo primario anti-IgE (1:200, 16-24 horas a 4 °C)
- Incubación anticuerpo secundario (1:200, 1 hora a temperatura ambiente)
- Detección con sistema avidina/peroxidasa (Vectastain ABC kit; Vector).
- Revelado con DAB (Vector)
- Contratinción con hematoxilina de Mayer

-
- Deshidratación (% creciente de etanol y xilol)
 - Montaje con DPX Mountant (Fluka 44581 Biochemika)

Se analizaron las muestras teñidas a 400 aumentos. Las células marcadas positivamente fueron contadas en 3-5 secciones por animal. Se examinaron de 7 a 10 vellosidades por sección usando un microscopio Olympus CH2. El análisis de todos los datos morfológicos se realizó a doble ciego para evitar el efecto del observador.

3.3. Determinación del título de IgG específica anti-OVA en suero

Para determinar el título de IgG específica anti-OVA en suero, placas de 96 pocillos fueron incubadas entre 16 y 24h a 4°C con solución de OVA en tampón carbónico (pH=9.6) a 5 µg/ml con 100 µl/pocillo. A continuación se realizó una incubación de 1h con una solución de PBS/0.02%T20/1% BSA a 37°C. Posteriormente se llevaron a cabo diluciones seriadas de los sueros a testar en la solución de PBS/0.02%T20/1% BSA y se incubaron las placas con estas diluciones durante 1 h a 37°C. Después de esto, se incubaron durante 1h con el conjugado de la IgG anti-rata producida en cabra y la peroxidasa (Zymed) diluido en PBS/BSA–Tween 20. El TMB fue añadido y las placas fueron reveladas a temperatura ambiente durante 5–15 min. Finalmente, se añadió H₂SO₄ 2N a 100 µl/pocillo y se midió la absorbancia a 450 nm. La determinación del título de los sueros a testar se realizó del mismo modo que para la titulación de IgE anti-OVA.

3.4. Valoración de la respuesta Th₂

3.4.1. Determinación de la concentración de IL4 en suero

La concentración de IL4 en el suero proveniente de la vena porta se midió con un kit comercial de ELISA (BD Biosciences. CA, USA), el proceso fue similar al descrito para la determinación de IgE total. Todos los análisis se hicieron por duplicado. La variabilidad entre los diferentes ensayos se evitó que afectara a los resultados añadiendo muestras representativas de todos los grupos en cada placa.

3.4.2. Tinción con Rojo Congo y conteo de eosinófilos

Tras el desparafinado e hidratación de secciones de yeyuno fijadas en formaldehído, estas fueron teñidas con Rojo Congo al 0.5% (peso/volumen) en etanol para la detección de eosinófilos y se contrastaron con hematoxilina de Mayer al 25% en agua destilada. Posteriormente, las muestras se deshidrataron y se montaron con DPX Mountant (Fluka 44581 Biochemika). Las células con tinción positiva fueron contadas como se describe para las células IgE+.

3.5. Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como MEDIA \pm SEM (*Standard Error Mean* o error estándar de la media). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante ANOVA seguido por el test *post hoc* de Bonferroni para la comparación de cada grupo expuesto a OVA con su respectivo grupo control no expuesto. Las diferencias entre los grupos se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

4. Resultados

4.1. Valoración de la presencia de IgE en ratas expuestas a OVA

La presencia de IgE anti-OVA se valoró mediante dos técnicas diferentes con el fin de corroborar los datos: titulación mediante ELISA y ensayo de anafilaxis cutánea pasiva (PCA).

4.1.1. Concentración de IgE total en suero portal

La exposición oral a OVA no indujo un aumento de la concentración de IgE total en suero portal (No expuesto: 16.34 ± 2.87 ng/ml; Expuesto a OVA: 13.98 ± 3.79 ng/ml).

4.1.2. Titulación de IgE específica anti-OVA en suero portal

Esta exposición a OVA tampoco produjo un incremento en la concentración de IgE específica anti-OVA (Figura 2) ya que no se detectó la presencia de esta molécula en suero portal de ninguno de los grupos. Sin embargo, el suero de ratas BN expuestas a OVA, el control positivo utilizado, dio titulación superior a la del valor de referencia, el suero de ratas SD no expuestas ($\Delta=2,2 \pm 0,8$ 2Log IgE titer).

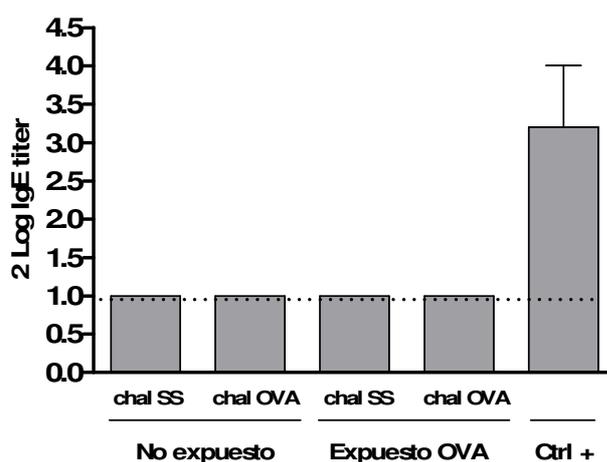


Figura 2: Títulación de IgE específica anti-OVA en suero portal del control positivo (BN expuestas oralmente a OVA) y de los 4 grupos de ratas SD, expuestas a OVA y no expuestas con *challenge* a OVA (chal OVA) y a solución salina (chal SS). Los datos se expresan como media de $^2\log$ IgE titer \pm SEM.

4.1.3. Ensayo de anafilaxis cutánea pasiva (PCA)

Tanto los sueros de ratas SD expuestas a OVA como los de ratas no expuestas dieron resultados negativos al realizar el ensayo de anafilaxis pasiva (PCA). No se produjo extravasación del colorante Azul Evans en ninguno de los puntos donde se inyectaron estos sueros. En contraposición, el suero de ratas BN expuestas a OVA (control positivo) produjo la extravasación del colorante unido a la OVA hacia los puntos de inyección de los sueros a testar, lo cual produjo una pápula azul (Figura 3).

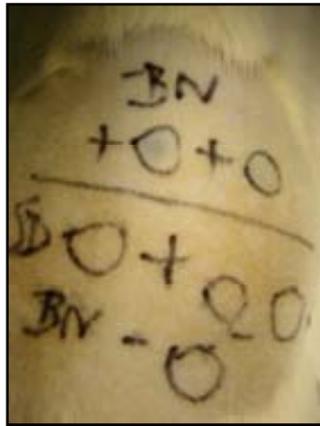


Figura 3: Aplicación de sueros a testar en el dorso de una rata no expuesta. Observación de pápula azul en el control positivo (BN expuesta oralmente a OVA).

4.1.4. Número de células IgE+ en la mucosa intestinal:

Las ratas SD expuestas a OVA mostraron un número similar de células IgE+ en yeyuno respecto a las ratas no expuestas, independientemente del *challenge* (Figura 4). En cambio, las ratas BN expuestas a OVA presentaron un número significativamente inferior al de las ratas BN no expuestas. Además el número basal de células IgE+ en las ratas BN era mucho mayor que en las ratas SD (Figura 5).

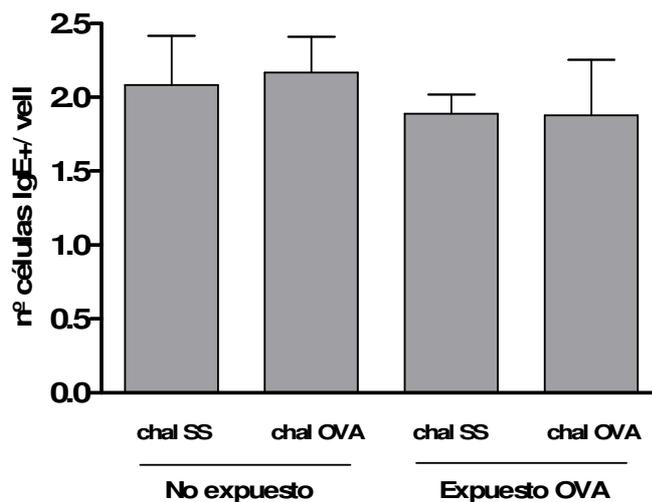


Figura 4: Número de células IgE+ expresado por vellosidad en yeyuno de los grupos expuestos a OVA y no expuestos con *challenge* a OVA (chal OVA) y a solución salina (chal SS) en ratas SD. Las barras representan la media \pm SEM de las 5 ratas de cada grupo.

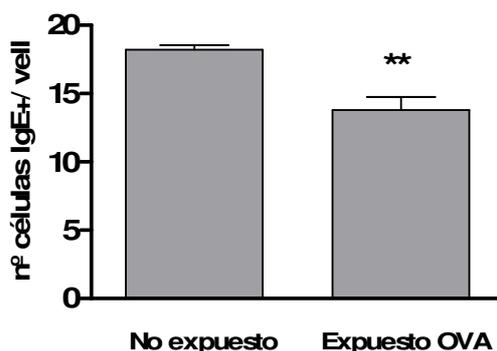


Figura 5: Número de células IgE+ expresado por vellosidad en yeyuno de ratas BN. Las barras representan la media \pm SEM de las 4 ratas de cada grupo. **, $P < 0.01$ respecto al grupo no expuesto.

4.2. Titulación de IgG específica anti-OVA en suero portal

No se detectó un aumento en la concentración de IgG anti-OVA en el suero de ninguno de los grupos (Figura 6). Sin embargo, tal y como sucedía para la titulación de IgE, sí que hubo un aumento en el título del control positivo (BN expuesta a OVA 11d) comparado con el valor de referencia, el suero de ratas SD no expuestas ($\Delta = 2.5 \pm 0.2$ 2Log IgG titre).

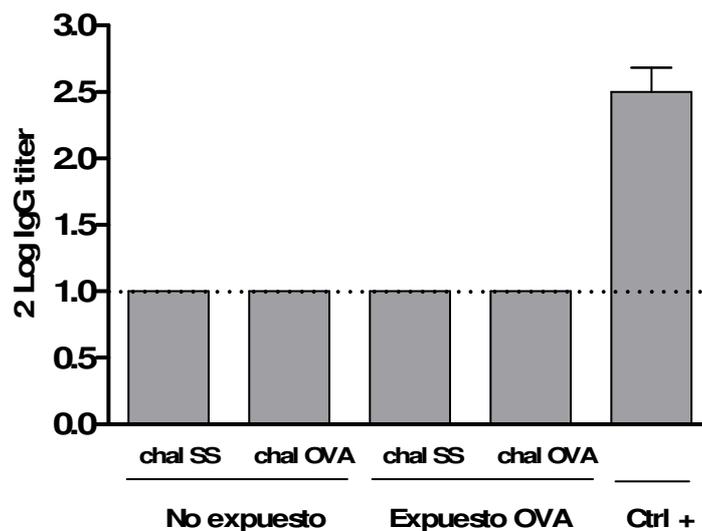


Figura 6: Títulación de IgG específica anti-OVA en suero portal del control positivo (BN expuestas a OVA por el protocolo 11d) y de los 4 grupos de ratas SD, expuestas a OVA y no expuestas con *challenge* a OVA (chal OVA) y a solución salina (chal SS). Los datos se expresan como media de $^2\log$ IgG titer \pm SEM.

4.3. Parámetros relacionados con la respuesta Th₂:

4.3.1. Número de eosinófilos

En los grupos no expuestos se observó la presencia de eosinófilos a lo largo de todo el intestino, aunque el valor variaba según se tratara de duodeno, yeyuno, ileon o colon. No obstante, la exposición oral con OVA no aumentó este parámetro en ninguna de las secciones intestinales (Tabla 1).

4.3.2. Concentración de IL4

Asímismo, la exposición a OVA no aumentó la concentración basal de IL4 en suero (Tabla 1). En cambio, el control positivo (OVA 11d BN) presentó una concentración mucho mayor (409.9 pg/ml) que el valor del grupo control. Incluso el grupo de ratas BN control del protocolo de 11d presentó una concentración de IL4 superior (8.2pg/ml) al grupo de ratas SD expuestas a OVA.

Tabla 1: Número de eosinófilos intestinales expresado por vellosidad en duodeno, yeyuno, ileon y colon de ratas SD y concentración de IL4 en suero portal expresado en pg/ml de los grupos expuestos a OVA y no expuestos con *challenge* a OVA (chal OVA) y a solución salina (chal SS).

Nº eosinófilos /vellosidad	No expuesto chal SS	No expuesto chal OVA	Expuesto OVA chal SS	Expuesto OVA chal OVA
Duodeno	8.09 ± 0,75	7.20 ± 0.55	7.46 ± 0.58	7.13 ± 0.86
Yeyuno	9.76 ± 0,41	9.80 ± 0,17	10.40 ± 0,06	10.87 ± 0,78
Ileon	5.30 ± 0.55	5.00 ± 0.16	5.06 ± 0.31	5.33 ± 0.19
Colon	2.98 ± 0.26	3.20 ± 0.23	3.06 ± 0.33	3.13 ± 0.17
IL4 (pg/ml)	1.92 ± 0,04	1.86± 0,01	1.86 ± 0,02	1.98 ± 0,09

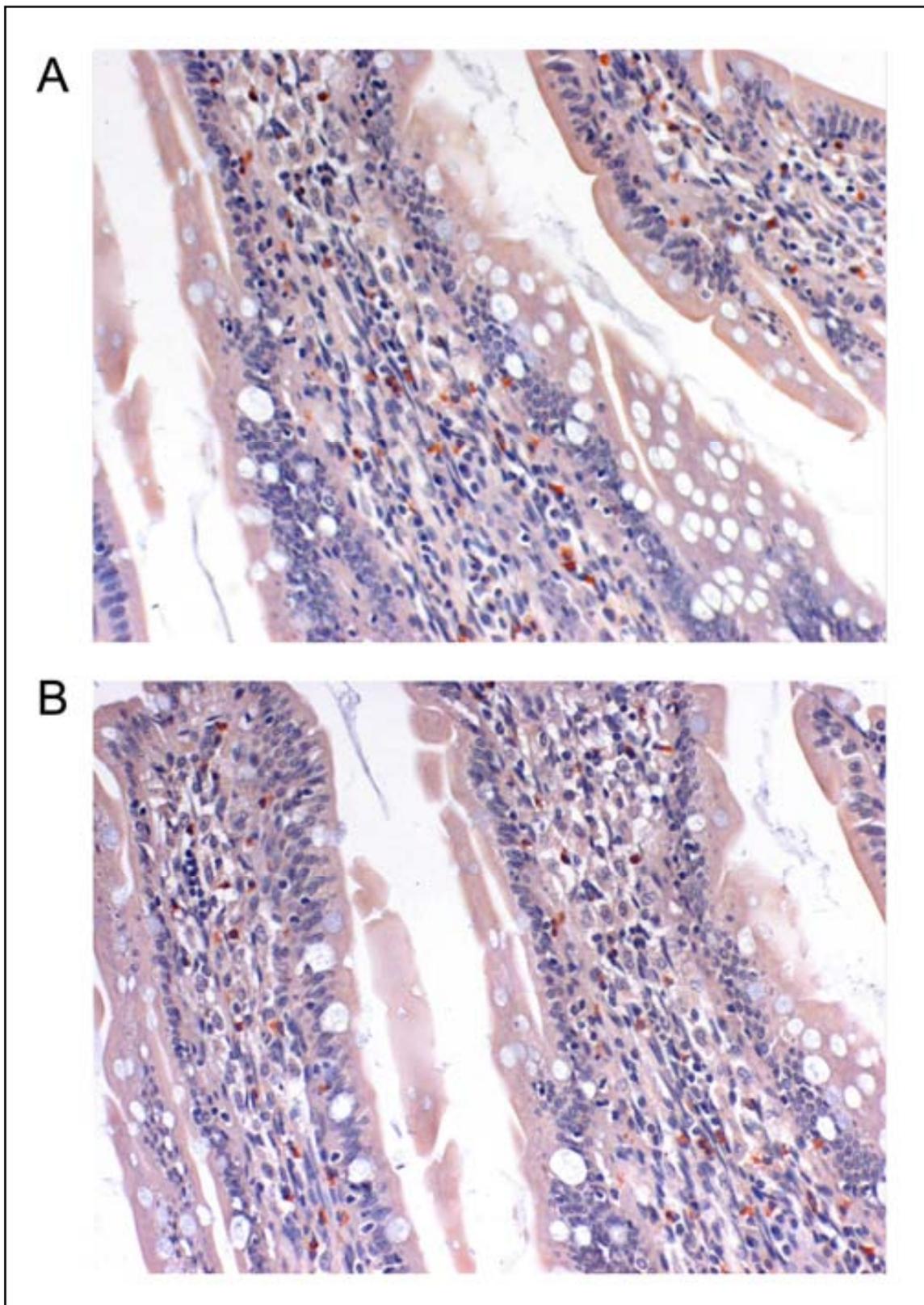


Figura 7: Microfotografía representativa que muestra eosinófilos teñidos con Rojo Congo en la mucosa intestinal de yeyuno a 200X aumentos. **A.** En rata SD no expuesta. **B.** En rata SD expuesta a OVA.

5. Discusión

Nuestros resultados revelan que la exposición oral a OVA en ratas SD no genera una respuesta de tipo alérgico, a diferencia de lo que se observa en ratas BN.

En primer lugar, analizamos si la respuesta a OVA estaba mediada por IgE en las ratas SD y observamos que la exposición oral a OVA no aumentaba significativamente la concentración de IgE total ni específica anti-OVA. En cambio, en ratas BN sí que se genera una respuesta mediada por IgE específica anti-OVA, coincidiendo con lo que ya se había descrito anteriormente (Knippels *et al.*, 1999b). Por tanto, en las ratas SD la respuesta a la exposición oral a OVA parece ser una respuesta independiente de IgEs, al menos en un análisis sistémico, aunque no se podía descartar que se trate de una respuesta local mediada por IgEs en la mucosa intestinal. Estudios clínicos sugieren que las IgEs pueden ser producidas localmente en la mucosa gastrointestinal (Schwab *et al.*, 2001), proporcionando una explicación a los casos en que los niveles de IgE séricas no se correlacionan con la reacción alérgica en mucosa intestinal (Bischoff *et al.*, 2000). En algunos de estos casos en los que no se detecta IgE sérica, el número de células portadoras de IgE aumenta en mucosa intestinal únicamente en el momento en que se desarrollan los síntomas del proceso de alergia alimentaria (Lin *et al.*, 2002). Por este motivo, se llevó a cabo una detección de las células portadoras de IgE (IgE+) en tejido intestinal tanto de ratas SD como de BN. Según nuestros resultados, la exposición oral a OVA no induce un aumento significativo en el número de células IgE+ en mucosa intestinal de yeyuno de ratas SD, las cuales se identificaron en su mayoría morfológicamente como mastocitos. Sin embargo, la exposición oral a OVA en BN sí que produce un efecto sobre el número de células IgE+ en mucosa intestinal disminuyendo este parámetro. Al tratarse de una molécula unida a un receptor de membrana, la activación y consiguiente degranulación de las células IgE+ no afectaría a su detección en tejido intestinal. Por tanto, la disminución en BN de este parámetro tras la exposición oral a OVA posiblemente no se deba a la activación de estas células IgE+. No obstante, la

predisposición de BN a desarrollar respuestas de tipo alérgico (Knippels & Penninks, 2005) podría ser la causa de la diferencia entre estas dos cepas.

De este modo, la respuesta a OVA no estaría mediada por IgE ni sistémicamente ni en la mucosa de las ratas SD aunque podría tratarse de una respuesta de tipo alérgico mediada únicamente por IgG (Zollner *et al.*, 2000). En trabajos previos se había comparado el protocolo de sensibilización oral a OVA en la cepa BN con respecto a otras cepas como la *Wistar*, *Hooded Lister* (HL) y *Piebald Virol Glaxo* (PVG). De este modo, se determinó que únicamente la cepa BN desarrollaba una respuesta específica hacia la OVA mediada por IgE. Sin embargo, se describió que se produce una respuesta específica hacia la OVA mediada por IgG, además de en BN, también en las cepas HL, PVG y *Wistar* (Knippels *et al.*, 1999b). En contraposición, nuestros resultados muestran que las ratas SD expuestas a OVA tampoco presentan una respuesta mediada por IgG.

La ausencia de una respuesta mediada por IgE o IgG podría deberse a que la administración repetida del alérgeno a dosis bajas en ratas SD, a diferencia de las otras cepas, puede estar induciendo tolerancia oral provocando una supresión de la respuesta mediada por células T (Holt, 1998). Uno de los posibles mecanismos implicados en la inducción de esta tolerancia en ratas SD podría ser la presencia de determinados fragmentos peptídicos inductores de tolerancia. Se ha descrito que la administración por vía oral de ciertos fragmentos de la OVA como el 173-196 estimulan células T específicas e inducen tolerancia oral con la supresión de una respuesta IgE específica hacia esta proteína (Ben, I *et al.*, 2003).

Por otra parte, en la respuesta alérgica los linfocitos Th₂ liberan IL4 que regula la síntesis de IgE y la quimioatracción de mastocitos y eosinófilos (Bischoff *et al.*, 1999). Además, se ha descrito que la respuesta a OVA puede tener un componente Th₂, a pesar de que los niveles de IgE sean indetectables o inexistentes (Novak *et al.*, 2004). Por este motivo, se evaluaron parámetros relacionados con este tipo de respuesta Th₂ tales como la concentración de IL4 y la presencia de eosinófilos en mucosa intestinal; los cuales no habían sido determinados con anterioridad en los modelos de exposición oral a OVA en rata BN ni en rata SD. De este modo, se observó que tras la exposición a OVA en rata SD no se produce un aumento en ninguno de estos dos parámetros

sugiriendo que la respuesta inducida por esta proteína no tiene un componente Th₂. Además se determinó que la concentración de IL4 en las ratas BN no expuestas es mucho mayor que en las ratas SD confirmando que esta cepa tiene una mayor susceptibilidad a desarrollar respuestas de este tipo. E sta ausencia de un componente Th₂ en la respuesta de las ratas SD parece lógica no habiéndose observado la producción de IgE o IgG específicas.

Por último, cabe destacar que, al utilizar ratas BN como control positivo, demostramos que la metodología utilizada es capaz de detectar la respuesta inmune que se produce en este modelo acorde con lo descrito en otros estudios (Knippels *et al.*, 1998).

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la exposición oral a OVA sólo induce una respuesta alérgica en individuos predispuestos genéticamente (atópicos). Por lo tanto, esto sugiere que la activación mastocitaria observada con anterioridad en ratas SD se desarrolla mediante mecanismos no inmunológicos.

ESTUDIO 2

Efecto de la exposición oral a ovo-albúmina
(OVA) sobre la actividad mastocitaria

1. Antecedentes

En la rata, los mastocitos de mucosa intestinal (IMMC) expresan selectivamente la proteasa RMCP II (*Rat Mast Cell protease II*) y los mastocitos de tejido conjuntivo expresan la proteasa RMCP I (*Rat Mast Cell protease I*). Por este motivo y por su localización selectiva en determinados órganos y tejidos, estas proteasas han sido empleadas como marcadores específicos de la actividad de estas dos poblaciones mastocitarias (Miller *et al.*, 1983). En el intestino se encuentran ambos tipos de mastocito aunque predominan los de mucosa y, por ello, entre los marcadores utilizados para valorar la actividad mastocitaria *in vivo*, destaca la medición de la concentración de RMCP II en suero (Serna *et al.*, 2006; Watzl *et al.*, 1999) y en extracto intestinal (Wilkes *et al.*, 2007). Otro abordaje en la evaluación de la actividad mastocitaria es contar el número de mastocitos que infiltran un tejido como, por ejemplo, la mucosa intestinal (Saavedra & Vergara, 2005; Serna *et al.*, 2006). Por otro lado, se dispone de líneas o cultivos celulares primarios para ahondar en el estudio de la biología mastocitaria *in vitro* (Kalesnikoff *et al.*, 2006; Nakae *et al.*, 2007).

Para el estudio de la sensibilización alérgica se dispone de diversos modelos animales inducidos mediante la exposición a proteínas de la dieta, tales como las procedentes de los cacahuets (*peanut extract*, PE), de la leche de vaca (*cow's milk*, CM) (Knippels *et al.*, 2000) o del huevo de gallina (*hen egg white*, HEW), especialmente la ovo-albúmina (OVA) (Knippels *et al.*, 1998). En cambio, otras proteínas como la gelatina no se han utilizado en estos modelos animales ya que no se conoce que induzcan procesos de sensibilización alérgica.

En un estudio anterior de nuestro grupo se observó que la exposición oral a OVA provoca la activación mastocitaria manifestada en un aumento en el número de mastocitos en mucosa intestinal y en la liberación de RMCP II a nivel local, así como la alteración de la motilidad intestinal (Saavedra & Vergara, 2005). En general en los modelos de sensibilización, se induce activación mastocitaria acompañada por un incremento en otros parámetros característicos de la respuesta alérgica como las IgEs específicas (Fritsche, 2003). Sin embargo, en el estudio anterior hemos demostrado que en nuestro modelo este efecto de OVA sobre la actividad mastocitaria no se debe a un proceso de carácter alérgico.

2. Objetivos

El objetivo general del estudio fue caracterizar el efecto de la exposición oral continuada de OVA sobre la actividad mastocitaria.

Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- Evaluar el efecto de OVA sobre la actividad mastocitaria *in vivo* mediante la evaluación del número de IMMC y de la concentración de RMCPII intestinal y sérica, tras la exposición oral continuada a OVA y tras la exposición puntual (*challenge*).
- Estudiar si el efecto de la OVA sobre los mastocitos es el resultado de la estimulación específica de esta proteína *in vivo*.
- Evaluar el efecto que la OVA y su hidrolizado (OVH) provocan sobre mastocitos no sensibilizados *in vitro*.

3. Material y Métodos

3.1. Diseño experimental

3.1.1. Animales

Se utilizaron 40 ratas macho *Sprague Dawley* (SD) provenientes de Charles River (Les Oncins, France) que se distribuyeron en 8 grupos de 5 animales (n=5). Los animales tenían libre acceso al agua y a una dieta estándar en forma de pellet que no contenía ningún rastro de OVA ni otro derivado del huevo así como tampoco de gelatina. Las ratas estaban libres de patógenos específicos (*Specific Pathogen Free*, SPF) y se estabularon en ambiente controlado (Temperatura: 20-21°C, Humedad: 60%, Foto-periodo:12h luz/12h oscuridad). Se estableció un período de aclimatación de los animales de una semana desde el momento de su recepción. La noche anterior al experimento se retiró el alimento. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por la Comisión Ética en la Experimentación Animal y Humana (CEEAH) de la Universitat Autònoma de Barcelona.

3.1.2. Exposición oral a OVA

Siguiendo el protocolo previamente descrito por Saavedra y Vergara (Saavedra & Vergara, 2005), ratas de 6 semanas de edad (n=10, 2 subgrupos de n=5) fueron expuestas a OVA (Grade V. Sigma, St Louis, MO, USA) mediante sondaje oral (1 mg de OVA en 1 ml de solución salina 0.9% NaCl, 1 ml/animal) realizado durante 6 semanas. Un grupo de ratas (n=10, 2 subgrupos de n=5) no expuestas a OVA se usaron como grupo control en el cual el protocolo de inducción se realizó como se describe anteriormente pero substituyendo la solución de OVA por solución salina.

El término *challenge* (o provocación intestinal) se refiere a la exposición puntual de un alérgeno después de establecerse sensibilización hacia éste. En este trabajo, se usará este término para referirnos a la exposición puntual a OVA después del periodo de exposición oral de 6 semanas. El objetivo de este *challenge* era evaluar la respuesta inmediata a la OVA tanto en el grupo previamente expuesto como en el no expuesto.

Diez días después de finalizar el periodo de exposición, a la mitad de los animales del grupo expuesto a OVA (n=5) se les administró solución salina (0.5

ml de solución salina o SS) y a la otra mitad (n=5) se les provocó un *challenge* con solución de OVA (0.5 ml de 0.2 g/ml de solución de OVA). El grupo control no expuesto a OVA fue también sometido a los dos tipos de *challenge*, tal y como se ha descrito anteriormente para el grupo expuesto a OVA. Los animales fueron sacrificados 1 hora después de efectuar el *challenge*.

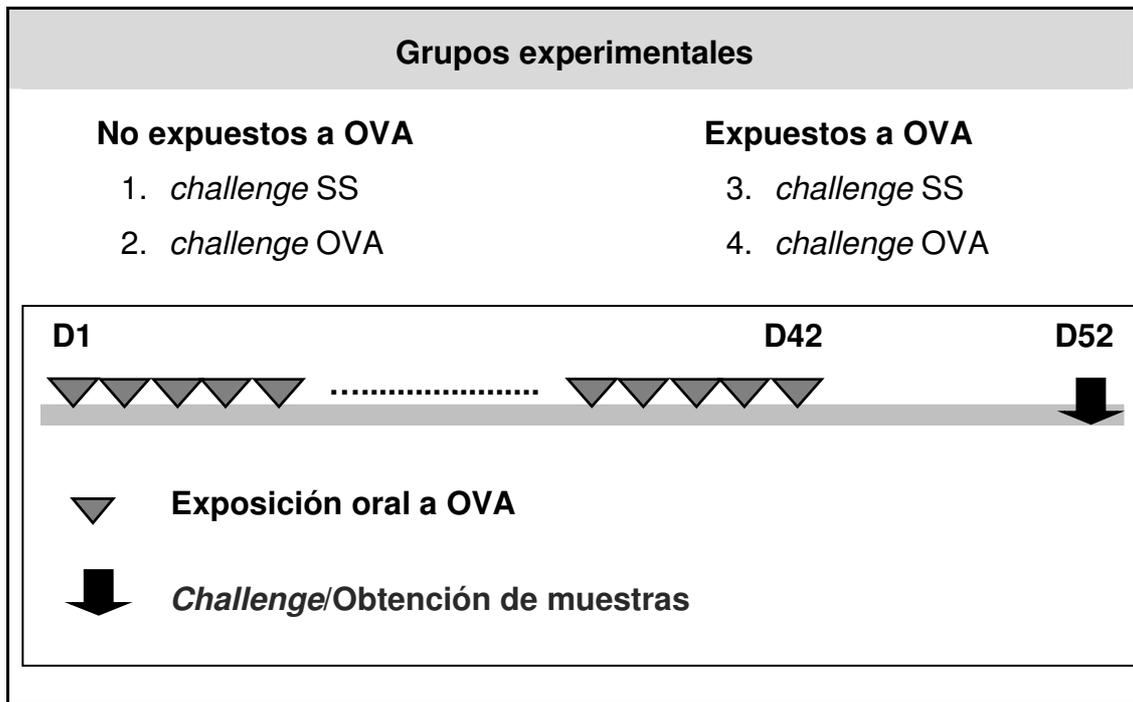


Figura 1: Los 2 grupos expuestos recibieron OVA durante 42 días (D1-D42) y los grupos no expuestos recibieron solución salina durante el mismo periodo. Diez días después de finalizar la exposición a OVA (D52) se realizaron los *challenges* correspondientes y 1 hora después se extrajeron las muestras.

3.1.3. Exposición oral a gelatina

Con el objetivo de evaluar si el efecto de la OVA sobre el mastocito era específico de esta proteína, se llevó a cabo un protocolo de exposición idéntico al de OVA pero con una proteína diferente, la gelatina. Un grupo adicional (n=10, 2 subgrupos de n=5) fue expuesto a gelatina (*gelatine from cold water fish skin*. Sigma, St Louis, MO, USA) siguiendo el mismo procedimiento descrito para OVA y otro grupo no expuesto a gelatina (n=10, 2 subgrupos de n=5) fue usado como control. El *challenge* (o exposición puntual) se realizó como en el protocolo de exposición a OVA pero con gelatina.

3.1.4. Obtención de muestras

Los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis de anestesia compuesta por ketamina (Imalgene®, Merial. Lyon, France) y xilacina (Rompun, Bayer. Kiel, Germany). Las muestras de sangre fueron extraídas de la vena porta y los sueros se mantuvieron a -30°C hasta el momento de su análisis. Posteriormente, se obtuvieron muestras de duodeno, yeyuno, ileon y colon, y una muestra de cada tejido fue fijada en formaldehído al 4% e incluida en parafina. Otra muestra fue congelada mediante nitrógeno líquido y mantenida a -80° C hasta su posterior análisis.

Para la extracción de proteínas, las muestras congeladas de yeyuno y colon fueron pulverizadas en mortero y diluidas en un tampón de extracción que contenía fenil-metil-sulfonil fluorado o PMSF (100 mM), ácido hidroxietil-piperacino-etano-sulfónico o HEPES (1M) y una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (Roche Molecular Biochemicals) con la siguiente composición: manitol (40-50 %), sal disódica del ácido etileno-diamino-tetraacético o EDTA (<25 %), amidino-fenil-metil-sulfonil fluorado o APMSF (10 - 20 %), polivinilpirrolidona o PVP (1-5 %) y polietilenglicol o PEG (1-5 %). Después de una incubación de 20 minutos en hielo, las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm a 4°C durante 10 minutos y los sobrenadantes se mantuvieron congelados a -30°C.

3.2. Valoración de la actividad mastocitaria

3.2.1. Inmunohistoquímica anti-RMCPII y contaje de mastocitos de mucosa intestinal (IMMC)

La inmunodetección fue llevada a cabo mediante un anticuerpo primario monoclonal contra RMCP II producido en ratón (Moredun. Scotland, UK) a una dilución 1:500 en secciones de duodeno, yeyuno, ileon y colon fijadas en formaldehído e incluidas en parafina. El anticuerpo secundario producido en caballo reconocía IgG de ratón y fue utilizado a una dilución 1:200. Se analizaron las muestras teñidas a $\times 400$ aumentos. Las células marcadas positivamente fueron contadas en 3-5 secciones por animal. Se examinaron de 7 a 10 vellosidades por sección usando un microscopio Olympus CH2. El análisis de todos los datos morfológicos se realizó a doble ciego para evitar el efecto del observador.

3.2.2. Determinación de la concentración de RMCP II

La concentración de RMCP II en el suero y en el extracto de proteína fue determinada tal y como se había descrito previamente (Saavedra & Vergara, 2005) mediante un kit comercial de ELISA que empleaba el mismo anticuerpo monoclonal contra RMCP II que se utilizó para la inmunohistoquímica (Moredun Scotland, UK). Todos los análisis se hicieron por duplicado. La variabilidad entre los diferentes ensayos se evitó que afectara a los resultados añadiendo muestras representativas de todos los grupos en cada placa. En el caso del contenido de RMCP II intestinal este se normalizó con el peso de tejido de cada muestra.

3.3. Estimulación *in vitro* de un cultivo celular de mastocitos

Para estudiar la estimulación de mastocitos no sensibilizados con OVA y su hidrolizado (OVH), se usó un cultivo de mastocitos murinos (C1.MC/57.1). Después de proceder con el contaje celular y la valoración de la viabilidad de la línea celular, esta se centrifugó durante 10 minutos a 400g. Los sobrenadantes fueron descartados y el pellet fue disuelto en PBS (libre de histamina) al 2% de suero bovino fetal (*fetal bovine serum*, FBS) para obtener una concentración de $1.25 \cdot 10^6$ cel / ml. Se usó una placa de 12 pocillos y en cada uno de ellos se pusieron 400 μ l ($5 \cdot 10^5$ células / pocillo) de esta solución celular.

En cada pocillo se añadieron 100 μ l de diferentes soluciones:

- Solución salina estéril (SS, control negativo): 0,9% NaCl
- Solución OVA: 10 ng/ml, 100 ng/ml
- Solución OVH (hidrolizado de OVA): 10 ng/ml, 100 ng/ml
- IgE-DNP (Dinitrofenol) + DNP-HSA (*Human Serum Albumin*): 50ng/ml

Se incubó la placa durante 2 horas a 37°C (estufa de CO₂) y se detuvo la reacción mediante el contacto de la placa con agua-hielo. Posteriormente se centrifugó durante 20 minutos a 500 rcf y los 400 μ l de sobrenadante obtenido en cada pocillo se guardaron a -30°C. El pellet se resuspendió en 200 μ l de PBS al 2% en FBS y fue sometido a 5 ciclos de congelación/descongelación a fin de romper las membranas de los mastocitos y liberar el contenido celular al sobrenadante. El sobrenadante obtenido en cada pocillo se guardó a -30°C.

La concentración de histamina en las muestras de sobrenadante y pellet se determinó mediante un kit comercial de ELISA (IBL, Hamburg, Germany). Todos los análisis se hicieron por duplicado. La variabilidad entre los diferentes ensayos se evitó que afectara a los resultados añadiendo muestras representativas de todos los grupos en cada placa.

3.4. Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como MEDIA \pm SEM. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante ANOVA seguido por el test *post hoc Bonferroni* para la comparación de cada grupo expuesto a OVA con su respectivo grupo control no expuesto. Un test *t de Student* se utilizó para valorar el efecto del *challenge* sobre la actividad mastocitaria comparando el número de mastocitos en colon del grupo expuesto a OVA con *challenge* a solución salina (SS) respecto al grupo expuesto con *challenge* a OVA. Así mismo este test fue utilizado para comparar el porcentaje de liberación de histamina por parte del cultivo celular de cada condición de estimulación respecto al valor de referencia. Las diferencias entre los grupos se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

4. Resultados

4.1. Efecto de la exposición oral a OVA en la actividad mastocitaria

4.1.1. Concentración de RMCP-II en suero y en tejido intestinal

Se extrajo sangre de la vena porta como reflejo de lo que sucedía localmente, suponiendo que si se obtenían muestras de sangre de una vena cercana al tejido intestinal el posible efecto de OVA podría ser detectado más claramente. De este modo, determinamos el efecto de la exposición oral a OVA sobre un parámetro característico de la actividad mastocitaria *in vivo*, como es la concentración de RMCP II sérica, y observamos que esta concentración en suero portal no se modificó debido a la exposición oral a OVA ni al *challenge* a OVA (Figura 2).

Sin embargo, la concentración de RMCP II en tejido intestinal sí que se alteró debido a la exposición a OVA, siendo superior en el yeyuno y el colon de los grupos expuestos a OVA. En este caso tampoco se observó que el *challenge* a OVA produjera un efecto sobre este parámetro (Figura 3).

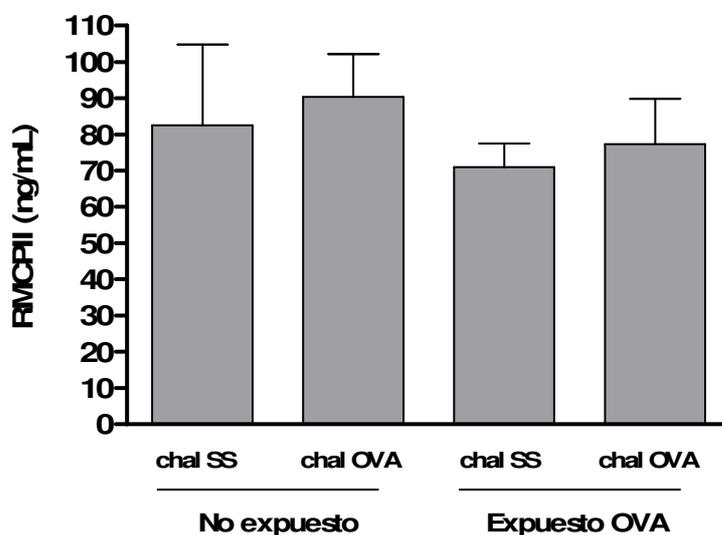


Figura 2: Concentración de RMCP II en el suero de la vena porta expresada en ng/ml de los grupos expuestos a OVA y no expuestos con *challenge* a OVA (chal OVA) y a solución salina (chal SS). Datos expresados como MEDIA \pm SEM.

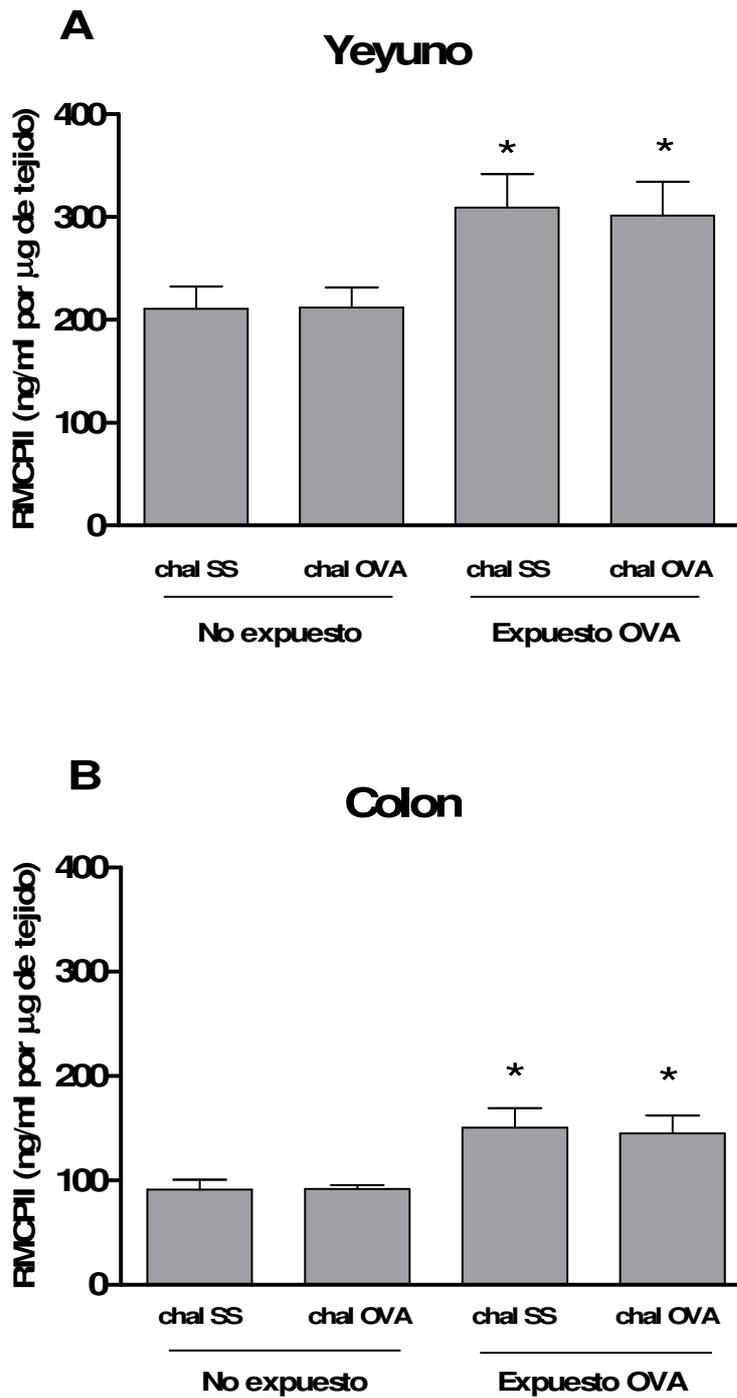


Figura 3: Concentración de RMCP II en tejido intestinal expresado en ng/ml por µg de tejido intestinal de los grupos expuestos a OVA y no expuestos con *challenge* a OVA (chal OVA) y a solución salina (chal SS).. **A.** En yeyuno. **B.** En colon. *, $P < 0.05$ respecto al grupo no expuesto correspondiente. Datos expresados como MEDIA \pm SEM.

4.1.2. Número de mastocitos de mucosa intestinal (IMMC)

Otro parámetro de la actividad mastocitaria *in vivo*, como es el número de IMMC, aumentó significativamente debido a la exposición oral a OVA en todas las secciones intestinales, especialmente en duodeno, yeyuno y colon (Figura 4.A,B,D). En ileon únicamente se observó un aumento significativo del número de mastocitos en el grupo expuesto a OVA que se sometió al *challenge* con OVA (Figura 4.C). En duodeno, yeyuno e ileon el número basal de mastocitos era muy similar, mientras que en colon era prácticamente la mitad que en el resto. Después del *challenge* a OVA se produjo una ligera disminución en la población mastocitaria en yeyuno y colon, tanto en el grupo expuesto como en el no expuesto, aunque tan sólo fue significativamente diferente en el grupo expuesto de colon (Figura 4.D, Figura 5).

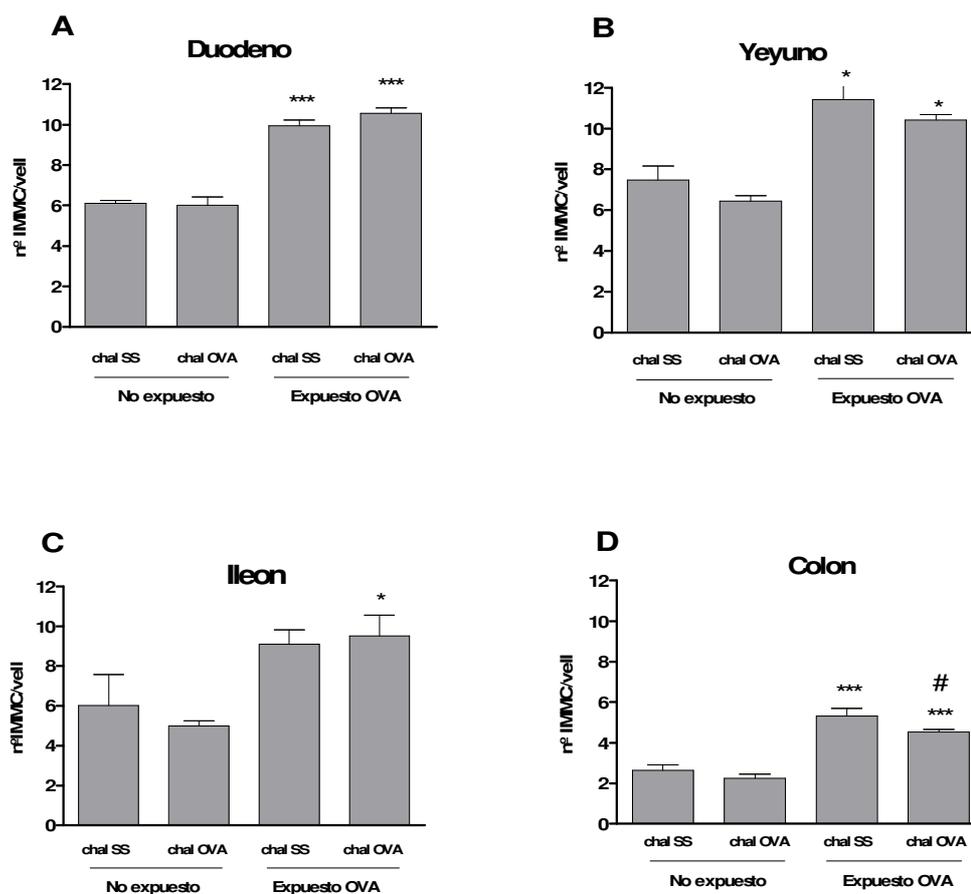


Figura 4: Número de mastocitos de mucosa intestinal (IMMC) expresado por vellosidad de los grupos expuestos a OVA y no expuestos con *challenge* a OVA (chal OVA) y a solución salina (chal SS).. **A.** En duodeno. **B.** En yeyuno. **C.** En ileon. **D.** En colon. *, *** $P < 0.05$, $P < 0.001$ respecto al grupo no expuesto correspondiente. # $P < 0.05$ en relación al grupo expuesto con *challenge* salino (+/-). Datos expresados como MEDIA \pm SEM.

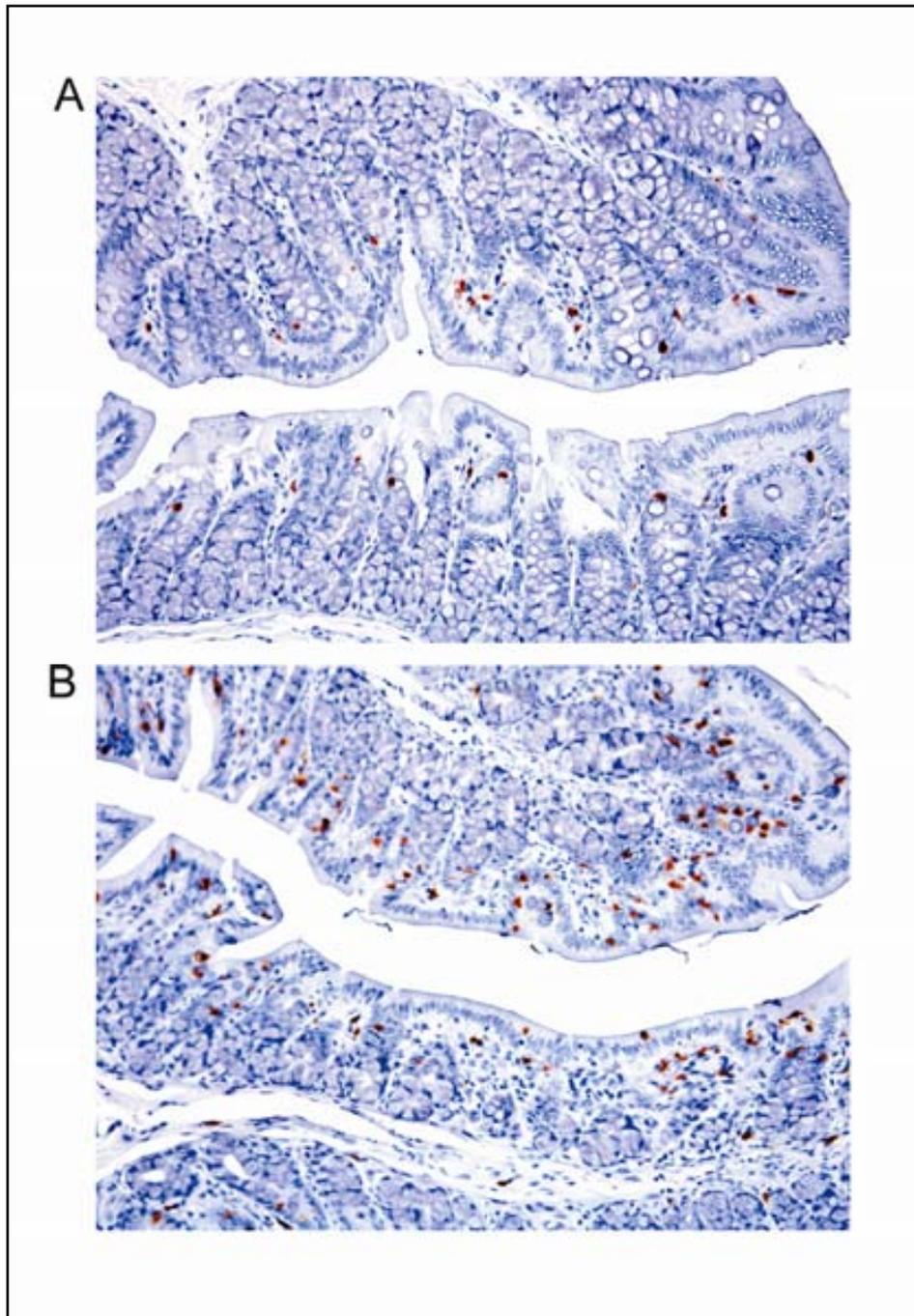


Figura 5: Microfotografía representativa que muestra células RMCP II inmunopositivas (mastocitos de mucosa) en la mucosa intestinal de colon a 200X aumentos. **A.** En rata SD no expuesta. **B.** En rata SD expuesta a OVA.

4.2. Caracterización de la respuesta local y sistémica generada por la exposición a OVA

4.2.1. Efecto de la exposición oral a gelatina en la actividad mastocitaria

Para evaluar si el efecto de OVA sobre el mastocito *in vivo*, a pesar de no haberse detectado inmunoglobulinas (Igs), era el resultado de la estimulación específica de esta proteína, se llevó a cabo un protocolo de exposición idéntico al de OVA pero con otra proteína, la gelatina.

En primer lugar, determinamos que la exposición oral a gelatina no aumentó significativamente el número de IMMC en yeyuno y que el *challenge* con gelatina no produjo una disminución en el número de mastocitos como en el caso del *challenge* con OVA (Figura 6). Otros parámetros de la actividad mastocitaria *in vivo* como son las concentraciones de RMCP II en suero y en tejido intestinal tampoco fueron modificadas por la exposición oral a gelatina (Tabla 1).

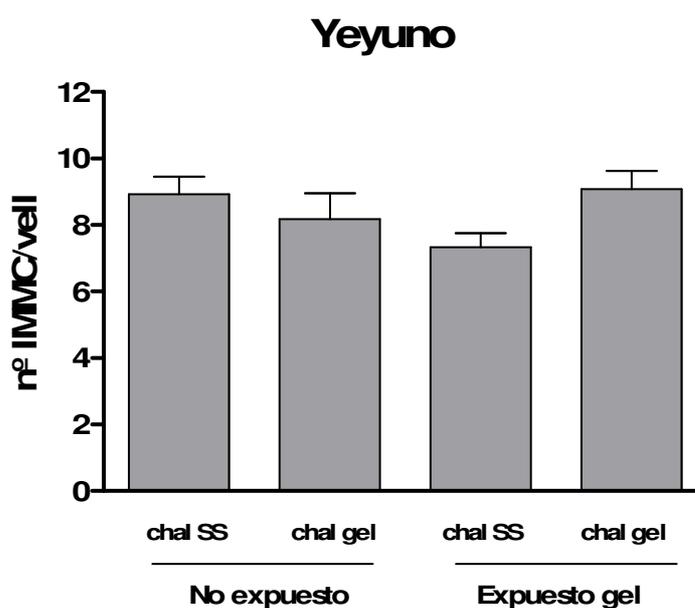


Figura 6: Número de mastocitos de mucosa intestinal expresado por vellosidad en yeyuno de los grupos expuestos a gelatina (gel) y no expuestos con *challenge* a gelatina (chal gel) y a solución salina (chal SS). Datos expresados como MEDIA ± SEM.

Tabla 1: Concentración de RMCPII sérica (expresada en ng/ml) e intestinal (expresada en ng/ml por μg de tejido intestinal en yeyuno) de los grupos expuestos a gelatina (gel) y no expuestos con *challenge* a gelatina (chal gel) y a solución salina (chal SS). Datos expresados como MEDIA \pm SEM.

Concentración RMCPII	No expuesto chal SS	No expuesto chal gel	Expuesto gel chal SS	Expuesto gel chal gel
Sérica (ng/ml)	86.68 \pm 16.55	84,56 \pm 10,88	84.96 \pm 11.30	80,89 \pm 12.92
Intestinal (ng/ml· μg tejido)	146.70 \pm 9,53	164,60 \pm 17,36	165.00 \pm 11,19	160,90 \pm 10,73

4.2.2. Efecto de la estimulación con OVA en la actividad mastocitaria *in vitro*

Con el fin de demostrar si la respuesta a la exposición a OVA podía deberse a un efecto directo sobre los mastocitos, se determinó la actividad mastocitaria *in vitro* midiendo la liberación de histamina frente a la estimulación con OVA en un cultivo murina de mastocitos no sensibilizados. La estimulación del cultivo de mastocitos con el conjugado IgE-DNP+DNP-HSA (control positivo) provocó un porcentaje de histamina liberada muy superior al resto de condiciones. No obstante, la estimulación con OVA y OVH aumentó el porcentaje de histamina liberada *in vitro* respecto a la estimulación con solución salina (SS, control negativo). Esta estimulación con OVA y OVH se realizó a dos dosis diferentes para determinar si la respuesta frente a la estimulación era dosis-dependiente pero no se encontró correlación entre la dosis y la magnitud de la respuesta (Figura 7).

Cabe destacar también que este efecto de OVA y OVH sobre la liberación de histamina no se debió a un proceso citotóxico ya que se observó que la viabilidad celular no se vio afectada por el estímulo con OVA y OVH (97% *aprox.*).

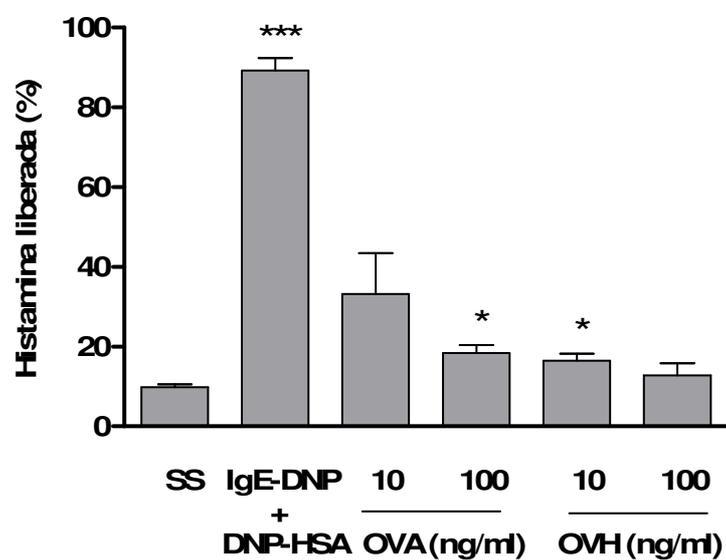


Figura 7: Porcentaje de liberación de histamina (%) por parte de la línea murina de mastocitos (C1.MC/57.1) tras la estimulación con solución salina (SS, 0.9% NaCl), IgE-DNP+DNP-HAS (50ng/ml), solución de OVA (10, 100 ng/ml) y solución de OVH (10,100 ng/ml). Las barras representan la MEDIA \pm SEM de 5 pocillos. *, ***, $P < 0.05$, $P < 0.001$ en comparación con su grupo control respectivo (t-test para datos no apareados).

5. Discusión

Nuestros resultados indican que la OVA induce la activación de los mastocitos de mucosa intestinal mediante una respuesta específica hacia esta proteína posiblemente causada por una interacción directa con el mastocito.

En primer lugar, evaluamos un marcador de la actividad mastocitaria sistémica como es la concentración sérica de RMCP II (Serna *et al.*, 2006;Watzl *et al.*, 1999) y observamos que este parámetro no se modificó en sangre portal tras la exposición oral a OVA, confirmando el resultado que ya se había descrito en un trabajo previo (Saavedra & Vergara, 2005). Una posible explicación para este fenómeno sería que la exposición oral actuaría sólo sobre la población mastocitaria intestinal, lo cual daría lugar a un nivel de producción de RMCP II indetectable en sangre. Por este motivo y con el fin de detectar la actividad mastocitaria local en el intestino, se evaluó la concentración de RMCP II intestinal (Wilkes *et al.*, 2007). Contrariamente a lo que sucedía sistémicamente, la exposición oral a OVA produjo un aumento en el contenido de RMCP II intestinal en el yeyuno y colon. De este modo, parece que la respuesta frente a OVA se encuentra muy localizada en la mucosa, habiendo mecanismos que favorecerían que esta respuesta no se generalizase (Guilarte *et al.*, 2007).

Previamente se había descrito que la exposición oral a OVA, a pesar de no producir un aumento en la RMCP II sérica, sí incrementa el número de IMMC en duodeno (Saavedra & Vergara, 2005). En este estudio hemos demostrado que la respuesta a OVA afecta a todo el intestino delgado y colon, tal y como se desprende del aumento significativo en el número de IMMC en duodeno, yeyuno, ileon y colon de las ratas expuestas a OVA.

También valoramos la respuesta *in vivo* a la exposición puntual a OVA (*challenge*) y observamos que el contenido de RMCP-II intestinal no se altera tras este *challenge*. Este hecho podría deberse a que se detectó la cantidad total de RMCP-II en tejido intestinal tanto dentro de los gránulos mastocitarios como la que habría sido liberada por degranulación (Miller *et al.*, 1983). En contraposición, observamos que el número detectable de mastocitos disminuye tras el *challenge* con OVA en yeyuno y colon, pero no en duodeno. Parece razonable sugerir que este decremento en la detección de los mastocitos podría

deberse a su activación al entrar en contacto con la OVA, lo cual provocaría su degranulación y, por tanto, una menor detección mediante el marcaje de RMCPII. La ausencia de efecto del *challenge* en duodeno podría deberse a que la OVA llegaría prácticamente sin hidrolizar a esta sección intestinal, mientras que el efecto sobre los mastocitos podría deberse a la interacción con los diferentes péptidos resultantes de la hidrolización de la OVA, tal y como se ha observado durante la respuesta alérgica (Ben, I *et al.*, 2003; Honma *et al.*, 1996). Aún así es necesario remarcar que, aunque el *challenge* con OVA no produzca ningún efecto sobre la población mastocitaria en duodeno, la exposición continuada a OVA sí induce un aumento en el número de mastocitos en esta sección intestinal. Este hecho podría deberse a que el efecto que produce OVA en yeyuno se extiende por todo el sistema intestinal, incluido el duodeno. En el caso del colon, la llegada de fracciones peptídicas hasta el final del tracto digestivo es poco probable así que el efecto sobre el número de mastocitos tanto tras la exposición oral crónica a OVA como tras el *challenge* también podría deberse a la estimulación generada en el yeyuno. Por lo tanto, la exposición oral a OVA está provocando una respuesta generalizada en todo el tracto intestinal a pesar de que la estimulación principal por parte de las fracciones peptídicas de OVA se daría en yeyuno, sección intestinal donde se habría producido una mayor hidrolización de esta proteína (NASSET, 1964). Se sabe que las vías de tránsito de los mastocitos son específicas para cada órgano asegurando que se pueda producir un reclutamiento hacia una localización determinada cuando la respuesta inmune lo requiera (Gurish & Boyce, 2006). En un modelo de infestación intestinal se ha observado que el reclutamiento de los mastocitos ocurre únicamente hacia zonas concretas del intestino (De *et al.*, 2002) ya que la mayor liberación de mediadores induce la acción quimioatrayente de otros mastocitos hacia los puntos de actividad mastocitaria. En nuestro caso, sería necesario investigar los mecanismos por los cuales esta respuesta no se restringe únicamente a las secciones intestinales donde se produce una mayor estimulación sino que se extiende por todo el tracto gastrointestinal.

Además, a diferencia de las otras secciones del intestino, el colon fue la sección donde el efecto de la OVA sobre la actividad mastocitaria fue más claro tanto

tras la exposición prolongada como tras el *challenge*. Este hecho evidencia que el colon es la sección intestinal más afectada en este modelo, lo que se corresponde con la sintomatología de los pacientes de IBS en los que la dismotilidad intestinal y la hipersensibilidad visceral se manifiestan principalmente en colon (Simren *et al.*, 2001;Spiller, 1999). Incluso se ha postulado que esta sección intestinal es la más adecuada para estudiar los mecanismos que provocan la patología en pacientes con IBS (Coremans *et al.*, 2002).

Recientemente se ha descrito que los pacientes con IBS presentan un aumento del número de IMMC y en algunos casos de su actividad (Barbara *et al.*, 2004a;Barbara *et al.*, 2004b;O'Sullivan *et al.*, 2000;Park *et al.*, 2003). Concretamente se ha observado que los pacientes de IBS-D (con predominancia de diarrea) presentan un aumento en el número de mastocitos sin un incremento significativo de la concentración de triptasa en suero o lumen intestinal (Guilarte *et al.*, 2007). Este resultado concuerda con la actividad mastocitaria localizada en el intestino que hemos observado en este estudio y sugiere que los mastocitos liberan sus mediadores localmente sin llegar a desencadenar una respuesta sistémica.

En contraposición a nuestros resultados, otros autores determinaron que el número de mastocitos no aumentaba en un modelo de IBS post-infeccioso en rata aunque sí su estado de activación en colon (La *et al.*, 2004). Esta diferencia podría deberse a que, al tratarse de un desencadenante de la enfermedad diferente, los mecanismos implicados no fueran los mismos que en el caso de la exposición oral a OVA.

Todos estos resultados sugieren que la respuesta de los mastocitos hacia OVA pueda ser consecuencia de la estimulación continuada por parte de esta proteína más que el resultado de un proceso de sensibilización alérgica. Además parece que el efecto del *challenge* con OVA en colon sería independiente de si se ha realizado o no la exposición continuada, lo que sugiere que el mastocito repondería cada vez que entra en contacto con OVA. Por lo tanto, si el mecanismo de interacción entre el mastocito y la OVA no es exclusivamente inmunológico, una explicación sería que se tratase de un efecto

directo entre la célula y la proteína. Por este motivo, en la segunda parte de este estudio quisimos evaluar si el efecto de OVA sobre la actividad mastocitaria podría deberse a una interacción directa entre OVA y el mastocito, así como si el proceso era específico de esta proteína.

Con este fin se realizó un experimento con un cultivo murino de mastocitos (Yamaguchi *et al.*, 1997) no sensibilizados al que se le aplicó OVA y OVH en diferentes concentraciones y se estudió su respuesta en forma de liberación de histamina. Previamente se había observado que el *challenge* con un antígeno *in vitro* induce la liberación de histamina por parte de los mastocitos cuando se ha establecido una sensibilización previa contra el alergeno (Sellge *et al.*, 2005). En cambio, en nuestro estudio se determinó que los estímulos de OVA y OVH *in vitro* provocan directamente la liberación de histamina a pesar de que los mastocitos no habían sido sensibilizados previamente contra OVA. Por lo tanto, este efecto directo *in vitro* nos orientaría sobre la posible interacción directa *in vivo* entre el mastocito y la OVA, o más probablemente con los fragmentos de su digestión (Ben, I *et al.*, 2003). El hecho de que la estimulación se lleve a cabo tanto por la proteína como por su hidrolizado podría ser debido a que, durante las 2 horas de incubación con los mastocitos, la OVA fuera parcialmente hidrolizada y produjera un efecto similar al de su hidrolizado (OVH). Si esto fuese así, este resultado se correspondería con lo ya observado en respuesta al *challenge* en yeyuno y colon pero no en duodeno, es decir, que los mastocitos degranulan principalmente frente a péptidos resultantes de la hidrolización de la OVA, tal y como se ha observado durante la respuesta alérgica (Ben, I *et al.*, 2003; Honma *et al.*, 1996).

A continuación, para evaluar si, a pesar de no estar mediado por inmunoglobulinas, el efecto de OVA sobre el mastocito era específico de esta proteína, se realizó un protocolo de exposición equivalente al de OVA pero con una proteína como la gelatina, la cual no está presente en la dieta de los animales y ha sido descrita como no alérgica. De este modo, determinamos que esta exposición a gelatina, a diferencia de la realizada con OVA, no provoca activación mastocitaria, es decir, no aumenta ni el número de IMMC y ni el contenido de RMCP-II.

El grado de antigenicidad de las diferentes proteínas presentes en la dieta se debe en parte a características proteicas tales como el tamaño, la estabilidad

proteolítica, la función biológica, el estado de glucosilación, la inmunogenicidad y las vías de procesamiento para la subsiguiente presentación al sistema inmune (Huby *et al.*, 2000; Kimber & Dearman, 2001). A pesar de que la respuesta de las ratas SD hacia OVA no es antigénica, podría ser que estas mismas características, que favorecen el desarrollo de antigenicidad hacia una proteína como OVA y no hacia otra como la gelatina, fueran las responsables de la activación mastocitaria en nuestro modelo.

En resumen, la exposición oral a OVA induce la activación de los mastocitos de mucosa intestinal de forma localizada en el intestino y esta población celular responde al *challenge*, posiblemente activándose al entrar en contacto con la OVA y provocando su degranulación. Este efecto podría no ser de tipo alérgico sino tratarse de un efecto directo y específico de OVA sobre los mastocitos intestinales.

ESTUDIO 3

Implicación de los mastocitos en
la hipermotilidad generada por
la exposición oral a ovo-albúmina (OVA)

1. Antecedentes

Los mastocitos están presentes en todas las capas del tracto gastrointestinal (Bischoff *et al.*, 1996; Lin T.J., 1999) y en algunas de ellas se localizan próximos a los nervios entéricos. De este modo, la liberación de mediadores inflamatorios por parte del mastocito puede afectar a la función nerviosa del sistema entérico y a la contractilidad del músculo liso intestinal (Bauer & Razin, 2000). Esta interacción entre el sistema nervioso y los mastocitos se puede producir a través de varias vías que incluyen eferentes parasimpáticas y simpáticas, aferentes extrínsecas (vagales y espinales) y conexiones de segundo orden a través de neuronas entéricas (Berthoud *et al.*, 2004). Además se cree que esta proximidad entre los nervios y los mastocitos se inicia por la liberación de mediadores por parte tanto de los mastocitos como de las terminales nerviosas. Concretamente se ha descrito que el factor de crecimiento nervioso (NGF), además de influir en el desarrollo y supervivencia de mastocitos y neuronas (Kassel *et al.*, 2001), es el principal responsable de esta intercomunicación (Blennerhassett & Bienenstock, 1998).

En pacientes con el Síndrome del Intestino Irritable (IBS) se ha observado un aumento del número de mastocitos de mucosa intestinal (IMMC) y de su actividad (Barbara *et al.*, 2004b; Barbara *et al.*, 2004a; O'Sullivan *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2003), junto con una localización próxima a la inervación de la mucosa. En modelos animales se ha demostrado que esta activación mastocitaria y consiguiente liberación de mediadores incrementa la excitabilidad de las neuronas entéricas y de las aferentes primarias (Reed *et al.*, 2003). Todos estos hechos sugieren que los mastocitos están implicados de forma directa en las alteraciones funcionales, sensitivas y motoras del IBS y, por lo tanto, esta población celular tiene un gran potencial como diana terapéutica para este síndrome (Santos *et al.*, 2006). Un posible abordaje para el estudio es la inhibición de la degranulación de los mastocitos mediante el uso de estabilizadores mastocitarios como el ketotifeno, el cromoglicato disódico (DSCG) o el doxantrazol (Crampton, 2003). Trabajos anteriores han demostrado que el ketotifeno estabiliza los IMMC y evita que se produzca su activación en el intestino de la rata (Juanola *et al.*, 1998). Además, recientemente se ha descrito que el ketotifeno puede disminuir la hipermotilidad

intestinal junto con la hiperplasia mastocitaria y la activación de esta población celular en el modelo de *T.Spiralis* en rata (Serna *et al.*, 2006). Se considera, por lo tanto, al ketotifeno como un agente adecuado para evaluar la relevancia de la actividad de los mastocitos en fenómenos biológicos, tales como la hipermotilidad generada por la exposición oral a ovo-albúmina (OVA).

2. Objetivos

El objetivo general de este estudio fue determinar la implicación de los mastocitos en la alteración de la respuesta motora inducida por la exposición oral a OVA y estudiar los mecanismos involucrados en el proceso.

Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- Evaluar el efecto del tratamiento con ketotifeno sobre la actividad mastocitaria, valorada por el contenido de RMCPII Intestinal y el número de mastocitos de mucosa intestinal.
- Caracterizar el efecto del ketotifeno sobre la alteración en la motilidad intestinal inducida por OVA:
 - Determinar si el proceso afecta a diferentes parámetros de la respuesta motora intestinal como la contractilidad intestinal espontánea, en respuesta a carbacol, a capsaicina y a ketotifeno *in vitro*.
 - Estudiar si existe una correlación entre la contractilidad intestinal y la actividad mastocitaria.
- Evaluar el efecto de la exposición oral a OVA y el tratamiento con ketotifeno sobre la expresión de NGF en tejido intestinal.

3. Material y Métodos

3.1. Diseño experimental

3.1.1. Animales

Se utilizaron 48 ratas macho *Sprague Dawley* (SD) provenientes de Charles River (Les Oncins, France) que se distribuyeron en 4 grupos de 12 animales (n=12). Los animales tenían libre acceso al agua y a una dieta estándar en forma de pellet que no contenía ningún rastro de OVA ni otro derivado del huevo así como tampoco de gelatina. Las ratas estaban libres de patógenos específicos (*Specific Pathogen Free*, SPF) y se estabularon en ambiente controlado (Temperatura: 20-21°C, Humedad: 60%, Foto-periodo:12h luz/12h oscuridad). Se estableció un período de aclimatación de los animales de una semana desde el momento de su recepción. La noche anterior al experimento se retiró el alimento. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por la Comisión Ética en la Experimentación Animal y Humana (CEEAH) de la Universitat Autònoma de Barcelona.

3.1.2. Exposición oral a OVA

Siguiendo el protocolo previamente descrito por Saavedra y Vergara (Saavedra & Vergara, 2005), ratas de 6 semanas de edad (n=12) fueron expuestas a OVA (Grade V. Sigma, St Louis, MO, USA) mediante sondaje oral (1 mg de OVA en 1 ml de solución salina 0.9% NaCl, 1 ml/animal) realizado durante 6 semanas. Un grupo de ratas (n=12) no expuestas a OVA se usaron como grupo control en el cual el protocolo de inducción se realizó como se describe anteriormente pero substituyendo la solución de OVA por solución salina.

3.1.3. Tratamiento con ketotifeno

Paralelamente otro grupo expuesto a OVA (n=12) y otro grupo no expuesto (n=12) fueron tratados con ketotifeno, un estabilizador mastocitario (Sigma Chemicals, St. Louis, MO). El tratamiento con ketotifeno fue realizado desde el día anterior al inicio de la exposición oral hasta el sacrificio de los animales. El ketotifeno fue disuelto en agua de bebida a 0.1 mg/ml, lo que permitió realizar el dosaje a 10 mg/kg/día, tal y como se había descrito previamente (Serna *et al.*,

inhibidores de proteasas (Roche Molecular Biochemicals) con la siguiente composición: manitol (40-50 %), sal disódica del ácido etileno-diamino-tetraacético o EDTA (<25 %), amidino-fenil-metil-sulfonil fluorado o APMSF (10 - 20 %), polivinilpirrolidona o PVP (1-5 %) y polietilenglicol o PEG (1-5 %). Después de una incubación de 20 minutos en hielo, las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm a 4°C durante 10 minutos y los sobrenadantes se mantuvieron congelados a -30°C.

3.2. Valoración de la actividad mastocitaria

3.2.1. Inmunohistoquímica anti-RMCP II y conteo de mastocitos de mucosa intestinal (IMMC)

La inmunodetección de RMCP II fue llevada a cabo en secciones de yeyuno y colon fijadas en formaldehído e incluidas en parafina. El anticuerpo primario monoclonal contra RMCP II producido en ratón (Moredun, Scotland, UK) se utilizó a una dilución 1:500. El anticuerpo secundario producido en caballo, el cual reconocía IgG de ratón, se utilizó a una dilución 1:200. Se analizaron las muestras teñidas a $\times 400$ aumentos. Las células marcadas positivamente fueron contadas en 3-5 secciones por animal. Se examinaron de 7 a 10 vellosidades por sección usando un microscopio Olympus CH2. El análisis de todos los datos morfológicos se realizó a doble ciego para evitar el efecto del observador.

3.2.2. Determinación de la concentración de RMCP II

La concentración de RMCP II en el extracto de proteína intestinal de yeyuno y colon fue determinada mediante un kit comercial de ELISA que empleaba el mismo anticuerpo monoclonal contra RMCP II que se utilizó para la inmunohistoquímica (Moredun, Scotland, UK). La concentración de RMCP II en el extracto de proteína intestinal se normalizó con la concentración de proteína total de cada muestra y la determinación de esta concentración se realizó mediante el kit comercial *Protein Assay Kit* (Sigma P5656).

3.3. Valoración de la contractilidad intestinal

Las preparaciones de tejido intestinal fueron obtenidas de colon medio y se mantuvieron todas las capas de tejido intactas. Los fragmentos que se extrajeron fueron de 1 cm de largo por 0.3 cm de ancho y se colgaron

orientadas para registrar la actividad motora de la musculatura circular. También se estudio la actividad de la musculatura longitudinal de secciones de yeyuno en las que también se mantuvieron todas las capas de tejido intactas. Las preparaciones se montaron bajo una tensión de 1g en copas en las que había 10 ml de solución de Krebs oxigenada (95% O₂-5% CO₂) a 37 ± 1 °C. La composición de la solución de Krebs fue: 10.10 mM glucosa, 115.48 mM NaCl, 21.90 mM NaHCO₃, 4.61 mM KCl, 1,14 mM NaH₂PO₄, 2.50 mM CaCl₂ y 1.16 mM MgSO₄ (pH 7.3–7.4). Los cambios de tensión en las tiras se midieron usando transductores de fuerza isométricos, se registraron en un *chart recorder* (Grass Instruments Co., Quincy, MA) y se digitalizaron (AcqKnowledge MP100; BIOPAC Systems, Inc., Goleta, CA). Después de una hora de equilibrado, se valoró la contractilidad espontánea y se analizó la inervación colinérgica tras la adición de carbacol (10 µM, Sigma Chemical, St. Louis, MO) y el efecto de la adición de ketotifeno (1 µM, Sigma). También se estudió la respuesta de las aferentes nerviosas tras la adición de capsaicina (0.1 µM, Sigma). Las soluciones se prepararon disolviendo el carbacol y el ketotifeno en agua destilada y la capsaicina en dimetil sulfóxido o DMSO.

3.4. Valoración de la expresión del *mRNA* de NGF

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con retro-transcriptasa o RT-PCR se utilizó para analizar la expresión del *mRNA* de NGF en el tejido intestinal de yeyuno y colon.

Se extrajo el *RNA* total de las muestras de yeyuno y colon congeladas a -80°C con el compuesto *TriReagent* (Biotechx, Houston, TX) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. El *RNA* total se trató con *DNA-free* (Ambion, Madison, WI) durante 30 minutos a 37°C para eliminar cualquier contaminación de *DNA* genómico. El *cDNA* se sintetizó a partir de 5 µg del *RNA* total en una mezcla de reacción de 50 µl los cuales contenían 0.5 µg de oligo-dT primer (Promega, Austin, TX), dNTP a 0.4mM (Ecogen, Barcelona, Spain), ditiotreititol a 10 mM y 10 U de retrotranscriptasa del *Moloney murine leukemia virus* (ambos de Epicenter, Madison, WI). El *cDNA* resultante fue amplificado en un volumen total de 50 µl que contenía 1 U de transcriptasa *TaqDNA*, dNTP a 0.2 mM y *primers* de NGF a 0.4 µM generando un fragmento de 288 pb (Little *et al.*, 1994). Como control de la eficiencia de la síntesis del *cDNA* también se

amplificó el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o GAPDH generando un fragmento de 140 pb (Torrents *et al.*, 2002).

El protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR fue el siguiente:

- Desnaturalización inicial a 95°C durante 7 minutos.
- 35 ciclos de tres fases cada uno:
 - Desnaturalización a 95°C durante 1 minuto.
 - Amplificación a 55°C (NGF) o a 50°C (GAPDH) durante 1 minuto.
 - Extensión a 72°C durante 1 minuto.
- Extensión final durante 5 min a 72°C.

Los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio y fotografiado bajo luz UV. A fin de tener una medida semicuantitativa del nivel de *mRNA* de NGF, se calculó una ratio entre la intensidad de la banda correspondiente a NGF y a GAPDH para cada muestra.

3.5. Análisis estadístico

Todos los resultados se expresaron como MEDIA \pm SEM. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante ANOVA seguido por el test *post hoc* de Bonferroni para la comparación de todos los grupos entre ellos. Un test *t* de *Student* se utilizó para analizar el efecto del ketotifeno sobre el número de IMMC y la expresión de NGF en yeyuno así como sobre la contractilidad intestinal espontánea y en respuesta a carbacol en colon. Además se efectuó un análisis de regresión lineal para establecer la correlación entre el contenido de RMCPII intestinal con dos parámetros de la respuesta motora. Las diferencias entre los grupos se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

4. Resultados

4.1. Efecto del tratamiento con ketotifeno sobre la actividad mastocitaria inducida por la exposición oral a OVA

4.1.1. Concentración de RMCP-II intestinal:

El tratamiento con ketotifeno no produjo ningún cambio *per se* en la concentración de RMCP-II en tejido intestinal. En cambio, el tratamiento con ketotifeno provocó que la concentración de RMCP-II del grupo expuesto a OVA fuera similar a la basal tanto en yeyuno como en colon (Figura 2). Por lo tanto, el tratamiento con ketotifeno evitó el aumento en la concentración de RMCP-II inducido por la exposición a OVA en yeyuno y colon.

4.1.2. Número de mastocitos de mucosa intestinal (IMMC):

La exposición a OVA aumentó, además de la concentración de RMCP-II intestinal, también el número de IMMC en yeyuno y colon (Figura 3), tal y como ya se había descrito en el Estudio 2.

El tratamiento con ketotifeno *per se* no provocó ningún efecto en el número de IMMC. En cambio, el tratamiento con ketotifeno en el grupo expuesto a OVA redujo el aumento en el número de IMMC generado por la exposición a OVA. Este efecto fue más destacado en el colon donde el número de mastocitos del grupo expuesto a OVA y tratado con ketotifeno era muy similar al número de los grupos no expuestos (Figura 3.B).

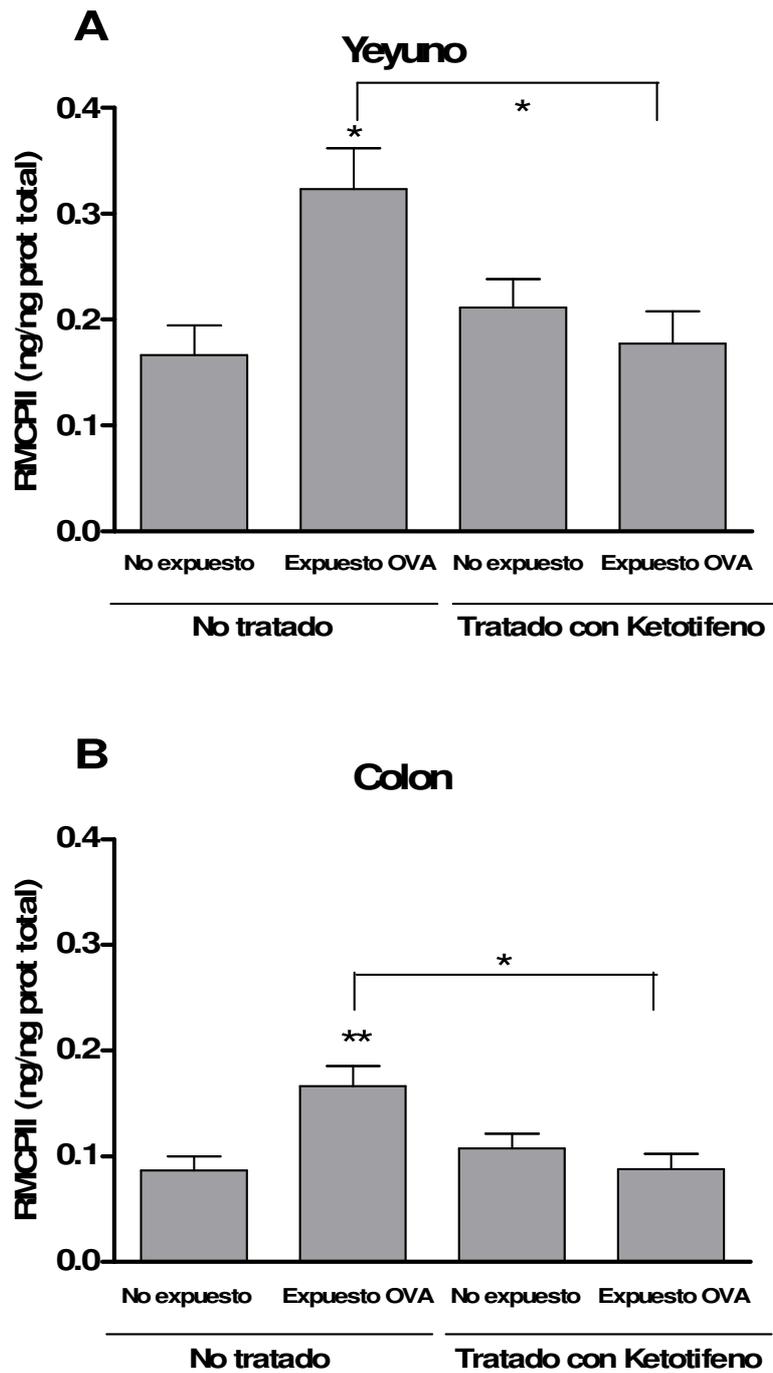


Figura 2: Concentración de RMCP II expresada en ng de RMCP II por ng de proteína total. **A.** En yeyuno. **B.** En colon. *, ** $P < 0.05$, $P < 0.01$ en comparación con el grupo no expuesto correspondiente o según se indique. Cada barra representa la media \pm SEM de 6 ratas.

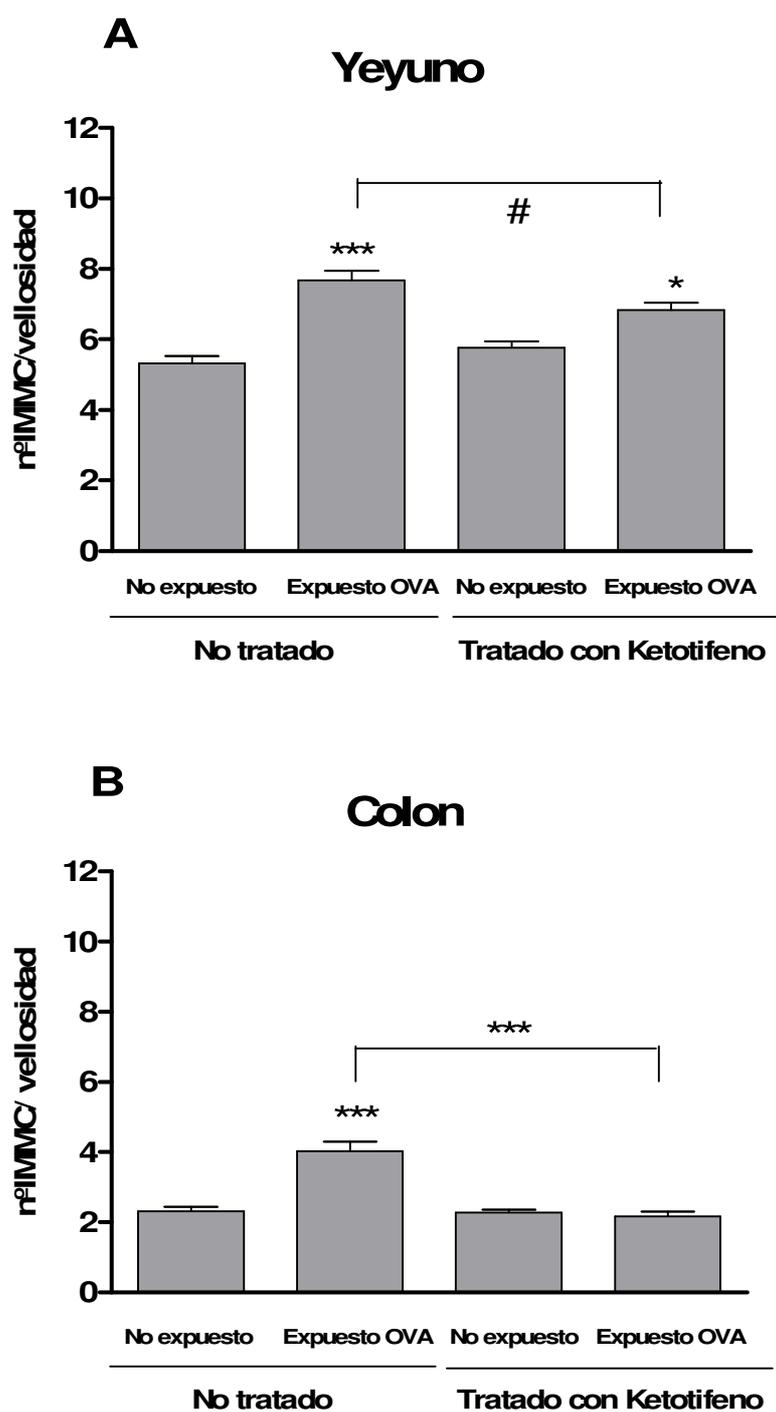


Figura 3: Número de mastocitos de mucosa intestinal (IMMC) expresado por villosidad. **A.** En yeyuno. **B.** En colon. *, ***, $P < 0.05$, $P < 0.001$ en comparación con el grupo no expuesto correspondiente o según se indique; # $P < 0.05$ entre los grupos indicados (t-test para datos no apareados). Cada barra representa la media \pm SEM de 6 ratas.

4.2. Efecto de la exposición oral a OVA y el tratamiento con ketotifeno sobre la motilidad intestinal

4.2.1. Contractilidad intestinal espontánea

La exposición oral a OVA causó un aumento en la contractilidad espontánea tanto en colon como en yeyuno. El tratamiento con ketotifeno disminuyó este parámetro en el colon tanto del grupo expuesto como del no expuesto a OVA (Figura 4.B). Sin embargo, el efecto del tratamiento con ketotifeno en el yeyuno del grupo expuesto a OVA no fue tan evidente como en el colon (Figura 4.A).

4.2.2. Correlación entre la contractilidad intestinal espontánea y la concentración de RMCP-II intestinal

A fin de investigar la correlación entre la contractilidad espontánea y la concentración de RMCP-II intestinal se llevó a cabo un análisis de regresión lineal utilizando los datos de estos dos parámetros para cada animal de todos los grupos (n=24). De este modo, en el colon se encontró que el contenido de RMCP-II intestinal se correlacionaba con la contractilidad espontánea (Figura 5.B; $P < 0.0001$, $r^2 = 0.6071$) mientras que en el yeyuno se mostraba una tendencia hacia esta dirección a pesar de que la correlación entre estos dos parámetros no llegó a alcanzar significación estadística (Figura 5.A; $P < 0.0558$, $r^2 = 0.1633$).

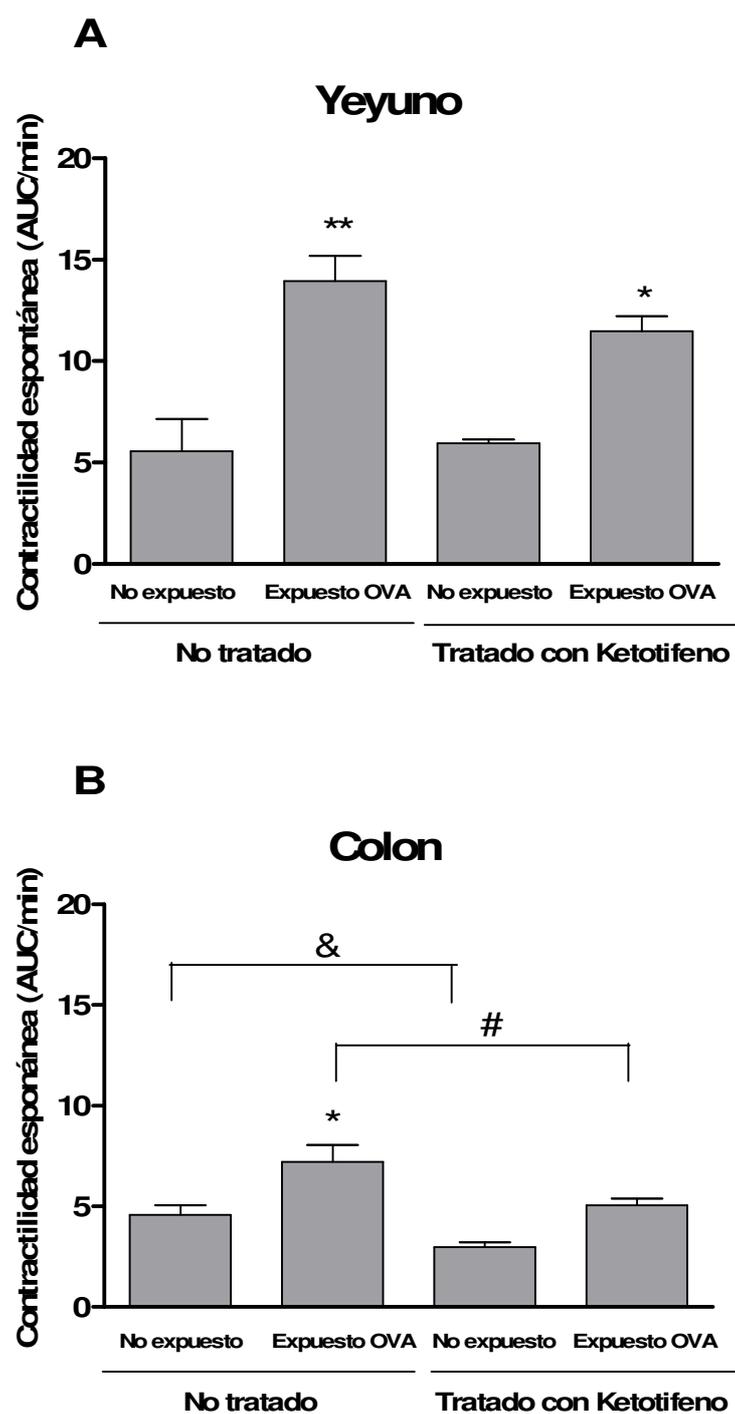


Figura 4: Contractilidad intestinal espontánea expresada como área bajo la curva (*Area Under Curve* (AUC)) por minuto **A.** En yeyuno **B.** En colon. *, **, $P < 0.05$, $P < 0.01$ respecto al grupo no expuesto correspondiente; #, & $P < 0.05$ entre los grupos indicados (t-test para datos no apareados). Cada barra representa la media \pm SEM de 6 ratas.

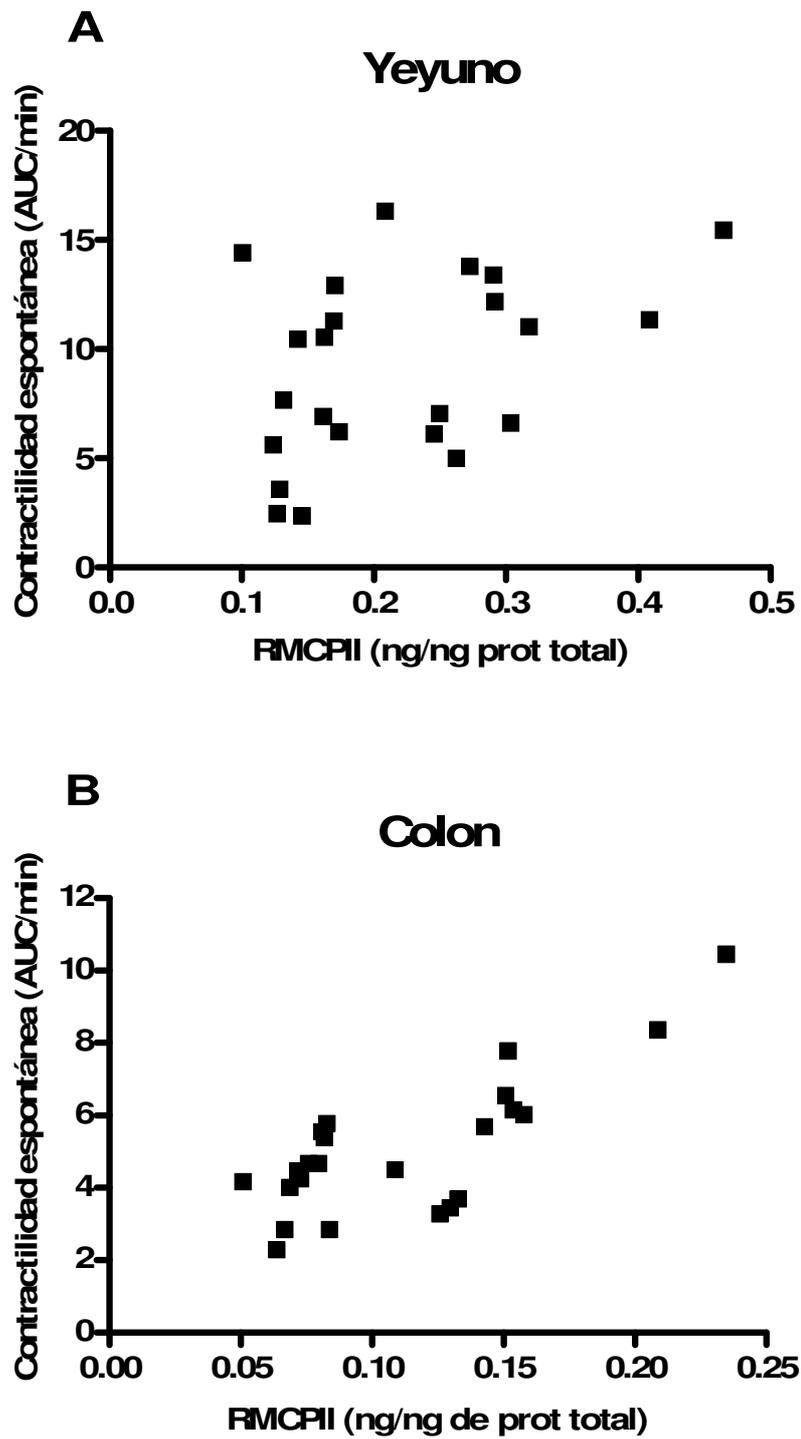


Figura 5: Correlación entre la contractilidad intestinal espontánea y la concentración de RMCP II intestinal mediante un análisis de regresión lineal. **A.** En yeyuno ($P < 0.0558$, $r^2 = 0.1633$). **B.** En colon ($P < 0.0001$, $r^2 = 0.6071$).

4.2.3. Contractilidad intestinal en respuesta a carbacol (CCH)

Tal y como se ha descrito para la contractilidad intestinal espontánea, la exposición a OVA generó un incremento en la contractilidad en respuesta a carbacol (CCH) tanto en yeyuno como en colon. El tratamiento con ketotifeno disminuyó este efecto en el grupo expuesto a OVA en colon (Figura 6.B) pero no en yeyuno (Figura 6.A).

4.2.4. Correlación entre la contractilidad intestinal en respuesta a carbacol y la concentración de RMCP-II intestinal

En este caso también se llevó a cabo un análisis de regresión lineal para determinar si había correlación entre la respuesta a carbacol y la concentración de RMCP-II intestinal. En el colon se observó que estos dos parámetros se correlacionaban de forma lineal (Figura 7.B; $P < 0.0001$, $r^2 = 0.6732$) mientras que en el yeyuno esto no sucedía (Figura 7.A; $P < 0.1451$, $r^2 = 0.0983$).

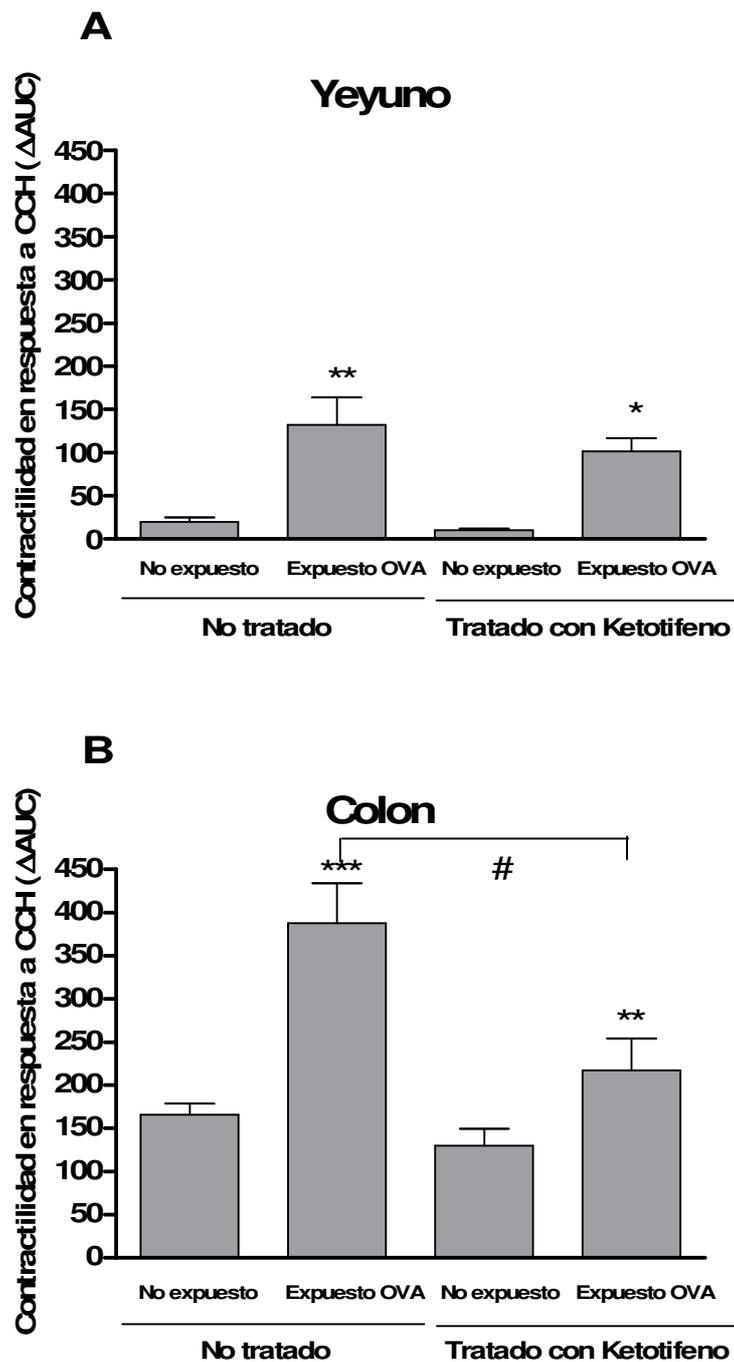


Figura 6: Contractilidad intestinal en respuesta a carbacol (CCH) expresada como incremento en la AUC (Δ AUC). **A.** En yeyuno **B.** En colon. *, **, ***, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$ respecto al grupo no expuesto correspondiente ; # $P < 0.05$ entre los grupos indicados (t-test para datos no apareados). Cada barra representa la media \pm SEM de 6 ratas.

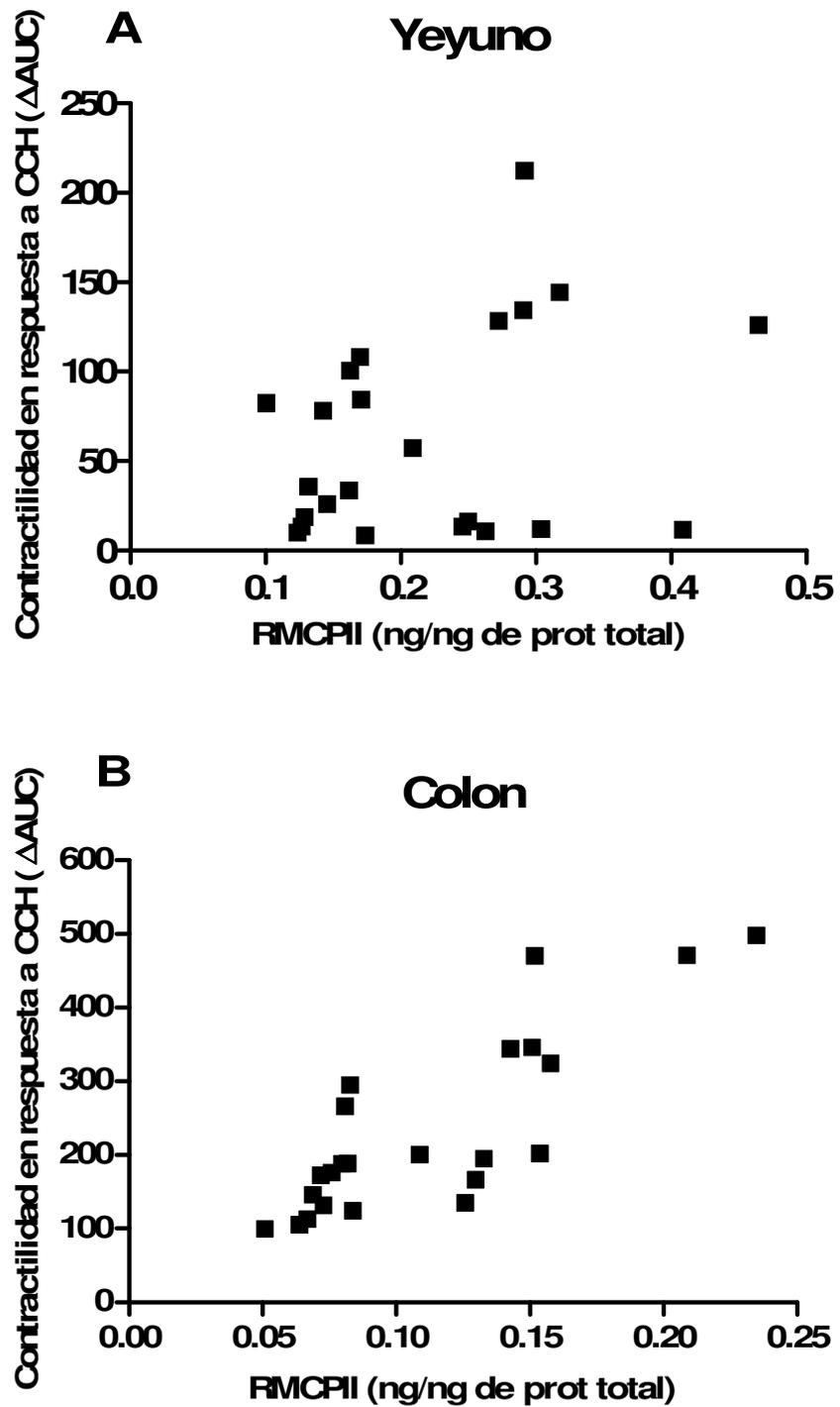


Figura 7: Correlación lineal entre la contractilidad intestinal en respuesta a carbacol y la concentración de RMCP II intestinal mediante un análisis de regresión lineal. . **A.** En yeyuno ($P < 0.1451$, $r^2 = 0.0983$). **B.** En colon ($P < 0.0001$, $r^2 = 0.6732$).

4.2.5. Contractilidad intestinal en respuesta a capsaicina

La exposición oral a OVA aumentó la contractilidad en respuesta a capsaicina, siendo más evidente en el colon (Figura 8.B). Aunque en yeyuno se mostraba una tendencia hacia este sentido, no se llegó a alcanzar una significación estadística. El tratamiento con ketotifeno revirtió esta respuesta a capsaicina pasando de ser excitatoria a inhibitoria independientemente de si se había efectuado la exposición oral a OVA o no, tanto en yeyuno como en colon (Figura 8).

4.2.6. Efecto de la adición *ex vivo* de ketotifeno sobre la contractilidad intestinal

La adición *ex vivo* de ketotifeno causó una disminución en la contractilidad del yeyuno y colon de todos los grupos. En el yeyuno la reducción que se produjo sobre la contractilidad fue similar en todos los grupos, mientras que en colon la reducción fue mucho mayor en los grupos tratados con ketotifeno que en los no tratados (Figura 9).

4.3. Efecto la exposición oral a OVA y el tratamiento con ketotifeno sobre la expresión de NGF

La exposición oral a OVA causó sobre-expresión de NGF en el tejido intestinal tanto en yeyuno como en colon (Figura 10, Figura 11). La expresión de NGF aumentó en el grupo expuesto a OVA, siendo significativo en colon donde disminuyó por debajo del basal en los grupos tratados con ketotifeno. Por lo tanto, el tratamiento con ketotifeno no sólo evitó el aumento en la expresión de NGF generado por OVA sino que además disminuyó esta expresión por debajo del basal tanto en yeyuno como en colon.

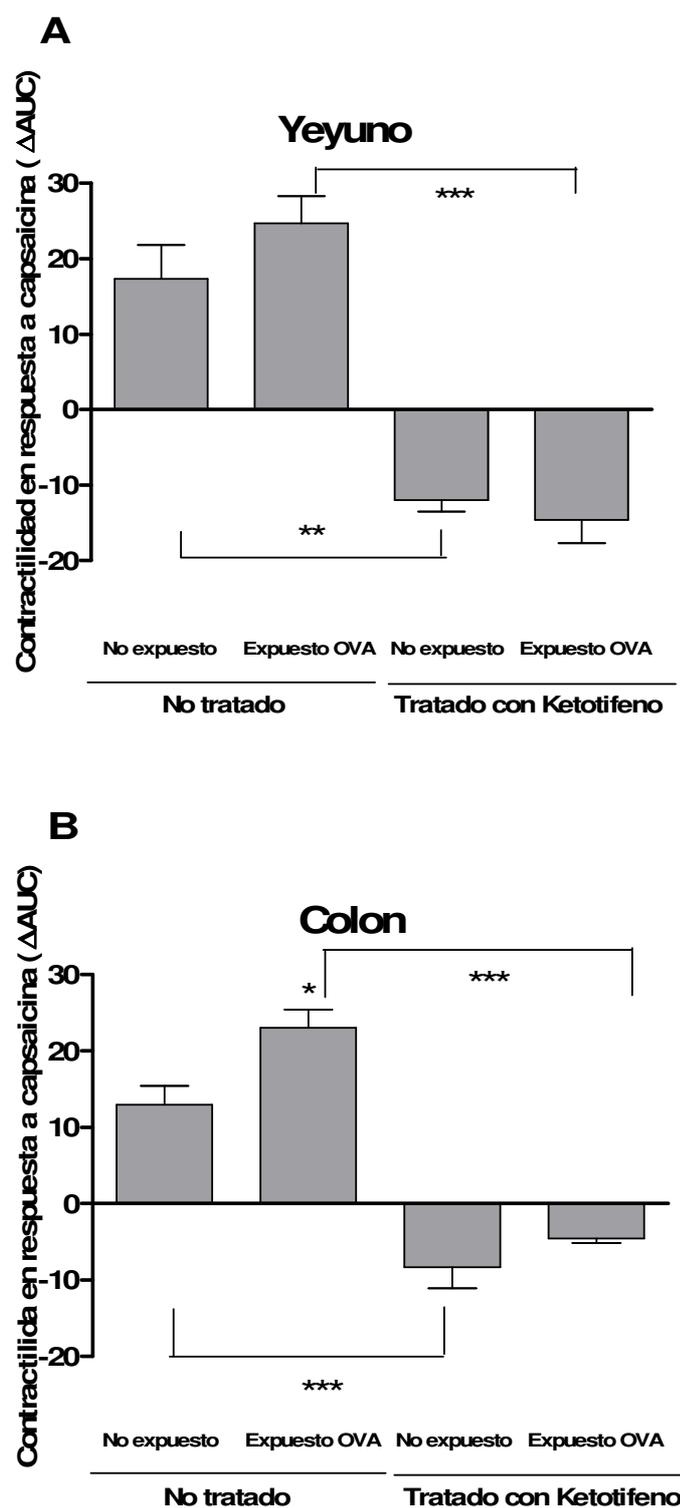


Figura 8: Contractilidad intestinal en respuesta a capsaicina expresada como incremento en la AUC (Δ AUC). **A.** En yeyuno **B.** En colon. *, **, ***, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$ respecto al grupo no expuesto correspondiente o entre los grupos indicados. Cada barra representa la media \pm SEM de 6 ratas.

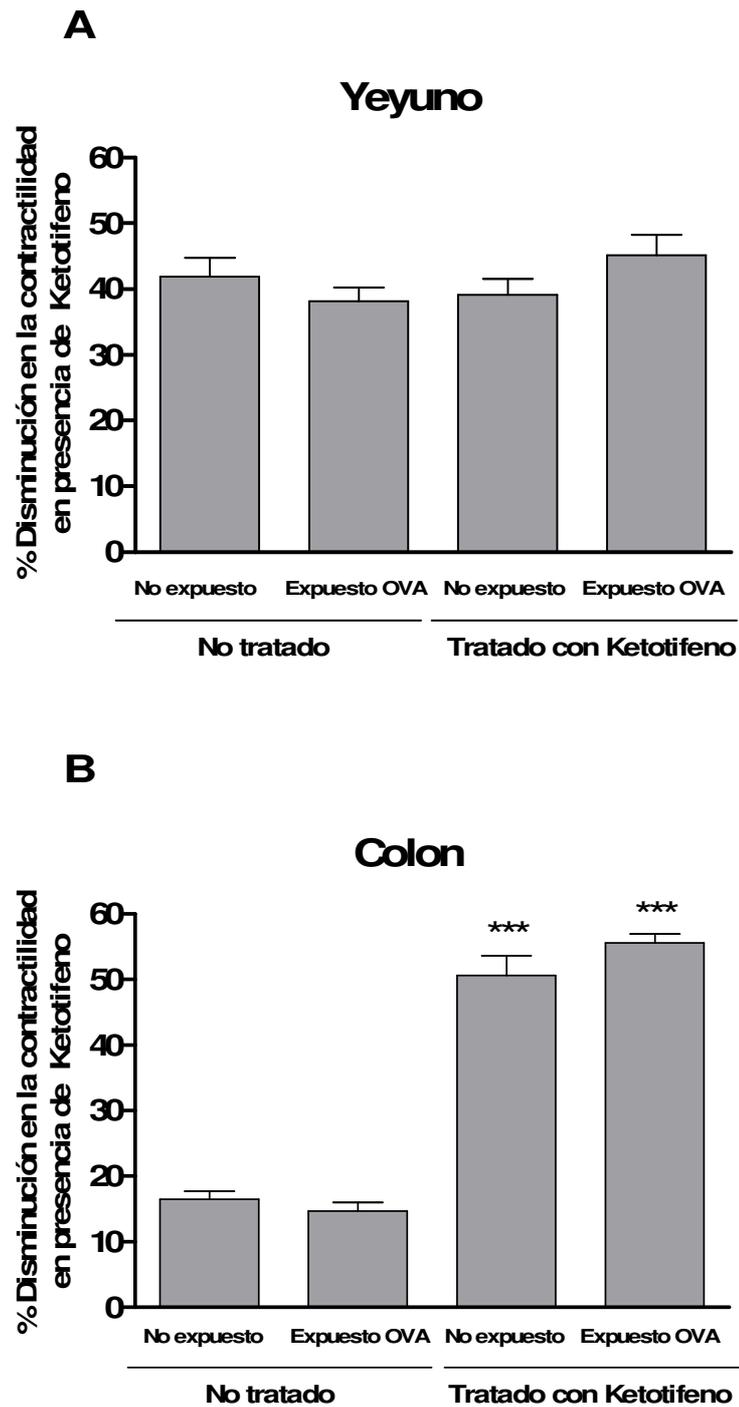


Figura 9: Disminución en la contractilidad intestinal en presencia de ketotifeno expresada como porcentaje (%). **A.** En yeyuno. **B.** En colon. ^{***}, $P < 0.001$ respecto al grupo no tratado correspondiente. Cada barra representa la media \pm SEM de 6 ratas.

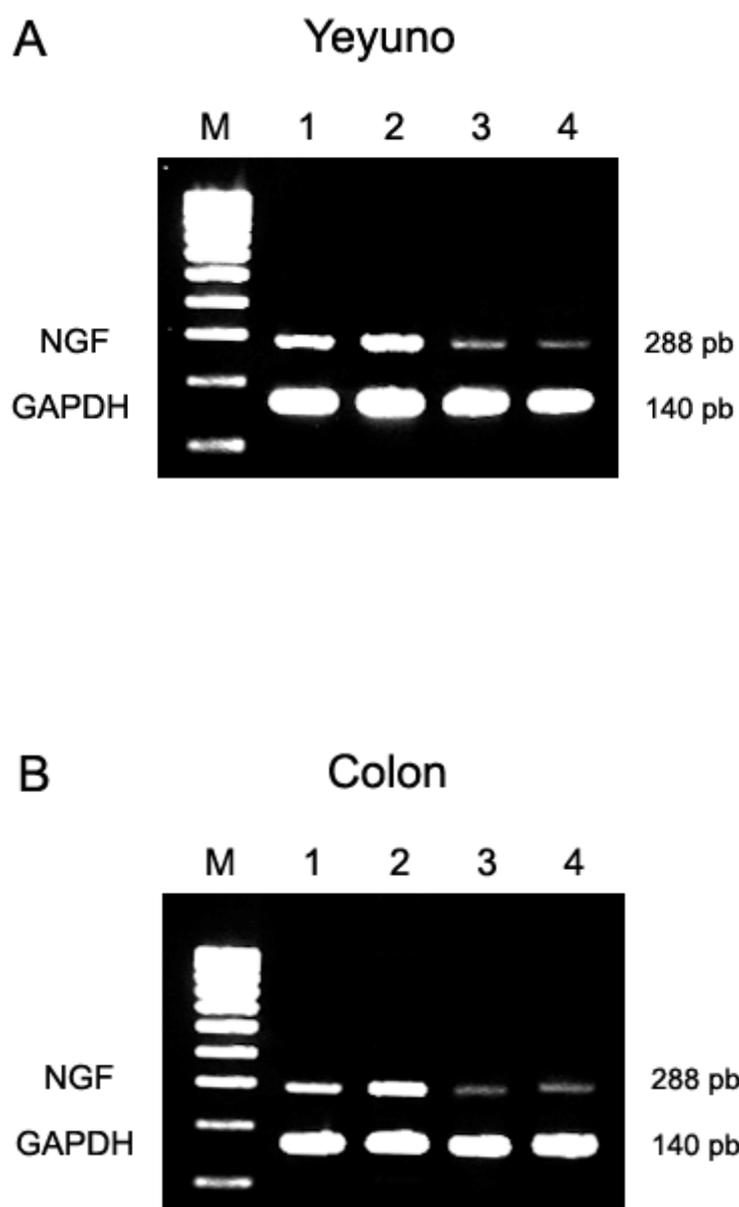


Figura 10: Fotografías representativas que muestran la expresión del mRNA de NGF **A.** En yeyuno **B.** En colon. **M.** Marcador molecular. **1.** Grupo no expuesto / no tratado. **2.** Grupo expuesto a OVA / no tratado. **3.** Grupo no expuesto / tratado con ketotifeno. **4.** Grupo expuesto a OVA / tratado con ketotifeno.

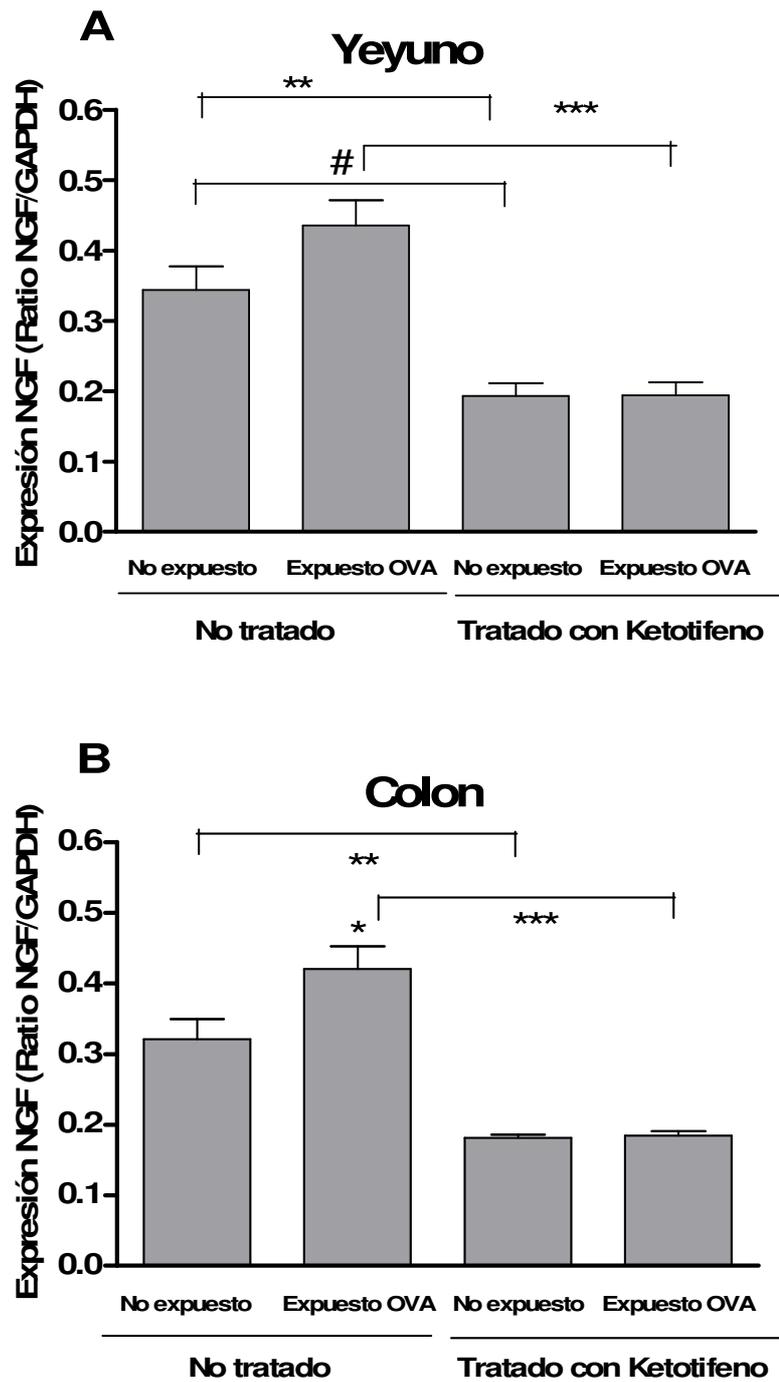


Figura 11: Expresión de NGF como ratio entre la intensidad de banda de NGF y de GAPDH **A.** En yeyuno **B.** En colon. *, **, ***, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$ respecto al grupo no expuesto o entre los grupos indicados; # $P < 0.05$ entre los grupos indicados (t-test para datos no apareados). Cada barra representa la media \pm SEM de 6 ratas.

5. Discusión

Nuestros resultados sugieren que los mastocitos están involucrados en la alteración de la respuesta motora intestinal inducida por OVA y que el NGF podría estar implicado en el proceso.

A pesar de que el ketotifeno está ampliamente aceptado como estabilizador mastocitario (Abe *et al.*, 2000), el mecanismo de acción de este fármaco no está bien establecido aún y podría estar actuando en otros tipos celulares, bloqueando las corrientes M en neuronas (Sato *et al.*, 2005) o induciendo necrosis en eosinófilos (Hasala *et al.*, 2005). Aún así se ha descrito que su acción principal se efectúa sobre los mastocitos de mucosa (Abe *et al.*, 2000; Schoch, 2003) y, por este motivo, nuestra hipótesis se basa en que la principal acción del ketotifeno haya sido la de estabilizar esta población celular.

En este estudio, hemos observado que el ketotifeno evita el aumento generado por la exposición a OVA en dos parámetros que reflejen la actividad mastocitaria como son el número de IMMC y el contenido de RMCP-II intestinal. Si se estabiliza a esta población celular con ketotifeno, la disminución en su degranulación provocaría una menor liberación de mediadores inductores de la acción quimioatrayente de otros mastocitos hacia el punto de actividad mastocitaria. Por lo tanto, nuestros resultados muestran que el número de células de esta población celular y su actividad viene dirigido positivamente por los propios mastocitos. Anteriormente ya se había descrito en un modelo de dermatitis en ratón que la liberación de un mediador mastocitario como la quimasa participaba en la regulación del número de mastocitos (Tomimori *et al.*, 2002). Además también se había observado una retroalimentación positiva en el número de mastocitos y liberación de RMCP-II en el modelo post-infeccioso de IBS (Serna *et al.*, 2006). Así pues, en el presente estudio se confirma que esta retroalimentación positiva se produce en nuestro modelo, incluso cuando la respuesta mastocitaria es de carácter más leve y no está influenciada por un proceso inflamatorio.

A diferencia de lo que sucede en colon, en yeyuno observamos que el efecto del tratamiento con ketotifeno sobre el aumento inducido por OVA en el contenido de RMCP-II no es tan evidente como el efecto sobre el número de

mastocitos. A pesar de esto, se observó que el valor del contenido de RMCP-II en yeyuno del grupo expuesto a OVA tratado con ketotifeno fue significativamente inferior al grupo expuesto y no tratado. Esta diferencia entre el efecto del ketotifeno sobre el contenido de RMCP-II y el número de mastocitos se podría deber a que este tratamiento, al inhibir la degranulación de los mastocitos, hizo más detectable a esta población celular mediante el marcaje anti-RMCP-II y, por tanto, facilitó su conteo (Rouleau *et al.*, 1997).

En cuanto a los resultados de la respuesta motora, estos sugieren que la actividad mastocitaria está implicada en la alteración en la motilidad intestinal inducida por OVA ya que un estabilizador mastocitario como el ketotifeno revierte este proceso. Anteriormente ya se había descrito que la actividad mastocitaria puede alterar la motilidad intestinal en un modelo de IBS post-infeccioso con *Trichinella Spiralis* (Serna *et al.*, 2006) y también, en ausencia de inflamación intestinal aparente, en el modelo de exposición oral a OVA que es el mismo que se utiliza en este estudio (Saavedra & Vergara, 2005).

En primer lugar, observamos que la exposición a OVA causa un aumento en la contractilidad intestinal espontánea y en respuesta a carbacol, que puede revertirse gracias al tratamiento con ketotifeno, aunque más claramente en colon que en yeyuno. En este estudio además describimos que existe una correlación lineal entre el contenido de RMCP-II y estos dos parámetros de la respuesta motora, contractilidad espontánea intestinal y en respuesta a carbacol en colon, evidenciando aún más que los mastocitos están involucrados en la modificación de la contractilidad espontánea inducida por OVA.

En cuanto a la contractilidad espontánea, el efecto inducido por OVA *in vitro* fue similar al que ya se había descrito previamente *in vivo* (Saavedra & Vergara, 2005). Así mismo también se había observado previamente que el tratamiento con ketotifeno podía revertir la motilidad espontánea exacerbada presente en el modelo de IBS post-infeccioso con *Trichinella Spiralis* (Serna *et al.*, 2006). Cabe destacar que el tratamiento con ketotifeno en el grupo no expuesto, aunque no afectó ni al número de IMMC ni al contenido de RMCP-II intestinal en colon, sí que pareció disminuir ligeramente la contractilidad espontánea en esta sección

intestinal. Esto sugiere que los mastocitos estarían implicados en el control de esta motilidad incluso en condiciones fisiológicas (Barczyk *et al.*, 1995).

El efecto reductor del tratamiento con ketotifeno sobre la respuesta a carbacol ya se había descrito con anterioridad demostrando que los mastocitos están involucrados en el proceso (Gay *et al.*, 2000). Este resultado del ketotifeno sobre la contractilidad en respuesta a carbacol corrobora el obtenido con la contractilidad espontánea, es decir, que los mastocitos están implicados en la alteración de la respuesta motora. La implicación de los mastocitos podría deberse a un remodelado nervioso asociado al aumento en el número de esta población celular (Stead *et al.*, 1987), ya que una gran cantidad de neuronas en proximidad a los mastocitos han sido identificadas como neuronas colinérgicas (Arizono *et al.*, 1990). Este remodelado podría ser similar al que causaría la alteración en la neurotransmisión colinérgica descrita en modelos de inflamación intestinal con hiperplasia mastocitaria como el de *Trichinella Spiralis* (Barbara *et al.*, 1997; Venkova *et al.*, 1999).

En segundo lugar, observamos que OVA aumenta *in vitro* la contractilidad intestinal en respuesta a capsaicina en el colon y muestra esta misma tendencia en yeyuno. Otros autores han descrito un aumento del tránsito gastrointestinal en respuesta a capsaicina *in vivo* (Gonzalez *et al.*, 1998). También determinamos que el tratamiento crónico con ketotifeno cambia el tipo de respuesta de la capsaicina de excitatoria a inhibitoria, independientemente de si se había producido la exposición a OVA. Una posible explicación a esta respuesta sería que este efecto excitatorio de la capsaicina sobre la respuesta motora fuera causado por la degranulación del mastocito y, por tanto, la estabilización de esta población celular con ketotifeno hiciera visible el efecto inhibitorio de la capsaicina. Estos resultados también indicarían que una de las vías por las cuales los mastocitos podrían estar regulando la actividad motora en el intestino fuera a través de las aferentes extrínsecas, las cuales se encuentran localizadas muy próximas a los mastocitos y parecen estar involucradas en la interacción entre el sistema nervioso y esta población celular (Gottwald *et al.*, 1997; Gottwald *et al.*, 1995). Además se ha descrito que, en condiciones fisiológicas, los mastocitos de la mucosa intestinal están regulados por un reflejo nervioso que implica vías aferentes vagales e inervación

adrenérgica y que la presencia intraluminal de hidrolizado de ovoalbúmina es capaz de estimular este reflejo (Juanola *et al.*, 1998; Vergara *et al.*, 2002).

Nuestros resultados muestran que, en el grupo no expuesto, el ketotifeno no afecta al número de IMMC ni al contenido de RMCP II intestinal, así como tampoco modifica prácticamente la contractilidad espontánea ni en respuesta a carbacol. En cambio, este estabilizador mastocitario sí induce la inhibición de la contractilidad en respuesta a la capsaicina acompañada por la disminución de la expresión de NGF, lo que sugiere que estos dos fenómenos podrían estar relacionados. Previamente se había definido, en un modelo de inflamación intestinal como el de *T. Spiralis*, que existe una sobreexpresión de NGF en el intestino y que esta neurotrofina juega un papel importante en el desarrollo de las alteraciones motoras, regulando el remodelado nervioso que afecta tanto a las aferentes como a la inervación motora (Torrents *et al.*, 2002).

El aumento observado en la expresión de NGF podría estar causado por el incremento en la actividad mastocitaria inducida por OVA, ya que el tratamiento con ketotifeno, al estabilizar a los mastocitos, disminuye la expresión de este factor de crecimiento por debajo de los niveles basales. El NGF podría ser expresado directamente por los mastocitos o bien indirectamente por otras poblaciones celulares activadas por mediadores derivados de la degranulación mastocitaria (Sawada *et al.*, 2000).

En un estudio anterior ya se había descrito que, a pesar de que la inmunoreactividad anti-NGF aumentaba en la mucosa de colon de ratas sometidas a estrés por separación materna, el marcaje de NGF en los mastocitos era muy leve (Barreau *et al.*, 2004). En nuestro caso, mediante técnicas inmunohistoquímicas, tampoco nos fue posible localizar el NGF en los mastocitos de mucosa intestinal de rata, lo que sugeriría que la sobre-expresión de NGF inducida por OVA no se debe directamente a la actividad de los mastocitos. Además el propio NGF puede inducir degranulación mastocitaria y, por tanto, activar otras poblaciones celulares que podrían ser responsables de la expresión de esta neurotrofina (Stempelj *et al.*, 2006; Stempelj & Ferjan, 2005).

Por otra parte, se ha observado una correlación entre los mastocitos y la presencia de fibras nerviosas que expresan el receptor para la capsaicina TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid type-1*) relacionada con hipersensibilidad visceral en pacientes con IBS (Akbar *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2003) y en modelos experimentales de esta patología (Winston *et al.*, 2007). El receptor TRPV1 se expresa en las fibras nerviosas (Yiangou *et al.*, 2001) y en los mastocitos (Stander *et al.*, 2004), y su activación desencadena la liberación local de neuropéptidos que contribuyen al proceso inflamatorio. Además el receptor para la capsaicina TRPV1 puede ser activado por NGF, el cual puede inducir un incremento en la expresión de este mismo receptor (Szallasi & Blumberg, 1999). Por tanto, una mayor expresión de NGF inducida por la exposición a OVA podría aumentar la expresión del receptor TRPV1 en las aferentes nerviosas provocando un mayor efecto en la contractilidad intestinal en respuesta a la capsaicina. En cambio, la disminución de la expresión de NGF por debajo de los niveles basales debido al tratamiento con ketotifeno podría provocar una disminución en la expresión del receptor TRPV1 en las aferentes nerviosas provocando un efecto inhibitorio en la contractilidad intestinal en respuesta a la capsaicina. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el NGF podría estar involucrado en alguno de los mecanismos que provocan la alteración de la respuesta motora en este modelo y posiblemente también en los mecanismos responsables de la hipersensibilidad intestinal descrita en pacientes con IBS (Akbar *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2003; Simren *et al.*, 2001).

Todos estos resultados muestran la fuerte correlación entre la actividad mastocitaria y las alteraciones en la motilidad intestinal sugiriendo el uso potencial de los estabilizadores mastocitarios en el tratamiento de los desordenes motores observados en el IBS. A pesar de esto, hay pocos estudios que hayan comprobado el potencial terapéutico de estos estabilizadores mastocitarios en el IBS (Stefanini *et al.*, 1995; Stefanini *et al.*, 1992). El uso de ketotifeno para el tratamiento de patologías intestinales ha sido muy limitado y únicamente se ha realizado un estudio piloto para tratar la colitis en niños (Jones *et al.*, 1998). En modelos animales, el ketotifeno evita las lesiones en la mucosa gástrica inducidas por etanol (Kalia *et al.*, 2005) y reduce

la respuesta motora exacerbada en un modelo post-infeccioso de IBS (Gay *et al.*, 2000). En cambio, este fármaco no es capaz de mejorar la alteración en la motilidad gastrointestinal en un modelo de Fibrosis Cística (De Lisle *et al.*, 2009).

En resumen, nuestros resultados sugieren que la estimulación sostenida de los mastocitos de mucosa intestinal debido a la exposición continuada con OVA puede ser responsable de una alteración de la respuesta motora en este modelo. Esta actividad mastocitaria, provocada por una respuesta no alérgica a componentes de la dieta, puede provocar una dismotilidad intestinal similar a la que se observa en el IBS. Por tanto, todos estos resultados indicarían una posible relación entre los componentes de la dieta y el IBS.

DISCUSIÓN GENERAL

Una de las mayores limitaciones en la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos del Síndrome del Intestino Irritable (IBS) estriba en la dificultad de encontrar modelos experimentales que reproduzcan la sintomatología de esta enfermedad. Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio indicaban que el modelo de exposición oral a ovo-albúmina (OVA) en rata *Sprague Dawley* (SD) es muy pertinente para estudiar los mecanismos implicados en las alteraciones en la respuesta motora inducidos por componentes de la dieta (Saavedra & Vergara, 2005). Por este motivo en esta tesis doctoral nos planteamos evaluar el tipo de respuesta inmunológica que induce la exposición a OVA de ratas SD y analizar la participación de los mastocitos y el papel del factor de crecimiento nervioso (NGF) en el proceso. Los datos obtenidos sugieren que la OVA induce una alteración motora intestinal mediante una activación no inmunológica de los mastocitos intestinales en la que el NGF podría estar implicado. Se sugiere por lo tanto que la disfunción motora inducida por OVA en las ratas es el resultado de un proceso que no es de naturaleza alérgica, una hipótesis refrendada por la ausencia de otros indicadores propios de este proceso. Con ello contribuimos a caracterizar el modelo con más detalle planteando un posible mecanismo que ayude a explicar la patogenia de la enfermedad (IBS) en pacientes no atópicos y proponemos un modelo idóneo para la identificación de nuevas dianas terapéuticas.

¿Es posible que componentes de la dieta induzcan el desarrollo del IBS mediante un proceso no alérgico?

En el IBS se expresan síntomas similares a los de la alergia alimentaria, tales como el empeoramiento post-prandial de los síntomas, por lo que el diagnóstico diferencial es complicado. No obstante, se ha observado que es posible discriminar entre estos dos procesos teniendo en cuenta síntomas como el dolor en la zona inferior del abdomen o el alivio de este dolor abdominal tras la evacuación intestinal (Neri *et al.*, 2000). Además se ha descrito que la alergia alimentaria se suele presentar en individuos atópicos como una respuesta mediada por IgE (Libeer *et al.*, 2007) y, en cambio, en pacientes con IBS generalmente no se produce un aumento de IgEs específicas contra

componentes de la dieta (Zar *et al.*, 2005;Zuo *et al.*, 2007). Sin embargo, estos pacientes suelen padecer un incremento de las IgGs específicas, aunque este hecho no se correlaciona con un empeoramiento de los síntomas, por lo que su relevancia clínica parece ser escasa (Drisko *et al.*, 2006;Zar *et al.*, 2005;Zuo *et al.*, 2007). Además hay controversia sobre la efectividad del tratamiento del IBS por eliminación de componentes de la dieta que induzcan una respuesta mediada por IgG (Hunter, 2005;Mawdsley *et al.*, 2005;Whorwell *et al.*, 2005). Todo esto apunta a que una parte de los pacientes con IBS responden a componentes de la dieta mediante el desencadenamiento de un proceso no alérgico que lleva a la aparición de la enfermedad, especialmente en individuos no atópicos. La rata SD constituye un buen modelo para demostrar esta hipótesis puesto que no presenta predisposición a desarrollar respuestas mediadas por IgEs específicas (Hylkema *et al.*, 2000) y, por tanto, permite estudiar los mecanismos alternativos involucrados en la patología inducida por OVA.

En nuestro estudio evidenciamos que la respuesta a OVA en SD no está mediada ni por IgE ni por IgG específicas y por lo tanto reproducimos la hipotética inducción de IBS en pacientes no atópicos. Probablemente, al menos en parte, la ausencia de IgE se explique por la no inducción de IL4, una citocina que regula la síntesis de esta inmunoglobulina. De acuerdo con la ausencia de signos de alergia, tampoco observamos inflamación eosinofílica en las ratas expuestas a OVA. Este hecho sugiere que la administración repetida de OVA a dosis bajas podría estar produciendo un fenómeno de tolerancia oral (Holt, 1998) y que el efecto sobre la actividad motora se produciría como resultado del equilibrio entre la actividad mastocitaria y la producción de mediadores inductores de esta tolerancia oral, tales como IL10, IFN γ y TGF β (Ng *et al.*, 2002;Penttila, 2006). De este modo, dado que el efecto de OVA sobre el mastocito no está mediado por anticuerpos sensibilizantes y sí es consecuencia de la estimulación continuada localmente en el intestino, creemos que se trata de un efecto directo de la proteína sobre la célula, tal y como sugieren los resultados con el cultivo de mastocitos murinos .

Este cuadro patogénico se asemeja al observado en pacientes con IBS en los que se produce una alteración de la actividad motora acompañada por una activación mastocitaria en ausencia de una respuesta inflamatoria. Por tanto, es

posible generar mediante elementos de la dieta un proceso patológico que reproduzca el IBS diagnosticado en pacientes no atópicos.

¿Por qué el colon es la zona más afectada en este modelo?

En nuestro estudio hemos observado que el colon es la sección intestinal más afectada por la exposición a OVA. En primer lugar, el *challenge* con OVA disminuye significativamente el número de mastocitos de mucosa intestinal (IMMC) detectados mediante marcaje de RMCP II solamente en el colon. Esto sugiere que el colon podría ser el área intestinal donde los mastocitos presentarían un estado más elevado de activación debido a la exposición prolongada a OVA. Además, es en el colon donde se ha descrito una mayor correlación entre la alteración en la respuesta motora y la actividad mastocitaria. Si bien la correlación estadística no revela inequívocamente una alteración funcional, este hallazgo podría deberse a que el aumento en la actividad mastocitaria inducido por la exposición prolongada a componentes de la dieta ha provocado una mayor alteración de la motilidad intestinal en el colon que en otras secciones. Finalmente, también el colon es la sección intestinal en la cual el tratamiento con ketotifeno tiene un efecto más claro sobre la actividad mastocitaria, sobre la respuesta motora y sobre el aumento de expresión de NGF evidenciando la implicación de los mastocitos en el proceso. Todo ello podría explicar además, que la dismotilidad intestinal y la hipersensibilidad visceral en el IBS se produzca mayoritariamente en esta sección intestinal (Simren *et al.*, 2001; Spiller, 1999).

¿Cuál es el papel de los mastocitos en la alteración intestinal inducida por la exposición a OVA?

Hemos demostrado que la exposición oral a OVA, a diferencia de otras proteínas como la gelatina, provoca la activación mastocitaria localmente en el intestino al aumentar el número de mastocitos de mucosa intestinal sin que se produzca en paralelo un incremento de la concentración de RMCP II sistémica. Este resultado se corresponde con el descrito en un estudio reciente en el que se ha observado que pacientes de IBS-D (con predominancia de diarrea) sufren un aumento en el número de mastocitos sin que a la vez se observe un

incremento significativo de la concentración de triptasa en suero, una proteasa específica de esta población celular (Guilarte *et al.*, 2007). De este modo, parece que los mastocitos liberan sus mediadores localmente provocando que la respuesta frente a OVA se restrinja a la mucosa intestinal sin llegar a desencadenar una respuesta sistémica.

Habíamos descrito con anterioridad que la actividad mastocitaria podía explicar en parte la disfunción motriz del intestino en el modelo de exposición oral a OVA en rata SD (Saavedra & Vergara, 2005) y en un modelo de IBS post-infeccioso con *Trichinella Spiralis* (Serna *et al.*, 2006). Los datos de esta tesis corroboran que esta actividad mastocitaria está implicada en las alteraciones motoras inducidas por OVA y además que el NGF, un mediador liberado entre otras células por los mastocitos y las neuronas, podría jugar un papel crucial en el proceso. De este modo, hemos contribuido a caracterizar la alteración en la respuesta motora inducida por OVA en el modelo de rata SD, mostrando que la exposición a esta proteína aumenta la contractilidad espontánea, en respuesta a carbacol y a capsaicina. Por lo tanto, no debe descartarse que los mastocitos intestinales sean directamente responsables de la alteración de la motilidad intestinal y que un posible mecanismo mediante el cual se produciría esta alteración podría ser el incremento de la liberación de NGF mastocitario (Blennerhassett & Bienenstock, 1998) o, más probablemente, por parte de otras poblaciones celulares responsables de la expresión de esta neurotrofina (Stempelj *et al.*, 2006; Stempelj & Ferjan, 2005).

Además se ha observado que según el tipo de respuesta inmune que OVA genere, la alteración de la respuesta motora inducida por esta proteína es diferente. En un modelo de sensibilización alérgica a OVA en ratón, en el que se producía un aumento del número de mastocitos de mucosa intestinal y de la concentración de IgE específica anti-OVA en suero, se observó que la motilidad muscular en respuesta a carbacol se reducía y este hecho se asociaba a un incremento en la expresión de IL4 en tejido intestinal (Valeur *et al.*, 2009). En contraposición, en nuestro modelo en el que el proceso no es de carácter alérgico, se produce una alteración en la motilidad con una contractilidad aumentada en respuesta a carbacol.

¿Qué sucede si estabilizamos a los mastocitos? ¿Se podría tratar el IBS con estabilizadores para esta población celular?

Nuestros resultados sugieren que los mastocitos están implicados en la alteración de la motilidad ya que, al inhibir su actividad *in vivo* con ketotifeno, el aumento en la contractilidad intestinal inducido por OVA se revierte. Algo similar se había descrito en el modelo de IBS post-infeccioso con *Trichinella Spiralis* en rata (Serna *et al.*, 2006), en el cual el ketotifeno reducía la disfunción de la motilidad. Además también se había observado que el tratamiento con este estabilizador mastocitario evitaba la aparición de una respuesta motora exacerbada al carbacol en un modelo de inflamación intestinal con *N. Brasiliensis* en rata (Gay *et al.*, 2000). En el caso de la respuesta a capsaicina, el tratamiento hace que la contractilidad disminuya por debajo del valor basal haciendo que pase de excitatoria a inhibitoria. Este efecto de la estabilización mastocitaria en respuesta a capsaicina se corresponde con la disminución que este fármaco provocó sobre la expresión intestinal de NGF, lo que sugiere que la alteración motriz y el aumento en NGF puedan ser dos fenómenos relacionados. Previamente se había descrito que esta neurotrofina juega un papel importante en el desarrollo de las alteraciones de la motilidad intestinal regulando el remodelado nervioso que afecta tanto a las aferentes como a la inervación motora en un modelo de inflamación intestinal como el de *T. Spiralis* (Torrents *et al.*, 2002). Por lo tanto, es posible que el NGF esté involucrado en la alteración de la respuesta motora y probablemente no provendría de los mastocitos directamente sino que sea resultado de su activación (Barreau *et al.*, 2004).

Todos estos resultados muestran la fuerte correlación entre la actividad mastocitaria y las alteraciones en la motilidad intestinal sugiriendo el uso potencial de los estabilizadores mastocitarios en el tratamiento de los desordenes en la motilidad intestinal observados en el IBS, tal y como ya han apuntado algunos autores (Santos *et al.*, 2006).

En resumen, los mastocitos participan en la alteración inducida por OVA en el intestino. Este efecto no es de naturaleza alérgica, si no que es probablemente el resultado de un efecto directo de la OVA sobre los mastocitos intestinales.

Esta estimulación sostenida de los mastocitos por parte de OVA explica las alteraciones intestinales que llevan a la dismotilidad, una disfunción en la que el NGF podría estar implicado. Esta actividad no inmunológica de los mastocitos sería el eslabón que explique la relación causa-efecto entre los componentes de la dieta y la inducción de IBS.

CONCLUSIONES

1. La alteración de la motilidad inducida en ratas *Sprague Dawley* (SD) por exposición oral crónica a ovo-albúmina (OVA) no es el resultado de una respuesta inmunitaria de naturaleza alérgica ya que ni se produjeron IgE o IgG específicas anti-OVA, ni se incrementó la IL4, ni hubo reclutamiento de eosinófilos.
2. La alteración de la motilidad inducida en ratas SD por exposición oral a OVA viene acompañada por un incremento en la actividad local de los mastocitos (aumento en número y en desgranulación) que es en parte responsable de la disfunción intestinal.
3. La OVA puede inducir un incremento en la actividad de los mastocitos por mecanismos no inmunomediados.
4. El factor de crecimiento nervioso (NGF) es un mediador de los mastocitos que puede ser candidato a generar las alteraciones intestinales inducidas por OVA en ratas SD.
5. La exposición oral crónica a OVA tiene un efecto sobre la actividad mastocitaria así como las alteraciones funcionales especialmente relevante en el colon.

Conclusión final:

Todo esto sugiere que es posible que en ciertos pacientes con IBS la alteración de la motilidad sea el resultado de una activación mastocitaria por parte de componentes de la dieta que no depende de un proceso alérgico. Estudios posteriores permitirán dilucidar con mayor exactitud los mecanismos implicados y permitirán avanzar en el hallazgo de dianas terapéuticas para el tratamiento y prevención de estas alteraciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. ABBAS A.K. LAHPJS (1997). *Cellular and molecular immunology*, 3rd ed. Philadelphia, USA.
2. Abe M, Kurosawa M, Igarashi Y, Ishikawa O, & Miyachi Y (2000). Influence of IgE-mediated activation of cultured human mast cells on proliferation and type I collagen production by human dermal fibroblasts. *J Allergy Clin Immunol* **106**, S72-S77.
3. Adam B, Liebrechts T, Gschossmann JM, Krippner C, Scholl F, Ruwe M, & Holtmann G (2006). Severity of mucosal inflammation as a predictor for alterations of visceral sensory function in a rat model. *Pain* **123**, 179-186.
4. Akbar A, Yiangou Y, Facer P, Walters JR, Anand P, & Ghosh S (2008). Increased capsaicin receptor TRPV1-expressing sensory fibres in irritable bowel syndrome and their correlation with abdominal pain. *Gut* **57**, 923-929.
5. Akiho H, Deng Y, Blennerhassett P, Kanbayashi H, & Collins SM (2005). Mechanisms underlying the maintenance of muscle hypercontractility in a model of postinfective gut dysfunction. *Gastroenterology* **129**, 131-141.
6. Arizono N, Matsuda S, Hattori T, Kojima Y, Maeda T, & Galli SJ (1990). Anatomical variation in mast cell nerve associations in the rat small intestine, heart, lung, and skin. Similarities of distances between neural processes and mast cells, eosinophils, or plasma cells in the jejunal lamina propria. *Lab Invest* **62**, 626-634.
7. Atkinson HA, Johnson IT, Gee JM, Grigoriadou F, & Miller K (1996). Brown Norway rat model of food allergy: effect of plant components on the development of oral sensitization. *Food Chem Toxicol* **34**, 27-32.
8. Atkinson HA & Miller K (1994). Assessment [correction of Assessment] of the brown Norway rat as a suitable model for the investigation of food allergy. *Toxicology* **91**, 281-288.

-
9. Atkinson W, Sheldon TA, Shaath N, & Whorwell PJ (2004). Food elimination based on IgG antibodies in irritable bowel syndrome: a randomised controlled trial. *Gut* **53**, 1459-1464.
 10. Barbara G, De GR, Stanghellini V, Cremon C, & Corinaldesi R (2002). A role for inflammation in irritable bowel syndrome? *Gut* **51 Suppl 1**, i41-i44.
 11. Barbara G, De GR, Stanghellini V, Cremon C, Salvioli B, & Corinaldesi R (2004a). New pathophysiological mechanisms in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* **20 Suppl 2**, 1-9.
 12. Barbara G, Stanghellini V, De GR, & Corinaldesi R (2006). Functional gastrointestinal disorders and mast cells: implications for therapy. *Neurogastroenterol Motil* **18**, 6-17.
 13. Barbara G, Stanghellini V, De GR, Cremon C, Cottrell GS, Santini D, Pasquinelli G, Morselli-Labate AM, Grady EF, Bunnett NW, Collins SM, & Corinaldesi R (2004b). Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* **126**, 693-702.
 14. Barbara G, Vallance BA, & Collins SM (1997). Persistent intestinal neuromuscular dysfunction after acute nematode infection in mice. *Gastroenterology* **113**, 1224-1232.
 15. Barczyk M, Debek W, & Chyczewski L (1995). Mast cells in the gastrointestinal tract. *Rocz Akad Med Bialymst* **40**, 36-57.
 16. Barreau F, Cartier C, Ferrier L, Fioramonti J, & Bueno L (2004). Nerve growth factor mediates alterations of colonic sensitivity and mucosal barrier induced by neonatal stress in rats. *Gastroenterology* **127**, 524-534.
 17. Bauer O & Razin E (2000). Mast Cell-Nerve Interactions. *News Physiol Sci* **15**, 213-218.

18. Baumgart DC & Carding SR (2007). Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* **369**, 1627-1640.
19. Beier R & Gebert A (1998). Kinetics of particle uptake in the domes of Peyer's patches. *Am J Physiol* **275**, G130-G137.
20. Ben N, I, Boyaka PN, Fennira Ben AF, Jeddi M, & Tome D (2003). The [173-196] fragment of ovalbumin suppresses ovalbumin-specific rat IgE responses. *Int Immunopharmacol* **3**, 1569-1579.
21. Bercik P, Wang L, Verdu EF, Mao YK, Blennerhassett P, Khan WI, Kean I, Tougas G, & Collins SM (2004). Visceral hyperalgesia and intestinal dysmotility in a mouse model of postinfective gut dysfunction. *Gastroenterology* **127**, 179-187.
22. Berthoud HR, Blackshaw LA, Brookes SJ, & Grundy D (2004). Neuroanatomy of extrinsic afferents supplying the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil* **16 Suppl 1**, 28-33.
23. Bischoff SC, Mayer J, Wedemeyer J, Meier PN, Zeck-Kapp G, Wedi B, Kapp A, Cetin Y, Gebel M, & Manns MP (1997). Colonoscopic allergen provocation (COLAP): a new diagnostic approach for gastrointestinal food allergy. *Gut* **40**, 745-753.
24. Bischoff SC, Mayer JH, & Manns MP (2000). Allergy and the gut. *Int Arch Allergy Immunol* **121**, 270-283.
25. Bischoff SC & Sellge G (2002). Mast cell hyperplasia: role of cytokines. *Int Arch Allergy Immunol* **127**, 118-122.
26. Bischoff SC, Sellge G, Lorentz A, Sebald W, Raab R, & Manns MP (1999). IL-4 enhances proliferation and mediator release in mature human mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8080-8085.

-
27. Bischoff SC, Wedemeyer J, Herrmann A, Meier PN, Trautwein C, Cetin Y, Maschek H, Stolte M, Gebel M, & Manns MP (1996). Quantitative assessment of intestinal eosinophils and mast cells in inflammatory bowel disease. *Histopathology* **28**, 1-13.
 28. Blennerhassett MG & Bienenstock J (1998). Sympathetic nerve contact causes maturation of mast cells in vitro. *J Neurobiol* **35**, 173-182.
 29. Bourdu S, Dapoigny M, Chapuy E, Artigue F, Vasson MP, Dechelotte P, Bommelaer G, Eschalier A, & Ardid D (2005). Rectal instillation of butyrate provides a novel clinically relevant model of noninflammatory colonic hypersensitivity in rats. *Gastroenterology* **128**, 1996-2008.
 30. Brandtzaeg PE (2002). Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. *Ann N Y Acad Sci* **964**, 13-45.
 31. Burks AW, Laubach S, & Jones SM (2008). Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment. *J Allergy Clin Immunol* **121**, 1344-1350.
 32. Camilleri M (2004). Is there a SERT-ain association with IBS? *Gut* **53**, 1396-1399.
 33. Chan CL, Facer P, Davis JB, Smith GD, Egerton J, Bountra C, Williams NS, & Anand P (2003). Sensory fibres expressing capsaicin receptor TRPV1 in patients with rectal hypersensitivity and faecal urgency. *Lancet* **361**, 385-391.
 34. Chen Y, Inobe J, Marks R, Gonnella P, Kuchroo VK, & Weiner HL (1995). Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* **376**, 177-180.
 35. Cooper PH & Stanworth DR (1976). Isolation of rat peritoneal mast cells in high yield and purity. *Methods Cell Biol* **14**, 365-378.

36. Coremans G, Azpiroz F, Collins S, Dapoigny M, Muller-Lissner SA, Pace F, Smout A, Stockbrugger RW, & Whorwell PJ (2002). The rectum: a window to irritable bowel syndrome? *Digestion* **65**, 238-249.
37. Crampton HJ (2003). Comparison of ketotifen fumarate ophthalmic solution alone, desloratadine alone, and their combination for inhibition of the signs and symptoms of seasonal allergic rhinoconjunctivitis in the conjunctival allergen challenge model: a double-masked, placebo- and active-controlled trial. *Clin Ther* **25**, 1975-1987.
38. Crowe SE & Perdue MH (1992). Gastrointestinal food hypersensitivity: basic mechanisms of pathophysiology. *Gastroenterology* **103**, 1075-1095.
39. Dahl C, Hoffmann HJ, Saito H, & Schlotz PO (2004). Human mast cells express receptors for IL-3, IL-5 and GM-CSF; a partial map of receptors on human mast cells cultured in vitro. *Allergy* **59**, 1087-1096.
40. De Lisle RC, Meldi L, Roach E, Flynn M, & Sewell R (2009). Mast cells and gastrointestinal dysmotility in the cystic fibrosis mouse. *PLoS ONE* **4**, e4283.
41. de Vries JE (1998). The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *J Allergy Clin Immunol* **102**, 165-169.
42. de Vries JE, Carballido JM, & Aversa G (1999). Receptors and cytokines involved in allergic TH2 cell responses. *J Allergy Clin Immunol* **103**, S492-S496.
43. De JF, Van NL, Adriaensen D, Van MF, Miller HR, Van ME, & Timmermans JP (2003). Effect of intestinal inflammation on capsaicin-sensitive afferents in the ileum of *Schistosoma mansoni*-infected mice. *Histochem Cell Biol* **119**, 477-484.
44. De JF, Van NL, Van MF, Miller HR, Van ME, & Timmermans JP (2002). Temporal distribution of distinct mast cell phenotypes during intestinal schistosomiasis in mice. *Parasite Immunol* **24**, 225-231.

-
45. Dearman RJ, Caddick H, Basketter DA, & Kimber I (2000). Divergent antibody isotype responses induced in mice by systemic exposure to proteins: a comparison of ovalbumin with bovine serum albumin. *Food Chem Toxicol* **38**, 351-360.
 46. Dearman RJ & Kimber I (2001). Determination of protein allergenicity: studies in mice. *Toxicol Lett* **120**, 181-186.
 47. Distrutti E, Sediari L, Mencarelli A, Renga B, Orlandi S, Russo G, Caliendo G, Santagada V, Cirino G, Wallace JL, & Fiorucci S (2006). 5-Amino-2-hydroxybenzoic acid 4-(5-thioxo-5H-[1,2]dithiol-3yl)-phenyl ester (ATB-429), a hydrogen sulfide-releasing derivative of mesalamine, exerts antinociceptive effects in a model of postinflammatory hypersensitivity. *J Pharmacol Exp Ther* **319**, 447-458.
 48. Drisko J, Bischoff B, Hall M, & McCallum R (2006). Treating irritable bowel syndrome with a food elimination diet followed by food challenge and probiotics. *J Am Coll Nutr* **25**, 514-522.
 49. Dunlop SP, Jenkins D, Neal KR, Naesdal J, Borgaonker M, Collins SM, & Spiller RC (2003). Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of prednisolone in post-infectious irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* **18**, 77-84.
 50. Enerback L (1966a). Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 2. Dye-binding and metachromatic properties. *Acta Pathol Microbiol Scand* **66**, 303-312.
 51. Enerback L (1966b). Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. I. Effects of fixation. *Acta Pathol Microbiol Scand* **66**, 289-302.
 52. Eutamene H, Theodorou V, Fioramonti J, & Bueno L (2003). Acute stress modulates the histamine content of mast cells in the gastrointestinal tract through interleukin-1 and corticotropin-releasing factor release in rats. *J Physiol* **553**, 959-966.

53. Fritsche R (2003). Animal models in food allergy: assessment of allergenicity and preventive activity of infant formulas. *Toxicol Lett* **140-141**, 303-309.
54. Galli SJ (2000). Mast cells and basophils. *Curr Opin Hematol* **7**, 32-39.
55. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimaldeston MA, Piliponsky AM, Williams CMM, & Tsai M (2005). Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: Recent advances. *Annual Review of Immunology* **23**, 749-786.
56. Gay J, Fioramonti J, Garcia-Villar R, & Bueno L (2000). Alterations of intestinal motor responses to various stimuli after *Nippostrongylus brasiliensis* infection in rats: role of mast cells. *Neurogastroenterol Motil* **12**, 207-214.
57. Gibbs BF, Wierecky J, Welker P, Henz BM, Wolff HH, & Grabbe J (2001). Human skin mast cells rapidly release preformed and newly generated TNF-alpha and IL-8 following stimulation with anti-IgE and other secretagogues. *Exp Dermatol* **10**, 312-320.
58. Gismera CS & Aladren BS (2008). Inflammatory bowel diseases: a disease (s) of modern times? Is incidence still increasing? *World J Gastroenterol* **14**, 5491-5498.
59. Gonzalez R, Dunkel R, Koletzko B, Schusdziarra V, & Allescher HD (1998). Effect of capsaicin-containing red pepper sauce suspension on upper gastrointestinal motility in healthy volunteers. *Dig Dis Sci* **43**, 1165-1171.
60. Gottwald T, Lhotak S, & Stead RH (1997). Effect of truncal vagotomy and capsaicin on mast cells and IgA-positive plasma cells in rat jejunal mucosa. *Neurogastroenterol Motil* **9**, 25-32.
61. Gottwald TP, Hewlett BR, Lhotak S, & Stead RH (1995). Electrical stimulation of the vagus nerve modulates the histamine content of mast cells in the rat jejunal mucosa. *Neuroreport* **7**, 313-317.

-
62. Groux H, Bigler M, de Vries JE, & Roncarolo MG (1996). Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med* **184**, 19-29.
63. Guilarte M, Santos J, de T, I, Alonso C, Vicario M, Ramos L, Martinez C, Casellas F, Saperas E, & Malagelada JR (2007). Diarrhoea-predominant IBS patients show mast cell activation and hyperplasia in the jejunum. *Gut* **56**, 203-209.
64. Gurish MF & Austen KF (2001). The diverse roles of mast cells. *J Exp Med* **194**, F1-F5.
65. Gurish MF & Boyce JA (2006). Mast cells: ontogeny, homing, and recruitment of a unique innate effector cell. *J Allergy Clin Immunol* **117**, 1285-1291.
66. Hasala H, Malm-Erfjelt M, Erfjelt J, Giembycz MA, Zhang X, Moilanen E, & Kankaanranta H (2005). Ketotifen induces primary necrosis of human eosinophils. *J Ocul Pharmacol Ther* **21**, 318-327.
67. He SH (2004). Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **10**, 309-318.
68. Hogan SP, Foster PS, & Rothenberg ME (2002). Experimental analysis of eosinophil-associated gastrointestinal diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **2**, 239-248.
69. Holt PG (1998). Mucosal immunity in relation to the development of oral tolerance/sensitization. *Allergy* **53**, 16-19.
70. Holten KB, Wetherington A, & Bankston L (2003). Diagnosing the patient with abdominal pain and altered bowel habits: is it irritable bowel syndrome? *Am Fam Physician* **67**, 2157-2162.

71. Holtmann G, Siffert W, Haag S, Mueller N, Langkafel M, Senf W, Zotz R, & Talley NJ (2004). G-protein beta 3 subunit 825 CC genotype is associated with unexplained (functional) dyspepsia. *Gastroenterology* **126**, 971-979.
72. Honma K, Kohno Y, Saito K, Shimojo N, Horiuchi T, Hayashi H, Suzuki N, Hosoya T, Tsunoo H, & Niimi H (1996). Allergenic epitopes of ovalbumin (OVA) in patients with hen's egg allergy: inhibition of basophil histamine release by haptenic ovalbumin peptide. *Clin Exp Immunol* **103**, 446-453.
73. Huby RD, Dearman RJ, & Kimber I (2000). Why are some proteins allergens? *Toxicol Sci* **55**, 235-246.
74. Hunter JO (2005). Food elimination in IBS: the case for IgG testing remains doubtful. *Gut* **54**, 1203.
75. Husby S, Mestecky J, Moldoveanu Z, Holland S, & Elson CO (1994). Oral tolerance in humans. T cell but not B cell tolerance after antigen feeding. *J Immunol* **152**, 4663-4670.
76. Hylkema MN, Hoekstra MO, Luinge M, & Timens W (2002). The strength of the OVA-induced airway inflammation in rats is strain dependent. *Clin Exp Immunol* **129**, 390-396.
77. Hylkema MN, van der DM, Pater JM, Kampinga J, Nieuwenhuis P, & Groen H (2000). Single expression of CD45RC and RT6 in correlation with T-helper 1 and T-helper 2 cytokine patterns in the rat. *Cell Immunol* **199**, 89-96.
78. Iba Y, Sugimoto Y, Kamei C, & Masukawa T (2003). Possible role of mucosal mast cells in the recovery process of colitis induced by dextran sulfate sodium in rats. *Int Immunopharmacol* **3**, 485-491.
79. Jones NL, Roifman CM, Griffiths AM, & Sherman P (1998). Ketotifen therapy for acute ulcerative colitis in children: a pilot study. *Dig Dis Sci* **43**, 609-615.

-
80. Juanola C, Giralt M, Jimenez M, Mourelle M, & Vergara P (1998). Mucosal mast cells are involved in CCK disruption of MMC in the rat intestine. *Am J Physiol* **275**, G63-G67.
81. Jun DW, Lee OY, Yoon HJ, Lee SH, Lee HL, Choi HS, Yoon BC, Lee MH, Lee DH, & Cho SH (2006). Food intolerance and skin prick test in treated and untreated irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* **12**, 2382-2387.
82. Kalesnikoff J, Rios EJ, Chen CC, Nakae S, Zabel BA, Butcher EC, Tsai M, Tam SY, & Galli SJ (2006). RabGEF1 regulates stem cell factor/c-Kit-mediated signaling events and biological responses in mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2659-2664.
83. Kalia N, Brown NJ, Wood RF, & Pockley AG (2005). Ketotifen abrogates local and systemic consequences of rat intestinal ischemia-reperfusion injury. *J Gastroenterol Hepatol* **20**, 1032-1038.
84. Kassel O, de BF, Duvernelle C, Olgart C, Israel-Biet D, Krieger P, Moreau L, Muller C, Pauli G, & Frossard N (2001). Local increase in the number of mast cells and expression of nerve growth factor in the bronchus of asthmatic patients after repeated inhalation of allergen at low-dose. *Clin Exp Allergy* **31**, 1432-1440.
85. Kawakami T & Galli SJ (2002). Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat Rev Immunol* **2**, 773-786.
86. Kim HJ, Camilleri M, Carlson PJ, Cremonini F, Ferber I, Stephens D, McKinzie S, Zinsmeister AR, & Urrutia R (2004). Association of distinct alpha(2) adrenoceptor and serotonin transporter polymorphisms with constipation and somatic symptoms in functional gastrointestinal disorders. *Gut* **53**, 829-837.
87. Kimber I, Atherton K, Kenna JG, & Dearman RJ (2000). Predictive methods for food allergenicity: perspectives and current status. *Toxicology* **147**, 147-150.

88. Kimber I & Dearman RJ (2001). Food allergy: what are the issues? *Toxicol Lett* **120**, 165-170.
89. Kirsch R & Riddell RH (2006). Histopathological alterations in irritable bowel syndrome. *Mod Pathol* **19**, 1638-1645.
90. Knippels LM & Penninks AH (2003). Assessment of the allergic potential of food protein extracts and proteins on oral application using the brown Norway rat model. *Environ Health Perspect* **111**, 233-238.
91. Knippels LM & Penninks AH (2005). Recent advances using rodent models for predicting human allergenicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **207**, 157-160.
92. Knippels LM, Penninks AH, Smit JJ, & Houben GF (1999a). Immune-mediated effects upon oral challenge of ovalbumin-sensitized Brown Norway rats: further characterization of a rat food allergy model. *Toxicol Appl Pharmacol* **156**, 161-169.
93. Knippels LM, Penninks AH, Spanhaak S, & Houben GF (1998). Oral sensitization to food proteins: a Brown Norway rat model. *Clin Exp Allergy* **28**, 368-375.
94. Knippels LM, Penninks AH, van MM, & Houben GF (1999b). Humoral and cellular immune responses in different rat strains on oral exposure to ovalbumin. *Food Chem Toxicol* **37**, 881-888.
95. Knippels LM, van der Kleij HP, Koppelman SJ, Houben GF, & Penninks AH (2000). Comparison of antibody responses to hen's egg and cow's milk proteins in orally sensitized rats and food-allergic patients. *Allergy* **55**, 251-258.
96. Komagata Y & Weiner HL (2000). Oral tolerance. *Rev Immunogenet* **2**, 61-73.

-
97. La JH, Kim TW, Sung TS, Kang JW, Kim HJ, & Yang IS (2003). Visceral hypersensitivity and altered colonic motility after subsidence of inflammation in a rat model of colitis. *World J Gastroenterol* **9**, 2791-2795.
 98. La JH, Kim TW, Sung TS, Kim HJ, Kim JY, & Yang IS (2004). Role of mucosal mast cells in visceral hypersensitivity in a rat model of irritable bowel syndrome. *J Vet Sci* **5**, 319-324.
 99. Lackner JM, Gudleski GD, & Blanchard EB (2004). Beyond abuse: the association among parenting style, abdominal pain, and somatization in IBS patients. *Behav Res Ther* **42**, 41-56.
 100. Libeer JC, Van HE, Kochuyt AM, Weykamp C, & Bossuyt X (2007). In vitro determination of allergen-specific serum IgE. Comparative analysis of three methods. *Clin Chem Lab Med* **45**, 413-415.
 101. Lin T.J. OPLMJLMESWBJ (1999). *Mast cells and eosinophils in mucosal defences and pathogenesis* San Diego, USA.
 102. Lin XP, Magnusson J, Ahlstedt S, hlman-Hoglund A, Hanson LL, Magnusson O, Bengtsson U, & Telemo E (2002). Local allergic reaction in food-hypersensitive adults despite a lack of systemic food-specific IgE. *J Allergy Clin Immunol* **109**, 879-887.
 103. Little JC, Westgate GE, Evans A, & Granger SP (1994). Cytokine gene expression in intact anagen rat hair follicles. *J Invest Dermatol* **103**, 715-720.
 104. Locke GR, III, Zinsmeister AR, Talley NJ, Fett SL, & Melton LJ, III (2000a). Familial association in adults with functional gastrointestinal disorders. *Mayo Clin Proc* **75**, 907-912.
 105. Locke GR, III, Zinsmeister AR, Talley NJ, Fett SL, & Melton LJ (2000b). Risk factors for irritable bowel syndrome: role of analgesics and food sensitivities. *Am J Gastroenterol* **95**, 157-165.

106. Lorentz A, Schwengberg S, Mierke C, Manns MP, & Bischoff SC (1999). Human intestinal mast cells produce IL-5 in vitro upon IgE receptor cross-linking and in vivo in the course of intestinal inflammatory disease. *Eur J Immunol* **29**, 1496-1503.
107. Lorentz A, Schwengberg S, Sellge G, Manns MP, & Bischoff SC (2000). Human intestinal mast cells are capable of producing different cytokine profiles: role of IgE receptor cross-linking and IL-4. *J Immunol* **164**, 43-48.
108. Macfarlane AJ, Kon OM, Smith SJ, Zeibecoglou K, Khan LN, Barata LT, McEuen AR, Buckley MG, Walls AF, Meng Q, Humbert M, Barnes NC, Robinson DS, Ying S, & Kay AB (2000). Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin. *J Allergy Clin Immunol* **105**, 99-107.
109. Madden KB, Urban JF, Jr., Ziltener HJ, Schrader JW, Finkelman FD, & Katona IM (1991). Antibodies to IL-3 and IL-4 suppress helminth-induced intestinal mastocytosis. *J Immunol* **147**, 1387-1391.
110. Marshall JS & Bienenstock J (1994). The role of mast cells in inflammatory reactions of the airways, skin and intestine. *Curr Opin Immunol* **6**, 853-859.
111. Mawdsley JE, Irving P, & Makins R (2005). IgG antibodies to foods in IBS. *Gut* **54**, 567.
112. Mayer EA (2008). Clinical practice. Irritable bowel syndrome. *N Engl J Med* **358**, 1692-1699.
113. McKay DM & Bienenstock J (1994). The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract. *Immunol Today* **15**, 533-538.
114. Metcalfe DD (1984). Mast cell mediators with emphasis on intestinal mast cells. *Ann Allergy* **53**, 563-575.

-
115. Metcalfe DD, Baram D, & Mekori YA (1997). Mast cells. *Physiol Rev* **77**, 1033-1079.
116. Miller HR, Woodbury RG, Huntley JF, & Newlands G (1983). Systemic release of mucosal mast-cell protease in primed rats challenged with *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunology* **49**, 471-479.
117. Murray CD, Flynn J, Ratcliffe L, Jacyna MR, Kamm MA, & Emmanuel AV (2004). Effect of acute physical and psychological stress on gut autonomic innervation in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* **127**, 1695-1703.
118. Nagler-Anderson C (2000). Tolerance and immunity in the intestinal immune system. *Crit Rev Immunol* **20**, 103-120.
119. Nakae S, Suto H, Berry GJ, & Galli SJ (2007). Mast cell-derived TNF can promote Th17 cell-dependent neutrophil recruitment in ovalbumin-challenged OTII mice. *Blood* **109**, 3640-3648.
120. NASSET ES (1964). THE ROLE OF THE DIGESTIVE TRACT IN PROTEIN METABOLISM. *Am J Dig Dis* **9**, 175-190.
121. Neri M, Laterza F, Howell S, Di GM, Festi D, Ballone E, Cucurullo F, & Talley NJ (2000). Symptoms discriminate irritable bowel syndrome from organic gastrointestinal diseases and food allergy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **12**, 981-988.
122. Ng TW, Holt PG, & Prescott SL (2002). Cellular immune responses to ovalbumin and house dust mite in egg-allergic children. *Allergy* **57**, 207-214.
123. Novak N, Allam JP, Betten H, Haberstock J, & Bieber T (2004). The role of antigen presenting cells at distinct anatomic sites: they accelerate and they slow down allergies. *Allergy* **59**, 5-14.

-
124. Nyrop KA, Palsson OS, Levy RL, Korff MV, Feld AD, Turner MJ, & Whitehead WE (2007). Costs of health care for irritable bowel syndrome, chronic constipation, functional diarrhoea and functional abdominal pain. *Aliment Pharmacol Ther* **26**, 237-248.
 125. O'Sullivan MA, Mahmud N, Kelleher DP, Lovett E, & O'Morain CA (2000). Patient knowledge and educational needs in irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **12**, 39-43.
 126. OVARY Z (1964). PASSIVE CUTANEOUS ANAPHYLAXIS. *Methods Med Res* **10**, 158-162.
 127. Parisi G, Leandro G, Bottona E, Carrara M, Cardin F, Faedo A, Goldin D, Pantalena M, Tafner G, Verdianelli G, & Zilli M (2003). Small intestinal bacterial overgrowth and irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* **98**, 2572-2574.
 128. Park CH, Joo YE, Choi SK, Rew JS, Kim SJ, & Lee MC (2003). Activated mast cells infiltrate in close proximity to enteric nerves in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *J Korean Med Sci* **18**, 204-210.
 129. Patrick MK, Dunn IJ, Buret A, Miller HR, Huntley JF, Gibson S, & Gall DG (1988). Mast cell protease release and mucosal ultrastructure during intestinal anaphylaxis in the rat. *Gastroenterology* **94**, 1-9.
 130. Penninks AH & Knippels LM (2001). Determination of protein allergenicity: studies in rats. *Toxicol Lett* **120**, 171-180.
 131. Penttila I (2006). Effects of transforming growth factor-beta and formula feeding on systemic immune responses to dietary beta-lactoglobulin in allergy-prone rats. *Pediatr Res* **59**, 650-655.
 132. Perdue MH & Gall DG (1985). Transport abnormalities during intestinal anaphylaxis in the rat: effect of antiallergic agents. *J Allergy Clin Immunol* **76**, 498-503.

-
133. Perdue MH & Gall DG (1986). Intestinal anaphylaxis in the rat: jejunal response to in vitro antigen exposure. *Am J Physiol* **250**, G427-G431.
134. Pimentel M (2009). Review of rifaximin as treatment for SIBO and IBS. *Expert Opin Investig Drugs* **18**, 349-358.
135. Pimentel M, Chow EJ, & Lin HC (2000). Eradication of small intestinal bacterial overgrowth reduces symptoms of irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* **95**, 3503-3506.
136. Pimentel M, Chow EJ, & Lin HC (2003). Normalization of lactulose breath testing correlates with symptom improvement in irritable bowel syndrome. a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol* **98**, 412-419.
137. Ragnarsson G & Bodemar G (1998). Pain is temporally related to eating but not to defaecation in the irritable bowel syndrome (IBS). Patients' description of diarrhea, constipation and symptom variation during a prospective 6-week study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **10**, 415-421.
138. Redegeld FA, van der Heijden MW, Kool M, Heijdra BM, Garssen J, Kraneveld AD, Van LH, Roholl P, Saito T, Verbeek JS, Claassens J, Koster AS, & Nijkamp FP (2002). Immunoglobulin-free light chains elicit immediate hypersensitivity-like responses. *Nat Med* **8**, 694-701.
139. Reed DE, Barajas-Lopez C, Cottrell G, Velazquez-Rocha S, Dery O, Grady EF, Bunnett NW, & Vanner SJ (2003). Mast cell tryptase and proteinase-activated receptor 2 induce hyperexcitability of guinea-pig submucosal neurons. *J Physiol* **547**, 531-542.
140. Ringel Y & Drossman DA (2002). Irritable bowel syndrome: classification and conceptualization. *J Clin Gastroenterol* **35**, S7-10.

141. Rouleau A, Dimitriadou V, Trung T, Newlands GF, Miller HR, Schwartz JC, & Garbarg M (1997). Mast cell specific proteases in rat brain: changes in rats with experimental allergic encephalomyelitis. *J Neural Transm* **104**, 399-417.
142. Saavedra Y & Vergara P (2005). Hypersensitivity to ovalbumin induces chronic intestinal dysmotility and increases the number of intestinal mast cells. *Neurogastroenterol Motil* **17**, 112-122.
143. Saavedra Y & Vergara P (2003). Somatostatin inhibits intestinal mucosal mast cell degranulation in normal conditions and during mast cell hyperplasia. *Regul Pept* **111**, 67-75.
144. Sanderson IR & Walker WA (1993). Uptake and transport of macromolecules by the intestine: possible role in clinical disorders (an update). *Gastroenterology* **104**, 622-639.
145. Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, Chey WY, Feagan BG, Fedorak RN, Kamm MA, Korzenik JR, Lashner BA, Onken JE, Rachmilewitz D, Rutgeerts P, Wild G, Wolf DC, Marsters PA, Travers SB, Blank MA, & van Deventer SJ (2004). Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease. *N Engl J Med* **350**, 876-885.
146. Santos J, Alonso C, Guilarte M, Vicario M, & Malagelada JR (2006). Targeting mast cells in the treatment of functional gastrointestinal disorders. *Curr Opin Pharmacol* **6**, 541-546.
147. Santos J, Guilarte M, Alonso C, & Malagelada JR (2005). Pathogenesis of irritable bowel syndrome: the mast cell connection. *Scand J Gastroenterol* **40**, 129-140.
148. Santos J, Saunders PR, Hanssen NP, Yang PC, Yates D, Groot JA, & Perdue MH (1999). Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat. *Am J Physiol* **277**, G391-G399.

-
149. Sato I, Munakata M, & Iinuma K (2005). Histamine H1 antagonists block M-currents in dissociated rat cortical neurons. *Brain Res* **1057**, 81-87.
 150. Sawada J, Itakura A, Tanaka A, Furusaka T, & Matsuda H (2000). Nerve growth factor functions as a chemoattractant for mast cells through both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways. *Blood* **95**, 2052-2058.
 151. Scherthaner GH, Hauswirth AW, Baghestanian M, Agis H, Ghannadan M, Worda C, Krauth MT, Printz D, Fritsch G, Sperr WR, & Valent P (2005). Detection of differentiation- and activation-linked cell surface antigens on cultured mast cell progenitors. *Allergy* **60**, 1248-1255.
 152. Schoch C (2003). In vitro inhibition of human conjunctival mast-cell degranulation by ketotifen. *J Ocul Pharmacol Ther* **19**, 75-81.
 153. Schwab D, Raithel M, Klein P, Winterkamp S, Weidenhiller M, Radespiel-Troeger M, Hochberger J, & Hahn EG (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.
 154. Schwartz LB (1994). Mast cells: function and contents. *Curr Opin Immunol* **6**, 91-97.
 155. Sellge G & Bischoff SC (2006). Isolation, culture, and characterization of intestinal mast cells. *Methods Mol Biol* **315**, 123-138.
 156. Sellge G, Laffer S, Mierke C, Vrtala S, Hoffmann MW, Klempnauer J, Manns MP, Valenta R, & Bischoff SC (2005). Development of an in vitro system for the study of allergens and allergen-specific immunoglobulin E and immunoglobulin G: Fcepsilon receptor I supercross-linking is a possible new mechanism of immunoglobulin G-dependent enhancement of type I allergic reactions. *Clin Exp Allergy* **35**, 774-781.

157. Serna H, Porras M, & Vergara P (2006). Mast cell stabilizer ketotifen [4-(1-methyl-4-piperidylidene)-4h-benzo[4,5]cyclohepta[1,2-b]thiophen-10(9 H)-one fumarate] prevents mucosal mast cell hyperplasia and intestinal dysmotility in experimental *Trichinella spiralis* inflammation in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **319**, 1104-1111.
158. Shanahan F, MacNiven I, Dyck N, Denburg JA, Bienenstock J, & Befus AD (1987). Human lung mast cells: distribution and abundance of histochemically distinct subpopulations. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **83**, 329-331.
159. Shin TY, Kim SH, Choi CH, Shin HY, & Kim HM (2004). *Isodon japonicus* decreases immediate-type allergic reaction and tumor necrosis factor-alpha production. *Int Arch Allergy Immunol* **135**, 17-23.
160. Silver R, Silverman AJ, Vitkovic L, & Lederhendler II (1996). Mast cells in the brain: evidence and functional significance. *Trends Neurosci* **19**, 25-31.
161. Simren M, Abrahamsson H, & Bjornsson ES (2001). An exaggerated sensory component of the gastrocolonic response in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* **48**, 20-27.
162. Simren M, Axelsson J, Gillberg R, Abrahamsson H, Svedlund J, & Bjornsson ES (2002). Quality of life in inflammatory bowel disease in remission: the impact of IBS-like symptoms and associated psychological factors. *Am J Gastroenterol* **97**, 389-396.
163. Spiller RC (1999). Disturbances in large bowel motility. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* **13**, 397-413.
164. Stander S, Moormann C, Schumacher M, Buddenkotte J, Artuc M, Shpacovitch V, Brzoska T, Lippert U, Henz BM, Luger TA, Metze D, & Steinhoff M (2004). Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp Dermatol* **13**, 129-139.

-
165. Stead RH, Tomioka M, Quinonez G, Simon GT, Felten SY, & Bienenstock J (1987). Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 2975-2979.
166. Stefanini GF, Prati E, Albini MC, Piccinini G, Capelli S, Castelli E, Mazzetti M, & Gasbarrini G (1992). Oral disodium cromoglycate treatment on irritable bowel syndrome: an open study on 101 subjects with diarrheic type. *Am J Gastroenterol* **87**, 55-57.
167. Stefanini GF, Saggiaro A, Alvisi V, Angelini G, Capurso L, di LG, Dobrilla G, Doderò M, Galimberti M, Gasbarrini G, & . (1995). Oral cromolyn sodium in comparison with elimination diet in the irritable bowel syndrome, diarrheic type. Multicenter study of 428 patients. *Scand J Gastroenterol* **30**, 535-541.
168. Stempelj M, Bavec A, & Ferjan I (2006). Regulation of nerve growth factor induced histamine and arachidonic acid release from rat mast cells by cannabinoids. *Inflamm Res* **55 Suppl 1**, S09-S10.
169. Stempelj M & Ferjan I (2005). Signaling pathway in nerve growth factor induced histamine release from rat mast cells. *Inflamm Res* **54**, 344-349.
170. Stenton GR, Vliagoftis H, & Befus AD (1998). Role of intestinal mast cells in modulating gastrointestinal pathophysiology. *Ann Allergy Asthma Immunol* **81**, 1-11.
171. Szallasi A & Blumberg PM (1999). Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* **51**, 159-212.
172. Talley NJ & Spiller R (2002). Irritable bowel syndrome: a little understood organic bowel disease? *Lancet* **360**, 555-564.

-
173. Tam SY, Tsai M, Yamaguchi M, Yano K, Butterfield JH, & Galli SJ (1997). Expression of functional TrkA receptor tyrosine kinase in the HMC-1 human mast cell line and in human mast cells. *Blood* **90**, 1807-1820.
174. Tomimori Y, Muto T, Fukami H, Saito K, Horikawa C, Tsuruoka N, Yamashiro K, Saito M, Sugiura N, Sumida M, Kakutani S, & Fukuda Y (2002). Mast cell chymase regulates dermal mast cell number in mice. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 1478-1482.
175. Torrents D, Torres R, De MF, & Vergara P (2002). Antinerve growth factor treatment prevents intestinal dysmotility in *Trichinella spiralis*-infected rats. *J Pharmacol Exp Ther* **302**, 659-665.
176. Troncone R, Caputo N, Florio G, & Finelli E (1994). Increased intestinal sugar permeability after challenge in children with cow's milk allergy or intolerance. *Allergy* **49**, 142-146.
177. Tsai M, Takeishi T, Thompson H, Langley KE, Zsebo KM, Metcalfe DD, Geissler EN, & Galli SJ (1991). Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6382-6386.
178. Valeur J, Lappalainen J, Rita H, Lin AH, Kovanen PT, Berstad A, Eklund KK, & Vaali K (2009). Food allergy alters jejunal circular muscle contractility and induces local inflammatory cytokine expression in a mouse model. *BMC Gastroenterol* **9**, 33.
179. van der Kleij HP, Ma D, Redegeld FA, Kraneveld AD, Nijkamp FP, & Bienenstock J (2003). Functional expression of neurokinin 1 receptors on mast cells induced by IL-4 and stem cell factor. *J Immunol* **171**, 2074-2079.
180. Van LH, Meade R, & Askenase PW (1983). An early component of delayed-type hypersensitivity mediated by T cells and mast cells. *J Exp Med* **157**, 1604-1617.

-
181. Venkova K, Palmer JM, & Greenwood-Van MB (1999). Nematode-induced jejunal inflammation in the ferret causes long-term changes in excitatory neuromuscular responses. *J Pharmacol Exp Ther* **290**, 96-103.
182. Vergara P, Saavedra Y, & Juanola C (2002). Neuroendocrine control of intestinal mucosal mast cells under physiological conditions. *Neurogastroenterol Motil* **14**, 35-42.
183. von der WT, Bulliard C, & Fritsche R (2001). Suppression of specific and bystander IgE responses in a mouse model of oral sensitization to beta-lactoglobulin. *Int Arch Allergy Immunol* **125**, 307-315.
184. Watzl B, Abrahamse SL, Treptow-van LS, Neudecker C, Hansch GM, Rechkemmer G, & Pool-Zobel BL (1999). Enhancement of ovalbumin-induced antibody production and mucosal mast cell response by mercury. *Food Chem Toxicol* **37**, 627-637.
185. Wheatcroft J, Wakelin D, Smith A, Mahoney CR, Mawe G, & Spiller R (2005). Enterochromaffin cell hyperplasia and decreased serotonin transporter in a mouse model of postinfectious bowel dysfunction. *Neurogastroenterol Motil* **17**, 863-870.
186. Whorwell PJ, Bentley KJ, Atkinson W, & Sheldon TA (2005). IgG antibodies to foods in IBS. *Gut* **54**, 1204.
187. Wilkes CP, Bleay C, Paterson S, & Viney ME (2007). The immune response during a *Strongyloides ratti* infection of rats. *Parasite Immunol* **29**, 339-346.
188. Winston J, Shenoy M, Medley D, Naniwadekar A, & Pasricha PJ (2007). The vanilloid receptor initiates and maintains colonic hypersensitivity induced by neonatal colon irritation in rats. *Gastroenterology* **132**, 615-627.

189. Woolley DE & Tetlow LC (2000). Mast cell activation and its relation to proinflammatory cytokine production in the rheumatoid lesion. *Arthritis Res* **2**, 65-74.
190. Wu X, Myers AC, Goldstone AC, Togias A, & Sanico AM (2006). Localization of nerve growth factor and its receptors in the human nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol* **118**, 428-433.
191. Xu JR, Luo JY, Shang L, & Kong WM (2006). Effect of change in an inhibitory neurotransmitter of the myenteric plexus on the pathogenetic mechanism of irritable bowel syndrome subgroups in rat models. *Chin J Dig Dis* **7**, 89-96.
192. Yale SH, Musana AK, Kieke A, Hayes J, Glurich I, & Chyou PH (2008). Applying case definition criteria to irritable bowel syndrome. *Clin Med Res* **6**, 9-16.
193. Yamaguchi M, Lantz CS, Oettgen HC, Katona IM, Fleming T, Miyajima I, Kinet JP, & Galli SJ (1997). IgE enhances mouse mast cell Fc(epsilon)RI expression in vitro and in vivo: evidence for a novel amplification mechanism in IgE-dependent reactions. *J Exp Med* **185**, 663-672.
194. Yamaguchi M, Sayama K, Yano K, Lantz CS, Noben-Trauth N, Ra C, Costa JJ, & Galli SJ (1999). IgE enhances Fc epsilon receptor I expression and IgE-dependent release of histamine and lipid mediators from human umbilical cord blood-derived mast cells: synergistic effect of IL-4 and IgE on human mast cell Fc epsilon receptor I expression and mediator release. *J Immunol* **162**, 5455-5465.
195. Yang PC, Berin MC, Yu L, & Perdue MH (2001). Mucosal pathophysiology and inflammatory changes in the late phase of the intestinal allergic reaction in the rat. *Am J Pathol* **158**, 681-690.
196. Yiangou Y, Facer P, Dyer NH, Chan CL, Knowles C, Williams NS, & Anand P (2001). Vanilloid receptor 1 immunoreactivity in inflamed human bowel. *Lancet* **357**, 1338-1339.

-
197. Zappulla JP, Arock M, Mars LT, & Liblau RS (2002). Mast cells: new targets for multiple sclerosis therapy? *J Neuroimmunol* **131**, 5-20.
 198. Zar S, Benson MJ, & Kumar D (2005). Food-specific serum IgG4 and IgE titers to common food antigens in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* **100**, 1550-1557.
 199. Zollner TM, Schmidt P, Kalveram CM, Emman AC, & Boehncke WH (2000). Anaphylaxis to red currants. *Allergy* **55**, 511.
 200. Zuo XL, Li YQ, Li WJ, Guo YT, Lu XF, Li JM, & Desmond PV (2007). Alterations of food antigen-specific serum immunoglobulins G and E antibodies in patients with irritable bowel syndrome and functional dyspepsia. *Clin Exp Allergy* **37**, 823-830.

ANEXO

Publicaciones generadas por los estudios de esta tesis

En forma de Artículo:

“MUCOSAL MAST CELLS MEDIATE MOTOR RESPONSE INDUCED BY CHRONIC ORAL EXPOSURE TO OVA IN THE RAT GASTROINTESTINAL TRACT”. Traver E, Torres R, de Mora F, Vergara P. Aceptado y pendiente de publicación en *Neurogastroenterology and Motility*.

En forma de Abstract en comunicaciones a congresos:

- DISMOTILITY INDUCED BY CHRONIC EXPOSURE TO OVA IN RATS IS MEDIATED BY MAST CELLS AND NGF. Traver E, de Mora F, Vergara P. Participación con póster en el congreso “*Joint International Meeting of Neurogastroenterology and Motility*” (NGM. 6-8th November 2008. Lucerne, Switzerland). *Neurogastroenterology and Motility* 2008; 20 (Suppl.2), SAT121.
- ORAL EXPOSURE TO OVALBUMIN INCREASES NGF EXPRESSION IN THE GUT OF SPRAGUE DAWLEY RATS: AN EFFECT MEDIATED BY MAST CELLS. Traver E, de Mora F, Vergara P. Participación con póster en el congreso “*European Academy of Allergology and Clinical Immunology*” (EAACI. 7-11 th June 2008, Barcelona). *Allergy* 2008 63 (Suppl.88):403, A1097.
- INFLUENCE OF HEALTH STATUS IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF FOOD ALLERGY. de Diego A, Traver E, Cantó J, Vergara P, Saavedra Y. Participación con póster en FELASA-ICLAS Joint Meeting (11-14 June 2007. Como, Italia).
- HYPERMOTILITY INDUCED BY MAST CELL ACTIVATION AFTER ORAL EXPOSURE TO OVALBUMIN OF SD RATS IS NOT IgE-MEDIATED. Traver E, de Mora F, Vergara P. Participación con póster en la “*Digestive Disease Week*” (DDW 19-23th May 2007. Washington DC., USA). *Gastroenterology* 2007 Volume 132. Number 4, Suppl2. pag.556, T1788.
- RESPUESTA MASTOCITARIA A LA SENSIBILIZACIÓN ORAL A LA OVO-ALBÚMINA: POSIBLE CAUSA DE HIPERSENSIBILIDAD MOTORA INTESTINAL. Traver E, de Mora F, Vergara P. Participación con póster en la “*Semana de las Enfermedades Digestivas*” (SED. Granada, Junio 2006). *REV ESP ENFERM DIG* 2006 ; 98 (Supl.1), pág. 55, P068.

-
- ALERGIAS ALIMENTARIAS: Una posible causa del Síndrome del Intestino Irritable (IBS). Presentación oral en la reunión anual del Grupo Español de Motilidad Digestiva (GEMD. Madrid, Marzo 2006).

