



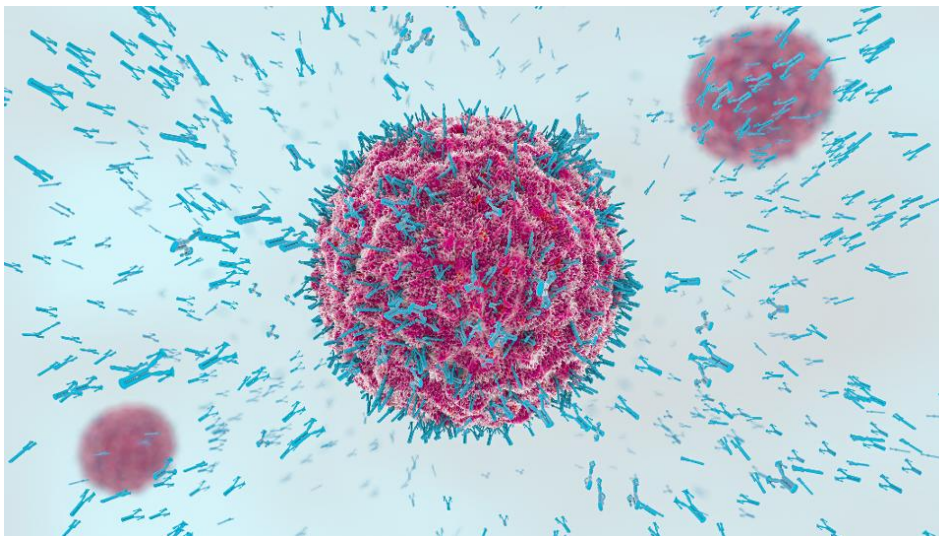
UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

eurecat
Centre Tecnològic de Catalunya

**ESTUDI *IN VIVO* PER AVALUAR ELS EFECTES DE LA
COMBINACIÓ D'UN PROBIÒTIC I UN PREBIÒTIC SOBRE
LA IMMUNOMODULACIÓ EN UN MODEL D'AL·LÈRGIA A
L'OVOALBÚMINA**

MARIA REPOLLÉS DE DALMAU

TREBALL DE FI DE GRAU DE BIOTECNOLOGIA



Tutor acadèmic: Roger Mariné Casadó, Departament de Bioquímica i Biotecnologia,
Universitat Rovira i Virgili. roger.marine@eurecat.org

En cooperació amb: Eurecat, Centre Tecnològic de Catalunya

10 de juliol 2020

Jo, *Maria Repollés de Dalmau*, amb DNI 39939746Q, sóc coneixedora de la guiade prevenció del plagi a la URV *Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants* (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueixen cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 10 de JULIOL de 2020

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long vertical stroke extending upwards from the top right.

(signatura)

AGRAÏMENTS

En primer lloc, m'agradaria donar les gràcies al Roger Mariné l'oportunitat que m'ha brindat per participar en aquest projecte que finalment s'ha convertit en el meu treball de fi de grau. Li agraeixo el constant suport, l'orientació i la confiança per acompanyar-me durant la realització d'aquest projecte.

També vull agrair a la resta de membres de la Unitat de Nutrició i Salut d'Eurecat pel tracte rebut i l'excel·lent suport que m'han ofert durant l'estada de pràctiques.

Voldria donar les gràcies als meus amics i companys de la universitat, pel seu interès, suport i alleugeriment durant aquest últims cinc anys. També a totes aquelles amistats extrauniversitàries que m'han acompanyat i han fet més amè el camí.

Finalment, vull expressar el meu agraïment a la meua família, especialment a la meua mare, la meua germana i el meu oncle, pel seu estímul i per haver-me recolzat i encoratjat durant la realització del doble grau universitari que, en part, culmina amb aquest treball.

ÍNDEX

1. DADES DEL CENTRE	5
2. RESUM.....	6
3. ABREVIACIONS.....	7
4. INTRODUCCIÓ.....	8
4.1. AL·LÈRGIES ALIMENTÀRIES	8
4.1.1. <i>Epidemiologia</i>	8
4.1.2. <i>Definició</i>	8
4.1.3. <i>Patogènesis</i>	8
4.2. SÍMPTOMES I TRACTAMENTS.....	11
4.3. PROBIÒTICS	12
4.4. PREBIÒTICS	15
4.5. SIMBIÒTICS	17
4.6. AL·LÈRGIA A L'OVOALBÚMINA.....	18
4.6.1. <i>Model animal d'al·lèrgia a OVA</i>	18
4.6.2. <i>Efectes del tractament amb Lactobacillus sobre l'al·lèrgia a OVA</i>	20
4.6.3. <i>Efectes del tractament amb inulina sobre l'al·lèrgia a OVA</i>	21
4.6.4. <i>Efectes del tractament simbiòtic sobre l'al·lèrgia a OVA</i>	21
5. HIPÒTESI I OBJECTIUS	23
6. MATERIALS I MÈTODES	24
6.1. ANIMALS	24
6.2. AL·L'ERGEN	24
6.3. DIETES I TRACTAMENTS	24
6.4. DISSENY EXPERIMENTAL.....	25
6.4.1. <i>Grups Experimentals</i>	25
6.4.2. <i>Sensibilització OVA i Sacrifici</i>	26
6.5. DETERMINACIONS.....	27
6.5.1. <i>Determinacions durant l'estudi</i>	27
6.5.2. <i>Determinacions al final de l'estudi</i>	27
6.6. ESTADÍSTICA.....	29
7. RESULTATS	30
7.1. DETERMINACIONS DURANT L'ESTUDI	30
7.1.1. <i>Control de la ingesta i el pes corporal</i>	30
7.1.2. <i>Determinació dels nivells plasmàtics d'IgE i IgG1</i>	32
7.2. DETERMINACIONS AL FINAL DE L'ESTUDI	34
7.2.1. <i>Estudi dels teixits com a marcadors d'inflamació sistèmica</i>	34
7.2.2. <i>Quantificació de l'expressió gènica en ili i colon</i>	36
8. DISCUSSIÓ	38
9. CONCLUSIONS.....	41
10. BIBLIOGRAFIA	42
11. AUTOAVALUACIÓ.....	48

1. DADES DEL CENTRE

Aquest estudi s'ha realitzat a partir dels resultats obtinguts en les pràctiques externes realitzades a la Unitat de Nutrició i Salut d'Eurecat, Centre Tecnològic de Catalunya (Reus, Espanya).

Eurecat és un centre que proveeix diferents serveis tecnològics a tots els sectors empresarials, especialment aquells relacionats amb els àmbits d'alimentació, d'energia i recursos, de sistemes industrials o de la indústria de la salut.

Un dels majors beneficis que Eurecat ofereix a les empreses és una disminució de la despesa en infraestructures científiques i tecnològiques, a la vegada que accelera la innovació i proporciona coneixement especialitzat específic per a cada una.

D'entre les seves diverses àrees, voldria destacar l'Àrea de Biotecnologia i la seva Unitat de Nutrició i Salut. Aquesta unitat s'encarrega d'oferir serveis relacionats amb el consum d'aliments i la salut, especialment aquells associats amb els nutracèutics i els aliments funcionals.

La realització de les pràctiques ha estat dirigida per el Dr. Roger Mariné Casadó.

2. RESUM

En les últimes dècades, la incidència de les al·lèrgies alimentàries ha crescut exponencialment fins al punt de considerar-se una de les epidèmies del segle XXI. Actualment, l'ús de probiòtics i prebiòtics està guanyant terreny com a possibles tractaments per reduir la simptomatologia associada a aquest tipus d'al·lèrgies degut a la seva capacitat d'immunomodulació associada a l'intestí, el principal òrgan on es duu a terme majoritàriament el procés de tolerància i sensibilització dels al·lèrgens alimentaris. Per aquest motiu, l'objectiu d'aquest estudi va ser investigar l'efecte de *Lactobacillus plantarum* com a probiòtic, de la inulina com a prebiòtic i una combinació d'ambdós com a simbiòtics en la reducció dels símptomes associats a l'al·lèrgia a la ovoalbúmina (OVA) en un model animal murí sensibilitzat. L'increment dels nivells circulants de les immunoglobulines IgE i IgG1 associades a OVA van indicar una satisfactòria inducció de l'al·lèrgia. Tot i així, cap dels tractaments estudiats va prevenir aquesta inducció. D'altra banda, l'estudi de l'estat inflamatori com a resposta al contacte amb l'al·lèrgen va mostrar una major estimulació del procés inflamatori en aquells animals sensibilitzats amb OVA, sent el probiòtic l'únic tractament en induir una lleugera reducció de l'estat inflamatori. Tot i que els resultats exposats en aquest treball no mostrin un efecte clar pel que fa als diferents tractaments analitzats, caldria fer més estudis per avaluar els possibles efectes protectors del probiòtic sobre altres processos relacionats amb un estat al·lèrgic com l'estrès oxidatiu o la mobilització de cèl·lules del sistema immunitari com els eosinòfils o els mastòcits.

PARAULES CLAU: al·lèrgia alimentària, ovoalbúmina, *Lactobacillus plantarum*, inulina, model murí

3. ABREVIACIONS

AGV: àcids grassos volàtils

AUC: àrea sota la corba

BAL: bacteris d'àcid làctic

GALT: en anglès, *Gut-associated lymphoid tissue*

Ig: immunoglobulina

IL: interleucina

INF γ : interferó gamma

FOS: fructooligosacàrids

GOS: galactooligosacàrids

NF κ B: factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres kappa de les cèl·lules B activades

NIAID: institut nacional d'al·lèrgies i malalties infeccioses

OMS: Organització Mundial de la Salut

ONUAA: Organització de les Nacions Unides per la Alimentació i l'Agricultura

OVA: ovoalbúmina

TGF β : factor de creixement transformant β

Th1: cèl·lules T efectores

Th2: cèl·lules T efectores específiques per l'al·lèrgen

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa

TLR: en anglès, *toll-like receptors*

Treg: cèl·lules T reguladores

4. INTRODUCCIÓ

4.1. Al·lèrgies alimentàries

4.1.1. Epidemiologia

Les al·lèrgies alimentàries s'han descrit com una de les epidèmies del segle XXI en les societats occidentals degut a l'increment en la seva prevalença en les últimes dècades. S'estima que entre l'1-5% de la població europea i nord-americana pateixen al·lèrgies alimentàries (1,2). Estudis científics han demostrat que les al·lèrgies alimentàries són més freqüents en infants que en adults i que, els principals al·lèrgens alimentaris són els cacauets, els fruits secs, el peix, el marisc, l'ou, la llet, el blat, la soja i les llavors (3).

4.1.2. Definició

Segons l'Institut Nacional d'Al·lèrgies i Malalties Infeccioses dels Estats Units (NIAID), les al·lèrgies alimentàries es defineixen com un efecte perjudicial per la salut derivat d'una resposta immunitària específica que es produeix reproductivament a l'exposició d'un determinat aliment (4). El desenvolupament d'al·lèrgies alimentàries està influenciat per la genètica, l'ambient i les interaccions genoma-entorn, incloent els efectes epigenètics. S'han proposat nombrosos factors de risc que contribueixen a les al·lèrgies alimentàries, incloent-hi riscos immutables, com ara el sexe, l'ètnia o la genètica, i factors de risc potencialment abordables per reduir i/o prevenir les al·lèrgies alimentàries, com ara l'augment d'higiene, influència de la microbiota, insuficiència de vitamina D o consum reduït d'àcids grassos omega-3 o antioxidants (3,5,6).

4.1.3. Patogènesis

Un sistema immunitari saludable és tolerant als aliments i es caracteritza per mantenir una resposta poc sostinguda davant dels potencials al·lèrgens dels aliments, fins i tot en absència d'una exposició regular dels al·lèrgens (7).

El sistema gastrointestinal és un dels òrgans amb més rellevància pel que fa a la homeòstasi del sistema immunitari controlant respostes vers patògens i antígens o regulant processos de sensibilització i tolerància vers aliments (8). El tracte gastrointestinal és l'òrgan immunològic més llarg del cos. Sota la seva capa epitelial s'hi troben un gran nombre de limfòcits intercalats en un teixit connectiu lax.

Tot i la gran i continua exposició d'antígens provinents de la dieta, només un petit percentatge de la població presenta al·lèrgies alimentàries gràcies al desenvolupament

de la tolerància oral. La tolerància oral es defineix com una inhibició de les respostes immunes a un antigen concret mitjançant una exposició prèvia a l'antigen a través de la via oral (9).

La tolerància immunològica és un procés actiu que comença amb la presa d'antígens alimentaris potencials a l'intestí prim, el qual conté gran part del teixit limfoide associat a l'intestí (GALT, per les sigles en anglès *Gut-associated lymphoid tissue*). Diversos tipus cel·lulars col·laboren en el manteniment de la tolerància immunitària, que inclou processos com la transmissió de l'antigen del lumen intestinal a la làmina pròpia i la posterior transferència al teixit limfoide per part dels macròfags, la presentació d'antigen per les cèl·lules dendrítiques i la inducció d'una resposta de cèl·lules T efectores (Th1) al teixit limfoide (7). Aquestes cèl·lules Th1 alliberen diferents moduladors inflamatoris que estableixen un patró no-al·lèrgic, com ara el factor de creixement transformant β (TGF- β) (9). La inducció i el manteniment de la tolerància als antígens alimentaris requereixen una generació activa de cèl·lules T reguladores (Treg) específiques per l'antigen alimentari (10). Aquestes cèl·lules es diferencien mitjançant un mecanisme dependent de TGF- β i àcid retinoic sintetitzats per les cèl·lules dendrítiques i estan altament influenciades per la microbiota resident i els antígens derivats de la dieta (11). Aquestes cèl·lules Treg redueixen o suprimeixen l'activació del sistema immunitari mitjançant l'alliberament de molècules com TGF- β o interleucina 10 (IL-10), mantenint així una homeòstasi del sistema immune (3,11). Al entrar en contacte amb un al·lèrgen alimentari, els individus no al·lèrgics produeixen immunoglobulines G (IgG) i IgA específiques per els al·lèrgens per part de les cèl·lules B, que no indueixen cap símptoma clínic (**Figura 1**) (12).

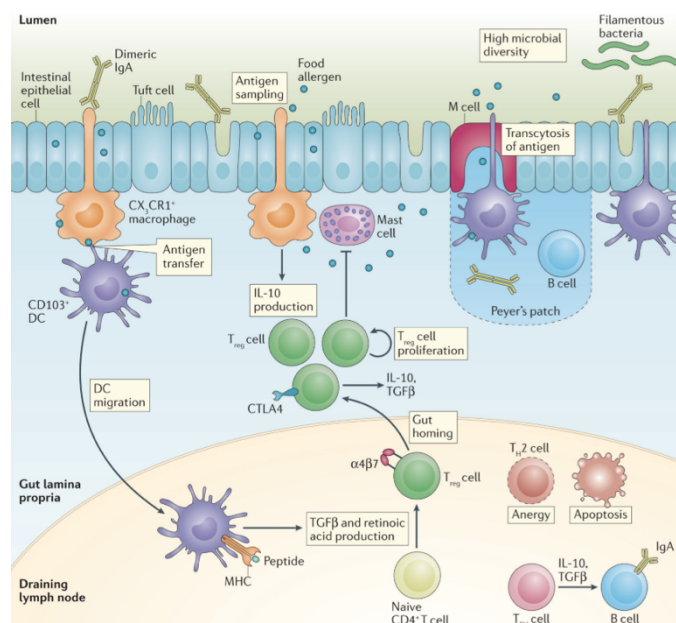


Figura 1. Tolerància immunològica vers antígens alimentaris en el tracte gastrointestinal. Imatge adaptada de Yu et al. (12).

El principal mecanisme derivat de les al·lèrgies alimentàries és la ruptura de la tolerància immunològica i clínica a un aliment ingerit, que resulta en reaccions d'hipersensibilitat mediades per IgE i reaccions retardades no mediades per IgE. La formació d'anticossos IgE específics dels al·lèrgens alimentaris és una característica principal de l'al·lèrgia alimentària associada a IgE i el seu diagnòstic (10,12).

La sensibilització al·lèrgica es defineix com la primera inducció d'una resposta immune al·lèrgica al reconèixer un al·lèrgen alimentari. Aquesta reacció es coneix com sensibilització primària i es basa principalment en induir la producció de IgE. La sensibilització als al·lèrgens alimentaris es pot produir a través del tracte gastrointestinal, per via respiratòria i, tot i que menys freqüentment, per via cutània (12).

Es creu que en pacients amb al·lèrgies alimentàries, la inducció inicial de cèl·lules Treg es veu compromesa i és substituïda per la generació de cèl·lules T efectores específiques per l'al·lèrgen (Th2), les quals produeixen citocines proinflamatòries que indueixen a un canvi de classe de les Ig per produir IgE específiques per l'al·lèrgen (3,12).

En individus sensibilitzats, l'exposició posterior i repetida a l'al·lèrgen alimentari desencadena una desgranulació regulada per IgE de cèl·lules efectores immunes, com ara mastòcits i basòfils, el que es tradueix en una ràpida manifestació. Aquesta unió de l'antigen a les IgE dona lloc a un alliberament d'histamina i altres mediadors inflamatoris de la reacció al·lèrgica immediata. Simultàniament, hi ha un reconeixement de l'al·lèrgen per part de cèl·lules presentadores d'antígens, com ara cèl·lules dendrítiques o cèl·lules B, les quals activen les cèl·lules Th2. Aquesta etapa es coneix com resposta immune secundària i consisteix en desencadenar una producció *de novo* de més mediadors inflamatoris com ara leucotriens i citocines proinflamatòries, destacant les IL-4, IL-9, IL-13 o IL-1 β per part de les cèl·lules Th2 i altres cèl·lules inflamatòries, com ara eosinòfils i basòfils, per mantenir la inflamació al·lèrgica (12,13). També són d'important rellevància la IL-6 i IL-23, ja que a part de ser citocines pluripotents implicades en la inflamació al·lèrgica, també impulsen l'expressió d'altres citocines pro-inflamatòries (14,15). A més, cal destacar que la IL-4 inhibeix la producció de citocines Th1 com l'interferó gamma (INF- γ) i la IL-2, el que indica que les citocines Th1 i Th2 actuen recíprocament en la inducció i la persistència de les respostes regulada per IgE (16).

Les mencionades cèl·lules B, també conegudes com cèl·lules de memòria, després d'actuar en la resposta immunitària poden residir en la mucosa o en els teixits limfoides adjacents amb l'objectiu de respondre més ràpid i eficaçment en possibles respostes immunitàries posteriors davant del mateix al·lèrgen (12) (**Figura 2**).

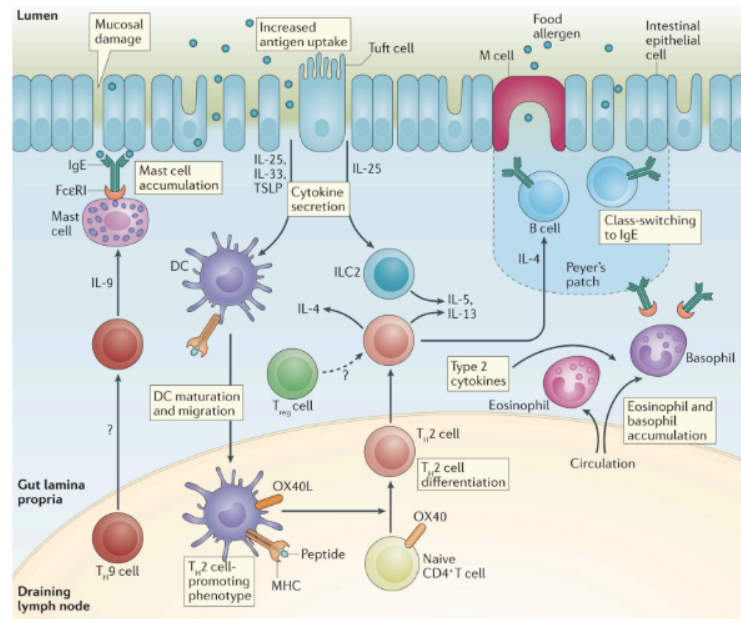


Figura 2. Resposta immunitària regulada per cèl·lules Th2 en resposta a antígens alimentaris en el tracte gastrointestinal. Imatge adaptada de Yu et al. (12).

Diversos estudis clínics han demostrat que en processos de resposta immunitària davant d'un al·lèrgen alimentari, a part de l'increment de producció d'IgE també s'ha observat augment en els nivells d'IgG, els quals corresponen a un efecte protector. Diferents investigacions han mostrat que nivells alts d'IgG bloquegen la interacció entre l'al·lèrgen i IgE, donant lloc a una remissió dels símptomes (11,12,17,18).

Des d'un punt de vista fisiopatològic, les al·lèrgies alimentàries mostren un gran nivell d'interconnexió entre la barrera intestinal -i els antígens alimentaris-, la resposta immunitària i la microbiota, entre d'altres influències, que regulen el procés de tolerància immunològica i que, alhora poden influir en el desenvolupament de les al·lèrgies (3).

4.2. Síntomes i tractaments

Els símptomes de les al·lèrgies alimentàries apareixen ràpidament (des de minuts fins a hores després de la ingesta de l'aliment) i poden variar des de lleus fins a greus, arribant a causar la mort en determinades condicions. Generalment els símptomes afecten a la pell (urticària), a les vies respiratòries (tos) i al tracte gastrointestinal (vòmits, diarrees). Malgrat el risc de les reaccions al·lèrgiques severes, actualment no hi ha cap tractament per tractar les al·lèrgies alimentàries, només es poden gestionar via eliminació de l'al·lèrgen o tractant els símptomes (4,10).

El principal tractament per reduir els símptomes són les dietes estrictes d'eliminació, les quals es basen en silenciar la inflamació al·lèrgica específica induïda per un aliment concret (6). Tot i això, en els últims anys hi ha hagut un creixent interès en la inducció de la sensibilització i la tolerància per immunoteràpia oral i epicutània amb l'objectiu de prevenir el desenvolupament d'al·lèrgies alimentàries (3). Es poden diferenciar dos nivells d'enfocs de prevenció diferents: la prevenció primària, que intenta reduir el risc de sensibilitzar a infants amb al·lèrgens alimentaris, i la prevenció secundària, que es basa en prevenir les expressions clíniques pròpies d'al·lèrgies en persones ja sensibles a al·lèrgens o amb altres trastorns al·lèrgics (ex: asma) (2).

Pel que fa al primer enfoc, una de les estratègies proposades és la lactància materna exclusiva i una posterior introducció d'al·lèrgens alimentaris a partir del quart mes de vida dels infants. En relació amb el segon enfoc, els nutrients amb capacitat per modular el sistema immunitari, com ara la vitamina D, s'han proposat com estratègies per prevenir al·lèrgies alimentàries (2). Altrament, també han estat de gran interès les teràpies basades en alterar la microbiota intestinal per intentar promoure el desenvolupament de la tolerància immunològica a través del sistema immunitari associat al intestí. Aquestes intervencions es fonamenten en la identificació de compostos dietètics potencialment immunomoduladors, amb l'objectiu de prevenir la sensibilització al·lèrgica mitjançant la reducció de la resposta inflamatòria (1,2,6).

Aquests suplementos alimentaris, també anomenats aliments funcionals, com ara els probiòtics i els prebiòtics, han demostrat ser capaços d'alterar, modificar i restablir la microbiota preexistent, a més de facilitar les funcions intestinals. D'aquesta manera, tindrien un paper important a nivell nutricional, alhora de prevenir i reduir factors de risc per a determinades malalties (19).

4.3. Probiòtics

Un dels compostos més estudiats en els últims anys per tractar al·lèrgies alimentàries són els probiòtics (20). Es defineixen com soques vives de microorganismes estrictament seleccionats que, quan s'administren en quantitats adequades, proporcionen un benefici per a la salut de l'hoste (21). Molts dels microorganismes considerats com a probiòtics formen part de la flora intestinal humana, on hi viuen en una relació simbiòtica. És per això que es consideren una de les eines més útils per equilibrar la microbiota intestinal i per tant, influir sobre la salut i les malalties humanes (22,23).

A diferència dels fàrmacs, els probiòtics es poden subministrar a pacients sans amb l'objectiu de reduir el risc de desenvolupar determinades malalties o per optimitzar funcions fisiològiques (24).

Es creu que la majoria dels efectes beneficiosos que presenten es deuen a que aquests microorganismes generen petits subproductes metabòlics moleculars que exerceixen una influència reguladora beneficosa sobre les funcions biològiques de l'hoste, com són per exemple els àcids grassos de cadena curta com el butirat (25).

Els probiòtics promouen una gran varietat d'efectes i s'han utilitzat per tractar tant afeccions gastrointestinals, com malalties al·lèrgiques, problemes cutanis, o fins i tot, patologies relacionades amb el sistema neurològic (22). L'avantatge principal de l'ús de probiòtics és l'efecte sobre el desenvolupament de la microbiota, assegurant un equilibri adequat entre els patògens i els bacteris necessaris per al bon funcionament de l'organisme. Un dels efectes positius més demostrats és la restauració de la microbiota després d'una teràpia amb antibiòtics, juntament amb l'acció protectora vers patògens intestinals ingerits per aliments contaminants o l'ambient. També són coneguts pels seus efectes en processos digestius, en el tractament d'al·lèrgies alimentàries, candidiasis o càries dentals. A més, s'ha descrit que estan implicats en la producció d'enzims, l'absorció de vitamines i la generació d'àcids orgànics i aminoàcids. (22,26). Els probiòtics també s'han relacionat amb l'increment d'eficiència del sistema immunològic. Aquest efecte es coneix com *immunomodulació*, i una desregulació del mateix pot donar lloc a immunopatologies i altres malalties associades (20).

Els efectes dels probiòtics es veuen mediatos bàsicament per el sistema immunitari innat, el qual s'inicia amb els receptors de tipus Toll (en anglès, *Toll-like receptors*, TLR). Aquests desencadenen una resposta immune que consisteix en la síntesi i diferenciació de cèl·lules Th, en la producció de citocines antiinflamatòries, com ara el TGF- β i la IL-10, i en una resposta intestinal augmentada via IgA (2).

Segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS), juntament amb la Organització de les Nacions Unides per la Alimentació i la Agricultura (ONUAA), per a què els microorganismes puguin ser considerats probiòtics han de presentar certs requisits tals com: ser no patogènics, tolerar als àcids i bilis, ser capaços d'adherir-se en el revestiment intestinal, tenir un temps de generació curt i alta supervivència, ser genèticament estables i produir àcids per disminuir el pH i inhibir el creixement de patògens (19,23,25,27). Generalment, les propietats dels probiòtics no s'associen a un gènere o espècie concreta, sinó que es designen a determinades soques d'espècies determinades (19,26).

En els darrers anys, hi ha hagut un augment a nivell mundial del consum de probiòtics de venda lliure per a la promoció de la salut i el benestar. Tot i això, clínicament s'ha demostrat que no totes les formulacions probiòtiques són realment efectives (28). Degut a això, un dels punts claus a tenir en compte a l'hora d'utilitzar els probiòtics com a tractament és escollir-los correctament. Una gran quantitat d'estudis clínics han demostrat que no tots els probiòtics són efectius per tractar qualsevol afecció. De manera que el funcionament dels probiòtics dependrà del gènere i soca del bacteri, de la dosi òptima, i dels components utilitzats per obtenir el producte probiòtic, entre altres condicions (26).

Els productes probiòtics poden estar formats per una soca o per la barreja de dues o més soques. Els efectes dels probiòtics són molt concrets i no es poden generalitzar, de manera que una sola soca pot presentar beneficis diferents quan s'administra individualment o en combinació. També s'ha observat que en alguns casos, els efectes d'una formulació probiòtica pot variar en grups de pacients (19,29).

Els gèneres bacterians més comunament usats com a probiòtics són, en diferència, *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. També són d'ús recurrent els gèneres *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* i *Bacillus*. Tot i que en menys freqüència, algunes soques pertanyents al gènere *Saccharomyces* també s'utilitzen en productes probiòtics (24–26).

El mètode d'administració de probiòtics més comú és per via oral, ja sigui a través d'aliments, suplementos alimentaris o suplementos medicinals. Més concretament, és força comú incorporar els probiòtics en productes alimentaris convencionals com ara els productes làctics, o bé en aliments més especialitzats com la xocolata o els cereals. Tot i això, els probiòtics també es poden incorporar per via cutània en forma de pomades per tractar ferides o bé en forma de cosmètics per tractar trastorns microbians en la pell (22).

Els probiòtics s'han proposat com un dels aliments funcionals per reduir o prevenir els símptomes causats per al·lèrgies alimentàries ja que actuen en moltes de les vies d'inflamació relacionades amb aquesta patologia. A més, nombrosos articles científics que han comparat la composició de la microbiota de pacients sans i de pacients amb al·lèrgies, han observat com aquests últims presenten nivells significativament més baixos de *Bifidobacterium*, el principal component per a la producció de productes probiòtics (2,30).

4.4. Prebiòtics

Un altre tipus d'aliment funcional altament estudiat per tractar els efectes de les al·lèrgies alimentàries són els prebiòtics. Segons la OMS i la ONUAA, els prebiòtics es defineixen com components alimentaris no viables que confereixen beneficis per a la salut de l'hoste associats a la modulació de la microbiota (31).

L'objectiu principal dels prebiòtics és estimular el creixement i l'activitat dels bacteris beneficiosos en el tracte gastrointestinal, el que proporciona un benefici per a la salut de l'hoste. Alhora, mitjançant mecanismes que inclouen antagonisme, com ara producció de substàncies antimicrobianes, i la competència per l'adhesió epitelial i pels nutrients, la microbiota intestinal actua com una barrera per als patògens (26).

Els prebiòtics es troben de forma natural en aliments com la llet materna, la soja, la civada crua, el blat i l'ordi no refinat i en hidrats de carboni no digeribles. Tot i això, els prebiòtics també es poden sintetitzar artificialment, d'entre els quals en destaquen compostos del grup de fructans com ara la lactulosa, la inulina, els fructooligosacàrids (FOS), els galactooligosacàrids (GOS), les ciclodextrines i la lactosacarosa, entre d'altres. Es creu que la inulina i la lactulosa són els més utilitzats i efectius en relació amb moltes espècies de probiòtics (19,25,26).

Els prebiòtics són majoritàriament fibres, aliments no digeribles que estimulen selectivament el creixement i l'activitat d'alguns gèneres de microorganismes del colon, sent els *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* els més comuns. Aquests productes poden servir com a medi d'alimentació per a probiòtics, estimulants el seu creixement (26). Aquestes fibres dietètiques, que estan compostes per carbohidrats, resisteixen la hidròlisi dels enzims digestius de l'intestí prim i són fermentades per la microbiota del colon. Dins dels tipus de carbohidrats en destaquen: el midó resistent (midó i els seus productes de degradació), polisacàrids del tipus no-midó (cel·luloses, hemicel·luloses, pectines), inulina i oligosacàrids (FOS, GOS) (32). FOS i GOS són productes d'hidròlisi de la inulina i estan formats per oligosacàrids amb diferents graus de polimerització de cadena llarga d'origen vegetal. Aquests tipus de fibres són de gran interès ja que han demostrat incrementar els nivells de *Bifidobacterium* fecal i el número de limfòcits i leucòcits en el GALT i en la sang perifèrica (2,19,26).

Entre els productes derivats de la fermentació dels prebiòtics per part de la microbiota, en destaquen els àcids grassos de cadena curta o volàtils (AGV). Els AGVs actuen com a font d'energia per la mucosa del colon i es componen principalment d'acetat, propionat i butirat, juntament amb altres metabòlits i gasos que es produeixen després de la

fermentació (27,32). L'AGV més interessant pel que fa a la regulació de la microbiota és el butirat ja que és principalment metabolitzat pels bacteris colonicomensals, on actua com a substrat preferent i regula el creixement i la diferenciació cel·lular per diferents mecanismes (32).

A part d'actuar com a font d'energia, els AGV també presenten altres funcions fisiològiques importants com disminuir el pH luminal, el que afavoreix la supervivència dels bacteris beneficiosos i alhora inhibeix el creixement i la viabilitat de patògens, i també influeixen en la motilitat intestinal (27,32). A més, els AGV actuen com a molècules de senyalització reduint la producció de citocines proinflamatòries i augmentant la població de cèl·lules Treg en l'intestí gros. També incrementen la secreció de IgA per part del GALT, el que estimula la funció fagocítica dels macròfags intrainflamatoris (32).

Tot i que els prebiòtics tenen un gran potencial per modificar la microbiota, aquesta capacitat és molt variable a nivell de soques i espècies individuals. A més, l'entorn intestinal, especialment el pH, té un paper fonamental en la determinació de la competència entre espècies (26). És per això que la quantitat i composició dels diferents AGV i gas produïts després de la fermentació per part de la microbiota dependrà del tipus de prebiòtic. Per tant, és de gran importància seleccionar diferents tipus de fibres prebiòtiques en base als seus potencials efectes en el colon per a la prevenció i el tractament d'algunes malalties inflamatòries específiques (32).

De la mateixa manera que en els probiòtics, també hi ha certs requisits que els compostos alimentaris han de presentar per ser seleccionats com a prebiòtics. Segons Wang (33), hi ha cinc criteris bàsics per la classificació d'aliments com a prebiòtics. El primer i més important és que els prebiòtics no han de ser digerits (o només parcialment digerits) per les parts superiors del tracte gastrointestinal. D'aquesta manera, s'assegura que arriben al colon on poden ser selectivament fermentats per bacteris potencialment beneficiosos, el que vindria a ser el segon criteri. També cal que la fermentació doni lloc a un increment en la producció o un canvi en l'abundància relativa dels diferents AGV, un augment en la massa fecal, una reducció en el pH colònic i una millora del sistema immunitari, el que es tradueix en un benefici per l'hoste (tercer criteri). Es considera un altre criteri l'estimulació selectiva del creixement i/o de l'activitat dels bacteris intestinals potencialment associats a la protecció i al benestar de la salut. Per últim, s'assumeix que un prebiòtic ha de ser capaç de resistir les condicions de processament dels aliments i que es mantingui intacte, no degradat ni químicament alterat, i que per tant, es trobi disponible per al metabolisme dels bacteris intestinals.

És important a l'hora d'ingerir prebiòtics escollir la dosi òptima. S'ha observat que quan són ingerits en quantitats correctes, els prebiòtics no estimulen cap efecte advers. Per contra, si s'administra una sobredosis d'aquests es poden manifestar efectes com flatulències i diarrea, susceptibilitat a la llum ultraviolada o lesions hepàtiques causades per antibiòtics. També s'ha demostrat que les substàncies prebiòtiques no són al·lèrgiques i que no incrementen l'abundància de gens de resistència als antibiòtics (26).

4.5. Simbiòtics

A vegades per millorar o incrementar l'eficàcia terapèutica, s'utilitzen aliments o suplementos alimentaris compostos tant per probiòtics com per prebiòtics. Aquests compostos es coneixen amb el terme de simbiòtics. L'eficiència de la combinació d'ambdós productes es deu en part a que els prebiòtics poder actuar com a substrats per als probiòtics, alhora que estimulen el seu desenvolupament (34),

Els simbiòtics van ser dissenyats inicialment per incrementar les possibilitats de supervivència dels probiòtics, ja que aquests han demostrat ser força vulnerables a factors com el pH, H₂O₂, àcids orgànics, oxigen o estrès a la temperatura (19). Tot i això, actualment els simbiòtics no només s'usen per millorar la supervivència de microorganismes beneficiosos, sinó també per estimular la proliferació de soques específiques natives presents en el tracte gastrointestinal.

L'estimulació dels probiòtics juntament amb prebiòtics dona lloc a una modulació de l'activitat metabòlica de l'intestí i al manteniment de la bioestructura intestinal, al desenvolupament de la microbiota beneficiosa i a la inhibició dels possibles patògens presents en el tracte gastrointestinal (26). A més, la seva funció pot ser tant complementària com sinèrgica. El fet de ser complementària indica que cada component dins del simbiòtic s'escull de manera independent pel seu efecte potencial de promoure la salut de l'hoste. D'altra banda, al ser sinèrgics implica que el component prebiòtic escollit dona suport a l'activitat d'un probiòtic específic (26,32).

A l'hora de dissenyar un simbiòtic és important seleccionar un probiòtic i un prebiòtic adequat, assegurant-se que tenen un efecte positiu en la salut de l'hoste quan s'usen per separat. Es creu que l'enfoc més adequat és seleccionar aquell prebiòtic que presenta propietats específiques favorables sobre un probiòtic concret i que simultàniament, limita o redueix l'estimulació d'altres microorganismes (19,26). La combinació més eficaç i popular sembla ser aquella formada per bacteris pertanyents

als gèneres *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, juntament amb oligosacàrids com la inulina o els seus derivats, els FOS i GOS (19,26,32).

La ingesta de simbiòtics ha demostrat proporcionar efectes beneficiosos a la salut de l'hoste com ara augmentar els nivells de *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* i equilibrar la microbiota, millorar la funció hepàtica en pacients cirròtics, millorar la capacitat d'immunomodulació i prevenir la translocació bacteriana (19).

4.6. Al·lèrgia a l'ovoalbúmina

Un dels al·lèrgens alimentaris més ben estudiats i establerts és l'ovoalbúmina (OVA) derivada de la clara d'ou. Aquest està àmpliament descrit al desenvolupar una reacció d'hipersensibilitat regulada per IgE (16,35). Alhora, l'OVA és l'al·lèrgen més freqüent en models animals d'al·lèrgies experimentals, en els quals s'observen nivells elevats d'IgE i d'Igs específics d'OVA (IgE, IgG i IgA) en sèrum (36). Això és degut a què la sensibilització a l'OVA i els tractaments aguts provoquen una resposta inflamatòria generalitzada, de manera que s'ha descrit com un bon model per l'estudi de malalties inflamatòries agudes (37).

En el model d'al·lèrgia a la OVA s'ha observat fàcilment l'activació de la resposta Th1 i Th2. Més concretament, en els organismes sensibilitzats s'ha detectat una activació de cèl·lules CD4+ i CD8+ , juntament amb l'alliberació de citocines Th2 en resposta a la presència de l'al·lèrgen. Aquesta resposta Th2 majoritària generalment implica un augment de les IL-4, IL-5 i IL-13 (37).

El model al·lèrgic d'OVA també és de gran interès degut a què diversos articles científics han demostrat com l'efecte de diversos probiòtics i prebiòtics poden remetre els símptomes relatius a la sensibilització d'OVA. Especialment cal destacar aquells que mostren com l'administració de bacteris del gènere *Lactobacillus* juntament amb prebiòtics com la inulina redueixen significativament la resposta immunitària Th2 i alhora incrementen la producció de citocines Th1 (18,36,38–41).

4.6.1. Model animal d'al·lèrgia a OVA

Els models murins, comparats amb altres models animals, presenten moltes característiques pròpies de les al·lèrgies que són similar a les que presenten els humans. Algunes d'aquestes similituds inclouen respostes inflamatòries immediates i tardanes després d'un tractament agut, producció d'IgE i acumulació de cèl·lules inflamatòries entre altres. D'aquesta manera, els resultats dels estudis en murins es

poden extrapolar als humans, el que és un dels avantatges principals (37,42). També és d'important rellevància que els models murins són fàcilment sensibilitzats amb OVA (37,43).

Pel que fa a quin model murí és més idoni per a l'estudi de les al·lèrgies alimentàries, els ratolins presenten l'avantatge d'induir símptomes al·lèrgics significatius més fàcilment (44). Específicament, la soca de ratolí BALB/c ha estat molt emprada en estudis d'al·lèrgies alimentàries a la OVA per la seva alta resposta vers IgE (16,35,42,44–47).

Pel que fa a l'elecció del sexe dels ratolins, múltiples estudis constaten que les femelles presenten una resposta significativament més elevada respecte els mascles (35,42). A més, en l'elecció de l'edat més idònia per a dur a terme la inducció d'aquest tipus d'al·lèrgia, considerables estudis han demostrat com l'etapa adulta inicial -6-8 setmanes d'edat- és l'opció més adient per a una eficient resposta immunitària (35,45,46).

A nivell de bibliografia hi ha una gran variabilitat de models d'inducció de l'al·lèrgia a l'OVA, sobretot pel que fa al mètode d'administració d'OVA, el nombre d'injeccions, el nombre de tractaments aguts i l'administració d'adjuvants (37). *Dearman et al.* (48) va comparar la capacitat de l'OVA per estimular la producció d'anticossos específics d'IgE i IgG en ratolins després d'una exposició parenteral (intraperitoneal) o oral (intragàstica), i va demostrar que només l'exposició intraperitoneal d'OVA estava associada a una forta producció d'anticossos IgE. *Perrier et al.* (46) va comparar l'administració de l'al·lèrgen per via intraperitoneal i intravenosa i va arribar a la mateixa conclusió que *Dearman et al.* (48). *Chen et al.* (42) va comparar diferents dosis d'al·lèrgen i freqüències de sensibilització i va concloure que la dosi òptima corresponia a 0,05 mg d'OVA administrats cada 3 dies un total de 5 vegades. També va determinar que per veure resultats significatius, la durada de l'estudi no havia de ser inferior a 28 dies. Ambdós autors van realitzar un seguiment dels valors d'IgE i IgG específics per l'OVA per tal de monitoritzar una correcta inducció de la sensibilització a l'al·lèrgen. Per visualitzar una resposta immunitària més augmentada, recomanaven l'ús d'adjuvants amb base d'alumini ja que aquests són coneguts per establir una resposta incrementada de Th2 (44).

Diversos articles científics relacionats amb l'al·lèrgia a l'OVA duen a terme tractaments aguts de l'al·lèrgen al final del procés de sensibilització per veure més clarament la situació real del sistema immunitari (37). La metodologia que es segueix generalment és subministrar entre 80-100 mg d'OVA sense adjuvant per via intragàstica mitjançant una cànula després d'1-2 setmanes després de l'última dosi de sensibilització

(39,46,47). Per fer més evident la resposta immunològica, i per tant, obtenir nivells d'immunoglobulines més elevats, *Tanabe et al.* (49) va dur a terme dos tractaments aguts en un període de 3 dies de diferència, sent l'últim d'ells realitzat el dia del sacrifici.

4.6.2. Efectes del tractament amb *Lactobacillus* sobre l'al·lèrgia a OVA

Diferents investigacions científiques han demostrat que els bacteris d'àcid làctic (BAL), ja siguin vius o morts per calor, alleugen els símptomes al·lèrgics modulant les respostes Th1/Th2 cap a un estat dominant Th1 (no al·lèrgic) (**Taula 1**) (50–53).

Taula 1. Conjunt d'estudis que mostren com l'ús de probiòtics pertanyents al grup de BAL redueixen la resposta immunològica associada a la sensibilitat a l'OVA.

Estudi	Tractament	Resultat
<i>Hougee et al.</i> (50)	<i>Lactobacillus plantarum</i> NumRes8	Disminució nivells IgE però no dels nivells d'IgG1
<i>Shin et al.</i> (51)	Mescla probiòtica: <i>Lactococcus lactis</i> KF140, <i>Pediococcus pentosaceus</i> KF159, <i>Lactobacillus pentosus</i> KF340, <i>Lactobacillus paracasei</i> 698 i <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 26N	Disminució nivells IgE totals i associats a OVA
<i>Wu et al.</i> (52)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Disminució dels nivells d'IgE associats a OVA
<i>Kim et al.</i> (53)	<i>Bifidobacterium lactis</i> AD011 i <i>Lactobacillus acidophilus</i> AD031.	Disminució dels nivells d'IgE i IgG1.

Dins del grup de BAL, el gènere *Lactobacillus* destaca com a component principal dels probiòtics emprats per a la prevenció o reducció dels símptomes associats a les al·lèrgies alimentàries i en concret, l'al·lèrgia a la OVA (36).

Bacteris del gènere *Lactobacillus* han demostrat exercir efectes antial·lèrgics tant en les citocines alliberades per l'estimulació de cèl·lules Th1 com Th2, incloent la inducció d'IL-12 (canvia el patró de producció de citocines d'un predomini Th2 a un Th1) i la reducció d'IL-4 (estimula una resposta proinflamatòria i per tant, produint IgE) (36). Altres efectes observats per aquest gènere de bacteris són la reducció del nombre d'eosinòfils i dels nivells d'IgE específics a l'OVA en murins sensibles a la OVA (50), la inducció de cèl·lules Treg (54) i una elevada producció i secreció de IgA en la mucosa intestinal (20).

Dins del gènere *Lactobacillus*, en destaca l'espècie *Lactobacillus plantarum* pels seus nombrosos efectes beneficiosos com agent anticancerígen, anticoagulant, antiviral, modulador immune, antiinflamatori i antioxidant (40). També cal mencionar la seva elevada potència immunomoduladora al induir elevats nivells IFN γ en cèl·lules

mononuclears de sang perifèrica humana (36) i inhibir la via de senyalització del factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres kappa de les cèl·lules B activades (NF- κ B), el que reafirma la seva capacitat d'induir tolerància a antígens alimentaris (55). Aquesta espècie també ha demostrat potenciar l'activació de cèl·lules Th1 i Treg en els nòduls limfàtics mesentèrics i incrementar els nivells de TGF- β , reduint així els nivells generalitzats d'inflamació (56). Més concretament en el model d'al·lèrgia a la OVA, *L. plantarum* ha mostrat ser capaç d'induir la síntesi de IL-12 i alhora reduir IL-4 i IL-6 (57). Un altre tret important a l'hora d'usar *L. plantarum* com a probiòtic per al tractament d'al·lèrgia a l'OVA és que ha estat recurrentment usat formant part de combinacions simbiòtiques i els seus efectes al reduir els nivells d'inflamació s'han mantingut (26).

4.6.3. Efectes del tractament amb inulina sobre l'al·lèrgia a OVA

Tal i com s'ha mencionat anteriorment, els prebiòtics més ben definits i estudiats són els fructans, i dins d'aquests, la inulina és un dels més definits.

Recents articles científics han demostrat com l'ús de prebiòtics fructans del tipus inulina en ratolins augmenta significativament el número de bifidobacteris, alhora que redueix els nivells de lipopolisacàrids i la probabilitat de desenvolupar tolerància a la glucosa i matèria greixosa. Aquests efectes estan associats amb l'increment dels nivells de butirats i la disminució del pH (58), que alhora afecten tant a la composició com a l'activitat de la microbiota (59). També s'ha observat com la inulina, juntament amb diversos probiòtics, és capaç de reduir efectes com la diarrea i els nivells d'inflamació en models inflamatoris d'al·lèrgia (19). Aquest efecte es deu a que la inulina modula el sistema immunològic tant a nivell del sistema gastrointestinal com a nivell sistèmic, reduint la severitat de les respostes al·lèrgiques induïdes. La principal mostra d'aquest efecte és l'increment de citocines Th1 com l'interferó gamma (IFN- γ) i la citocina reguladora IL-10, juntament amb un increment de la resposta de cèl·lules Treg (59).

A part dels seus efectes beneficiosos en situacions d'inflamació, la inulina també s'ha vist relacionada amb millores metabòliques com la pèrdua de pes, la reducció de nivells de triacilglicèrids en fetge i una menor susceptibilitat a danys hepàtics induïts per fàrmacs (41).

4.6.4. Efectes del tractament simbiòtic sobre l'al·lèrgia a OVA

En nutrició humana, una de les combinacions de simbiòtics més eficaces segons diversos estudis preclínic és l'ús de bacteris del gènere *Lactobacillus* i inulina (26).

Diversos articles han mostrat com la presència del prebiòtic inulina promou i augmenta tant l'estabilitat com la viabilitat de *L. plantarum* en el tracte gastrointestinal (60–62).

En una investigació on es van comparar diverses combinacions de simbiòtics, la formada per bacteris del gènere *Lactobacillus* i inulina va inhibir la via de senyalització NF- κ B i va reduir la producció del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (63). En un altre estudi amb model animal murí, la combinació simbiòtica de *L. plantarum* i inulina va incrementar els nivells d'IgA intestinal (64). També s'ha demostrat en altres articles com la combinació esmentada, a part de reafirmar la seva capacitat immunomoduladora reduint els marcadors d'inflamació proinflamatoris (IL-6, NF κ B), també presenta capacitats prodiferenciadores i antiproliferatives (65,66).

5. HIPÒTESI I OBJECTIUS

Tal i com s'ha explicat anteriorment, prebiòtics i probiòtics han demostrat tenir un efecte en la disminució dels símptomes relatius a les al·lèrgies alimentàries. Per això, en aquest treball es planteja la següent hipòtesi: el tractament amb el probiòtic *Lactobacillus plantarum*, el prebiòtic inulina i una combinació d'ambdós per veure el seu efecte sinèrgic, poden prevenir el desenvolupament de l'al·lèrgia alimentària a l'ovoalbúmina i, com a conseqüència, reduir els processos inflamatoris i efectes clínics associats, en un model murí.

Per comprovar tal hipòtesi, es presenta el següent objectiu:

Comprovar l'eficàcia dels tractaments amb *Lactobacillus plantarum* i inulina, per separat, i en combinació en forma de simbiòtic en la remissió dels símptomes associats a l'al·lèrgia a l'ovoalbúmina.

6. MATERIALS I MÈTODES

6.1. Animals

Com a model d'estudi es van utilitzar 50 ratolins BALB/c femella de 6 setmanes d'edat, comprats a Envigo (Barcelona, Espanya). Els ratolins es van alimentar *ad libitum* amb dietes lliures d'ovoalbúmina (OVA) subministrades per Envigo i aigua al llarg de tot l'estudi. Les condicions de l'estabulari es van mantenir a 22°C, 50% d'humitat relativa i cicles de llum-fosc de 12:12-h.

El comitè d'Ètica Animal d'Eurecat-Reus (Reus, Espanya) i la Generalitat de Catalunya van aprovar tots els procediments.

6.2. Al·lèrgen

L'al·lèrgen escollit va ser l'ovoalbúmina (Sigma Aldrich, Madrid, Espanya). L'al·lèrgia a l'OVA es va induir mitjançant una injecció intraperitoneal de 50µg d'OVA junt amb hidròxid d'alumini (Sigma Aldrich, Madrid, Espanya) com coadjuvant, un total de cinc vegades durant dues setmanes. La solució de tractament contenia 0,5mg/mL d'OVA i 50mg/mL d'hidròxid d'alumini en PBS.

Primer es va preparar una solució d'OVA de 2mg/mL i posteriorment, es va preparar la solució d'OVA-alumini afegint-hi hidròxid d'alumini en PBS. La solució es va incubar en rotació durant 4 hores a 4°C per a la completa absorció de l'alumini.

6.3. Dietes i tractaments

Durant l'estudi es van administrar tres tractaments diferents:

1. Probiòtic: el microorganisme emprat va ser *Lactobacillus plantarum*.
2. Prebiòtic: la fibra emprada va ser la inulina, que estava incorporada en la dieta degut a la seva baixa solubilitat en aigua.
3. Simbiòtic: combinació del probiòtic i del prebiòtic mencionats anteriorment.

Al llarg de tot l'estudi es van utilitzar dietes lliures d'OVA per no interferir en el procés de sensibilització a l'OVA.

Es van utilitzar dues dietes isocalòriques diferents en funció dels diferents tractaments dels animals: (1) una dieta control amb un 10% de cel·lulosa com a font principal de fibra (100 g/Kg) i (2) una dieta amb un 10% de inulina com a font principal de fibra (107,53

g/Kg). Degut a què aquesta última dieta contenia una inulina al 93%, va caler incrementar la quantitat d'inulina per tal que ambdós dietes continguessin el mateix contingut en fibra. La composició d'ambdós dietes es mostra a la **Taula 2**.

Taula 2. Composició nutricional de les dietes emprades en l'estudi.

Composició	Dieta control	Dieta amb 10% d'inulina
Caseïna (g/kg)	140	140
L-Cistina (g/kg)	1,8	1,8
Midó (g/kg)	415,69	415,69
Maltodextrina (g/kg)	155	155
Sacarosa (g/kg)	100	92,47
Oli de soja (g/kg)	40	40
Cel·lulosa (g/kg)	100	0
Inulina (g/kg)	0	107,53
Mix de minerals, AIN-93M-MX (94049)	35	35
Mix de vitamines, AIN-93-VX (94047)	10	10
Bitartrat de colina	2,5	2,5
TBHQ, antioxidant	0,008	0,008

6.4. Disseny Experimental

6.4.1. Grups Experimentals

Després d'una setmana d'adaptació, els animals es van distribuir en un total de 5 grups segons el tractament que van rebre (n=10) (**Figura 3**):

1. **Control (CON)**: els ratolins van rebre placebo com a tractament (maltodextrina) i van ser alimentats amb la dieta control *ad libitum*. Durant les dues setmanes de sensibilització se'ls hi va injectar tampó fosfat salí (PBS, en anglès). Durant els dos dies de tractament agut d'OVA se'ls hi va administrar PBS.
2. **Ovoalbúmina (OVA)**: els ratolins van rebre placebo com a tractament i van ser alimentats amb la dieta control *ad libitum*. Durant les dues setmanes de sensibilització se'ls hi va injectar OVA (50µg) junt amb hidròxid d'alumini. Durant els dos dies de tractament agut se'ls hi va administrar OVA (100mg).
3. **Lactobacillus (LAC)**: els ratolins van ser tractats amb *L. plantarum* a una dosi de 10⁹ unitats formadores de colònies (UFC)/dia i alimentats amb la dieta control *ad libitum*. Durant les dues setmanes de sensibilització se'ls hi va injectar OVA (50µg) junt amb hidròxid d'alumini. Durant els dos dies de tractament agut se'ls hi va administrar OVA (100mg).

4. **Inulina (INU)**: els ratolins van rebre placebo com a tractament i van ser alimentats amb la dieta al 10% d'inulina *ad libitum*. Durant les dues setmanes de sensibilització se'ls hi va injectar OVA (50µg) junt amb hidròxid d'alumini. Durant els dos dies de tractament agut se'ls hi va administrar OVA (100mg).
5. **Combinació (COMB)**: els ratolins van ser tractats amb *L. plantarum* a una dosi de 10⁹ UFC/dia i alimentats amb la dieta al 10% d'inulina *ad libitum*. Durant les dues setmanes de sensibilització se'ls hi va injectar OVA (50µg) junt amb hidròxid d'alumini. Durant els dos dies de tractament agut se'ls hi va administrar OVA (100mg).

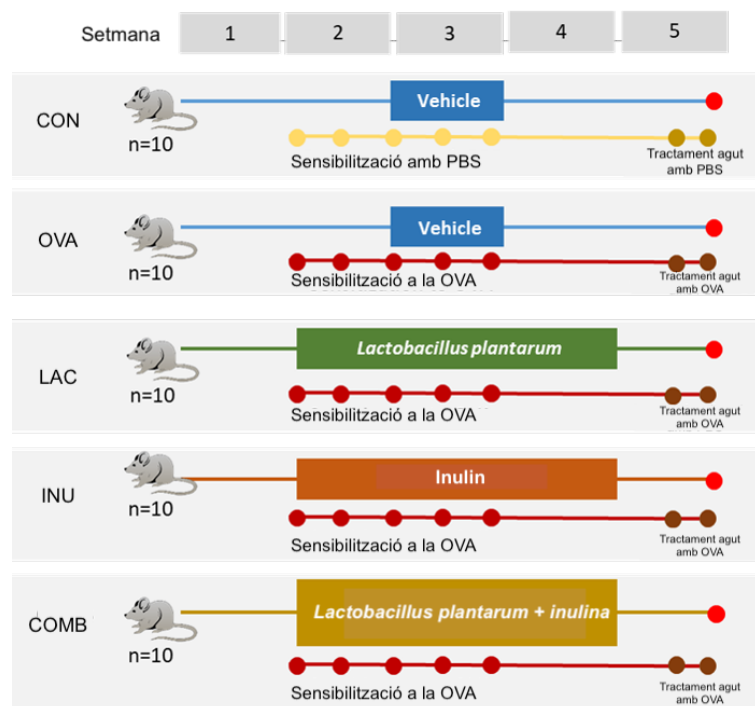


Figura 3. Condicions dels diferents grups experimentals.

6.4.2. Sensibilització OVA i Sacrifici

L'administració dels diferents tractaments es va iniciar una setmana abans de la primera sensibilització a l'OVA i es van mantenir fins completar les cinc setmanes de l'estudi.

La sensibilització a l'OVA es va dur a terme durant les setmanes dos i tres del tractament, on es van administrar cinc dosis d'OVA i coadjuvant via intraperitoneal, tal i com s'ha descrit anteriorment. La solució es va subministrar amb xeringues d'1mL (BD Plastipak, Madrid, Espanya) i agulles de 25G (BD Plastipak, Madrid, Espanya).

Durant la cinquena setmana de tractament es van realitzar dos tractaments aguts d'OVA (100mg) sense coadjuvant mitjançant una sonda intragàstrica; els dos tractaments es van dur a terme amb una diferència de tres dies i es van administrar a temperatura

ambient. Els tractaments aguts d'OVA es van realitzar amb els animals individualitzats amb gàbies sense menjar i sense serradures.

Després del segon i últim tractament agut es van sacrificar els animals sota anestèsia general amb pentobarbital sòdic (Sigma Aldrich, Madrid, Espanya) a una concentració de 100 mg/kg mitjançant punció cardíaca. La sang es va recollir en eppendorfs heparinitzats. El plasma es va obtenir per centrifugació (2000 g, 15 min, 4°C) i emmagatzemat a -80°C fins al moment d'ús. Durant el sacrifici es van obtenir els teixits relacionats amb el sistema immunitari (melsa) i amb la resposta a nivell intestinal (intestí prim i colon). Es va mesurar el pes i longitud dels diferents teixits i es van emmagatzemar en nitrogen líquid fins la seva congelació a -80°C.

6.5. Determinacions

6.5.1. Determinacions durant l'estudi

Control de la ingesta i el pes corporal

Es va registrar el pes corporal dels animals un cop per setmana. També es va determinar el pes del pinso ingerit i de la ingesta líquida un cop per setmana, registrant el pes del pinso i aigua consumida per cada gàbia d'animals en un període de 24 hores.

Determinació dels nivells plasmàtics de IgE i IgG1

Durant els dies 15, 21 i 27 de tractament es van realitzar extraccions de sang per vena safena mitjançant capil·lars amb EDTA (Sarsted, Barcelona, Espanya). Es va obtenir el plasma mitjançant centrifugació a 2000g durant 15 minuts a 4°C.

La determinació dels nivells de IgE (Cayman Chemicals, Michigan, Estats Units) i IgG1 (Cayman Chemicals, Michigan, Estats Units) específics contra la OVA es va realitzar mitjançant assajos ELISA seguint les indicacions del fabricant.

6.5.2. Determinacions al final de l'estudi

Conservació i tractament dels teixits

Un cop sacrificats els animals es van disseccionar els següents teixits: (1) melsa: es va pesar per determinar l'índex de pes com a marcador d'inflamació sistèmica. (2) Intestí prim: es va disseccionar, pesar i mesurar la seva longitud per estudiar la relació pes/longitud com a mesura d'inflamació. (3) Colon: es va disseccionar, pesar i mesurar la seva longitud per determinar el ràtio pes/longitud com a mesura d'inflamació. Tots els teixits es fan emmagatzemar a -80°C fins al moment de dur a terme les corresponents determinacions.

Quantificació de l'expressió gènica en ili i colon

En primer lloc es va fer una extracció de RNA per precipitació dels diferents teixits a partir d'uns 15-30mg d'ili i de colon. Breument, ambdós teixits es van homogeneïtzar amb TriPure Isolation Reagent (Roche, Sant Cugat del Vallès, Espanya) amb l'homogeneïtzador TissueLyser (Qiagen, Madrid, Espanya) i boles d'homogeneïtzació de 7mm (Qiagen, Madrid, Espanya). La purificació del RNA es va dur a terme mitjançant rentats amb compostos orgànics. La quantitat i qualitat del RNA extret es va determinar mitjançant un nanoespectrofotòmetre (IMPLEN, Barcelona, Espanya).

Per cada mostra es va sintetitzar cDNA a partir d'1µg de RNA mitjançant el kit comercial High Capacity cDNA Transcription Kit (Life Technologies, Madrid, Espanya) amb l'equip Termocycle MG P6 G (LongGene Scientific, Xina).

La determinació de l'expressió gènica es va realitzar mitjançant PCR quantitatives (qPCR) amb SYBR Green I Master (Roche, Sant Cugat del Vallès, Espanya) en un aparell LightCycler 480 II (Roche, Sant Cugat del Vallès, Espanya). Les qPCR es van realitzar amb plaques de 384 pous (Roche, Sant Cugat del Vallès, Espanya), amb el cDNA corresponents a 10ng de RNA total, amb els oligonucleòtids específics per cada gen (**Taula 3**) (0.2 µM) en 10µL de volum total per reacció i per mostra. L'expressió de cada mostra per cada gen es va realitzar per triplicats. Per calcular l'expressió es va utilitzar el mètode $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalitzant l'expressió de cada mostra per la corresponent expressió del gen de referència.

En els dos teixits, en ili i en colon, es van determinar els nivells d'expressió dels gens TNF α , IL1b i IL23 com a gens pro-inflamatoris i IL10 i TGF β com a gens anti-inflamatoris; com a gens de referència es van utilitzar UBC i HPRT.

Taula 3. Primes utilitzats en la determinació de l'expressió gènica (qPCR). Tm: temperatura de melting; %GC: percentatge de guanina i citosina.

Gen	Primer Forward			Primer Reverse		
	Seqüència	Tm	%GC	Seqüència	Tm	%GC
TNF-α	AAGTCAACCTCCTCTCTGCC	59,02	55	TGGATGAACACCCATTCCCT	58,62	50
IL1-b	CCTCACAAGCAGAGCACAAG	59,13	55	GTTTCTTGTGACCCTGAGCG	59,13	55
IL-23	AGCAGCTCTCTCGGAATCTC	58,97	55	TGTCCTTGAGTCCTTGTGGG	59,24	55
IL-10	ACCTGGTAGAAGTGATGCC	59,09	55	ACACCTTGGTCTTGGAGCTT	59,15	50
TGF-β	CATGCCAACTTCTGTCTGGG	58,83	55	TAGTAGACGATGGGCAGTGG	58,60	55
UBC	CCAAGAAGGTCAAACAGGAAGA	58,18	45,45	GGAAAATAAGACACCTCCCC	57,93	52,38
HPRT	AGTCCCAGCGTCGTGATTAG	59,54	55	CCTCCCATCTCCTTCATGACAT	59,29	50

6.6. Estadística

Els resultats es presenten com mitja \pm error estàndard de mitjana (SEM). L'efecte dels tractaments en l'evolució del pes, la ingesta i els nivells plasmàtics de IgE i IgG1 es va analitzar mitjançant l'anàlisi de variància (ANOVA) de mesures repetides (efecte temps (t); efecte tractament (T) i efecte interacció temps x tractament (t x T) . Els nivells de IgE i IgG1 també es van analitzar mitjançant el mètode de mesura de l'àrea sota la corba (AUC). Per analitzar diferències significatives en els teixits i en l'expressió gènica dels diferents grups es va dur a terme una ANOVA d'1 via, seguit d'un test de Duncan *post hoc*. El test de Grubbs es va emprar per detectar outliers, els quals van ser descartats abans dels anàlisis posteriors. Tots els anàlisis estadístics es van realitzar utilitzant el software estadístic IBM SPSS Statistics 25.0 (SPSS, IBM Corp. Armonk, NY, Estats Units). Els p valors <0.05 es van considerar estadísticament significatius.

7. RESULTATS

7.1. Determinacions durant l'estudi

7.1.1. Control de la ingesta i el pes corporal

En primer lloc es van monitoritzar les ingestes de pinso i d'aigua en un període de 24 hores setmanalment per tal d'observar diferències entre els grups experimentals al llarg de l'estudi (**Figura 4**).

Pel que fa a la ingesta diària de pinso al llarg de l'experiment, l'anàlisi estadístic d'ANOVA de mesures repetides va mostrar un efecte temps (t), tractament (T) i interacció temps x tractament (t x T). Tal i com mostra la **Figura 4A**, tot i observar diferències significatives entre els diferents grups d'estudi en les setmanes 1, 3 i 4 de l'estudi, no es va observar un comportament constant entre els diferents grups, els quals van mostrar una elevada variabilitat entre setmanes. Únicament el grup tractat amb la combinació del probiòtic i la inulina (COMB) va mostrar un increment significatiu dels nivells d'ingesta acumulada de pinso al llarg de l'estudi en comparació amb el grup control (CON) (**Figura 4B**).

Per altra banda, en la ingesta diària d'aigua al llarg de l'experiment, l'anàlisi estadístic d'ANOVA de mesures repetides també va mostrar un efecte temps (t), tractament (T) i interacció temps x tractament (t x T). En la **Figura 4C** es mostren diferències significatives entre els diferents grups les setmanes 1, 3 i 4. Concretament, es va observar que en les dues últimes setmanes de l'estudi i després del procés de sensibilització, els tres grups tractats (LAC, INU i COMB) van mostra una reducció en la ingesta d'aigua respecte els grups control positiu (OVA) i negatiu (CON). En l'anàlisi de la ingesta acumulada d'aigua al llarg de l'experiment (**Figura 4D**) també es va observar una reducció significativa de la ingesta líquida, en primer lloc entre el grup control i el grup OVA i grups tractats, i alhora entre el grup OVA i els diferents tractaments administrats.

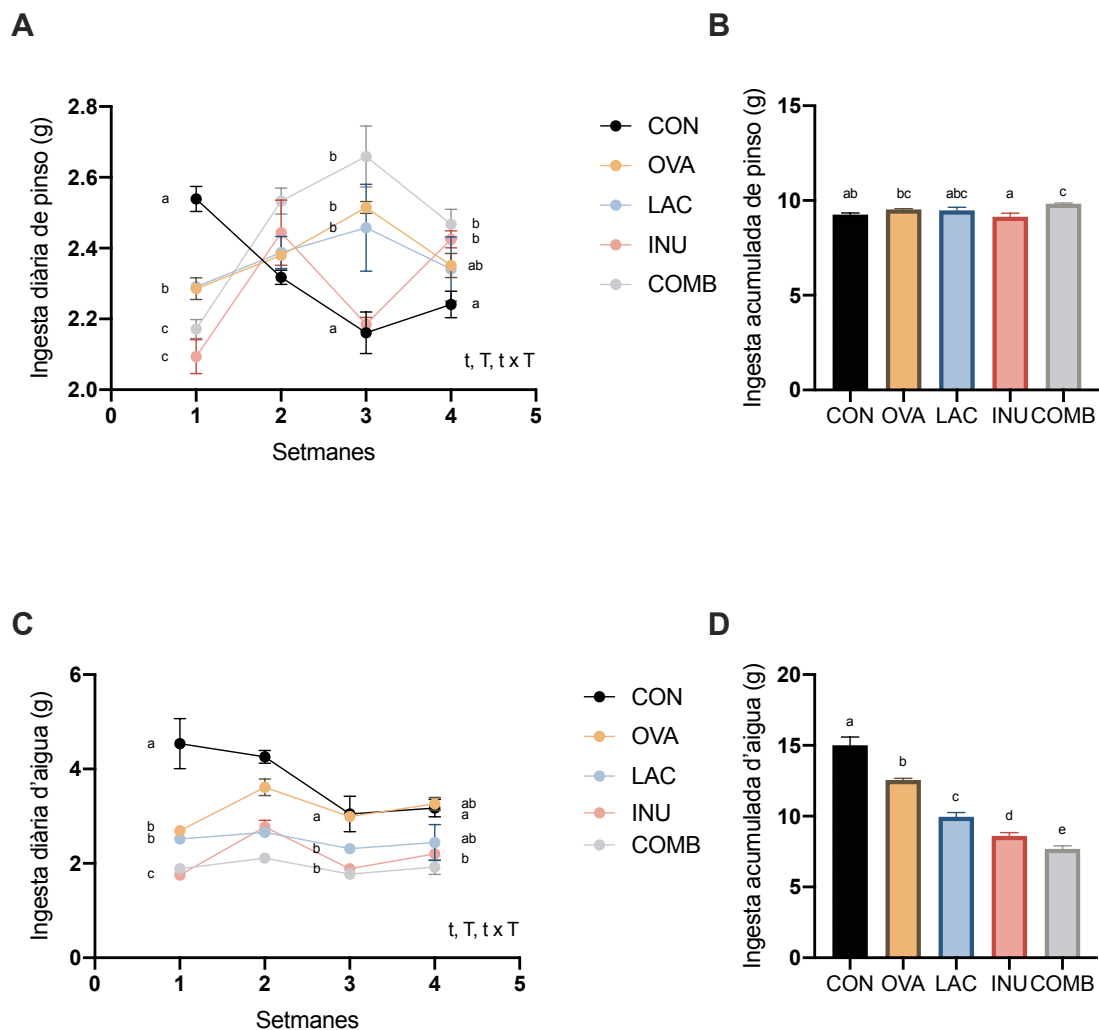


Figura 4. Nivells d'ingesta diaris de pinso (A) i aigua (B) durant l'experiment i ingesta acumulada de pinso (B) i aigua (C) al final de l'estudi. Les dades s'expressen com mitjanes \pm SEM. En els resultats dels nivells d'ingesta diària de pinso i aigua (A, C) es mostren els resultats de l'anàlisi estadística ANOVA de mesures repetides (t, efecte temps; T, efecte tractament; t x T, efecte interacció temps x tractament). En els resultats dels nivells d'ingesta diària de pinso i aigua (A, C) i en els resultats de la ingesta acumulada de pinso i aigua (B, D) es mostren els resultats de l'anàlisi estadística ANOVA d'1 via i la comparació post-hoc amb el test de Duncan (en relació als tractaments, els valors mitjos representats per diferents lletres són significativament diferents entre ells, $p < 0,05$).

Pel que fa al monitoratge del pes corporal durant l'estudi (**Figura 5A**), tot i que es va observar una tendència a augmentar el pes corporal durant l'experiment, no hi van haver diferències significatives entre els diferents grups al llarg de l'estudi. En l'anàlisi de l'increment de pes corporal (**Figura 5B**) tampoc es van trobar diferències entre els diferents grups experimentals.

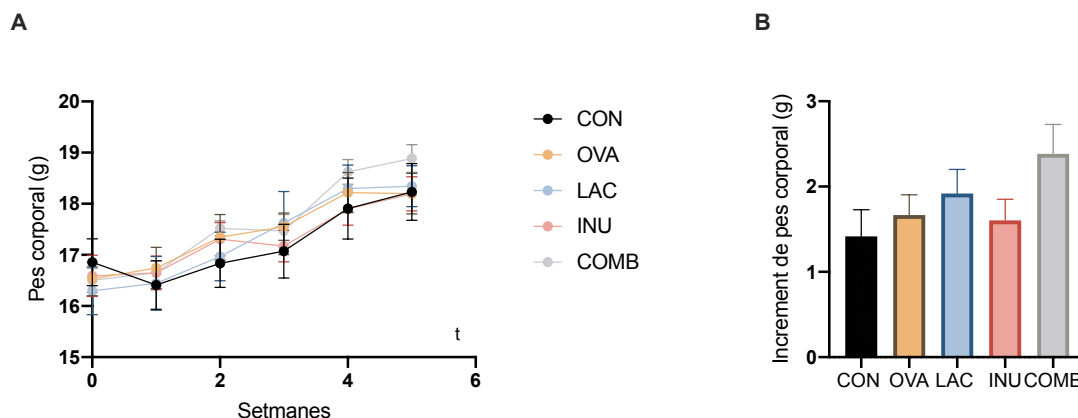


Figura 5. Variació de pes corporal al llarg de l'estudi (A) i increment de pes corporal al final de l'estudi (B). Les dades s'expressen com mitjanes \pm SEM. En la figura del seguiment del pes corporal al llarg de l'estudi (A) es mostren els resultats de l'anàlisi estadística ANOVA de mesures repetides (t, efecte temps). En els resultats dels nivells de pes corporal (A) i en els resultats de l'increment de pes corporal (B) es mostren els resultats de l'anàlisi estadística ANOVA d'1 via i la comparació post-hoc amb el test de Duncan.

7.1.2. Determinació dels nivells plasmàtics d'IgE i IgG1

Per tal de monitoritzar el procés de sensibilització a l'OVA es van analitzar els nivells d'IgE i d'IgG1 específiques a l'OVA en tres moments diferents al llarg de l'estudi (**Figura 6**), els quals mitjançant l'anàlisi estadística d'ANOVA de mesures repetides van mostrar un efecte temps (t), tractament (T) i interacció temps x tractament (t x T) per ambdues Igs.

Pel que fa al final de la primera setmana de sensibilització, on se'ls hi havia administrat dues dosis d'OVA per a la inducció de l'al·lèrgia a aquesta proteïna (setmana 3 de l'estudi), tots els grups experimentals van presentar nivells basals pel que fa a ambdues Igs, no mostrant diferències entre els diferents tractaments (**Figura 6A i 6C**).

En la quarta setmana de l'experiment, la qual correspon al final de la segona setmana en el procés de sensibilització on els ratolins ja portaven 4 dosis d'OVA, es van observar diferències significatives entre el grup control i els diferents grups sensibilitzats en ambdós Igs, els quals presentaven valors més elevats. No obstant, no es van observar diferències entre els diferents grups de tractament (**Figura 6A i 6C**).

En la última extracció de sang es van analitzar els nivells d'Igs una setmana posterior a la cinquena i última injecció d'OVA. Pel que fa als nivells plasmàtics d'IgE específica d'OVA, es va poder observar un augment significatiu dels valors presents en les mostres dels ratolins sensibilitzats amb OVA respecte el grup control. També es va observar un augment significatiu dels nivells plasmàtics del grup tractat amb la combinació del probiòtic i la inulina (COMB) respecte el grup tractat amb únicament el prebiòtic (INU)

(Figura 6A). Pel que fa als nivells plasmàtics d'IgG1 específica d'OVA, es van trobar valors incrementats dels grups sensibilitzats respecte el grup control, però no es van trobar diferències significatives entre els diferents grups de tractament (Figura 6C).

L'anàlisi de l'àrea sota la corba (AUC) va mostrar ser significativament major en tots els grups sensibilitzats amb l'OVA. Tot i això, no es van trobar diferències significatives pel que fa a l'efecte dels diferents tractaments al llarg del procés de sensibilització, tant pels nivells d'IgE específica a l'OVA (Figura 6B) com pels nivells d'IgG1 específica a l'OVA (Figura 6D).

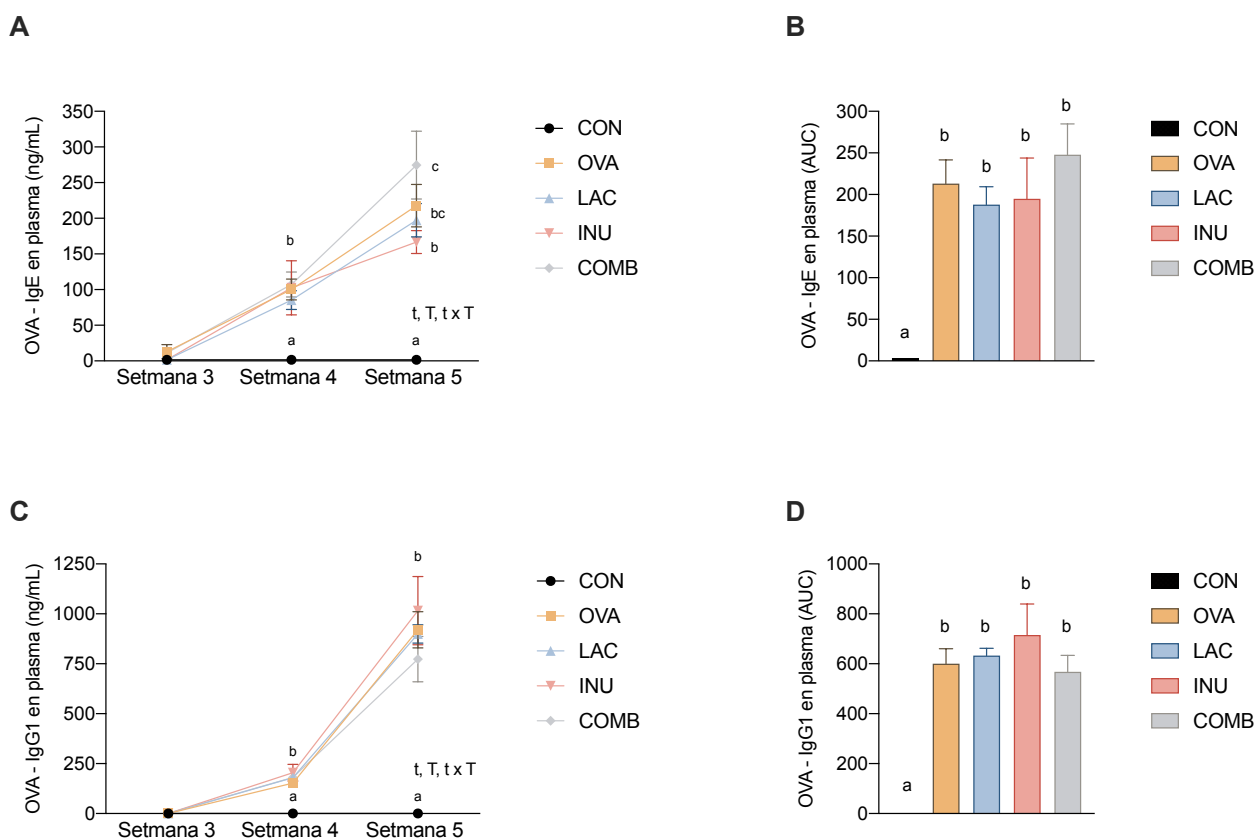


Figura 6. Nivells plasmàtics d'IgE (A) i IgG1 (C) associats a l'OVA durant el període de sensibilització a l'OVA i àrea sota la corba (AUC) dels nivells plasmàtics d'IgE (B) i IgG1 (D) associats a l'OVA. Les dades s'expressen com mitjanes \pm SEM. En els resultats dels nivells plasmàtics d'IgE i IgG1 associats a l'OVA durant la fase de sensibilització (A, C) es mostren els resultats de l'anàlisi estadístic ANOVA de mesures repetides (t, efecte temps; T, efecte tractament; t x T, efecte interacció temps x tractament). En els resultats dels nivells plasmàtics d'IgE i IgG1 associats a l'OVA durant la fase de sensibilització (A, C) i en els resultats de l'àrea sota la corba en ambdós Ig (B, D) es mostren els resultats de l'anàlisi estadístic ANOVA d'1 via i les comparacions post-hoc amb el test de Duncan (en relació als tractaments, els valors mitjos representats amb diferents lletres són significativament diferents entre ells, $p < 0,05$).

Després del procés de sensibilització amb l'OVA es van dur a terme dos tractaments aguts amb OVA per estimular el sistema immunitari i avaluar la resposta de l'organisme a l'entrar en contacte amb l'al·lèrgen. Durant aquests tractaments aguts, vam observar

que els animals pertanyents al grups experimentals als quals se'ls hi havia induït l'al·lèrgia mostraven símptomes de reacció anafilàctica, com la disminució de la temperatura corporal, piloerecció, prostració i una absència de resposta a estímuls (37,45,46,67). A més, un nombre molt elevat d'animals van morir degut a un shock anafilàctic, especialment aquells tractats amb inulina, sent el grup tractat amb el probiòtic el que va mostrar un menor nombre de morts (**Figura 7**).

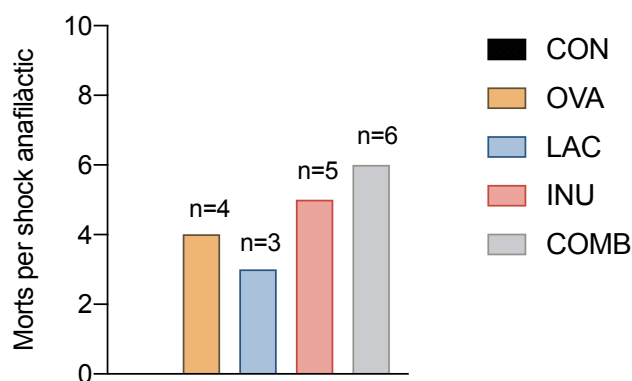


Figura 7. Nombre de morts per shock anafilàctic després del procés de sensibilització degut als tractaments aguts amb OVA. Els valors de "n" representen el nombre de morts en cada grup.

7.2. Determinacions al final de l'estudi

7.2.1. Estudi dels teixits com a marcadors d'inflamació sistèmica

Es van analitzar els teixits associats al sistema immunitari ja que són considerats marcadors d'inflamació, tant pel que fa al propi pes com per la relació pes/longitud dels mateixos.

En primer lloc, pel que fa a la longitud de l'intestí prim (**Figura 8A**) i del colon (**Figura 8C**), tot i que es van trobar una tendència a presentar valors més elevats en els grups sensibilitzats a l'OVA respecte el grup control, la diferència no era significativa. Tampoc es van observar diferències entre els valors dels diferents grups de tractament.

També es va analitzar la ràtio pes/longitud dels mateixos òrgans (**Figura 8B i 8D**) però tampoc es van trobar diferències significatives entre els diferents grups. Tot i això, en ambdós teixits sembla haver-hi una tendència a augmentar el valor en el grup tractat amb la mescla simbiòtica.

Pel que fa al pes de la melsa, tot i no observar-hi diferències significatives entre els diferents grups experimentals, sí que es va poder observar un augment tendencial pel que fa als grups sensibilitzats amb OVA respecte el grup control, sent el grup tractat amb la mescla simbiòtica el que va mostrar el major increment (**Figura 8E**).

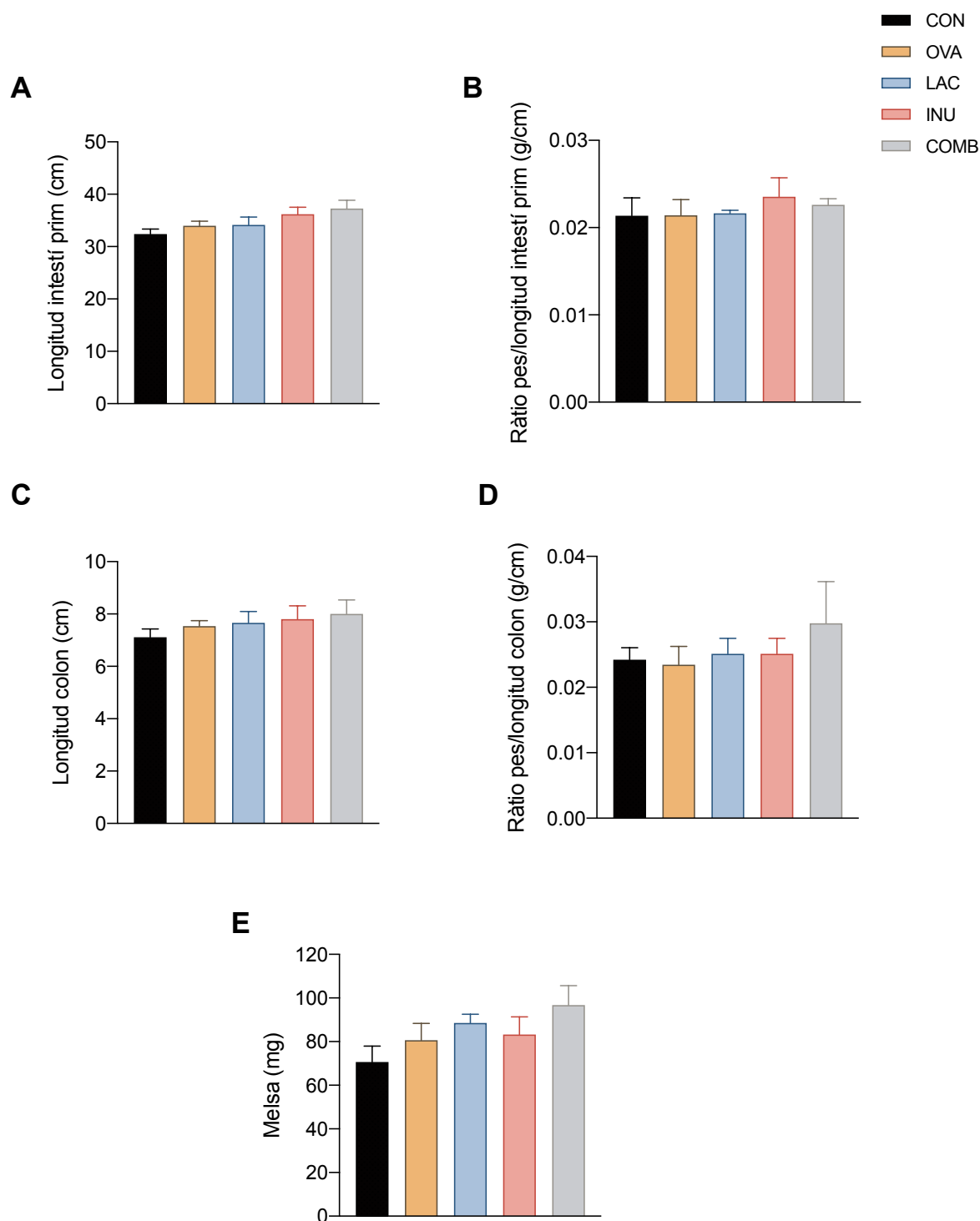


Figura 8. Nivells dels valors morfològics de longitud (A, C), pes (E) i ràtio pes/longitud (B, D) dels òrgans associats al sistema immunitari. Les dades s'expressen com mitjanes ± SEM.

7.2.2. Quantificació de l'expressió gènica en ili i colon

Es van analitzar els nivells d'expressió gènica de diferents citocines proinflamatòries i antiinflamatòries, tant en l'intestí prim com en el colon, per analitzar la resposta inflamatòria de l'organisme a l'entrar en contacte amb l'al·lergen.

En ambdós teixits es va observar un patró d'expressió similar entre els diferents grups experimentals, tant pel que fa a les citocines proinflamatòries com per les antiinflamatòries, exceptuant alguns casos concrets.

Pel que fa a les citocines proinflamatòries analitzades, es pot observar com els nivells de TNF- α en l'ili (**Figura 9A**) eren molt similars entre els diferents grups mentre que, a nivell de colon, es va observar una tendència dels grups OVA, INU i COMB a incrementar els nivells d'aquesta citocina en comparació al grup CON, tot i que les diferències no van ser significatives. Per contra, el grup tractat amb el probiòtic (LAC) va mostrar uns nivells numèricament inferiors als observats en la resta de grups al·lèrgics (**Figura 9B**). Pel que fa als nivells d'expressió de les altres dues citocines analitzades, IL-1b i IL-23, en ambdós teixits es van trobar resultats força similars. Pel que fa a la IL-1b es van trobar nivells més elevats en els grups sensibilitzats respecte el grup control, especialment en el grup tractat amb inulina i amb el tractat amb la combinació simbiòtica. Tot i que a nivell d'ili aquests canvis només es mostren a nivell tendencial, a nivell de colon sí que van mostrar una diferència significativa. Contràriament, els nivells d'expressió de la IL-23 es van trobar numèricament més elevats en el grup control comparat amb els grups sensibilitzats amb OVA, tant a nivell d'ili com a nivell de colon. Pel que fa als nivells d'expressió de les citocines antiinflamatòries analitzades, es pot observar com la IL-10 presenta valors més elevats en el grup control que en la resta de grups al·lèrgics, tant en ili com en colon, presentant aquest últim diferències significatives (**Figura 9**). Altrament, els nivells d'expressió de TGF- β en ili presenten un patró similar en tots els grups experimentals (**Figura 9A**), mentre que a nivell de colon el grup control sembla presentar tendencialment nivells més elevats respecte els grups sensibilitzats amb OVA, exceptuant el grup tractat amb el prebiòtic (**Figura 9B**).

Estudi *in vivo* per avaluar els efectes de la combinació d'un probiòtic i un prebiòtic sobre la immunomodulació en un model d'al·lèrgia a l'ovoalbúmina

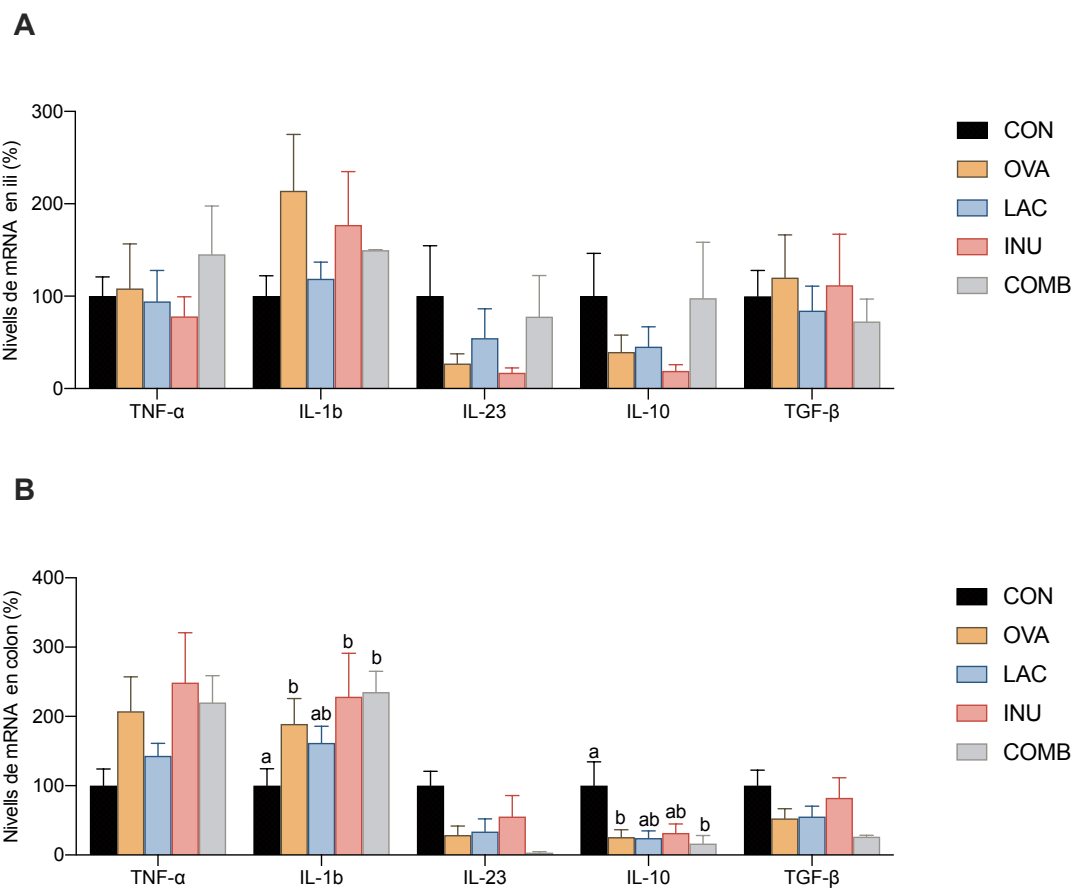


Figura 9. Nivells d'expressió gènica en ili (A) i colon (B) de marcadors d'inflamació. Les dades s'expressen com mitjanes \pm SEM. En els resultats dels nivells d'expressió dels marcadors d'inflamació mostren els resultats de l'anàlisi estadístic ANOVA d'1 via i les comparacions post-hoc amb el test de Duncan (els valors mitjos representats amb diferents lletres són significativament diferents entre ells, $p < 0,05$).

8. DISCUSSIÓ

En els últims anys ha augmentat significativament el nombre de persones que pateixen al·lèrgies alimentàries. Aquestes reaccions adverses als aliments, que tenen en el seu origen un mecanisme immunitari, presenten símptomes que van des de molt lleus fins a potencialment fatals i, a dia d'avui, l'únic tractament 100% efectiu per evitar els seus efectes és no consumir els aliments que les causen (1,4). És per això que és de gran importància la recerca de tractaments alternatius per reduir els efectes associats a aquests desordres, sent un exemple clar els prebiòtics i els probiòtics per la seva capacitat immunomoduladora (2,6). En aquest estudi s'ha estudiat l'efecte d'un probiòtic, d'un prebiòtic i la combinació d'ambdós en un model murí d'al·lèrgia a la OVA per la seva semblança als humans a l'hora d'establir una resposta immunitària alta, clara i ràpida (37,42).

En patologies relacionades amb estats inflamatoris, com ara les al·lèrgies alimentàries, un dels símptomes més apreciats és la pèrdua de pes i la reducció de la gana (4,68). En el present estudi no es van trobar diferències remarcables entre els diferents tractaments pel que fa al monitoratge del pes corporal al llarg de l'estudi. Tot i això, sí que es va observar una reducció tendencial de l'increment de pes del grup tractat amb el prebiòtic inulina, el que s'ha relacionat amb l'efecte propi de les fibres alimentàries de disminuir el pes corporal degut a la seva baixa densitat energètica (41). Pel que fa als nivells d'ingesta de pinso no es va poder establir un patró generalitzat entre els diferents tractaments administrats al llarg de l'experiment. No obstant, sí que es va poder observar que el tractament amb el prebiòtic inulina havia reduït la ingesta acumulada, el que es correlaciona amb la disminució de pes corporal, mentre que en el grup tractat amb la combinació de prebiòtic i probiòtic l'havia augmentat. D'altra banda, sí que es va poder observar un efecte significatiu dels diferents tractaments al reduir la ingesta d'aigua a partir de l'inici del procés de sensibilització amb l'OVA, com fan referència altres estudis científics (27).

Tal i com s'ha mencionat al inici d'aquest treball, una exposició contínua i repetida a l'al·lèrgen alimentari desencadena una resposta immunitària regulada per IgE, en la que hi destaca l'alliberació de mediadors inflamatoris i la síntesi d'Igs per fer front a la infecció, especialment d'IgE i IgG específiques de l'antigen alimentari. Per tal de controlar que el procés de sensibilització a l'OVA en el model emprat es produïa correctament, en el present estudi es va fer un monitoratge dels nivells plasmàtics d'IgE i d'IgG1 específiques d'OVA al ser les Igs més associades a la resposta al·lèrgica tal i

com s'ha descrit en articles previs (11,12). Els resultats obtinguts van mostrar que el procés de sensibilització a l'al·lèrgen es va produir idòniament ja que es van observar nivells circulants molt elevats d'ambdós Igs en els grups d'estudi sensibilitzats. A més, les concentracions d'ambdós Igs van augmentar gradualment al llarg del procés de sensibilització a mesura que els animals rebien més dosis d'OVA, sent una setmana posterior a la última sensibilització a OVA on es van quantificar nivells més elevats. Aquests resultats concorden amb la resposta immunològica esperada i amb les observacions de múltiples estudis previs on es van analitzar els mateixos paràmetres (13,35,36,42,53).

Una de les propietats més importants que presenten els probiòtics i els prebiòtics per ser considerats tractaments idonis per a la reducció dels símptomes al·lèrgics és la capacitat d'immunomodulació, la qual es caracteritza per estimular una resposta immune del tipus antiinflamatòria i reduir la producció de citocines proinflamatòries, i alhora, generar una resposta intestinal augmentada per part del GALT per estimular la funció fagocítica dels macròfags (2,32). Tot i l'elevada resposta immunològica generada, en el present estudi no es va observar un efecte clar pel que fa als diferents tractaments estudiats. A diferència d'altres estudis científics com el realitzat per *Hougee et al.* (50) on, sota condicions molt similars a les del present estudi, sí que va observar una disminució significativa dels valors d'IgE en el grup tractat amb el probiòtic *Lactobacillus plantarum*, en aquest treball no s'han pogut descriure tals canvis. Resultats similars es troben al comparar altres estudis basats en la mateixa metodologia (36,39,53). Pel que fa a l'efecte de la inulina com a prebiòtic, tot i el reduït nombre d'evidències científiques de la seva acció antiinflamatòria en la bibliografia, es va proposar com a tractament per la seva coneguda capacitat immunomoduladora (59). Malgrat ser considerat un possible candidat, en el present treball tampoc s'ha pogut determinar un efecte clar. Una mostra del baix efecte protector dels tractaments administrats és el nombre de morts per shock anafilàctic després dels tractaments aguts amb OVA, ja que tots els grups sensibilitzats van mostrar un considerable número de morts. Tot i això, el grup tractat amb el probiòtic va ser el que va presentar menys morts. Un dels motius de la ineficàcia dels tractaments estudiats es podria deure a l'alta resposta immunològica generada, ja que els valors trobats d'Igs en aquest estudi són força més alts que en altres articles ja revisats (39,53). Això implicaria que, tot i que els probiòtics i prebiòtics administrats exercissin un efecte antiinflamatori en els ratolins sensibilitzats, aquest no seria suficient per reduir els nivells dels marcadors inflamatoris a nivells basals. Un altre motiu al qual es podria deure el baix efecte dels tractaments analitzats és l'especificitat dels tractaments emprats, ja que tal i com descriu *Markowiak et al.* (26), l'efectivitat i el funcionament dels probiòtics, dels

prebiòtics, i de la combinació dels dos en forma de simbiòtic depèn de molts paràmetres tals com el gènere, espècie i sòcia del probiòtic, l'efecte en si del prebiòtic i la idoneïtat de la combinació probiòtic-prebiòtic per a dur a terme una funció determinada.

Tal i com s'ha mencionat anteriorment, un altre paràmetre de gran rellevància en la generació de reaccions al·lèrgiques és la producció de marcadors inflamatoris com ara les citocines. Aquest tipus de molècules, ja siguin del tipus proinflamatòries o antiinflamatòries, es sintetitzen i s'alliberen al desencadenar-se una resposta inflamatòria (12). Al analitzar una resposta al·lèrgica, és de gran importància determinar quines citocines estan presents en l'organisme per identificar si la resposta immunitària que s'està produint és del tipus Th1, la qual correspon a la remissió de la inflamació, o Th2, la qual es relaciona amb la generació d'un estat inflamatori (16). En aquest estudi es van analitzar els nivells d'expressió de tres citocines proinflamatòries (TNF- α , IL-1b i IL-23) i de dues citocines antiinflamatòries (IL-10 i TGF- β) en ili i colon per determinar quin era l'estat inflamatori dels òrgans diana en els tractaments estudiats. Tal i com es referència en altres estudis similars (36,53), es van trobar nivells més elevats de citocines proinflamatòries tant en ili com en colon en aquells animals que van estar exposats al procés de sensibilització a l'OVA. Pel que fa als tractaments estudiats, només el grup tractat amb el probiòtic *Lactobacillus plantarum* va mostrar un lleuger efecte reductor en l'expressió de citocines proinflamatòries tot i que aquests resultats no van ser significatius. Pel que fa a l'expressió de citocines antiinflamatòries, cap dels tractaments va mostrar un efecte clar en l'augment d'aquestes molècules per reduir la resposta inflamatòria. Probablement, aquest efecte es degui a l'elevat estat inflamatori en el que es trobaven els animals, tal i com s'ha comentat anteriorment. També és d'important rellevància comentar que les citocines analitzades en aquest treball, tot i estar associades a respostes inflamatòries, generalment s'han relacionat més a estats d'inflamació crònica que no pas a estats al·lèrgics, de manera que aquesta podria ser una altra causa per explicar la baixa diferència d'expressió de les citocines analitzades entre els diferents grups experimentals.

A part de la generació de reaccions inflamatòries, una altra conseqüència de les al·lèrgies alimentàries és l'afectació de diversos òrgans, en especial aquells relacionats amb el sistema immunitari com són la melsa i el tracte gastrointestinal (6,47). És per això que un marcador d'inflamació àmpliament acceptat és el pes de tals òrgans, així com la relació pes/longitud dels mateixos (69). En el present estudi, tot i que sí sembla haver-hi una tendència a augmentar tals paràmetres en els animals sensibilitats, no s'ha pogut establir un efecte clar pel que fa a aquest tipus de marcadors d'inflamació entre els diferents tractaments estudiats.

9. CONCLUSIONS

En resum, a partir de les dades obtingudes podem concloure que tot i que s'ha induït satisfactòriament una reacció al·lèrgica a partir del procés de sensibilització amb l'OVA, cap dels tres tractaments analitzats en aquest treball, un tractament amb *Lactobacillus plantarum* com a probiòtic, un tractament amb inulina com a prebiòtic i un tractament que combinava els mencionats probiòtic i prebiòtic, han presentat un efecte clar en la prevenció de la inducció de l'al·lèrgia i per tant, tampoc en la reducció de la resposta inflamatòria associada a l'al·lèrgia a l'OVA en les condicions experimentals emprades. Tot i així, el grup tractat amb el probiòtic va mostrar un lleuger efecte en la reducció de la resposta inflamatòria.

És per això que caldria fer més estudis per avaluar els possibles efectes protectors del probiòtic sobre altres processos relacionats amb un estat al·lèrgic, com ara l'estrès oxidatiu o la mobilització de cèl·lules del sistema immunitari. També seria interessant continuar analitzant el mateix patró al·lèrgic però augmentant la dosi dels tractaments administrats o bé, canviant la composició dels mateixos per trobar la combinació idònia per reduir els símptomes associats a l'al·lèrgia alimentària a l'OVA.

10. BIBLIOGRAFIA

1. E I, AC O, K L. Novel Approaches to the Nutritional Management of the Allergic Infant. *Acta Paediatr Suppl.* 2005;94(449).
2. Heine RG. Food Allergy Prevention and Treatment by Targeted Nutrition. *Ann Nutr Metab.* 2018;72(3):33–45.
3. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *J Allergy Clin Immunol.* 2018 Jan 1;141(1):41–58.
4. NIAID-Sponsored Expert Panel JA, Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Dec;126(6 Suppl):S1-58.
5. G du T, T T, S L, G L. Prevention of Food Allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(4).
6. SH S, HA S. Food Allergy: Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(2).
7. Yu W, Freeland DMH, Nadeau KC. Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(12):751.
8. Vighi G, Marcucci F, Sensi L, Di Cara G, Frati F. Allergy and the gastrointestinal system. *Clin Exp Immunol.* 2008 Sep;153 Suppl(Suppl 1):3–6.
9. Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 Jan 1;115(1):3–12.
10. Tordesillas L, Berin MC, Sampson HA. Immunology of Food Allergy. *Immunity.* 2017 Jul 18;47(1):32–50.
11. Tordesillas L, Berin MC. Mechanisms of oral tolerance. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2018;55(2):107.
12. R V, H H, B L, S P. Food Allergies: The Basics. *Gastroenterology.* 2015;148(6).
13. Han N-R, Moon P-D, Kim N-R, Kim H-Y, Jeong H-J, Kim H-M. *Schisandra chinensis* and Its Main Constituent Schizandrin Attenuate Allergic Reactions by Down-Regulating Caspase-1 in Ovalbumin-Sensitized Mice. *Am J Chin Med.*

2017 Jan 6;45(01):159–72.

14. Xu L, Xie R, Xie H, Ju J, Fu X, Di D, et al. Chimeric specific antigen epitope-carrying dendritic cells induce interleukin-17(+) regulatory T cells to suppress food allergy. *Clin Exp Allergy*. 2020 Feb 2;50(2):231–43.
15. Yan-Ru L, Cheng-Zhong Z. Immunoregulatory Effect of Adipose-Derived Stem Cell Transplantation in Young Mouse Model of Food Allergy. *Chinese J Contemp Pediatr*. 2016;18(7):656–61.
16. van Halteren AG, van der Cammen MJ, Biewenga J, Savelkoul HF, Kraal G. IgE and mast cell response on intestinal allergen exposure: a murine model to study the onset of food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Jan 1;99(1 Pt 1):94–9.
17. Sato S, Yanagida N, Ogura K, Imai T, Utsunomiya T, Iikura K, et al. Clinical Studies in Oral Allergen-Specific Immunotherapy: Differences among Allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014;164(1):1–9.
18. Burks AW, Jones SM, Wood RA, Fleischer DM, Sicherer SH, Lindblad RW, et al. Oral Immunotherapy for Treatment of Egg Allergy in Children. *N Engl J Med*. 2012 Jul 19;367(3):233–43.
19. Pandey KR, Naik SR, Vakil B V. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *J Food Sci Technol*. 2015;52(12):7577.
20. Hardy H, Harris J, Lyon E, Beal J, Foey AD. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: Homeostasis and immunopathology. Vol. 5, *Nutrients*. 2013. 1869–1912 p.
21. Joint FAO/WHO Working Group. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, Canada; 2002.
22. ES L, EJ S, YD N, SY L. Probiotics in Human Health and Disease: From Nutriotics to Pharmabiotics. *J Microbiol*. 2018;56(11).
23. SU I. Clinical Uses of Probiotics. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(5).
24. F P, M P, G Q. Probiotics in Digestive Diseases: Focus on Lactobacillus GG. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2015;61(4).
25. DW T, FR G. Probiotics and Prebiotics in Pediatrics. *Pediatrics*. 2010;126(6).
26. Markowiak P, Śliżewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*. 2017;9(9).

27. K P, G Z, B F, V A, M K, B P, et al. Discovering Probiotic Microorganisms: In Vitro, in Vivo, Genetic and Omics Approaches. *Front Microbiol.* 2015;6.
28. J S, N Z, E S, E E. The Pros, Cons, and Many Unknowns of Probiotics. *Nat Med.* 2019;25(5).
29. Chapman CMC, Gibson GR, Rowland I. Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? *Eur J Nutr.* 2011 Feb 13;50(1):1–17.
30. Björkstén B. The epidemiology of food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2001 Jun 1;1(3):225–7.
31. Pineiro M, Asp N-G, Reid G, Macfarlane S, Morelli L, Brunser O, et al. FAO Technical Meeting on Prebiotics. *J Clin Gastroenterol.* 2008 Oct 1;42 Suppl 3:S156-9.
32. Tsai Y-L, Lin T-L, Chang C-J, Wu T-R, Lai W-F, Lu C-C, et al. Probiotics, prebiotics and amelioration of diseases. *J Biomed Sci.* 2019;26.
33. Wang Y. Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Res Int.* 2009 Jan 1;42(1):8–12.
34. Boger MCL, Bueren AL van, Dijkhuizen L. Cross-Feeding among Probiotic Bacterial Strains on Prebiotic Inulin Involves the Extracellular exo-Inulinase of *Lactobacillus paracasei* Strain W20. *Appl Environ Microbiol.* 2018;84(21).
35. Saldanha JCS, Gargiulo DL, Silva SS, Carmo-Pinto FH, Andrade MC, Alvarez-Leite JI, et al. A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. *Brazilian J Med Biol Res.* 2004 Jun;37(6):809–16.
36. Liu YW, Liao TW, Chen YH, Chiang YC, Tsai YC. Oral administration of heat-inactivated *Lactobacillus plantarum* K37 modulated airway hyperresponsiveness in ovalbumin-sensitized BALB/c mice. *PLoS One.* 2014;9(6).
37. Kucharewicz I, Bodzenta-Łukaszyk A, Buczek W. Experimental asthma in rats. *Pharmacol Rep.* 2008;60(6):783–8.
38. JC C, CC T, CC H, A L, CC H, SF L. Multispecies Probiotics Combination Prevents Ovalbumin-Induced Airway Hyperreactivity in Mice. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2018;46(4).
39. Nawaz M, Ma C, Basra MAR, Wang J, Xu J. Amelioration of ovalbumin induced allergic symptoms in Balb/c mice by potentially probiotic strains of lactobacilli.

- Benef Microbes. 2015;6(5):669–78.
40. Song S, Lee SJ, Park DJ, Oh S, Lim KT. The anti-allergic activity of *Lactobacillus plantarum* L67 and its application to yogurt. *J Dairy Sci.* 2016;99(12):9372–82.
 41. Kuo S-M. The Interplay Between Fiber and the Intestinal Microbiome in the Inflammatory Response. *Adv Nutr.* 2013 Jan 1;4(1):16–28.
 42. Chen C, Sun N, Li Y, Jia X. A BALB/c mouse model for assessing the potential allergenicity of proteins: Comparison of allergen dose, sensitization frequency, timepoint and sex. *Food Chem Toxicol.* 2013;62:41–7.
 43. Hylkema MN, Hoekstra MO, Luinge M, Timens W. The strength of the OVA-induced airway inflammation in rats is strain dependent. *Clin Exp Immunol.* 2002 Sep;129(3):390–6.
 44. Diesner SC, Knittelfelder R, Krishnamurthy D, Pali-Schöll I, Gajdzik L, Jensen-Jarolim E, et al. Dose-dependent food allergy induction against ovalbumin under acid-suppression: A murine food allergy model. *Immunol Lett.* 2008 Nov 16;121(1):45–51.
 45. Zuercher AW, Holvoet S, Weiss M, Mercenier A. Polyphenol-enriched apple extract attenuates food allergy in mice. *Clin Exp Allergy.* 2010;40(6):942–50.
 46. Perrier C, Thierry AC, Mercenier A, Corthésy B. Allergen-specific antibody and cytokine responses, mast cell reactivity and intestinal permeability upon oral challenge of sensitized and tolerized mice. *Clin Exp Allergy.* 2010;40(1):153–62.
 47. SJ B, Y T, J H, I K. Interleukin-5 Involvement in Ovalbumin-Induced Eosinophil Infiltration in Mouse Food-Allergy Model. *J Dermatol Sci.* 1999;21(1).
 48. Dearman R., Caddick H, Stone S, Kenna J., Basketter D., Kimber I. Immunogenic properties of rapidly digested food proteins following gavage exposure of mice: a comparison of ovalbumin with a potato acid phosphatase preparation. *Food Chem Toxicol.* 2002 May 1;40(5):625–33.
 49. Tanabe K, Kitagawa E, Wada M, Haraguchi A, Orihara K, Tahara Y, et al. Antigen exposure in the late light period induces severe symptoms of food allergy in an OVA-allergic mouse model. *Sci Rep.* 2015;5(February):1–8.
 50. Hougee S, Vriesema AJM, Wijering SC, Knippels LMJ, Folkerts G, Nijkamp FP, et al. Oral Treatment with Probiotics Reduces Allergic Symptoms in Ovalbumin-

- Sensitized Mice: A Bacterial Strain Comparative Study. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010;151(2):107–17.
51. Shin H-S, Eom J-E, Shin D-U, Yeon S-H, Lim S-I, Lee S-Y. Preventive Effects of a Probiotic Mixture in an Ovalbumin-Induced Food Allergy Model. *J Microbiol Biotechnol.* 2018 Jan 28;28(1):65–76.
 52. Wu C-T, Chen P-J, Lee Y-T, Ko J-L, Lue K-H. Effects of immunomodulatory supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* on airway inflammation in a mouse asthma model. *J Microbiol Immunol Infect.* 2016 Oct;49(5):625–35.
 53. Kim JY, Choi YO, Ji GE. Effect of oral probiotics (*Bifidobacterium lactis* AD011 and *Lactobacillus acidophilus* AD031) administration on ovalbumin-induced food allergy mouse model. *J Microbiol Biotechnol.* 2008;18(8):1393–400.
 54. T Y, W F, M E, S N, H M, H S, et al. An Increased Number of CD4+CD25+ Cells Induced by an Oral Administration of *Lactobacillus Plantarum* NRIC0380 Are Involved in Antiallergic Activity. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;162(4).
 55. P van B, FJ T, S van H, C van der M, WM de V, PJ de G, et al. Differential NF-kappaB Pathways Induction by *Lactobacillus Plantarum* in the Duodenum of Healthy Humans Correlating With Immune Tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(7).
 56. S L, B D, M N, F F, S B, G M, et al. A Novel Probiotic Mixture Exerts a Therapeutic Effect on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mediated by IL-10 Producing Regulatory T Cells. *PLoS One.* 2010;5(2).
 57. H D, I R, P Y. Comparative Effects of Six Probiotic Strains on Immune Function in Vitro. *Br J Nutr.* 2012;108(3).
 58. Patel R, DuPont HL. New approaches for bacteriotherapy: prebiotics, new-generation probiotics, and synbiotics. *Clin Infect Dis.* 2015 May 15;60 Suppl 2(Suppl 2):S108-21.
 59. BC van E, S A, MA D, GM D, LF H, AP V, et al. Post-sensitization Administration of Non-Digestible Oligosaccharides and *Bifidobacterium breve* M-16V Reduces Allergic Symptoms in Mice. *Immunity, Inflamm Dis.* 2016;4(2).
 60. N T, M H, S I, H I, T M, K S. Inulin Prolongs Survival of Intragastrically Administered *Lactobacillus Plantarum* No. 14 in the Gut of Mice Fed a High-Fat Diet. *J Nutr.* 2010;140(11).

61. N R, P M, ME Z-H, A G-Z. Physico-chemical and Structural Properties of Crystalline Inulin Explain the Stability of Lactobacillus Plantarum During Spray-Drying and Storage. *Food Res Int.* 2018;113.
62. C A, A B, M S. Prolonging the Viability of Lactobacillus Plantarum Through the Addition of Prebiotics Into the Medium. *J Food Sci.* 2011;76(6).
63. T E, H P, F Z, M S, R M, A H. Synbiotic Supplementation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Pilot Study. *Am J Clin Nutr.* 2014;99(3).
64. Piotr Socha, Anna Stolarczyk JS. Wpływ probiotyków i prebiotyków na gospodarkę lipidową. *Pediatr Współczesna Gastroenterol Hepatol i Żywnie Dziecka.* 2002;4(1):85–8.
65. M K, N B, L S, P O, V D, R J, et al. Anticancer and Immunomodulatory Effects of Lactobacillus Plantarum LS/07, Inulin and Melatonin in NMU-induced Rat Model of Breast Cancer. *Anticancer Res.* 2016;36(6).
66. E H, A Š, R S, J K, L S, A B, et al. Preventive Use of Lactobacillus Plantarum LS/07 and Inulin to Relieve Symptoms of Acute Colitis. *Acta Biochim Pol.* 2015;62(3).
67. Zuercher AW, Weiss M, Holvoet S, Moser M, Moussu H, Van Overtvelt L, et al. Lactococcus lactis NCC 2287 alleviates food allergic manifestations in sensitized mice by reducing IL-13 expression specifically in the ileum. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012.
68. Myles IA. Fast food fever: reviewing the impacts of the Western diet on immunity. *Nutr J.* 2014 Dec 17;13(1):61.
69. Y X, NH H, S B. The Role of Granulocyte Macrophage-Colony-Stimulating Factor in Acute Intestinal Inflammation. *Cell Res.* 2008;18(12).

11. AUTOAVALUACIÓ

Formar part d'un estudi d'investigació en un centre de recerca com és Eurecat m'ha permès poder adquirir i millorar tots aquells coneixements i aptituds necessàries per un futur laboral pròsper en aquest sector. A part d'aportar-me una visió més àmplia del què és el dia a dia en un laboratori, també m'ha servit per créixer professionalment i m'ha donat la confiança de poder treballar individualment en un laboratori.

A nivell acadèmic/professional, l'estada a Eurecat i per tant, la realització d'aquest treball de fi de grau, m'ha permès consolidar nombrosos conceptes teòrics i pràctics apresos durant aquests últims cinc anys. Al mateix temps, he adquirit coneixements per realitzar noves tècniques que no havia fet amb anterioritat com ara determinacions ELISA específiques o homogeneïtzació de mostres del tracte gastrointestinal, entre altres. També m'ha ensenyat a treballar amb molta més cura i de manera més ordenada, ja que degut als certificats ISO que posseeix l'empresa, la manera de treballar ha d'estar molt controlada. Alhora, també m'ha permès aprendre a treballar de manera independent i organitzada seguint les pautes d'un projecte, el que m'ha donat confiança per dur a terme determinacions i anàlisis individualment. A més, m'ha permès poder treballar en unes instal·lacions relativament noves i molt ben dotades, tant a nivell d'equipament, com d'espai i recursos.

L'elaboració d'aquest treball també m'ha permès aprofundir els meus coneixements en la patogènesis de les al·lèrgies, així com ampliar les nocions que tenia sobre la funció dels prebiòtics i probiòtics, i els seus possibles usos.

Pel que fa a un nivell més personal, la realització d'aquest treball m'ha permès millorar el criteri crític durant l'estudi de les dades, així com la meva capacitat d'interpretació i anàlisis de resultats. També m'ha ajudat a ser més eficient en la cerca, lectura i redacció de treballs científics.

En definitiva, la valoració final de la realització d'aquest treball de fi de grau és d'allò més positiva, no només pels beneficis acadèmic-professionals, sinó també pels estímuls que he rebut a nivell personal.