



Efecte d'una dieta enriquida en cacau sobre la resposta immunitària i anafilàctica en un model d'al·lèrgia alimentària en rata

Maria del Mar Abril Gil

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Facultat de farmàcia

EFFECTE D'UNA DIETA ENRIQUIDA
AMB CACAU SOBRE LA
RESPOSTA IMMUNITÀRIA I
ANAFILÀCTICA EN UN MODEL
D'AL·LÈRGIA ALIMENTÀRIA EN
RATA

Maria del Mar Abril Gil
Barcelona, 2015



Facultat de Farmàcia

Programa de doctorat:
ALIMENTACIÓ I NUTRICIÓ

EFFECTE D'UNA DIETA ENRIQUIDA AMB CACAU SOBRE LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA I ANAFILÀCTICA EN UN MODEL D'AL·LÈRGIA ALIMENTÀRIA EN RATA

Memòria presentada per **Maria del Mar Abril Gil** per optar al títol de doctora per la
Universitat de Barcelona

Margarida Castell Escuer
(directora)

Àngels Franch Masferrer
(directora)

Maria del Mar Abril Gil
(doctoranda)

Maria del Mar Abril Gil
Barcelona, 2015

Margarida Castell Escuer, catedràtica, i Àngels Franch Masferrer, professora titular, del Departament de Fisiologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona,

INFORMEN

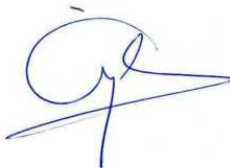
Que la memòria titulada *Efecte d'una dieta enriquida amb cacau sobre la resposta immunitària i anafilàctica en un model d'al·lèrgia alimentària en rata* presentada per MARIA DEL MAR ABRIL GIL per optar al Grau de Doctor per la Universitat de Barcelona, ha estat realitzada sota la nostra direcció al Departament de Fisiologia, i considerant-la conclosa, autoritzem la seva presentació per ser jutjada pel tribunal corresponent.

I perquè així consti, signem el present a

Barcelona, 18 de maig de 2015



Dra. Margarida Castell
Catedràtica de Fisiologia
Departament de Fisiologia
Facultat de Farmàcia
Universitat de Barcelona



Dra. Àngels Franch
Professora Titular
Departament de Fisiologia
Facultat de Farmàcia
Universitat de Barcelona

La tesi realitzada ha estat finançada per:



Ministerio de Ciencia e Innovación [AGL2008-02790]



Ministerio de Economía y Competitividad [AGL2011-24279]

La doctoranda ha gaudit del següent ajut:



Beca de col·laboració en projectes de recerca per a estudiants de tercer cicle de la universitat de Barcelona (2010-2015).

Fundació Bosch i Gimpera

Als meus pares,

Rafael i Maria

Interès, hipòtesi i objectius.....	1
Introducció.....	7
1. Al·lèrgia alimentària	9
1.1. Reaccions d'al·lèrgia mitjançades per IgE	9
1.2. Molècules i cèl·lules implicades en les respostes al·lèrgiques	11
1.2.1. Immunoglobulina E	11
1.2.2. Mastòcits.....	13
1.3. Respostes immunitàries intestinals i tolerància oral	14
1.4. Patogènia de l'al·lèrgia alimentària	17
1.5. Mediadors alliberats.....	18
1.5.1. Histamina	18
1.5.2. Citocines.....	20
1.5.2.1. Interleucina-3	22
1.5.2.2. Interleucina-4	23
1.5.2.3. Interleucina-5	23
1.5.2.4. Interleucina-10.....	23
1.5.2.5. Interleucina-13.....	24
1.5.3. Proteases.....	24
1.5.4. Derivats lipídics de l'àcid araquidònic.....	24
1.5.4.1. Prostanoides	25
1.5.4.2. Leucotriens.....	25
1.5.4.3. Lipoxines, resolvines i protectines	26
1.5.4.4. Isoprostans.....	26
1.6. Manifestacions clíniques de l'al·lèrgia alimentària	26
1.6.1. Manifestacions de l'al·lèrgia alimentària mitjançades per IgE	27
1.6.2. Manifestacions de l'al·lèrgia alimentària no mitjançades per IgE	29
1.6.3. Manifestacions de l'al·lèrgia alimentària mixtes	31
2. Modulació de la resposta al·lèrgica per flavonoides de la dieta	33
2.1. Efectes dels flavonoides en models animals d'al·lèrgia.....	33
2.1.1. Flavonoides i anticossos IgE	34
2.1.2. Flavonoides i anafilaxi cutània passiva.....	36
2.1.3. Flavonoides i anafilaxi sistèmica	37
2.1.4. Flavonoides en models d'al·lèrgia respiratòria	37
2.2. Estudis clínics amb flavonoides en al·lèrgia.....	42
2.2.1. Flavonoides en pacients amb asma al·lèrgica	42
2.2.2. Flavonoides en pacients amb rinitis al·lèrgica	42
2.2.3. Estudis epidemiològics amb flavonoides en malalties al·lèrgiques.....	44

3. Cacao	46
3.1. Procés d'elaboració del cacao	48
3.2. Composició del cacao	49
3.3. Flavonoides del cacao.....	51
3.3.1. Biodisponibilitat dels flavonoides del cacao	51
3.4. Efectes biològics del cacao	52
3.4.1. Capacitat antioxidant.....	52
3.4.1.1. Estudis <i>in vitro</i>	53
3.4.1.2. Estudis <i>in vivo</i>	53
3.4.2. Efectes cardiovasculars	54
3.4.2.1. Estudis <i>in vitro</i>	55
3.4.2.2. Estudis <i>in vivo</i>	55
3.4.3. Efectes antitumorals	56
3.4.3.1. Estudis <i>in vitro</i>	57
3.4.3.2. Estudis <i>in vivo</i>	58
3.4.4. Efectes en el sistema immunitari.....	58
3.4.4.1. Estudis <i>in vitro</i>	59
3.4.4.2. Estudis <i>in vivo</i>	59

Resultats preliminars.....	63
-----------------------------------	-----------

Resultats	69
------------------------	-----------

Article 1	71
Resum.....	73
Resultats article 1	75
Article 2	83
Resum.....	85
Resultats article 2	87
Article 3	93
Resum.....	95
Resultats article 3	97
Article 4	119
Resum.....	121
Resultats article 4	123

Discussió	157
------------------------	------------

Conclusions.....	169
-------------------------	------------

Bibliografia.....	175
--------------------------	------------

Figura 1. Classificació dels tipus d'hipersensibilitat alimentària.....	4
Figura 2. Estructura de la IgE	6
Figura 3. Receptor d'alta afinitat d'IgE (FcεRI): A) estructura i B) mecanisme de transducció de senyals.....	7
Figura 4. Mecanisme de desgranulació mastocitària en la hipersensibilitat	8
Figura 5. Captura i processament d'antígens alimentaris a nivell intestinal	10
Figura 6. Mecanisme de sensibilització de l'al·lèrgia alimentària.....	12
Figura 7. Polarització Th1/Th2 segons el patró de citocines alliberat	15
Figura 8. Representació del Déu Quetzalcoatl.....	39
Figura 9. Hernan Cortés i Moctezuma	40
Figura 10. Arbre i fruits del cacau	41
Figura 11. Procés d'elaboració dels productes derivats del cacau	42

Taula 1. Receptors d'histamina i la seva expressió cel·lular	13
Taula 2. Principals famílies de receptors de citocines	14
Taula 3. Funció de les principals citocines Th2	16
Taula 4. Tipus de proteases mastocitàries i la seva localització	18
Taula 5. Manifestacions de l'al·lèrgia alimentària segons el seu mecanisme patogènic	21
Taula 6. Classificació dels flavonoides segons la seva estructura química	28
Taula 7. Estudis amb flavonoides en models animals d'al·lèrgia respiratòria.....	31
Taula 8. Informació nutricional del cacau en pols per 100 g	43
Taula 9. Dissenys experimentals preliminars.....	65

— Abreviatures —

AHR	hiperreactivitat bronquial o de les vies aèries
BALF	fluid broncoalveolar (<i>bronchoalveolar lavage fluid</i>)
CCL	l·ligand de quimiocina amb motiu CC
CMA1	quimasa humana de mastòcit-1
CPA	carboxipeptidasa A
CYP	citocrom P450
DC	cèl·lules dendrítiques (<i>dendritic cells</i>)
DNP	dinitrofenil
ECA	enzim convertidor d'angiotensina
EFSA	European Food Safety Authority
ERK	quinases regulades per senyals extracel·lulars (<i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
Fab	Fragment d'unió l'antigen
Fc	Fragment cristal·litzable
FcεRI	receptor d'IgE d'alta afinitat
Foxp3	factor de transcripció <i>forkhead box P3</i>
GALT	teixit limfoide associat a intestí (<i>gut-associated lymphoid tissue</i>)
GJIC	comunicacions intercel·lulars en fenedura (<i>gap-junction intercellular communication</i>)
GLM	ganglis limfàtics mesentèrics

GM-CSF	factor estimulant de colònies de granulòcits i macròfags
HDL	Lipoproteïnes d'alta densitat
HR	receptor d'histamina (<i>histamin receptor</i>)
ICAM	molècula d'adhesió intracel·lular(<i>intercellular adhesion molecule</i>)
IEL	limfòcits intraepiteliais (<i>intraepithelial lymphocyte</i>)
IFN	interferó
Ig	immunoglobulina
IL	interleucina
iNOS	òxid nítric sintasa induïble
ITAM	motius d'activació d'immunoreceptors basats en tirosina
JNK	<i>Jun-terminal kinase</i>
kDa	kiloDalton
LDL	Lipoproteïnes de baixa densitat
LP	<i>lamina propria</i>
LPL	Limfòcits de <i>lamina propria</i>
LPS	lipopolisacacàrid
LT	leucotriens
LTx	limfotoxina

— *Abreviatures* —

MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP	proteïna quimiotàctica de monòcits (<i>monocyte chemoattractant protein</i>)
M_T	mastòcits que contenen triptasa
MHC	complex major d'histocompatibilitat (<i>major histocompatibility complex</i>)
MC_{TC}	mastòcits que contenen triptasa, quimasa i carboxipeptidasa A
Mmcp	proteasa mastocitària de ratolí
MMP	metal·loproteïnasa de matriu
NF-κB	factor de transcripció nuclear-κB
NK	cèl·lules <i>natural killer</i>
NO	òxid nítric
OVA	ovoalbúmina
PARP	poliADP-ribosa (<i>poly (ADP-ribose) polymerase,</i>)
PBMC	cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PCA	reacció d'anafilaxi cutània passiva (<i>passive cutaneous anaphylaxis</i>)
PG	prostanglandina
PP	plaques de Peyer
RLE	cèl·lules epitelials de fetge de rata (<i>rat liver epithelial</i>)
RMCP	proteasa mastocitària de rata

ROS	espècies reactives d'oxigen (<i>reactive oxygen species</i>)
SAO	síndrome d'al·lèrgia oral
s-IgA	IgA secretora
SCF	factor de cèl·lules mare (<i>stem cell factor</i>)
TC	toxina colèrica
tBp	toxina de <i>Bordetella pertussis</i>
Tfh	limfòcits T helper fol·liculars
TGF	factor transformador de creixement
Th	limfòcits T helper
TNF	factor de necrosi tumoral
Treg	cèl·lules T reguladores
TxA₂	tromboxà A ₂
vCAM	molècula d'adhesió vascular
WAO	Organització Mundial d'Al·lèrgia (<i>World Allergy Organization</i>)

Interès,

hipòtesi i

objectius

L'Organització Mundial d'Al·lèrgia (*World Allergy Organization*, WAO) defineix l'al·lèrgia com una reacció d'hipersensibilitat originada per mecanismes immunitaris que pot ser mitjançada per anticossos o cèl·lules. En la majoria dels casos, l'anticòs responsable de la resposta al·lèrgica és la immunoglobulina (Ig) E [1]. D'entre les al·lèrgies destaca l'al·lèrgia alimentària, que consisteix en una resposta immunitària anòmala enfront d'un aliment o component alimentari que es produeix en determinats individus. Aquesta capacitat de reactivitat depèn de la susceptibilitat individual i la seva patogènia inclou la pèrdua de tolerància oral a proteïnes dels aliments i, en la majoria de casos, s'acompanya de la producció d'IgE. Les manifestacions de l'al·lèrgia alimentària mitjançades per IgE es desenvolupen ràpidament i comporten l'aparició d'afectacions cutànies, gastrointestinals i, en el pitjor dels casos, es pot produir un xoc anafilàctic que pot comprometre la vida del pacient.

L'al·lèrgia alimentària representa un problema de salut important en els països industrialitzats. Actualment s'estima que uns 11-26 milions de membres de la població europea la pateixen. És més freqüent en infants i, tot i que no es coneixen les dades amb exactitud, en general s'accepta que entre el 6-8% dels infants menors de 3 anys presenten reaccions al·lèrgiques a aliments, on la llet i l'ou són els principals responsables. Les dades epidemiològiques procedents d'adults mostren una prevalença que oscil·la entre l'1,5 i el 2% de la població [2,3]. Tot i això, nombroses evidències demostren un increment general de les afeccions al·lèrgiques i, en conseqüència, d'al·lèrgies alimentàries en els països industrialitzats.

Malgrat que des de fa temps s'investiga la relació entre nutrició, alimentació i salut, hi ha pocs estudis que demostrin l'efecte de nutrients o determinades dietes en la prevenció de malalties del sistema immunitari. En aquest sentit, la immunonutrició constitueix una ciència d'interès creixent. El cacau és un aliment ric en flavonoides capaç d'influir sobre diferents sistemes orgànics. Així, hi ha nombrosos estudis que demostren la capacitat antioxidant del cacau i d'altres que recolzen els efectes beneficiosos dels flavonoides del cacau en malalties cardiovasculars [4,5]. A més, estudis previs realitzats pel grup d'Autoimmunitat i Tolerància demostren que el cacau té un efecte regulador sobre la immunitat innata (resposta inflamatòria) i l'adquirida (activació limfocitària). Concretament, s'ha observat que aquest tipus de

dieta en rata atenua la síntesi d'anticossos, tant a nivell sistèmic com a nivell intestinal [6–17].

En base a aquests efectes, la hipòtesi de partida d'aquesta tesi ha estat que **la capacitat immunomoduladora del cacau pot ser útil per controlar la patogènia de malalties mitjançades per anticossos com és el cas de les al·lèrgies**. Atès que l'al·lèrgia a aliments es produeix en persones susceptibles per pèrdua de tolerància oral, aquesta constitueix una patologia clau per ampliar el coneixement del potencial immunoregulator del cacau. L'estudi dels efectes preventius d'aliments habituals en la dieta, com és el cas del cacau, en malalties amb elevada prevalença, com és l'al·lèrgia, pot tenir un impacte rellevant sobre la salut i, en conseqüència una forta repercussió socioeconòmica.

Partint d'aquesta hipòtesi, l'objectiu principal de la tesi ha estat:

Establir la capacitat reguladora dels flavonoides presents al cacau en la resposta al·lèrgica, emprant un model d'al·lèrgia alimentària induïda en rata.

Per assolir aquest objectiu s'han desenvolupat els següents objectius específics:

1. **Desenvolupar un model en rata de pèrdua de tolerància oral a proteïnes d'ou (ovoalbúmina) que comporti la formació d'anticossos IgE i permeti la inducció d'una resposta anafilàctica.**
2. **Establir indicadors de pèrdua de tolerància oral, d'activació de la resposta immunitària Th2 i de la resposta anafilàctica en animals amb al·lèrgia alimentària.**
3. **Determinar l'efecte d'una dieta rica en cacau en la resposta immunitària enfront de l'al·lèrgen que es produeix en un model experimental d'al·lèrgia alimentària.**
4. **Establir la contribució dels flavonoides en l'efecte immunomodulador del cacau sobre l'al·lèrgia alimentària.**
5. **Esbrinar la influència del cacau sobre el sistema immunitari intestinal d'animals amb al·lèrgia alimentària.**
6. **Determinar l'efecte del cacau sobre la resposta anafilàctica induïda en animals amb al·lèrgia alimentària.**

Introducció

1. Al·lèrgia alimentària

El terme “al·lèrgia” (provinent del grec **ἄλλος** (*állos*): altre, i **ἔργον** (*érgon*): reacció, entesa com a reacció estranya) va ser introduït pel científic vienès Clemens von Pirquet (1874-1929) fa més de 100 anys, el 1906, quan estudiava la resposta cutània dels pacients que havien rebut prèviament la vacuna de la verola. Va ser llavors que va adonar-se'n que aquests tenien una reacció més ràpida i més greu davant d'una segona exposició [18]. Les al·lèrgies són freqüents als països desenvolupats, particularment entre infants, adolescents i adults joves. La seva prevalença ha augmentat en els darrers anys especialment en els països industrialitzats [2,19]. Entre els diferents factors de risc per desenvolupar la malaltia, la genètica és un factor clau ja que s'ha descrit, per exemple, l'elevada predisposició per part dels fills de progenitors al·lèrgics a patir-la [20]. També influeixen factors ambientals, així s'ha observat que els nadons nascuts en els mesos que precedeixen al període de pol·linització tenen el doble de risc de patir al·lèrgia al pol·len que els nascuts en altres períodes. Un altre factor de risc per desenvolupar al·lèrgia és el fet de viure en zones urbanes ja que sembla ser que la pol·lució aèria pot actuar com adjuvant i promoure el desenvolupament d'al·lèrgies [21].

L'al·lèrgia alimentària és una de les al·lèrgies més importants. El 2004, la *World Allergy Organization* (WAO) va revisar la terminologia referent a l'al·lèrgia alimentària i va recomanar la seva utilització per definir aquelles reaccions adverses als aliments provocades per mecanismes immunològics, incloent les reaccions mitjançades per immunoglobulina (Ig) E, i les provocades per altres mecanismes immunològics. D'aquesta manera diferencia l'al·lèrgia alimentària de les reaccions d'hipersensibilitat alimentària causades per dèficits enzimàtics, sensibilitat a amines biògenes, etc. (**Figura 1**) [22].

1.1. Reaccions d'al·lèrgia mitjançades per IgE

La forma més comuna d'al·lèrgia alimentària és la mitjançada per IgE o hipersensibilitat de tipus I [23], també coneguda com immediata, ja que té lloc entre els primers minuts i les dues hores posteriors al contacte amb l'aliment responsable. Aquesta resposta es produeix quan un individu

genèticament susceptible a desenvolupar al·lèrgia -anomenat atòpic-desencadena una resposta immunitària enfront de proteïnes innòcues conegudes com al·lergògens. En l'al·lèrgia alimentària, els al·lergògens són proteïnes dels aliments (ous, llet, fruita seca...), mentre que altres al·lergògens d'origen ambiental (pols, pol·len, pèl d'animal...) donen lloc a al·lèrgies respiratòries, encara que alguns d'ells poden tenir reactivitat encruuada amb aliments (per exemple, determinats pòl·lens). Les manifestacions clíniques de la hipersensibilitat immediata inclouen afeccions cutànies, alteracions gastrointestinals, alteracions respiratòries i, en el pitjor dels casos, xoc anafilàctic [24,25].

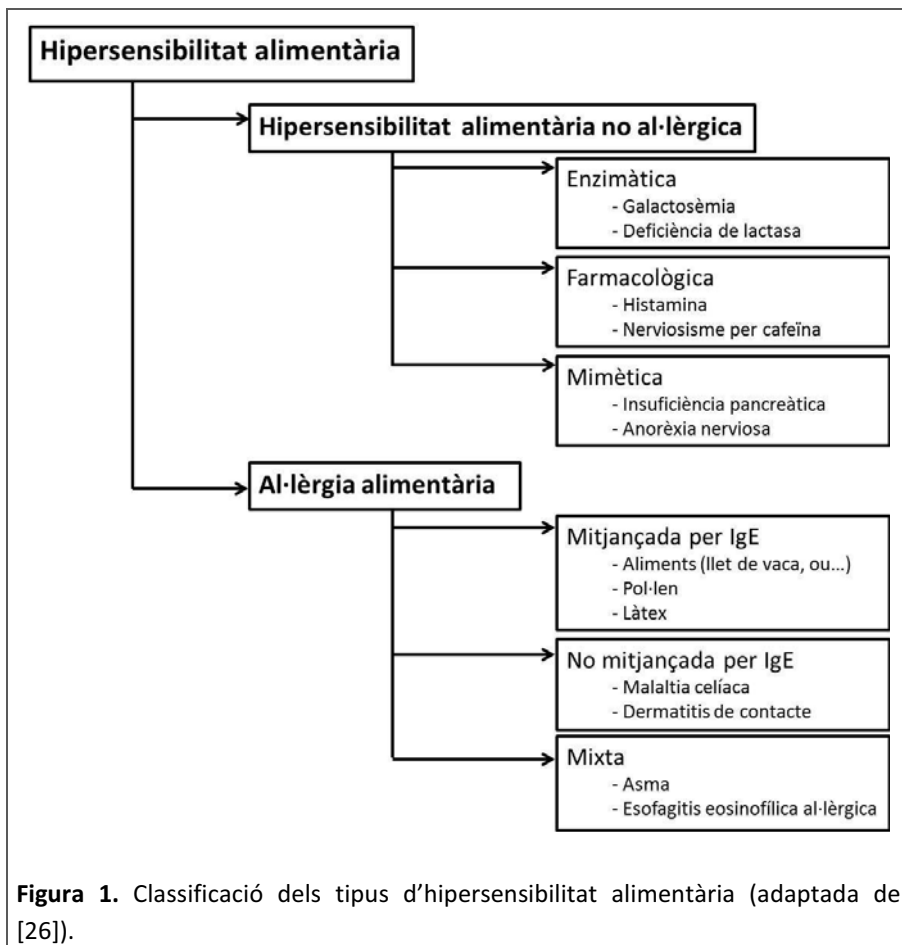


Figura 1. Classificació dels tipus d'hipersensibilitat alimentària (adaptada de [26]).

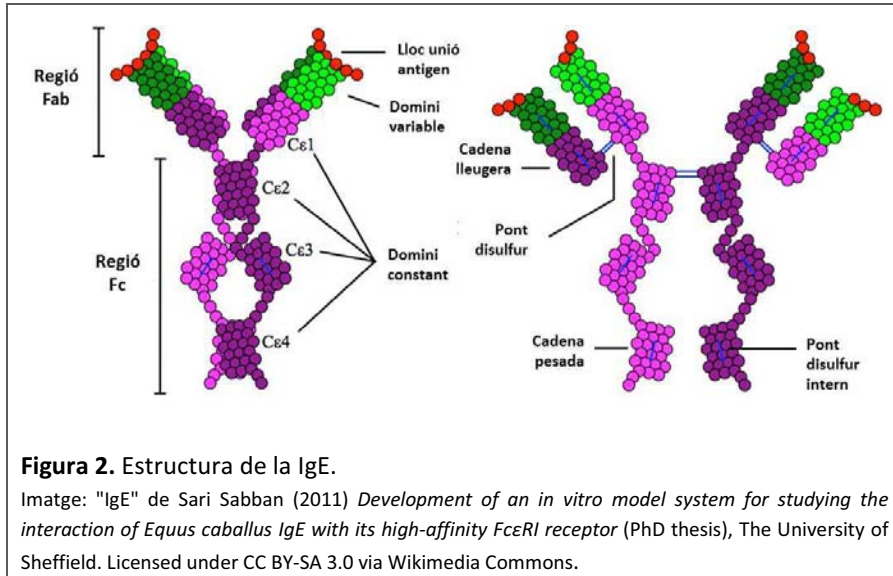
1.2. Molècules i cèl·lules implicades en les respostes al·lèrgiques

1.2.1. Immunoglobulina E

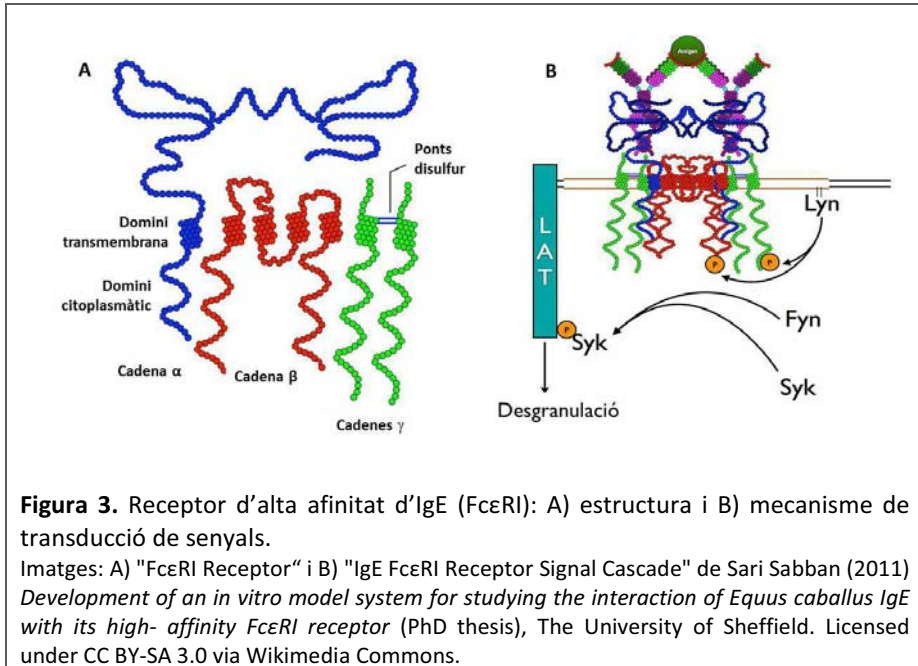
Les immunoglobulines són glicoproteïnes secretades per les cèl·lules plasmàtiques procedents de limfòcits B i estan formades per dues cadenes pesades i dues lleugeres connectades per ponts disulfur. Hi ha cinc classes de cadenes pesades (α , δ , ϵ , γ i μ) i dues classes de cadenes lleugeres (κ i λ). Tant les cadenes pesades com les lleugeres contenen regions variables aminoterminals (V) que constitueixen els llocs d'unió als antígens específics, i regions constants carboxiterminals (C) que els hi confereixen diferents funcions biològiques. Estructuralment també es consideren dos fragments o regions diferents: el d'unió a l'antigen (Fab) i el fragment cristal·litzable (Fc).

Existeixen cinc isotips d'immunoglobulines que es diferencien per l'estructura de les regions C de les cadenes pesades. En el cas de la IgE la seva cadena pesada s'anomena *epsilon* ϵ (**Figura 2**). La IgE va ser descrita cap a finals dels anys 60 [27,28] i, dels cinc isotips, és la menys abundant en plasma. La seva concentració incrementa al llarg de la infància i assoleix el seu màxim entre els 10 i 15 anys d'edat; després, durant l'edat adulta, la seva concentració sol decreixer [29].

La IgE és la immunoglobulina principal de les respostes d'hipersensibilitat immediata. Després de ser secretada per les cèl·lules plasmàtiques, s'uneix al seu receptor d'alta afinitat, anomenat Fc ϵ RI, que es troba a la superfície de mastòcits, basòfils i eosinòfils. Quan el receptor es troba lliure, sense IgE ancorada, la seva vida mitjana en la superfície dels mastòcits és de 24 h mentre que quan té la IgE unida, s'expressa durant tota la vida de la cèl·lula [30].



El FcεRI és un receptor multimèric que presenta dues formes: la tetramèrica i la trimèrica. La forma tetramèrica està formada per 3 subunitats: una cadena α (domini extracel·lular), una cadena β (domini transmembrana) i dues cadenes γ unides per dos ponts disulfur (**Figura 3A**) [30]. La forma trimèrica no conté domini β i s'expressa en una ampla varietat de cèl·lules immunitàries com cèl·lules presentadores d'antigen, monòcits, macròfags, eosinòfils, etc., la forma tetramèrica es troba majoritàriament en mastòcits i basòfils. La unió de la IgE al receptor té lloc pel domini Cε3 de la IgE a la cadena α del FcεRI [31]. Les subunitats β i γ presenten motius d'activació d'immunoreceptors basats en tirosina (ITAM) en les seves cues citoplasmàtiques i són les encarregades de la transducció del senyal. Concretament la cadena β està implicada en l'amplificació del senyal de FcεRI i en l'increment de la seva expressió en la superfície cel·lular mentre que les cadenes γ són unitats de senyalització. Estan implicades principalment tres cinases: Lyn i Fyn, que s'uneixen a la cadena β , i Syk que ho fa a les cadenes γ . Quan l'antigen s'uneix a dues molècules d'IgE (unió encreuada) unides al seus receptors, Lyn s'activa i fosforila els ITAM de β i γ això fa que Syk sigui reclutada cap a γ on s'activa i llavors fosforila a LAT (proteïna adaptadora), així inicia tota una cascada de senyals amb mediadors secundaris que provoca, finalment, la desgranulació mastocitària [32] (**Figura 3B**).



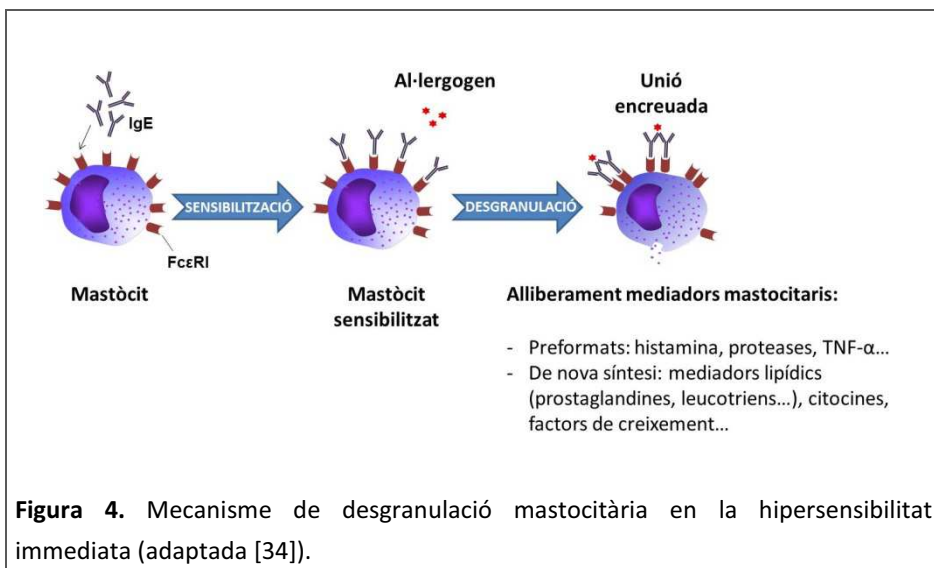
1.2.2. Mastòcits

Els mastòcits es generen a partir de la cèl·lula progenitora pluripotencial a la medul·la òssia. Els precursors immadurs dels mastòcits viatgen per la sang fins al teixit específic, on acaben el procés de maduració, el qual depèn del factor de les cèl·lules mare (*stem cell factor*, SCF). Els mecanismes exactes d'atracció cap als teixits no estan clars, però sí que es coneixen els efectes moduladors d'algunes citocines en el fenotip i comportament mastocitari. Així, per exemple, la interleucina (IL)-4 promou la sobreexpressió de FcεRI, la IL-5 promou la proliferació de mastòcits en presència de SCF, mentre que d'interferó (IFN)-γ redueix el seu nombre [29].

Els mastòcits van ser identificats per Paul Ehrlich el 1878 mitjançant la tinció metacromàtica dels grànuls presents al seu citoplasma [33]. Se'ls pot anomenar segons el teixit on resideixen (serosals, mucosals o cerebrals) o segons el seu contingut granular (MC_T per als mastòcits que contenen triptasa o MC_{TC} si contenen triptasa, quimasa i carboxipeptidasa A (CPA)) [29,34].

Els mediadors mastocitaris es poden classificar en preformats, que es troben emmagatzemats en grànuls citoplasmàtics (histamina, proteases...) i els de nova síntesi que poden ser mediadors lipídics (leucotriens, prostaglandines...) o citocines i quimocines (**Figura 4**). Malgrat tot hi ha excepcions ja que per exemple, el factor de necrosi tumoral (TNF)- α , pot trobar-se emmagatzemat en els grànuls citoplasmàtics o ser de nova síntesi [29].

La unió encreuada de l'al·lèrgen al complex IgE-Fc ϵ RI no és l'únic estímul que provoca la desgranulació mastocitària, també ho fan altres factors com agonistes que s'uneixen al receptor (anafilotoxines, neuropèptids, citocines...), estímuls físics (temperatura o pressió) i contacte cèl·lula-cèl·lula (com els coreceptors i els seus lligands OX40/OX40L, CD40/CD40L...)[34].



1.3. Respostes immunitàries intestinals i tolerància oral

El tracte gastrointestinal humà conté el teixit limfoide associat a intestí (*gut-associated lymphoid tissue*, GALT) que inclou el GALT organitzat, constituït per plaques de Peyer (PP), fol·licles limfoides aïllats i ganglis limfàtics mesentèrics (GLM), i el GALT difús, format per limfòcits dispersos al llarg de l'epiteli (limfòcits intraepiteliais, *intraepithelial lymphocyte*, IEL) i de la *lamina propria* (LP) de la mucosa [35,36].

Diàriament el tracte gastrointestinal s'exposa a grans quantitats d'antígens de la dieta, bacteris comensals i patògens. En condicions normals, un antígen alimentari es troba amb una primera línia de defensa encarregada d'evitar la penetració d'antígens estranys [37] i constituïda per cèl·lules de l'epiteli intestinal (segellades entre sí per unions estretes), les cèl·lules de la immunitat innata (cèl·lules *natural killer* o NK i macròfags) i les cèl·lules de la immunitat adaptativa (limfòcits de la LP o LPL, PP i IgA secretora o s-IgA). Encara així, alguns antígens poden penetrar la mucosa intestinal, pas que pot tenir lloc a través de les cèl·lules M de les PP, mitjançant les cèl·lules dendrítiques (*dendritic cells*, DC) o per les cèl·lules epitelials (**Figura 5**). Les cèl·lules M són enteròcits modificats i especialitzats en la captació d'antígens que introdueixen a l'interior de la PP. Una altra via d'entrada consisteix en capturar l'antigen de l'espai luminal mitjançant l'extensió de les dendrites de les DC a través de l'espai paracel·lular. Per últim, l'antigen pot accedir a través de l'epiteli gastrointestinal via que és important en cas d'increment de la permeabilitat intestinal, per exemple en un estat inflamatori.

Les DC de PP o LP, en aquests compartiments o bé en els GLM, processen l'antigen i el presenten mitjançant el complex major d'histocompatibilitat de classe II (*major histocompatibility complex*, MHC-II) als limfòcits T CD4⁺ verges. En condicions normals, s'indueix la diferenciació de cèl·lules T reguladores (Treg) que es dirigiran a la LP on s'expandiran i suprimiran la generació de citocines T col·laboradores (*helper*, Th)2 i IgE [38] (**Figura 5**).

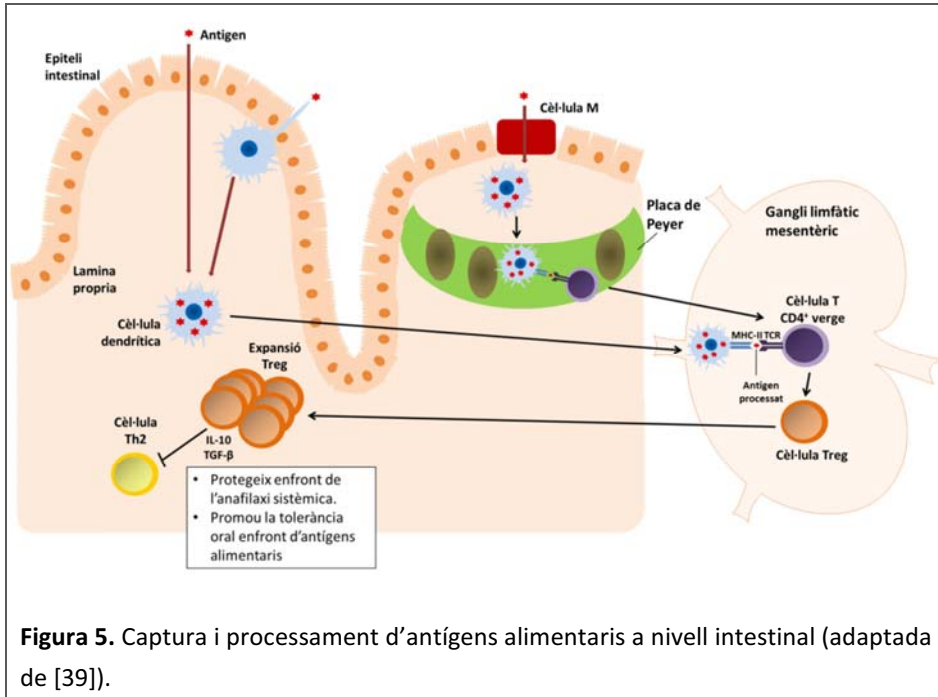


Figura 5. Captura i processament d'antigen alimentaris a nivell intestinal (adaptada de [39]).

Durant la generació del repertori immunològic, en la maduració dels limfòcits B i T és indispensable que tingui lloc la selecció negativa (o tolerància central) i deleció d'aquells limfòcits amb receptors que poden reaccionar amb autoantigen o antigen innocu. Aquest procés té lloc al timus per als limfòcits T i a la medul·la òssia per als limfòcits B. Una altra forma de tolerància consisteix en la formació de cèl·lules Treg naturals, que reconeixen autoantigen amb alta afinitat i que expressen el factor de transcripció *Foxp3* (*forkhead box P3*). Les cèl·lules Treg actuen inhibint la generació de cèl·lules T efectores i, per tant, estan implicades en diversos processos immunològics ja que poden evitar el desenvolupament de malalties autoimmunitàries. En aquest sentit els limfòcits Treg poden exercir una activitat supressora en l'activació o eliminació dels limfòcits T autoreactius, poden establir tolerància enfront d'antigen exògens, el que els hi confereix una funció important en el trasplantament d'òrgans i també tenen un paper supressor en el desenvolupament de respostes al·lèrgiques gràcies a que intervien en els processos de tolerància perifèrica [40].

Els mecanismes de tolerància mitjançant la deleció de limfòcits específics i la formació de cèl·lules Treg naturals no són eficients per als antigen que

penetren per l'intestí, ja que no es troben en els òrgans on es produeix la diferenciació i maduració limfocitària [36].

S'han proposat diversos mecanismes per explicar la tolerància oral, és a dir, la tolerància a antígens que penetren per via digestiva. Així s'ha reconegut la implicació de limfòcits Treg, la depleció clonal i l'anergia clonal dels limfòcits T. Weiner *et al.* [35] van suggerir que els mecanismes de tolerància oral podien estar associats a la dosi d'antigen rebuda: si era una dosi única i elevada s'afavoria l'eliminació clonal o l'anergia clonal, mentre que si es tractava de dosis petites i repetides s'associava amb la supressió mitjançada per Treg. Tot i això, en estudis recents s'ha descrit que quan més gran és la dosi d'antigen emprada, més nombrosa és la població de limfòcits Treg Foxp3⁺ responsable de la tolerància oral [41].

Les DC CD103⁺ en l'ambient dels GLM tenen una funció important en el mecanisme de tolerància oral. La molècula CD103⁺ s'expressa a la majoria de les DC migratòries que es troben a la LP i, quan capten l'antigen intestinal, el porten cap a GLM i és allà que s'indueix la generació de cèl·lules Treg que tenen una funció clau en la tolerància oral [36].

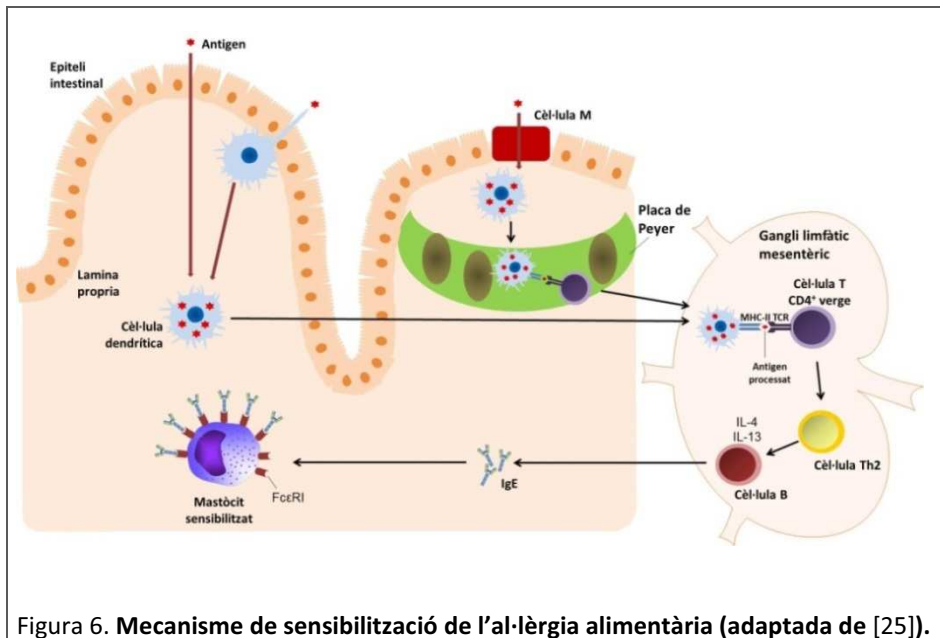
Hi ha dos tipus de cèl·lules Treg Foxp3⁺: les Treg naturals, generades a timus i les Treg induïdes, que es generen a partir de cèl·lules T CD4⁺ verges en el sistema immunitari perifèric i que poden diferenciar-se cap a altres limfòcits Th en condicions inflamatòries [42]. A més, quan no hi ha inflamació, la regulació immunològica mitjançada per Treg Foxp3⁺ és un fenomen potent i pot conferir tolerància oral de llarga durada.

1.4. Patogènia de l'al·lèrgia alimentària

La reacció al·lèrgica alimentària, a l'igual que altres al·lèrgies, comprèn dues fases (**Figura 6**). La primera, anomenada fase de sensibilització, té lloc amb el primer contacte amb l'al·lèrgogen. L'al·lèrgogen és capturat per les DC i presentat en les PP o GLM als limfòcits Th específics. Aquests limfòcits proliferen i es diferencien a cèl·lules Th2 que alliberen una sèrie de citocines que promouen la diferenciació dels limfòcits B cap a cèl·lules plasmàtiques productores d'IgE contra l'al·lèrgogen. Les IgE específiques s'uneixen al FcεRI de la membrana de mastòcits i basòfils i d'aquesta manera es produeix la sensibilització. La segona fase té lloc quan es produeix la segona exposició a

l'al·lèrgen. Aquest s'uneix a la IgE ancorada a la superfície de mastòcits i basòfils sensibilitzats i es produeix la desgranulació cel·lular amb la conseqüent alliberació de mediadors (apartat 1.6) que seran els responsables de les manifestacions clíniques de l'al·lèrgia [43,44].

La resposta al·lèrgica pot incloure tres fases: la primerenca, la tardana i la crònica. La fase primerenca té lloc entre segons i minuts post-desgranulació, afecta al teixit *in situ* i es desencadena per l'alliberament ràpid dels mediadors preformats. La fase tardana té lloc entre les dues i sis hores després del contacte amb l'al·lèrgen i es desencadena per l'alliberament de mediadors de nova síntesi. Finalment, com a conseqüència de les exposicions reiterades amb l'al·lèrgen es pot arribar a assolir un estat crònic [25].



1.5. Mediadors alliberats

1.5.1. Histamina

La histamina (2-[4-imidazol]-etilamina) és una amina vasoactiva producte de la descarboxilació de l'aminoàcid L-histidina catalitzada per l'enzim L-histidina descarboxilasa. La histamina pot ser sintetitzada per diversos tipus

cel·lulars com ara DC, limfòcits i plaquetes, entre altres, però només es troba emmagatzemada a les cèl·lules gàstriques, les neurones histaminèrgiques i als grànuls citoplasmàtics dels mastòcits i basòfils [45,46].

La histamina realitza les seves funcions en unir-se a un dels quatre tipus de receptors d'histamina de membrana heptahelicoïdals anomenats HR (*histamin receptor*) 1, HR2, HR3 i HR4, que pertanyen a la família de receptors acoblats a la proteïna G i que es poden trobar a diferents tipus cel·lulars (**Taula 1**).

Taula 1. Receptors d'histamina i la seva expressió cel·lular (adaptada de [45] i [46]).

Tipus de receptor	Tipus cel·lular	Funcions principals
HR1	Múscul llis, cèl·lules endotelials, nervioses, epitelials, neutròfils, eosinòfils, monòcits, macròfags, DC, limfòcits B i T	Hipersensibilitat al·lèrgica i broncoconstricció, increment de la permeabilitat vascular, regulació del consum d'aliment i aigua, convulsions, atenció i regulació de la son. Efectes antagònics a HR2.
HR2	Múscul llis, cèl·lules endotelials, nervioses, epitelials, neutròfils, eosinòfils, monòcits, macròfags, DC, limfòcits B i T	Efectes antagònics a HR1 (en basòfils i mastòcits inhibició de l'alliberament d'histamina). Inhibició de la síntesi d'anticossos, proliferació de limfòcits T i síntesi de citocines tipus Th1.
HR3	Neurones histaminèrgiques, monòcits, eosinòfils	Funcions cerebrals i efectes perifèrics. Intervé en processos cognitius, estat de son-vigília, regulació homeostàtica d'energia i inflamació.
HR4	Eosinòfils, DC, cèl·lules de Langerhans, neutròfils, limfòcits T, basòfils i mastòcits	Reclutament i activació de cèl·lules involucrades en la resposta inflamatòria. Important en respostes nociceptives, desordres autoimmunitaris, al·lèrgia i càncer de còlon i mama.

HR: receptor histamina

Fisiològicament, la histamina regula moltes i diverses funcions com la proliferació i diferenciació cel·lular, l'hematopoesi, el desenvolupament embrionari, la regeneració tissular, la regulació del cicle son-vigília i la memòria. En situacions patològiques, la histamina desencadena ràpidament símptomes ja que té una acció ràpida sobre l'endoteli vascular, el bronquial i les cèl·lules de múscul llis [45]. En les reaccions al·lèrgiques els receptors

implicats són el HR1 i HR2. Segons la localització dels mastòcits, els signes i símptomes varien i inclouen l'aparició de vasodilatació, eritema, augment de la permeabilitat vascular, broncoconstricció (que provoca obstrucció de les vies aèries i sibilàncies), increment en la secreció mucosal, esternuts, picor i tos [25].

1.5.2. Citocines

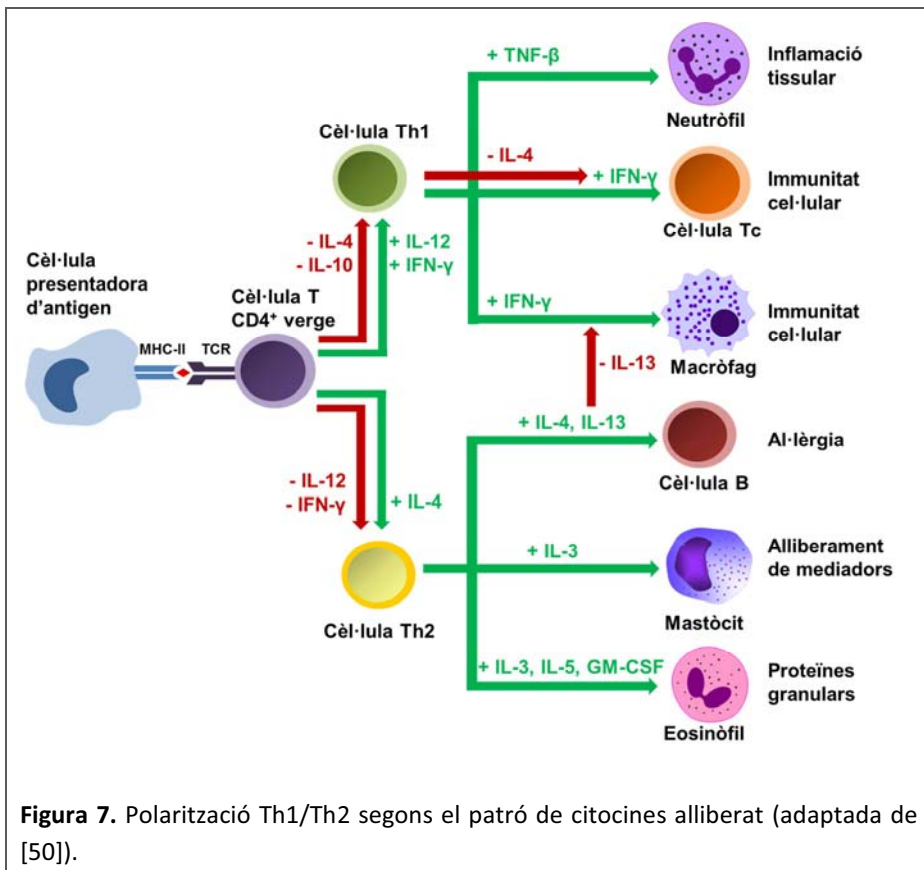
Les citocines són molècules proteiques de baix pes molecular, sintetitzades per diferents tipus cel·lulars i capaces de modular la funció d'altres tipus cel·lulars. Una mateixa citocina pot tenir efectes diversos en diferents tipus cel·lulars (pleiotropia) i diferents citocines poden realitzar la mateixa funció (redundància). A més a més, les citocines poden ser sinèrgiques, és a dir contribueixen per realitzar una mateixa funció, o antagoniques, amb accions contràries. Les citocines s'uneixen a receptors cel·lulars que es poden classificar en sis grups segons la seva homologia estructural en les regions d'unió a les citocines i els mecanismes de transducció del senyal (**Taula 2**). La majoria de citocines implicades en les respostes al·lèrgiques s'uneixen a la família de receptors tipus I, concretament al subtipus que tenen en comú la cadena γ (γc) i els que tenen en comú la cadena β (βc) [47].

Taula 2. Principals famílies de receptors de citocines (adaptada de [47]).

Receptors	Subclasse	Principals citocines
Receptors tipus I (o de hemopoetina)	gp130	IL-6, IL-11, IL-27
	Cadena comú γ (γc)	IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21
	Cadena comú β (βc)	IL-3, IL-5, GM-CSF
Receptors tipus II		IFN, IL-10, IL-20, IL-24, IL-26
Receptors TNF		TNF, LTx, CD40
Receptors IL-1		IL-1, IL-8
Receptors de 7 regions transmembrana acoblats a proteïna G		Quimiocines
Receptors TGF		TGF- β 1, - β 2, - β 3

GM-CSF: factor estimulador de colònies de granulòcits i macròfags; IFN: interferó; IL: interleucina; LTx: limfotoxina; TNF: factor de necrosi tumoral; TGF: factor transformador de creixement

Les citocines s'encarreguen d'iniciar i de mantenir la resposta immunitària. Bàsicament, un limfòcit Th activat es diferenciarà en cèl·lules Th1 o Th2 - encara que existeixen altres llinatges cel·lulars com Th9, Th17, Th21, limfòcits Th fol·liculars (Tfh) i Treg [48] - segons l'estímul rebut i les citocines presents (**Figura 7**). La diferenciació cap a Th1 es produeix per l'estímul de patògens intracel·lulars i provoca la secreció principalment IFN- γ . En el cas de Th2, l'estímul és extracel·lular i es produeix majoritàriament IL-4 [49]. L'IFN- γ de Th1 i la IL-4 de Th2 tenen accions d'inhibició recíproca.



En els processos al·lèrgics es produeix un desplaçament de l'equilibri Th1/Th2 cap a la síntesi de citocines del subtipus Th2 com són IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13, responsables de l'activació d'eosinòfils, producció d'IgE, producció de mucositat, etc. [51,52] (**Taula 3**).

Taula 3. Funció de les principals citocines Th2 (adaptada de [53]).

Citocina	Cèl·lula secretora	Cèl·lula diana	Funcions principals
IL-3	Limfòcits T, macròfags, mastòcits, cèl·lules NKT, eosinòfils i cèl·lules estromals	Basòfils, eosinòfils, cèl·lules progenitores de la línia mieloide, granulòcits, macròfags	Factor de creixement hematopoètic, activació de basòfils i eosinòfils
IL-4	Cèl·lules Th2, basòfils, eosinòfils, mastòcits, cèl·lules NKT i limfòcits T $\gamma\delta$	Limfòcits T i B	Inducció de la diferenciació cap a cèl·lules Th2 i inhibició de Th1, canvi d'isotip cap a IgE en limfòcits B
IL-5	Cèl·lules Th2, eosinòfils activats, mastòcits, cèl·lules NK i NKT i cèl·lules T $\gamma\delta$	Basòfils, eosinòfils i mastòcits	Promoció del creixement i diferenciació d'eosinòfils
IL-10	Limfòcits T i B, monòcits, macròfags i DC	Limfòcits T i B, monòcits, macròfags, DC, mastòcits i granulòcits	Inhibició de la producció de citocines i inhibició de la resposta tipus Th1
IL-13	Limfòcits T, cèl·lules NKT, mastòcits, basòfils i eosinòfils	Limfòcits B, cèl·lules epitelials i de múscul llis, mastòcits, eosinòfils i macròfags	Canvi d'isotip cap a IgE en limfòcits B, activació de monòcits, eosinòfils i reclutament mastocitari

1.5.2.1. Interleucina-3

La IL-3 és un monòmer de 15,1 kilodaltons (kDa) codificada al cromosoma 5, en una regió molt propera al factor estimulador de colònies de granulòcits i macròfags (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) i a la IL-5, fet que explica que les seves funcions se solapin parcialment. El seu receptor és de tipus I i comparteix la cadena comú β amb IL-5 i GM-CSF. Durant els estadis primerencs de l'hematopoesi, la IL-3 actua com a factor de creixement per a granulòcits, macròfags i cèl·lules de la línia mieloide. També incrementa l'alliberament de mediadors d'eosinòfils i de basòfils en resposta a la unió de la IgE al seu receptor [53].

1.5.2.2. Interleucina-4

La IL-4 va ser descoberta el 1982 originalment com a factor de creixement o factor estimulador de cèl·lules B. És un monòmer de 15 kDa (129 aminoàcids) i és sintetitzada per cèl·lules Th2, basòfils, eosinòfils i mastòcits (**Taula 3**). Té dos tipus de receptors: tipus I (IL-4R) que només uneix a IL-4, i tipus II que comparteix amb la IL-13 [53]. És el principal estímul en el desenvolupament de la resposta Th2. Té una funció important en la producció d'IgE ja que indueix el canvi d'isotip en la producció d'anticossos cap a IgE, incrementa l'expressió del MHC-II, dels receptors antigènics dels limfòcits B i de CD23, *in vitro* perllonga la vida de les cèl·lules B i T i actua com a mediador en l'adhesió tissular i la inflamació [50,53].

1.5.2.3. Interleucina-5

La IL-5 va ser descrita el 1987 com a factor de creixement d'eosinòfils i de limfòcits B. És una citocina hematopoètica codificada al cromosoma 5 (5q23.3-q31.1). La IL-5 és un dímer de 15 kDa. El seu receptor és de tipus I, amb una cadena α i una cadena comuna β que també comparteix amb IL-3 i GM-CSF. Principalment promou la proliferació, activació, diferenciació, supervivència i adhesió dels eosinòfils. També fa de vincle entre l'activació de limfòcits T i la inflamació eosinofílica [50,53].

1.5.2.4. Interleucina-10

La IL-10 va ser descrita per primera vegada el 1989 com a factor inhibidor de la síntesi de citocines, com a factor derivat de Th2 que inhibia la producció d'IFN- γ i altres citocines de tipus Th1 en models murins. Tot i això s'ha vist que en humans la IL-10 no és exclusiva de resposta Th2 sinó que les cèl·lules Th1 també són capaces de produir-la i, de fet, la principal font d'IL-10 són les cèl·lules Treg. És un homodímer de 20,5 kDa i és codificada, tant en humans com en murins, en el cromosoma 1 (1q31-32) [53]. La IL-10 disminueix la resposta immunitària cel·lular ja que inhibeix la producció de citocines de tipus Th1 en malalties víriques. A més, també evita l'acumulació i l'activació eosinofílica, i inhibeix la producció d'IL-5 induïda per al·lèrgens en models animals d'asma [50].

1.5.2.5. Interleucina-13

La IL-13 va ser descrita el 1989 com a P600, una proteïna expressada en cèl·lules Th2 activades en ratolí. És un monòmer de 10 kDa i és codificada en el cromosoma 5 (5q31), en un clúster de citocines on també es troben els gens per a IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 i GM-CSF [53]. En malalties al·lèrgiques mitjançades per IgE té un paper central en la promoció de la reacció al·lèrgica inflamatòria que cursa amb eosinofília. També inhibeix la producció de citocines inflamatòries, indueix la proliferació i la diferenciació de cèl·lules B, incloent la producció d'IgE, i estimula l'expressió de CD23 i MHC-II [50].

1.5.3. Proteases

Els mastòcits madurs contenen tres tipus de proteases específiques: triptases, quimases i CPA. Aquestes proteases s'emmagatzemen en grànuls i són enzimàticament actives. Segons el tipus, es poden trobar al teixit connectiu o a la mucosa (**taula 4**).

Taula 4. Tipus de proteases mastocitàries i la seva localització (adaptada de [54][55]).

Espècie	Teixit	Proteases		
		triptases	quimases	CPA
Ratolí	Connectiu	Mmcp-6, 7	Mmcp-4, 5, 9	CPA
	Mucosal		Mmcp-1, 2	
Rata	Connectiu	RMCP-6, 7	RMCP-1, 5	CPA
	Mucosal		RMCP-2, 5	
Humà	Connectiu	α, β (I, II i III)	CMA1	CPA
	Mucosal	α, β (I, II i III)		

CMA1: quimasa humana de mastòcit-1; CPA: carboxipeptidasa A; Mmcp: proteasa mastocitària de ratolí; RMCP: proteasa mastocitària de rata

1.5.4. Derivats lipídics de l'àcid araquidònic

Els mediadors lipídics tenen un gran impacte en al·lèrgia i inflamació, tant en el seu inici com en la seva resolució. Deriven d'àcids grassos poliinsaturats com l'àcid araquidònic. L'àcid araquidònic es metabolitza principalment a través dels enzims ciclooxigenasa, que genera els prostanoides (prostaglandines, prostaciclina i tromboxans), i lipooxigenasa, que genera leucotriens.

1.5.4.1. Prostanoides

Es generen per acció de la ciclooxigenasa i inclouen la prostaglandina (PG) D_2 , PGE_2 , prostaciclina o PGI_2 i el tromboxà A_2 (TxA_2). Biològicament són molt actius i es troben implicats en la inflamació del tracte respiratori.

La PGD_2 és produïda pels mastòcits activats i està associada amb la resposta inflamatòria de l'asma al·lèrgica. S'ha descrit que després d'una provocació antigènica aguda en pacients asmàtics, la PGD_2 pot incrementar fins a 150 vegades en el fluid broncoalveolar (*bronchoalveolar lavage fluid*, BALF) [56]. En ratolí un dèficit del receptor per a PGD_2 evita la hiperreactivitat de les vies aèries induïda per l'al·lèrgen [57].

La PGE_2 destaca entre la resta de prostanoides pels seus efectes en l'asma al·lèrgica. És principalment broncoprotectora i antiinflamatòria però també presenta efectes proinflamatoris. Aquesta dualitat depèn de la cèl·lula diana i/o del receptor al que s'uneix. Per exemple, quan activa el receptor E de prostaglandina (subtipus EP3) inhibeix la inflamació de les vies respiratòries en ratolí però, quan hi ha deficiència d'aquest receptor, es desenvolupa una reacció al·lèrgica pulmonar més pronunciada [58]. A la malaltia inflamatòria intestinal, quan s'activen els receptors EP2 i EP4, la PGE_2 exacerba el procés inflamatori [59].

D'altra banda, PGI_2 i TxA_2 tenen efectes en el sistema cardiovascular. La PGI_2 ha estat descrita com a antitrombòtica i vasodilatadora, mentre que el TxA_2 té efectes antagònics a PGI_2 [60].

1.5.4.2. Leucotriens

Es generen per acció de la lipooxigenasa i inclouen els leucotriens (LT) B_4 , C_4 , D_4 i E_4 . El LTB_4 és un derivat dihidroxilat de l'àcid araquidònic i és un potent mediador quimiotàctic de neutròfils i eosinòfils, agent proinflamatori, estimula l'adhesió cel·lular, la producció de radicals d'oxigen i l'alliberació d'enzims hidrolítics per part dels neutròfils [61]. Els LTC_4 , LTD_4 i LTE_4 , també anomenats cisteinil-LT per un residu de cisteïna que tenen en comú, són sintetitzats per la unió del tripèptid glutatió a l'àcid araquidònic (LTC_4) i posterior eliminació de l'àcid glutàmic (LTD_4) i dels residus de glicines (LTE_4). Inicialment es van descobrir com a potents mediadors espasmogènics de

múscul llis (són potents broncoconstrictors), relacionats amb el reclutament de cèl·lules inflamatòries, broncospasme, producció de mucositat, remodelació de vies aèries i filtració vascular pulmonar, ja que incrementen la permeabilitat vascular [61,62].

1.5.4.3. Lipoxines, resolvines i protectines

A més dels eicosanoides esmentats, a partir de l'àcid araquidònic, l'àcid eicosapentanoic i l'àcid docosahexanoic, es poden produir lipoxines, resolvines i protectines. Aquestes substàncies tenen funció antiinflamatòria i són mediadors implicats en la resolució de la inflamació, ja que redueixen la circulació i infiltració de leucòcits cap als teixits on regulen i disminueixen la magnitud de resposta de les citocines i d'espècies reactives d'oxigen (*reactive oxygen species*, ROS) produïdes [63,64].

1.5.4.4. Isoprostans

Existeixen uns altres tipus de prostanoides que es generen a partir de l'àcid araquidònic mitjançant una conversió no enzimàtica induïda per radicals lliures i que s'anomenen isoprostans. Aquests tenen una funció important en la inflamació pulmonar [65] i s'ha descrit, per exemple, que els pacients amb al·lèrgia asmàtica després d'una provocació amb l'al·lèrgogen presenten nivells elevats d'isoprostans a l'orina i BALF, que es pot evitar amb el tractament amb corticosteroides [66].

1.6. Manifestacions clíniques de l'al·lèrgia alimentària

Les manifestacions clíniques de l'al·lèrgia alimentària depenen de si el mecanisme patogènic involucra la síntesi d'IgE, és independent d'IgE o és mixt (**taula 5**).

Taula 5. Manifestacions de l'al·lèrgia alimentària segons el seu mecanisme patogènic (adaptada de [3]).

Mitjançades per IgE	No mitjançades per IgE	Mixtes
Cutànies		
Urticària Angioedema Erupció Eritema	Dermatitis de contacte Dermatitis herpetiforme	Dermatitis atòpica
Respiratòries		
Rinoconjuntivitis aguda Laringospasme Broncospasme	Hemosiderosi pulmonar per proteïnes alimentàries Síndrome de Heiner	Asma
Gastrointestinals		
Síndrome d'al·lèrgia oral Hipersensibilitat immediata gastrointestinal	Enterocolitis per proteïnes alimentàries Enteropatia per proteïnes alimentàries Proctitis per proteïnes alimentàries Malaltia celíaca	Esofagitis eosinofílica Gastroenteritis eosinofílica
Generalitzada		
Anafilaxi		

1.6.1. Manifestacions de l'al·lèrgia alimentària mitjançades per IgE

Causades pels mediadors alliberats com a resultat de la desgranulació de mastòcits. Quan el mastòcit sensibilitzat (amb la IgE unida als receptors) s'exposa a l'al·lèrgen, desgranula ràpidament i allibera mediadors (apartat 1.6). En general, les manifestacions clíniques es produeixen després de pocs minuts i fins a 2 hores de la ingesta de l'aliment que conté l'al·lèrgen. A continuació es detallen les més comunes:

- **Manifestacions cutànies:** la pell és l'òrgan diana més comú en reaccions al·lèrgiques alimentàries mitjançades per IgE. Les manifestacions més habituals són la *urticària*, que consisteix en l'aparició de faves edematoses al derma generalment acompanyada de una forta prujia i l'*angioedema*, similar a la urticària i afecta al derma, mucoses i submucoses però cursa sense l'aparició de faves. Són afectacions agudes i duren menys de 6 setmanes. També pot aparèixer urticària de contacte provocada pel contacte de la pell amb marisc, carn crua, peix, verdura crua, fruita, arròs, ou, mostassa i llet

[67]. Altres afectacions freqüents són eritema, pruíja i exantema maculopapular (erupció similar a la que apareix en el xarampió). L'al·lèrgia alimentària no causa urticària crònica [3].

- **Manifestacions gastrointestinals:** poden tenir dues formes de presentació: la *síndrome d'al·lèrgia oral* (SAO) i la *hipersensibilitat immediata gastrointestinal*. La SAO afecta exclusivament a la zona de l'orofaringe i es manifesta en forma de pruíja i/o formigueig als llavis, llengua, paladar i gola, amb o sense inflamació. Sol ser la manifestació d'al·lèrgia alimentària que es presenta de forma encreuada amb al·lèrgia al pol·len. Els aliments que solen desencadenar la SAO inclouen fruites i verdures crues, i generalment es resolen sense causar cap afectació sistèmica.

La *hipersensibilitat immediata gastrointestinal* es manifesta en forma de nàusees, dolor i rampes abdominals, vòmits i/o diarrea i apareixen entre minuts i hores després de la ingesta. Poden formar part de la reacció anafilàctica o presentar-se de forma aïllada [26][3].

- **Manifestacions respiratòries:** l'al·lèrgia alimentària pot manifestar-se per afectacions respiratòries (de les vies superiors o inferiors). En general són signes i símptomes associats amb manifestacions cutànies i gastrointestinals. En cas d'afectació de les vies superiors, les més comunes són la rinoconjuntivitis, la congestió nasal i la pruíja. Les afectacions de les vies inferiors són més complicades i potencialment mortals i requereixen intervenció mèdica immediata. Entre aquestes manifestacions s'inclouen dispnea, sibilàncies, tos i laringospasme. En pacients amb malalties pulmonars concomitants s'incrementa el risc de patir manifestacions greus [3]. És extremadament inusual l'aparició de rinitis al·lèrgica crònica aïllada associada a al·lèrgia alimentària. Els aliments causants de manifestacions respiratòries descrites són la farina de blat, els crustacis, la soja, el cacauet, l'ou i la llet.
- **Manifestacions oculars:** acostumen a acompanyar les manifestacions respiratòries. Les manifestacions més freqüents inclouen eritema periocular i/o conjuntival, pruíja i llagrimeig.

- **Anafilaxi:** és la forma més greu de manifestació d'al·lèrgia alimentària ja que pot posar en risc la vida del pacient. Consisteix en una reacció multisistèmica d'inici molt ràpid, entre segons i minuts post-ingesta, que pot arribar a ser fatal. Les característiques clíniques poden incloure les mencionades anteriorment. Les manifestacions cutànies (urticària, angioedema, pruija, eritema o erupció) apareixen en un 80% dels casos i s'acompanyen d'afectacions respiratòries tant de les vies superiors com inferiors (rinorrea, congestió, esternuts, estridor, ronquera, tos, sibilàncies, dispnea, opressió al pit i cianosi), afectacions gastrointestinals (pruija o edema dels llavis/llengua/paladar, sabor metàl·lic a la boca, nàusees, vòmits, rampes abdominals i diarrea) o afectacions cardiovasculars (taquicàrdia, arítmies, síncope, hipotensió i xoc). La pruija, la hiperèmia conjuntival i el llagrimaig poques vegades es produeixen de forma aïllada, es veuen més sovint en combinació amb altres manifestacions. També es poden presentar símptomes neurològics. La forma més greu d'anafilaxi és el xoc anafilàctic que implica afectació cardiovascular amb increment de la permeabilitat vascular i disminució de la pressió arterial.

1.6.2. Manifestacions de l'al·lèrgia alimentària no mitjançades per IgE

Resulten de l'alliberament de citocines de tipus Th2 (IL-4, IL-5 i IL-13) les quals indueixen inflamació eosinofílica. Són més lentes que les mitjançades per IgE i triguen més de 4 hores en aparèixer després de la ingestió. Principalment són afectacions gastrointestinals encara que també poden afectar a altres òrgans.

- **Manifestacions gastrointestinals:** Es poden manifestar en forma d'*enterocolitis gastrointestinal* que afecta principalment als infants però també està descrita en adults. En aquesta apareixen signes aguts en forma de vòmits i/o diarrea profusos i recurrents produïts després de la ingestió de l'aliment responsable. Les manifestacions més greus cursen amb depleció de volum, deshidratació i/o hipotensió. En general apareixen després de la ingesta de llets maternitzades que contenen llet de vaca o batuts vegetals que contenen proteïnes de soja, encara que també s'han associat a menjar sòlid [68]. En femtes es pot detectar sang, neutròfils,

eosinòfils i cristalls de Charcot-Leyden. En la biòpsia intestinal del jejú s'observen vellositats aplanades, edema i augment en el nombre de limfòcits, eosinòfils i mastòcits.

L'enteropatia induïda per proteïnes alimentàries es caracteritza per síndrome de malabsorció amb presència de diarrea, vòmits i poc augment de pes. També apareix dolor i distensió abdominal, hipoproteïnèmia i edema. Es diferencia de l'anterior perquè no s'observa sang a les femtes i el vòmit és menys abundant.

Una altra afectació comuna és la *proctocolitis induïda per proteïnes alimentàries* que es presenta en els primers mesos de vida i s'identifica per l'aparició de sang i mucositat a les femtes. Els infants que ho pateixen no semblen malalts ja que tenen un creixement normal i absència de vòmit. Les lesions se centren en general al recte però pot involucrar tot l'intestí gros on provoca infiltrats eosinofílics o abscessos d'eosinòfils a l'epiteli intestinal [3].

Per últim, *la malaltia celíaca*, genera una atròfia de les vellositats intestinals amb una intensa infiltració cel·lular. Els pacients presenten diarrea o esteatorrea acompanyada d'una distensió abdominal i flatulències, retard en el creixement, i ocasionalment nàusees i vòmits. Els pacients han de seguir una dieta lliure de gluten durant tota la vida [3,26].

- **Manifestacions cutànies:** principalment es produeix *dermatitis de contacte* per manipulació d'aliments, el més perjudicial és el marisc cru encara que també pot aparèixer per contacte amb carn, fruites, verdures i espècies. La zona afectada es torna eczematososa amb eritema i vesiculació [69]. També hi ha casos de dermatitis herpetiforme que és una manifestació de la malaltia celíaca i consisteix en una erupció cutània crònica amb aparició de faves, caracteritzada per lesions papulovesiculars cròniques, pruriginoses, distribuïdes en colzes, esquena, genolls i natges. L'eliminació del gluten de la dieta resol aquesta afectació.
- Manifestacions respiratòries: Se sol presentar *hemosiderosi pulmonar induïda per aliments*, concretament la *síndrome de Heiner*

que es produeix per ingesta de llet de vaca. Es caracteritza per infiltracions pulmonars recurrents, hemosiderosi, pèrdua de sang per via gastrointestinal, deficiència de ferro per anèmia i retard en el creixement. Es resol eliminant la llet de la dieta.

1.6.3. Manifestacions de l'al·lèrgia alimentària mixtes

En afectacions mixtes, els mecanismes mitjançats per IgE i sense IgE actuen conjuntament produint una exacerbació de la simptomatologia com la dermatitis atòpica o l'eosinofília gastrointestinal.

- **Manifestacions cutànies:** s'estima que almenys un terç dels afectats per *dermatitis atòpica* pateixen també reaccions d'hipersensibilitat alimentària. Els aliments més freqüentment implicats en infants són l'ou, la soja, la llet de vaca i el blat [70]. En adults és poc freqüent que es desencadeni dermatitis atòpica per al·lèrgia alimentària.
- **Manifestacions respiratòries:** l'asma, de la mateixa manera que succeeix amb la rinitis al·lèrgica, no és una alteració que es produeixi de forma aïllada en l'al·lèrgia alimentària però sí que apareix durant la reacció al·lèrgica sistèmica com a asma induïda per aliments. A més a més, és l'afectació més descrita per inhalació de partícules d'origen alimentari [71], sent la farina de blat l'aliment més perjudicial quan s'inhala i s'ha descrit que afecta a un 9% del forners [26].
- **Manifestacions gastrointestinals:** les gastroenteropaties al·lèrgiques eosinofíliques són un grup de malalties que es caracteritzen per infiltració d'eosinòfils. L'*esofagitis eosinofílica* produeix, disfàgia, nàusees, vòmits, dolor abdominal i regurgitació. En casos greus poden aparèixer estenosi esofàgica i obstrucció. Els pacients sovint presenten alguna altra malaltia atòpica i poden sintetitzar IgE específica contra els al·lèrgens alimentaris causants, però per al diagnòstic no cal una prova d'IgE positiva.

—Introducció—

La *gastroenteritis eosinofílica* està caracteritzada per infiltració d'eosinòfils a l'estómac, intestí prim o en tots dos òrgans i, a vegades, també es veu afectat l'intestí gros. Les manifestacions clíniques són vòmits, dolor abdominal, diarrea, síndrome de malabsorció, ascites eosinofílica i retard en el creixement [3].

2. Modulació de la resposta al·lèrgica per flavonoides de la dieta

Els flavonoides són metabòlits secundaris dels vegetals implicats en la defensa contra patògens i la protecció enfront de radiacions ultraviolades. Estructuralment pertanyen a la família dels polifenols. En els vegetals comestibles contribueixen a certes propietats organolèptiques com l'amargor, l'astringència, el color, l'olor, el sabor i l'estabilitat oxidativa [72]. Actualment es coneixen més de 8000 estructures fenòliques i prop de 4000 corresponen a flavonoides.

Els flavonoides són els polifenols més abundants en la dieta humana. L'estructura bàsica és un esquelet de quinze àtoms de carboni amb dos anells aromàtics (anells A i B) units per un pont de tres carbonis (anell C)(**Taula 6**) [73].

Els flavonoides es poden classificar en diferents subgrups: flavonols, flavones, flavanones, isoflavones, flavanols (o flavan-3-ols) i antocianidines (**Taula 6**). Les principals fonts de flavonoides són vegetals i fruites, té negre i verd, vi negre, cafè, xocolata, olives, algunes herbes i espècies (com la cúrcuma o el romaní), fruita seca i algues [74].

Fa més de 60 anys que van aparèixer les primeres publicacions que conferien als flavonoides (aleshores vitamina P) certes propietats protectores en al·lèrgia i anafilaxi [75–78].

2.1. Efectes dels flavonoides en models animals d'al·lèrgia

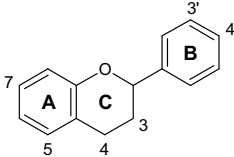
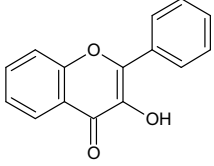
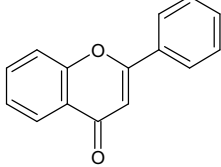
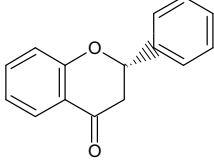
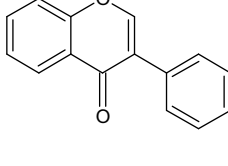
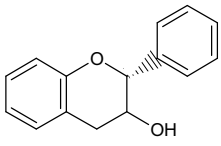
Els models animals han permès estudiar l'efecte protector dels flavonoides en l'al·lèrgia, sobretot en l'al·lèrgia respiratòria. Molts d'aquests estudis estan centrats en l'efecte dels flavonoides sobre la producció d'IgE, d'altres mostren la seva influència en la desgranulació mastocitària i l'alliberament dels seus mediadors i també n'hi ha que avaluen el seu efecte després d'una provocació amb l'al·lèrgen per via respiratòria.

2.1.1. Flavonoides i anticossos IgE

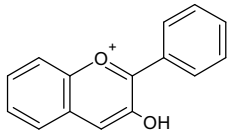
Hi ha diversos estudis que demostren l'efecte de l'administració de flavonoides sobre la concentració sèrica d'IgE de forma aïllada encara que molts ho fan en models d'al·lèrgia (apartat 2.1.4). S'ha observat que una dieta amb flavones, concretament crisina i apigenina, en ratolins sensibilitzats amb ovoalbúmina (OVA), és capaç de reduir la concentració d'IgE total, encara que no modifica la IgE específica [79,80]. D'altra banda, l'administració oral d'un extracte de la planta *Kalanchoe pinnata*, que conté flavonols com la quercetina, la quercitina i el kaempferol, en ratolins sensibilitzats amb OVA, és capaç de reduir la concentració d'anticossos IgE específics [81].

Malgrat aquests efectes atenuants sobre els nivells d'IgE s'ha descrit que isoflavones de la soja, com l'equol i la daidzeïna, augmenten la producció d'IgE en ratolins sensibilitzats [82].

Taula 6. Classificació dels flavonoides segons la seva estructura química (adaptada de [83]).

Estructura química	Flavonoides		
<p>ESTRUCTURA BÀSICA</p> 			
<p>FLAVONOLS</p> 	<p>Astragalina Fisetina Hiperina Isoquercitina Kaempferol Morina</p>	<p>Miricetina Miricitrina Quercetina Quercitrina Rutina</p>	
<p>FLAVONES</p> 	<p>Apigenina Baicaleïna Crisina Diosmetina</p>	<p>Luteolina Orientina Vitexina Tricetinidina</p>	
<p>FLAVANONES</p> 	<p>Eriocitrina Eriodictiol Hesperetina Naringenina Ponciretina</p>		
<p>ISOFLAVONES</p> 	<p>Daidzeïna Equol Genisteïna Tectorigenina</p>		
<p>FLAVAN-3-OLS (FLAVANOLS)</p> 	<p>Mono- mèrics</p> <hr/> <p>Polimèrics</p>	<p>(-)-epicatequina Gal·lat d'(-)- epicatequina (ECG) (-)- epigal·locatequin a</p> <hr/> <p>Procianidines</p>	<p>(-)- epigal·locatequin a-3-gal·lat (EGCG) (+)-catequina (+)- gal·locatequina</p>

ANTOCIANIDINES



Cianidina
Delfinidina
Malvidina
Pelargonidina

2.1.2. Flavonoides i anafilaxi cutània passiva

Estudis amb flavonoides suggereixen el seu potencial com a inhibidors de la desgranulació mastocitària a l'avaluar la reacció d'anafilaxi cutània passiva (*passive cutaneous anaphylaxis*, PCA). La PCA és una resposta dèrmica immediata que permet la detecció visual de l'increment de la permeabilitat vascular. En primer lloc s'administra intradèrmicament una solució d'IgE anti-dinitrofenil (anti-DNP) que indueix la sensibilització cutània, al cap de 24 o 48 h post-sensibilització s'administra per via intravenosa DNP-albúmina sèrica humana que conté el colorant blau Evans. Quan es produeix la unió antigen-anticòs en els animals sensibilitzats es desencadena la desgranulació mastocitària que permet la visualització de la reacció al·lèrgica gràcies a l'aparició del colorant en la pell dels animals.

S'ha descrit que l'administració per via oral o intraperitoneal de flavanones com naringenina, hesperidina i ponciretina és capaç d'inhibir parcialment la reacció de PCA, i és la naringenina la flavanona més efectiva [84,85].

Així mateix s'ha demostrat l'activitat inhibidora de la PCA per part de flavanols, com els presents en un extracte de mongetes d'azuki (*Vigna angularis*), ric en catequina i epicatequina [86] i en un extracte de l'escorça del pi marítim (*Pinus pinaster*) ric en procianidines [87]. Els flavonols isoquercitina i morina també han demostrat un efecte inhibidor de la PCA en ratolins [88–90].

2.1.3. Flavonoides i anafilaxi sistèmica

L'activitat antial·lèrgica dels flavonoides també s'ha estudiat en l'anafilaxi sistèmica provocada pel component 48/80 que dóna lloc a la desgranulació massiva dels mastòcits, fet que pot induir la mort de l'animal.

Un estudi realitzat amb un extracte de KOB03, que conté la flavona baicaleïna, va demostrar un efecte inhibitor de l'alliberament d'histamina i la capacitat d'augmentar la supervivència dels animals que havien rebut aquest flavonoide [91]. Així mateix, l'administració oral d'un extracte de *Kalanchoe pinnata*, que conté quercetina, quercitina i kaempferol, va ser capaç de protegir davant d'un xoc anafilàctic [81], a l'igual que un extracte d'*Albizia lebeck* amb catequina [92].

2.1.4. Flavonoides en models d'al·lèrgia respiratòria

S'ha avaluat l'efecte dels flavonoides en models animals d'al·lèrgia respiratòria (**Taula 7**). En aquests models s'immunitzen els animals amb un al·lèrgogen, en general OVA i més tard es realitza una provocació mitjançant l'exposició a l'al·lèrgogen en forma d'aerosol. En pacients amb al·lèrgia respiratòria el contacte constant amb al·lèrgens ambientals provoca una inflamació persistent que té com a resultat alteracions compensatòries estructurals de les vies anomenades "remodelació de les vies respiratòries" i que provoquen limitacions en el flux respiratori o la hiperreactivitat bronquial (o de les vies aèries, AHR). En els models animals es valora aquesta AHR, la infiltració cel·lular pulmonar i mediadors en sèrum i/o en el BALF.

Taula 7. Estudis amb flavonoides en models animals d'al·lèrgia respiratòria (adaptada de [83]).

Flavonoide (classe)	Font	Ruta/dosi	Efectes pulmonars	Efectes sistèmics (sèrum)
Crisina (flavona)		p.o. 50 mg/kg	↓ AHR ↓ cèl·lules inflamatòries en BALF ↓ cèl·lules productores de mucositat ↓ cèl·lules caliciformes	↓ [IgE total]

Introducció

Luteolina (flavona)		p.o. 0,1-10 mg/kg	↓ broncoconstricció ↓ AHR ↓ [IL-5] en BALF ↑ IFN- γ /IL-4 en BALF	↓ [IgE específica]
Baicaleïna (flavona)	KOB03	p.o. 100-200 mg/kg	↓ manifestacions rinitis ↓ canvis histopatològics en mucosa nasal	↓ [histamina] ↓ [IgE específica] ↓ [TNF- α]
Bioxanina A (isoflavona)	<i>Trifolium pratense</i>	p.o. 100 μ mol/kg	↑ funció respiratòria ↓ cèl·lules inflamatòries ↓ [IL-2], [IL-4], [IL-5], [TNF- α] en BALF ↓ [IgE total], [IgE específica] en BALF	↓ [IgE total] ↓ [IgE específica]
Quercetina (flavonol)		i.p. 8-16 mg/kg	↓ reacció asmàtica ↓ nombre eosinòfils ↓ [peroxidasa eosinòfils] en BALF ↓ [IL-4], [IL-5], [eotaxina] en BALF	
	<i>Helianthus elastica</i>	p.o. 25-100 mg/kg	↓ broncospasme ↓ signes acústics nasals ↓ nombre eosinòfils	↓ [IgE]
	<i>Kalanchoe pinnata</i>	p.o. 30 mg/kg	↓ AHR ↓ inflamació de les vies aèries	↓ [IgE total] ↓ [IgE específica]
		p.o. 400 mg/kg	↓ metaplàsia cèl·lules caliciformes ↓ [IL-5], [IL-13], [TNF] en BALF	
	Dosi única p.o. 20 mg/kg	Efecte broncodilatador		
Quercetina Isoquercetri na (flavonols)		p.o. 10 mg/kg 15 mg/kg	↓ inflamació eosinofílica	
Quercitrina (flavonol)		p.o. 30 mg/kg	Sense efecte	
Miricetina (flavonol)		p.o. 5 mg/kg	↓ cèl·lules inflamatòries ↓ [peroxidasa eosinòfils] en BALF	↓ [IgE específica] ↓ [IgG1 específica]
	Pol·len d'abella	p.o. 100-200 mg/kg		

Kaempferol (flavonol)		s.c. 30-90 mg/kg	↓ producció mucositat ↓ AHR ↓ nombre cèl·lules inflamatòries ↓ [IL-5], [IL-13] en BALF	
Fisetina (flavonol)		i.p. 1-3 mg/kg	↓ nombre cèl·lules inflamatòries ↓ hiperplàsia cèl·lules caliciformes ↓ [IL-4], [IL-5], [IL-13], [eotaxina] en BALF	
Vitexina ramnòsid (flavona) Rutina (flavonol)	<i>Crataegus pinnatifida</i>	p.o. 100-200 mg/kg	↓ AHR ↓ nombre cèl·lules inflamatòries ↓ producció mucositat ↓ [IL-4], [IL-5] en BALF ↓ expressió de ICAM-1, VCAM-1, MMP-9 ↓ activat MMP-9	
Quercitrina (flavonol) Catequina (flavanol)	<i>Agrimonia pilosa</i> Ledeb	i.p. 50-100 mg/kg	↓ AHR ↓ nombre cèl·lules inflamatòries ↓ [IL-4], [IL-5] en BALF	↓ [IgE total]
Proantocian ines Antocianine s Catequina (flavanols) Flavonols	Provinol®	p.o. 20 mg/kg	↓ resistència vies respiratòries ↓ infiltració eosinòfils ↓ [IL-4], [IL-5] en BALF	
Narirutina (flavanona)		p.o. 10 mg/kg	↓ inflamació de les vies aèries ↓ nombre cèl·lules inflamatòries en BALF ↓ [IL-4] en BALF	↓ nombre eosinòfils sang ↓ [IgE]

Hesperidina (flavanona)		p.o. 1-5 mg/kg 5-30 mg/kg	↓ inflamació de les vies aèries ↓ AHR ↓ infiltració eosinòfils ↓ [IL-5], [IL-17] en BALF	↓ [IgE específica]
	<i>Pinellia ternate</i> + <i>Citrus reticulata</i> 50/50	p.o. 200-400 mg/kg	↓ inflamació de les vies aèries ↓ AHR ↓ infiltració eosinòfils ↓ nombre cèl·lules en BALF ↓ [IL-4], [IL-5], [IL-13], [eotaxina] en BALF	↓ [histamina] ↓ [IgE específica]
	Pyeongwe e-San	p.o. 10-1000 mg/kg	↓ nombre fregaments nasals ↓ [proteïnes inflamatòries] en mucosa nasal ↓ infiltració cel·lular en mucosa nasal	↓ [histamina] ↓ [IgE]
Naringenina (flavanona)		i.p. 50-100 mg/kg	↓ reactivitat i inflamació de les vies aèries ↓ [IL-4], [IL-13] en BALF ↓ expressió del mRNA de CCL5, CCL11 i iNOS	↓ [IgE total]

AHR: hiperreactivitat de les vies aèries; BALF: fluid broncoalveolar; CCL: lligand de quimiocina amb motiu CC; ICAM: molècula d'adhesió intracel·lular; IFN: interferó; IL: interleucina; iNOS: òxid nítric sintasa induïble; MMP: metal·loproteinasa de matriu; TNF: factor necrosi tumoral; VCAM: molècula d'adhesió vascular

Flavones com la luteïna han demostrat tenir efectes preventius i curatius en un model d'asma en ratolí, en el que el polifenol redueix la IgE sèrica, incrementa l'IFN- γ en BALF i modula l'AHR [93]. De forma similar, la crisina és capaç de reduir l'AHR i de disminuir la concentració d'IgE sèrica, dels marcadors inflamatoris i de cèl·lules inflamatòries i cèl·lules caliciformes en el BALF [94].

Els flavonols també han demostrat exercir efectes antiasmàtics. Així, la quercitina és capaç d'incrementar la concentració d'IFN- α i reduir la d'IL-4 i el nombre d'eosinòfils en BALF [95], té un efecte preventiu en el broncospasme induït per histamina [96] i provoca broncodilatació després d'una sola administració [97]. Un extracte fenòlic de pol·len d'abella ric en miricetina, tricetina, quercetina i luteolina és capaç d'inhibir la síntesi d'IgE i IgG1 específiques, la migració leucocitària en BALF i l'activitat peroxidasa d'eosinòfils en teixit pulmonar [98]. Així mateix s'ha demostrat l'efecte

preventiu i curatiu del kaempferol [99] en la producció de mucositat, l'AHR, el nombre de leucòcits i eosinòfils presents en BALF, així com el seu potencial per atenuar les citocines relacionades amb resposta Th2. La fisetina, present en una gran varietat de fruites i verdures, també ha demostrat la seva capacitat per atenuar la inflamació pulmonar, amb reducció de la hiperplàsia de les cèl·lules caliciformes, del nombre d'eosinòfils i limfòcits en BALF, de l'AHR i de la producció de mediadors i citocines relacionats amb resposta Th2, fets que es podrien atribuir al seu efecte sobre el factor de transcripció GATA-3 i de l'expressió del factor de transcripció nuclear (NF)- κ B a nivell pulmonar [100].

Respecte a la rinitis al·lèrgica, s'ha descrit l'efecte d'un compost d'herbes que conté principalment la flavona baicaleïna. La seva administració per via oral va millorar les manifestacions associades a la rinitis al·lèrgica en ratolins, va disminuir el nombre d'esternuts i de fregaments nasals, va reduir els canvis histopatològics a nivell de la mucosa nasal i també va reduir els nivells sèrics d'IgE, histamina i TNF- α [91].

En estudis amb flavanols també s'ha demostrat el seu potencial beneficiós en malalties respiratòries. En un treball realitzat amb extracte d'*Agrimonia pilosa Ledeb* (Rosàcia), que conté majoritàriament catequina i quercitina, es va reduir la infiltració cel·lular pulmonar, va disminuir la producció de citocines en BALF i va atenuar l'AHR en un model d'inflamació induïda per OVA [101]. També s'ha estudiat l'efecte del Provinol, un extracte de vi negre que conté principalment proantocianines i en menor quantitat antocianines, catequines i flavonols, i ha demostrat ser capaç de modular la reactivitat del múscul llis traqueal, induir broncodilatació, disminuir el grau d'inflamació i reduir la concentració d'IL-4 i IL-5 en BALF [102].

Finalment, s'ha descrit l'efecte de flavanones en la modulació de la inflamació de les vies aèries. Treballs amb hesperidina demostren la supressió de la infiltració eosinofílica, la inflamació de les vies aèries i l'AHR en ratolins al·lèrgics, fet que s'ha relacionat amb la disminució de les concentracions d'IL-5, IL-17 en BALF i IgE específica en sèrum [103,104]. Efectes similars s'han observat en ratolí a l'administrar naringenina intraperitonealment o narirutina per via oral [105,106].

2.2. Estudis clínics amb flavonoides en al·lèrgia

Les evidències clíniques dels flavonoides són més limitades que en els estudis preclínic i inclouen estudis d'intervenció en pacients asmàtics i en pacients amb rinitis al·lèrgica a més d'estudis observacionals.

2.2.1. Flavonoides en pacients amb asma al·lèrgica

Els estudis se centren sobretot en Pycnogenol® que conté catequina, epicatequina, taxifolina i flavonoides condensats (procianidines /proantocianidines). En un estudi aleatoritzat, doble cec, controlat amb placebo i creuat, es va administrar Pycnogenol® (2,2 mg/kg/dia; màxim 200 mg/dia) i es va demostrar que els polifenols reduïen la producció de leucotriens i produïen una millora de la funció pulmonar i de la simptomatologia associada [107].

En un altre estudi aleatoritzat, doble cec i controlat amb placebo, de Pycnogenol® (2,2 mg/kg/dia durant 3 mesos) realitzat en 60 pacients amb asma infantil es va observar que el grup dels flavonoides presentava una millora tant a nivell de funció pulmonar com de les manifestacions clíniques d'asma amb reducció dels nivells de leucotriens en orina i un menor ús dels inhaladors [108]. Així mateix Pycnogenol® (100 mg durant 6 mesos) combinat amb corticoides inhalats en 76 pacients amb al·lèrgia als àcars de la pols millorava els signes i símptomes i reduïa la necessitat de corticosteroides [109].

Finalment, en un assaig clínic aleatoritzat, doble cec i controlat amb placebo amb un extracte ric en isoquercitina, procedent de la pell de la granadilla porpra (150 mg/dia durant 4 setmanes) es va demostrar que el flavonoide reduïa la simptomatologia asmàtica (tos, dispnea i sibilàncies) i augmentava la seva capacitat vital forçada [110].

2.2.2. Flavonoides en pacients amb rinitis al·lèrgica

S'han portat a terme diversos assajos clínics amb productes rics en flavonoides en pacients afectats de rinitis al·lèrgica estacional o perenne. Així, mitjançant un assaig clínic aleatori, doble cec i controlat amb placebo realitzat en 58 pacients amb rinitis al·lèrgica perenne, s'ha testat Biminne®,

una mescla d'herbes que, entre d'altres, conté *Ginkgo biloba* i *Scutellaria baicalensis* fonts de quercetina (flavonol) i baicaleïna (flavona). El tractament amb Biminne® va millorar algunes manifestacions de la rinitis al·lèrgica i va disminuir la concentració d'IgE sèrica total i específica [111].

En un estudi realitzat en pacients afectats de rinoconjuntivitis estacional durant la temporada de pol·linització del cedre japonès (*Cryptomeria japonica*) s'ha valorat l'efecte beneficiós d'un extracte de *Perilla frutescens* enriquit en àcid rosmarínic (100 o 50 mg de l'extracte o placebo durant 21 dies) i s'ha observat que les dues dosis de l'extracte milloren la simptomatologia i disminueixen el nombre de neutròfils i eosinòfils en el líquid de rentat nasal [112].

Per altra banda, s'han portat a terme assajos clínics amb extracte de pomaric en procianidines. En un estudi doble cec, controlat amb placebo, en pacients amb pol·linosi pel cedre, l'administració de l'extracte (500 mg, 12 setmanes, 2 setmanes abans de l'inici de la pol·linització), és capaç de reduir la taxa d'esternuts [113] i de forma similar, en pacients amb rinitis al·lèrgica pels àcars de la pols, l'extracte (50 o 200 mg polifenols, 4 setmanes) també millora la simptomatologia amb reducció del nombre d'esternuts, la secreció i la inflamació nasal [114].

També s'ha estudiat l'efecte de Pycnogenol® administrat de forma preventiva (3-4 setmanes o bé 7-8 setmanes abans de la pol·linització) en pacients amb rinitis al·lèrgica al pol·len del bedoll. El grup Pycnogenol® va presentar una millora de la simptomatologia nasal i ocular i amb reducció de la necessitat de medicació quan el tractament s'iniciava un mínim de 5 setmanes abans de la pol·linització [115].

Per altra banda estudis clínics realitzats amb flavonols també demostren la seva eficàcia antial·lèrgica. En un estudi doble cec, controlat amb placebo, l'administració de quercetina o de kaempferol (12 setmanes) presents en un extracte d'aigua de llúpul va alleugerir els símptomes relacionats amb la pol·linosi pel cedre japonès [116]. Així mateix, la isoquercetina modificada enzimàticament en pacients amb rinitis al·lèrgica per pol·linosi millora notablement la simptomatologia ocular produïda pel pol·len, tant si l'administració comença al mateix temps com 4 setmanes abans de la pol·linització [117,118].

En un assaig aleatori, doble cec i controlat amb placebo d'un extracte de pell de tomàquet (*Lycopersicon esculentum*; 360 mg/8 setmanes) font de naringenina, en pacients amb rinitis al·lèrgica perenne es millora la simptomatologia, amb menor freqüència d'esternuts, de rinorrea i d'obstrucció nasal [119].

2.2.3. Estudis epidemiològics amb flavonoides en malalties al·lèrgiques

Els estudis observacionals han demostrat una associació entre el consum de fruita i verdura i la protecció enfront de malalties al·lèrgiques [120–122] i són nombrosos els estudis epidemiològics tipus cas-control o transversals que mostren que el consum de fruita i verdura té un efecte beneficiós sobre la simptomatologia asmàtica i la funció pulmonar en nens [123–129]. D'altra banda, s'ha descrit que un consum elevat de fruita i verdura en dones embarassades està associat amb un menor risc de desenvolupar al·lèrgia en els futurs nadons [130] i també que el consum de vegetals, cítrics i β -carotè durant l'embaràs s'associa a un menor risc de desenvolupar èczema en el nadó [131]. Tot i això en aquests estudis no es pot atribuir l'efecte beneficiós específicament als flavonoides. Malgrat tot, en un estudi transversal realitzat en 11.562 nens d'entre 4 i 6 anys a Anglaterra no s'ha trobat associació entre la prevalença d'asma i el consum de fruites en la dieta [132].

En un estudi cas-control dut a terme a Londres s'ha intentat relacionar el consum d'antioxidants en adults amb una menor freqüència i gravetat d'asma. Aquest estudi, amb 607 casos i 864 controls, s'ha dut a terme a través de qüestionaris sobre asma i hàbits alimentaris. Els resultats permeten concloure que el consum de dues pomes setmanals està inversament associat amb el risc de patir asma, i que el consum de vi negre ho està amb la seva gravetat [133]. Tot i això, un altre estudi cas-control no troba cap relació entre el consum diari de catequina, flavonols i flavanols i la prevalença o gravetat de l'asma [134].

En un estudi de cohort prospectiu realitzat en 2.512 gal·lesos d'entre 45-59 anys d'edat, s'ha avaluat la relació entre el consum de vitamina C, vitamina E, β -carotè, cítrics, pomes i suc de fruites amb la funció pulmonar. Els resultats mostren que existeix una forta associació entre el consum de pomes i la millora de la funció pulmonar [135].

En un altre estudi de cohort a Finlàndia (10.054 persones) s'ha avaluat la possible associació entre el consum de flavonoides i el risc de patir diverses malalties cròniques, entre elles l'asma. Els resultats demostren que la incidència d'asma és menor en les persones que havien fet un consum elevat de quercetina, naringenina i hesperidina [136].

3. Cacao

L'any 1502, durant el seu quart viatge al “Nou Món”, Cristòfol Colom i la seva tripulació van interceptar una canoa a Guanaja (Hondures) que contenia un fruit similar a l'ametlla. Aquelles “ametlles” eren en realitat el fruit de l'arbre *Theobroma cacao*, anomenat així per ser qualificat com a menjar dels déus (del grec **θεος** (*theos*): déu; i **βρῶμα** (*broma*): menjar). Aquesta va ser la primera descoberta del cacao per part dels europeus, tot i que Colom mai no va ser conscient de la importància de la seva troballa ni va arribar a conèixer el pes que tenia el cacao a la cultura mesoamericana. Les llavors de cacao eren molt preuades i eren utilitzades com a moneda de canvi a Mesoamèrica [137].

El terme cacao és originari del poble olmeca, situat a les terres baixes de l'est de la costa del golf de Mèxic; va ser adoptat posteriorment per les cultures maia i asteca i s'ha mantingut pràcticament invariable al llarg dels anys [138]. Tant la religió asteca com la maia tenen històries similars sobre l'origen diví del cacao: el Déu sobirà “Serp emplomada” dels maies o el Déu Quetzalcoatl dels asteques (**Figura 8**), van descobrir el cacao en una muntanya plena d'altres vegetals i ho van oferir a l'ésser humà. Totes dues cultures realitzaven ofrenes regulars als déus oferint-los cacao, begudes de cacao, encens i sacrificis tant d'animals com d'humans.



Figura 8.
Representació del Déu
Quetzalcoatl

Originàriament, el cacao es preparava com a beguda sense sucre, ja que era un producte desconegut per a ells, però l'assaonaven amb xilis i farina de blat de moro i l'anomenaven *xocoatl* [139]. Era una beguda que estava destinada únicament als homes adults, especialment aquells que eren sacerdots, alts funcionaris governamentals, oficials militars i guerrers distingits, així com a les víctimes dels sacrificis humans en rituals. Es considerava que era un producte tòxic per a dones i nens i que havia de quedar reservat per a la noblesa [137].

Tot i ser Colom el primer en descobrir el cacau, la seva introducció a Europa va ser de la mà d'Hernan Cortés. Quan va desembarcar a la costa est de Mèxic, prop de Veracruz, va portar a les seves tropes cap a l'interior, a la capital mexicana Tenochtitlan, on van ser rebuts pel rei Moctezuma (**Figura 9**). Cortés i el seu oficial, Bernal Díaz del Castillo, van deixar constància escrita de la seva conquesta així com del descobriment del cacau. Cortés i els seus homes van ser els primers europeus en assistir al ritual de preparació i consum del cacau a la cort de Moctezuma [137].

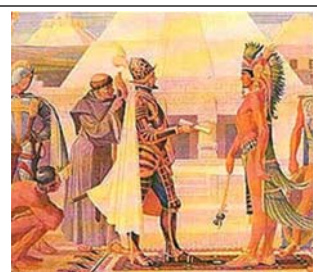


Figura 9. Hernan Cortés i Moctezuma

El 1529, el sacerdot espanyol Bernardino de Sahagún va viatjar a la Nova Espanya on, durant 60 anys, va recopilar informació sobre l'agricultura asteca. En els seus escrits descriu l'ús medicinal de la beguda feta a partir de les llavors del cacau per al tractament de la febre, el mal de panxa, la diarrea infantil i la tos, entre d'altres. Les anotacions de Sagahún no són les úniques que revelen l'ús medicinal del cacau. Al còdex "De la Cruz-Badiano", datat del 1552, i al "Ritual dels Bacabs", còdex descobert a Yucatán el 1914, també s'hi poden trobar descrits els múltiples usos del cacau en diferents afectacions [137].

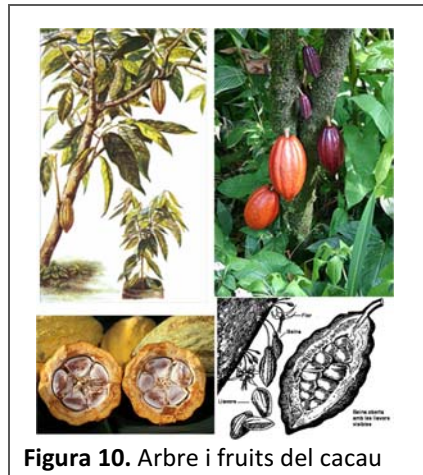
Un cop introduït a Europa, el cacau va ser un producte reservat per a l'alta societat. Casanova li va atribuir propietats afrodisíaques, fet que el va fer encara més popular. El Dr. Henry Stubbe va escriure una tesi anomenada "El nèctar indi" on afirmava que "no havia res que provoqués tanta luxúria com la xocolata". En assabentar-se el Papa Pius V va tastar una tassa, però va trobar que era una beguda tan desagradable que ningú podria fer un hàbit del seu consum, així que no va considerar prohibir-lo. En aquell temps ja s'havia modificat la manera de preparació de la beguda, i se li afegia sucre, vainilla, canyella o, fins i tot, midó per aconseguir una textura diferent [139,140].

Però no va ser fins al segle XIX que van aparèixer els primers productes derivats del cacau tal i com els coneixem avui dia. El 1828, l'holandès Conraad van Houten va aconseguir elaborar cacau en pols i, el 1878, el suïss

Daniel Peters Vevey va afegir llet a aquest cacau i va aconseguir un producte pràcticament igual a la xocolata amb llet actual [140].

3.1. Procés d'elaboració del cacau

L'arbre del cacau és força particular, produeix tant flors com fruits, en forma de beina, que maduren al mateix temps i de manera contínua (**Figura 10**). Un cop recol·lectades, les beines s'obren per separar les llavors. Les llavors experimenten aleshores dos processos: la **fermentació** i l'**asseccament** (**Figura 11**) on s'aconsegueix el gust característic del cacau. Les llavors es netegen i es deixen reposar de 4-6 dies per tal que fermentin. Durant aquest procés, els sucres passen a alcohol i aquest es converteix en diferents àcids (com acètic o d'altres àcids orgànics). La fermentació té lloc a uns 50 °C i les llavors canvien de color porpra a marró. Quan perden la polpa adherida passen a l'asseccament. Aquest procés dura aproximadament una setmana i el contingut d'aigua es redueix del 50% al 5-7%. En aquest punt s'aconsegueix un producte estable que és apte per al transport [140].



El següent pas consisteix en netejar i torrar les llavors assecades (120-130 °C durant 30-40 min), procés que provoca la pèrdua d'àcids volàtils. Al producte torrat se li treu la pellofa i aleshores s'anomena *nib*. Opcionalment els nibs es poden alcalinitzar, procés que altera el color, el sabor i la solubilitat. Alcalinitzats o no, els nibs es molen i així s'aconsegueix el licor o pasta de cacau, producte líquid a temperatura ambient. El següent pas consisteix en passar el licor per una premsa hidràulica d'on s'obtenen dos subproductes: un residu sòlid (la torta) que es mol una segona vegada per obtenir el cacau en pols i, per una altra banda, un greix que un cop refinat serà la mantega de cacau [140]. En funció de la durada de la premsada s'obté un cacau amb diferent contingut de matèria grassa i, segons les mesclades realitzades, s'obtenen diferents productes: per a la xocolata negra es mescla el licor de

cacau amb diferents percentatges de sucre i, per obtenir la xocolata amb llet, es barreja el licor de cacau amb mantega de cacau, sucre i llet.

Tot i que es coneixen diverses varietats de cacau les més importants són: Forastero, la varietat més produïda i cultivada sobretot a l'Àfrica occidental; Criollo, conegut com a "cacau fi" i cultivat a Veneçuela, Carib i Madagascar, i Trinitario que és un híbrid dels dos primers i es cultiva principalment a Antilles i Trinitat [141].

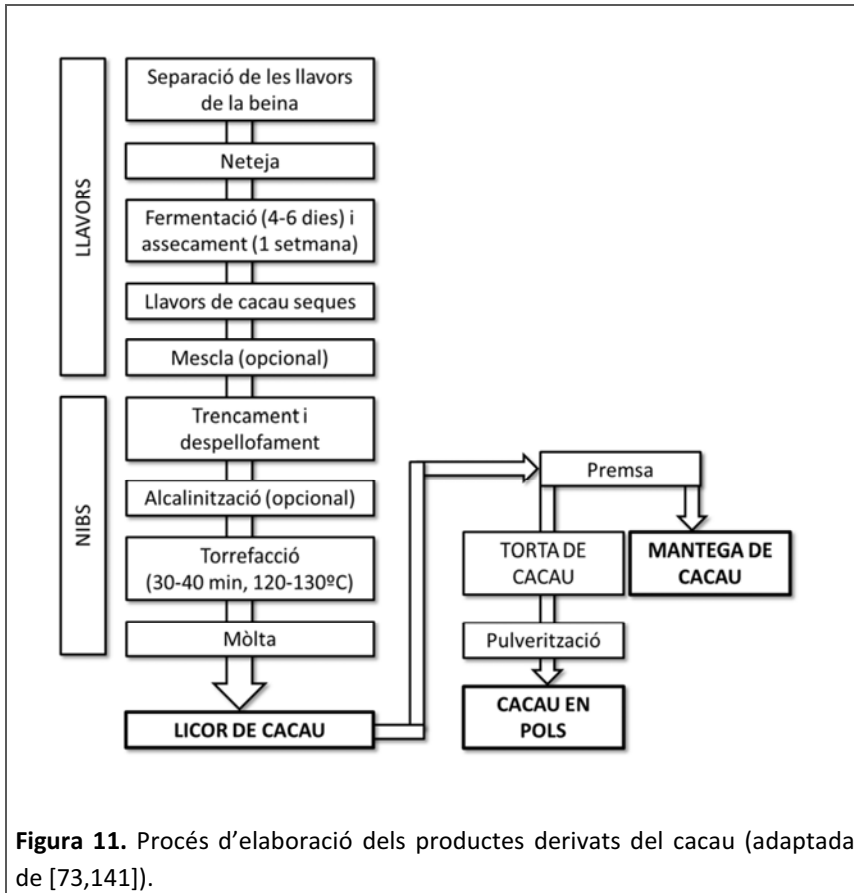


Figura 11. Procés d'elaboració dels productes derivats del cacau (adaptada de [73,141]).

3.2. Composició del cacau

El cacau en pols és una font de fibra (26-40%), proteïnes (15-20%), carbohidrats (~15%) i lípids (10-24%, majoritàriament 10-12%); també conté minerals (fòsfor, magnesi, calci, ferro, zinc, potassi i coure) i vitamines (A, B, E i àcid fòlic) [4] (**Taula 8**). A més a més, el cacau és un aliment ric en polifenols; el cacau en pols pot arribar a tenir 70 mg/g de polifenols [142].

Els principals polifenols presents a la llavor fresca de cacau són flavonoides, concretament catequines, com (+)-epicatequina (és la més abundant, 21–43 mg/g) i (-)-catequina, que constitueixen un 37% del contingut polifenòlic, i oligòmers derivats d'aquest monòmers anomenats procianidines (també anomenades tanins condensats) [143,144]. Els diferents processos que pateix la llavor del cacau fins arribar als productes finals redueixen el seu contingut en polifenols; així, per exemple, l'epicatequina i els polifenols solubles disminueixen fins al 10-20% [145]. A més dels polifenols, al cacau també es poden trobar metilxantines, com la cafeïna (0,2%) i la teobromina (4%) que representen un 0,5-2% de la matèria seca i són responsables de l'ànsia per menjar-ne o l'antull [146,147].

Taula 8. Informació nutricional del cacau en pols per 100 g (adaptada de [4]).

Nutrients	Contingut per 100 g
Macronutrients	
Energia	
kJ	836,8
kcal	200
Proteïnes (g)	21
Carbohidrats (g)	16
Midó	13
Sucre	3
Lípids	10,4
Saturats	6,5
Monoinsaturats	3,6
Poliinsaturats	0,3
Fibra (g)	32,7
Micronutrients	
Sodi (g)	0,02
Potassi (g)	4,2
Calci (mg)	150
Fòsfor (mg)	700
Ferro (mg)	25
Magnesi (mg)	550
Zinc (mg)	7
Coure (mg)	4
Vitamina A (mg) (retinol)	< 0,2
Vitamina E (mg) (tocoferol)	2,4
Vitamina B ₁ (mg)	0,2
Vitamina B ₂ (mg)	0,4
Niacina (mg)	0,6

3.3. Flavonoides del cacau

Els flavonoides pertanyen a l'extens grup de polifenols que es troben presents en tots els aliments comestibles d'origen vegetal [83]. Els flavonoides són metabòlits secundaris de les plantes i contribueixen a la pigmentació blava, vermella i taronja present en fulles, flors i fruits. A més a més, els flavonoides estan presents en llavors, grans, espècies i begudes com el vi, el te o la cervesa [148].

El contingut de flavonoides es veu alterat durant els diferents processos d'obtenció dels productes derivats i això afecta a la seva biodisponibilitat. Quan les llavors del cacau són fresques, en massa seca i sense greix, el contingut de flavonoides solubles és del 15-20% i en les llavors fermentades és del 5%. Durant la fermentació, els flavonoides se sotmeten a processos d'oxidació, de polimerització i reaccions amb proteïnes, el que provoca que el contingut d'epicatequina es redueixi un 10-20% i el de les procianidines de 3 a 5 vegades. També influeixen els processos posteriors (assecament i torrefacció), encara que tots ells els hi confereixen l'aroma típic del cacau. Una altra variable és el contingut i tipus de flavonoides, que depèn de l'origen del cacau [139,144].

Al considerar l'activitat biològica dels flavonoides cal tenir en compte la seva biodisponibilitat, l'absorció i metabolisme al tracte gastrointestinal, la seva distribució tissular i posterior absorció cel·lular, i les seves formes bioactives [149].

3.3.1. Biodisponibilitat dels flavonoides del cacau

La biodisponibilitat dels flavonoides del cacau depèn de l'estructura química del flavonoide, la matriu alimentària, les interaccions amb altres components de la dieta (la presència de sucres augmenta la biodisponibilitat [150], mentre que les proteïnes làctiques la disminueix [151,152]), o factors com l'edat, la genètica, el gènere, la presència d'alteracions fisiològiques, el metabolisme, la microbiota o l'activitat enzimàtica colònica pròpia de la persona que ingereix el flavonoide [139].

La majoria de flavonoides presents en aliments es troben en forma d'èsters, glucòsids o polímers que no poden ser assimilats directament a l'intestí. Per

això els flavonoides requereixen ser hidrolitzats bé per enzims intestinals o per la microbiota abans de poder ser absorbits. Durant el procés d'absorció, se sotmeten a certes modificacions, com per exemple conjugacions i reaccions de metilació, sulfatació i/o glucoronidació (processos que els hi confereixen capacitat antioxidant) en la mucosa intestinal o altres teixits com el fetge [72,139]. L'acumulació de flavonoides en aquest teixits és la fase més important del metabolisme i condiona la seva acció biològica [72].

Hi ha certa controvèrsia respecte a l'assimilació dels flavonoides del cacau, sobretot en referència a les procianidines. Del 22 al 55% dels flavonoides monomèrics s'absorbeixen a nivell intestinal, arriben a una concentració plasmàtica màxima a les dues hores després de ser ingerits i un 20% del que es consumeix s'excreta en l'orina [139,153]. Les estructures oligomèriques, com les procianidines, es degraden a nivell intestinal per la microbiota colònica [143]. S'havia postulat que en l'ambient àcid del medi gàstric les procianidines es podien hidrolitzar [154], però aquesta hipòtesi va ser descartada quan es va observar que, durant el trànsit gàstric, les procianidines romanien estables i arribaven intactes a l'intestí prim. Tot i això hi ha una limitada absorció a aquest nivell (menys d'un 0,5%) i arriben fins al còlon on interactuen amb la microbiota [155].

3.4. Efectes biològics del cacau

3.4.1. Capacitat antioxidant

El cacau té un alt contingut fenòlic que li confereix una capacitat antioxidant més elevada que altres aliments rics en polifenols, com el te verd i el te negre o el vi negre. Concretament, el cacau és dues vegades més antioxidant que el vi negre, de dues a tres vegades més que el te verd i de quatre a cinc vegades més que el te negre [144].

Els flavonoides, més concretament catequina i epicatequina, actuen com antioxidants ja que neutralitzen els radicals lliures, actuen de quelants de metalls (Fe^{2+} i Cu^+) els quals potencien la formació de ROS, com radicals hidroxil ($\cdot\text{OH}$), anions superòxid (O_2^-), peròxid d'hidrogen (H_2O_2) i àcid hipocloròs (HClO) [4]. Tanmateix, s'ha descrit que els flavonoides poden tenir un efecte prooxidant quan s'administren a dosis elevades [156,157].

3.4.1.1. Estudis *in vitro*

Nombrosos estudis demostren l'efecte antioxidant del cacau *in vitro* principalment inhibint o reduint la formació de ROS [158–161]. En un estudi realitzat en cèl·lules de carcinoma de fetge, HepG2, s'ha observat que després d'induir apoptosi per estrès oxidatiu, el tractament amb flavonoides de cacau redueix la formació de ROS [162]. També s'ha comprovat l'efecte neuroprotector, tant de l'epicatequina com d'un extracte de cacau, ja que redueix l'acumulació de ROS en un línia cel·lular neuronal sotmesa a estrès oxidatiu [163]. Recentment, s'ha demostrat l'efecte quimioprotector de l'epicatequina enfront de l'estrès oxidatiu induït químicament en una línia cel·lular de cèl·lules β pancreàtiques, Ins-1E, i el seu paper preventiu enfront del desenvolupament de diabetis tipus 2 [164].

3.4.1.2. Estudis *in vivo*

El nombre d'estudis portats a terme *in vivo* és menor que l'existent *in vitro*. En rates Wistar, s'ha estudiat l'efecte de dietes enriquides amb un 4 i 10% de cacau durant tres setmanes i s'ha comprovat l'increment de la capacitat antioxidant en timus, melsa i fetge [8]. En un altre estudi, també en rates Wistar, s'ha observat que un extracte polifenòlic de cacau, anomenat Acticoa, administrat durant dues setmanes provoca un efecte preventiu en la producció de radicals lliures quan els animals han estat exposats a una temperatura de 40 °C durant 2 h [165]. En un altre estudi, després de la inducció d'un model de colitis en ratolí, l'administració de dietes amb un 5 o 10% de cacau provoca una reducció en els mediadors inflamatoris (NOS i ciclooxigenasa-2), els quals es troben incrementats en aquest model [166]. D'altra banda, la suplementació amb cacau en un model d'inflamació relacionada amb l'obesitat redueix la concentració plasmàtica de mediadors proinflamatoris com la IL-6, MCP-1 i l'adiponectina, disminueix l'expressió de gens proinflamatoris en el teixit adipós blanc de l'epidídim [167].

Els resultats obtinguts en humans es consideren menys conclouents que els obtinguts en models animals ja que no permeten afirmar la contribució del cacau en la defensa antioxidant [168]. Alguns assajos clínics demostren que el consum de cacau comporta un increment de la concentració d'epicatequina plasmàtica la qual redueix la concentració plasmàtica de productes d'oxidació com la concentració d'espècies reactives [169]. En un

altre estudi s'ha descrit que el consum de cacau ric en flavonoides redueix la taxa d'hemòlisi d'eritròcits d'humans adults provocada per estrès oxidatiu [170]. D'altra banda, en un estudi realitzat en adults amb hipercolesterolèmia moderada, el consum de cacau (13,9 mg de polifenols; 4 setmanes) va produir l'increment de lipoproteïnes d'alta densitat (*high density lipoproteins*, HDL) i una disminució de la glucosa, IL-1 β i IL-10 [171]. En situacions d'exercici prolongat, s'ha associat el consum regular de xocolata negra amb una reducció de marcadors d'estrès oxidatiu [172].

3.4.2. Efectes cardiovasculars

Els efectes del cacau i els seus flavonoides sobre els processos oxidatius, el diàmetre dels vasos sanguinis, la inflamació i l'agregació plaquetària, fa que la ingesta de cacau s'associï a la prevenció de malalties cardiovasculars [173]. Diferents estudis *in vitro* i *in vivo* han permès la identificació de dianes cel·lulars i moleculars per a les quals el cacau és capaç d'activar l'òxid nítric (NO), modular el sistema renina-angiotensina-aldosterona, millorar el perfil lipídic i inhibir l'activació i agregació plaquetària [5,174–176].

Les malalties cardiovasculars són una de les principals causes de mort a nivell mundial [177]. Entre els factors de risc d'aquestes malalties es troben la hipertensió, el tabaquisme, la hiperlipidèmia i la diabetis mellitus [178]. S'ha establert que la dieta és un dels factors més importants a l'hora de modificar la incidència de les malalties cardiovasculars [179]. S'ha constatat que els flavonoides de la dieta poden reduir aquests factors de risc mitjançant la protecció de l'oxidació de lípids, proteïnes i àcids nucleics; i també per la reducció de la inflamació, i la inhibició de l'activació plaquetària [180].

Un dels primers estudis epidemiològics que va relacionar l'efecte beneficiós del consum de cacau amb la prevenció de la hipertensió es va realitzar en la població aborigen dels indis Kuna, originaris de l'arxipièlag de San Blas (Panamà) [173]. Aquesta població es caracteritza per presentar taxes d'incidència d'hipertensió associada a l'edat molt baixes, però quan una part de la població va migrar cap a la ciutat va assolir nivells d'hipertensió similars a la resta de habitants del nucli urbà [181]. Es van analitzar els diferents factors mediambientals implicats, incloent-hi la dieta, i es va descobrir que els indis Kuna no emigrants consumien cinc tasses al dia de cacau ric en polifenols (900 mg/dia) [182,183].

3.4.2.1. Estudis *in vitro*

S'ha demostrat que, *in vitro*, el cacau pot inhibir l'enzim convertidor d'angiotensina (ECA) i, per tant, pot disminuir la pressió arterial. En un estudi amb cèl·lules endotelials de vena umbilical humana, l'addició d'un extracte de cacau (6,25-100 mg/mL) provoca una reducció dosi-depenent de l'activitat d'ECA als 10 min i, a les 24 h i a les dosis més altes, un increment de la síntesi de NO [176]. En un altre estudi realitzat també en cèl·lules endotelials de vena umbilical humana, s'ha observat l'efecte inhibidor de l'epicatequina en l'expressió gènica i l'activitat de l'arginasa 2, el que produeix una major disponibilitat de NO en la paret vascular [184]. Similarment, s'ha constatat que les procianidines polimèriques del cacau són capaces de provocar la relaxació endotelial d'anells aòrtics procedents de conill [185].

L'oxidació de les lipoproteïnes de baixa densitat (*low density lipoproteins*, LDL) contribueix a la formació de la placa d'ateroma. En aquest sentit s'ha observat que els flavonoides del cacau (catequina, epicatequina i procianidines) inhibeixen aquest procés d'oxidació [186–189].

3.4.2.2. Estudis *in vivo*

En models animals s'han trobat evidències del potencial beneficiós del cacau sobre les malalties cardiovasculars. En conill, hámster i rata s'ha aprofundit en l'efecte del cacau sobre el desenvolupament de plaques d'ateroma i el perfil lipídic. S'ha observat que, en conills amb hipercolesterolèmia, el consum prolongat de cacau incrementa el temps d'oxidació de les LDL i redueix l'àrea de lesions ateroscleròtiques de l'aorta [174]. També s'ha descrit que l'administració de cacau a llarg termini és capaç de reduir la concentració de colesterol, triglicèrids i LDL en un model d'aterosclerosi en hámster [190]. En aquesta línia, en un estudi realitzat en rates Wistar que seguien una dieta hipercolesterolèmica es va comprovar que la ingesta de cacau incorporat al pinso durant 4 setmanes reduïa la concentració plasmàtica de colesterol i incrementava l'excreció de colesterol fecal i àcids biliars totals. Aquest efecte, però, no s'observava quan la dieta contenia una mescla d'epicatequina i catequina [191]. També s'ha descrit que una administració única d'extracte de cacau no fermentat enriquit en flavonoides (CocoanOX®) provoca un efecte antihipertensiu en rates que desenvolupen hipertensió espontàniament però no en rates normotenses [175].

Diversos estudis centrats en intervencions amb cacau en individus sans indiquen que el seu consum redueix l'oxidació de LDL [188] i incrementa la concentració plasmàtica d'HDL [192–194]. Tanmateix, però, s'ha demostrat que, en pacients amb malalties coronàries, l'oxidació de LDL no es modifica pel consum diari de 48 g de xocolata o 18 g de cacau durant 6 setmanes [195]. També s'ha demostrat, en individus sans, que el consum de xocolata redueix l'activitat plaquetària [196].

Un efecte nociu de l'oxidació és la reacció del NO amb l'anió superòxid per formar peroxinitrit. Aquesta reacció pot comportar una reducció del NO necessari perquè les cèl·lules de múscul llis causin relaxació dels vasos sanguinis i l'increment de peroxinitrit pot promoure el dany oxidatiu. S'ha demostrat que la ingesta de cacau ric en flavonoides per part d'individus amb una funció endotelial reduïda, provoca un augment de la concentració plasmàtica de NO acostant-se als valors observats en individus sans [197]. Similarment, s'ha demostrat l'efecte vasodilatador dels flavonoides del cacau en individus sans després de cinc dies de consum d'una beguda rica en flavonoides del cacau (821 mg/dia).

Donat que els estudis preclínic i clínic recolzen els efectes beneficiosos dels flavonoides del cacau a nivell cardiovascular, l'*European Food Safety Authority* (EFSA), el 2010 i el 2012, ha aprovat les declaracions de propietats saludables dels flavonoides del cacau referents al sistema cardiovascular [198,199].

3.4.3. Efectes antitumorals

Els flavonoides del cacau modulen l'activació de NF- κ B que està involucrat en les respostes proliferatives i inflamatòries, l'adhesió cel·lular i la regulació de la producció de citocines [200]. La inflamació crònica així com l'estrès oxidatiu són factors importants en els processos de carcinogènesi. La formació de ROS i també d'espècies reactives intermèdies d'oxigen i nitrogen (ROI i RNI) poden lesionar el DNA i/o interferir en la seva reparació i generar mutacions que impedeixen el control de la replicació i creixement cel·lular.

3.4.3.1. Estudis *in vitro*

Diversos estudis han descrit la capacitat antiproliferativa, antimutagènica i quimioprotectora del cacau, juntament amb la seva acció preventiva de la formació de ROS [201–206] el que pot evitar l'oxidació del DNA, implicada en els processos de mutagènesi i carcinogènesi.

En un model d'escissió del DNA per mitomicina C, el licor de cacau és capaç d'inhibir la lesió del DNA [201]. De forma similar, un estudi realitzat en cèl·lules de medul·la adrenal de rata (PC12) incubades amb procianidines mostra l'efecte protector dels flavonoides en l'apoptosi cel·lular induïda per H₂O₂. Concretament, H₂O₂, a través de la polimerasa poliADP-ribosa (*poly (ADP-ribose) polymerase*, PARP) disminueix l'expressió de Bcl-XL i Bcl-2 en PC12; però la incubació amb flavonoides redueix l'acció de PARP i incrementa l'expressió de Bcl-XL i Bcl-2 i, a més, inhibeix l'activació de la caspasa-3 a través d'una reducció de la fosforilació de quinases (*Jun-terminal kinase*, JNK i *mitogen-activated protein kinase*, MAPK), relacionades, entre altres funcions, amb processos apoptòtics [203].

Per altra banda, s'ha demostrat que un extracte de flavonoides del cacau en cèl·lules epitelials de fetge de rata (*rat liver epithelial*, RLE) inhibeix diversos processos induïts per H₂O₂ i relacionats amb la carcinogènesi [205]. Concretament, el cacau és capaç d'inhibir la formació de comunicacions intercel·lulars en fenedura (*gap-junction intercellular communication*, GJIC), la fosforilació i la internalització de la connexina 43, l'acumulació de ROS i l'activació de les quinases regulades per senyals extracel·lulars (*extracellular signal-regulated kinase*, ERK) [205]. Els efectes antiproliferatius de les procianidines del cacau també s'han comprovat mitjançant el bloqueig de la fase G2/M del cicle cel·lular, i la disminució de l'activitat de l'ornitina descarboxilasa i la S-adenosilmetionina descarboxilasa, dos enzims clau en la biosíntesi de poliamines [202].

En relació als efectes antimutagènics i quimioprotectors, Ohno *et al.* [204] han observat que l'extracte de cacau és capaç d'inhibir un mutagen químic, el benzo[α]pirè, que provoca dany al DNA quan el seu metabolisme és activat mitjançant el citocrom P450 (CYP), concretament el CYP1A. En cèl·lules tumorals de càncer de mama, s'ha descrit que l'extracte de cacau provoca la sobreexpressió de CYP1A1 i aquest afavoreix el metabolisme i la producció de

metabòlits estrogènics cap a formes no genotòxiques, el que pot comportar una davallada en els nivells estrogènics presents en els tumors mamaris i contribuir amb l'activitat citotòxica del tamoxifen, un fàrmac antiestrogen amb efectes citotòxics [206].

3.4.3.2. Estudis *in vivo*

Els estudis *in vivo* sobre l'efecte antitumoral del cacau se centren sobretot en models animals. S'ha estudiat l'efecte de l'extracte de licor de cacau sobre l'activitat enzimàtica de marcadors tumorals com la fosfatasa alcalina, la γ -glutamil transpeptidasa, el glutatió-S-transferasa i el glutatió reductasa, tant en plasma com en fetge de rates amb hepatocarcinoma. Els resultats obtinguts han confirmat que l'administració diària de l'extracte de licor de cacau, durant dues setmanes, redueix l'activitat d'aquests marcadors tumorals en plasma i fetge i demostra el seu potencial en reduir la gravetat de l'hepatocarcinogènesi [207].

S'ha avaluat l'efecte d'un extracte de cacau en pols (Acticoa) en la incidència de càncer de pròstata en rates Wistar. Després de la inducció del càncer, les rates van rebre Acticoa (24 o 48 mg/kg) durant 9 mesos. Passat aquest temps, els animals que havien rebut la dosi més alta van mostrar una incidència menor de tumors prostàtics, mentre que els animals que van rebre la dosi inferior no presentaven tumors i tenien una taxa de supervivència superior al grup de 48 mg i molt similar al grup control sa [208].

Un altre estudi en rates Wistar ha demostrat que una dieta rica en cacau exerceix efectes antiproliferatius en rates amb càncer de colon a través de la reducció dels nivells d'ERK, proteïna quinasa B i ciclina D, els quals són importants en processos de senyalització durant la divisió i supervivència cel·lular, ja que inhibeixen els processos apoptòtics. A més, la dieta rica en cacau va mostrar efectes proapoptòtics ja que va reduir els nivells de Bcl-XL i va incrementar els nivells de Bax i l'activitat de caspasa-3 [209].

3.4.4. Efectes en el sistema immunitari

El cacau mostra capacitat immunomoduladora en la resposta immunitària innata i adquirida [4,210] tant *in vitro* com *in vivo*.

3.4.4.1. Estudis *in vitro*

Diversos estudis han demostrat el potencial antiinflamatori del cacau *in vitro* [4]. Un extracte de cacau enriquit en epicatequina i catequina és capaç d'inhibir la producció de molècules inflamatòries, com el TNF- α i la proteïna quimiotàctica de monòcits (*monocyte chemoattractant protein*, MCP)-1, en macròfags estimulats amb lipopolisacàrid (LPS) [6]. De forma similar, l'epicatequina en cèl·lules sanguínies estimulades inhibeix la producció d'IL-6 i IL-8 [211]. En canvi, els flavonoides del cacau de cadena més llarga augmenten la secreció de TNF- α , IL-1 i IL-6 en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) estimulades amb LPS [212,213]. També s'ha observat que l'epicatequina, les procianidines B1 i B2 i l'extracte de cacau redueixen l'alliberament de NO per part de macròfags estimulats [6,214].

Respecte a l'efecte del cacau sobre la resposta immunitària adquirida, un extracte de cacau i procianidines en forma de pentàmers, hexàmers i heptàmers redueixen la transcripció d'IL-2 en PBMC humanes estimulades [215,216]. A més, epicatequina i un extracte de cacau en una línia cel·lular limfoide activada amb IL-1 disminueixen l'expressió de CD25 i la secreció de IL-2, molècules relacionades amb l'activació de limfòcits T [217]. Aquests fets podrien estar relacionats amb la capacitat d'epicatequina i procianidines dimèriques de reduir l'activació de NF- κ B en una línia limfoide [200].

En un estudi sobre la modulació del cacau en cèl·lules T efectores, s'ha observat que el cacau suprimeix la producció d'IFN- γ (citocina Th1) en PBMC estimulades [218], mentre que epicatequina incrementa la secreció d'IL-4 (citocina Th2) en una línia cel·lular limfoide i en PBMC [216,217].

3.4.4.2. Estudis *in vivo*

La majoria dels estudis *in vivo* es refereixen a assajos preclínic. En rates Wistar joves i sanes s'ha demostrat que una dieta amb un 10% de cacau, durant tres setmanes, modula la maduració i composició limfocitària i promou la progressió de timòcits immadurs cap a estadis més madurs [7]. També s'ha demostrat que la ingesta de cacau disminueix la proporció de limfòcits Th en melsa, GLM i PP, tot i que la resposta proliferativa i la secreció d'IL-2 en aquests teixits no s'ha vist modificada [7][9]. A més, una dieta enriquida en cacau incrementa el percentatge de cèl·lules T $\gamma\delta$ en GLM i PP, i

també la proporció de limfòcits B en PP [9]. D'altra banda, en rates alimentades amb cacau s'ha detectat una concentració menor d'IgA, IgM i IgG sèriques i s-IgA i s-IgM a nivell intestinal, fet que no està associat amb una proporció menor de limfòcits B en els òrgans limfoides [7,9,12] i pot atribuir-se, en part, a una disminució de la seva diferenciació provocada per un descens en les citocines de tipus Th2. De fet, els esplenòcits d'animals alimentats amb cacau han mostrat una menor capacitat secretora d'IL-4 [7].

En rates adultes Lewis i rates joves Wistar i Brown Norway s'ha avaluat l'efecte de dietes enriquides amb cacau i de dietes enriquides amb un extracte de cacau ric en flavonoides sobre la síntesi d'anticossos, tant sèrics com intestinals. S'ha observat una modulació de la concentració d'IgG sèrica i d'IgA intestinal, si bé la sensibilitat als efectes del cacau depèn de la soca de rata utilitzada [17,219].

En rates immunitzades amb OVA que van rebre una dieta amb un 4 i 10% de cacau a llarg termini (9 setmanes), s'ha observat que la ingesta d'aquesta dieta comporta una secreció menor d'IL-4 i un increment d'IFN- γ per part de limfòcits de melsa i GLM. Per altra banda, també s'ha demostrat que el cacau inhibeix la producció d'IgG1, IgG2a (anticossos relacionats amb resposta de tipus Th2), IgG2c i IgM i incrementa la d'IgG2b (relacionada amb Th1) [11].

També s'ha estudiat l'efecte d'una dieta enriquida en cacau en models d'artritis. En rates Wistar amb artritis adjuvant que van rebre una dieta amb un 5 o 10% de cacau, no s'ha observat reducció de la inflamació, però, en canvi, la dieta amb un 5% de cacau es capaç de disminuir la producció de ROS i de normalitzar les activitats superòxid dismutasa i catalasa [14]. En un estudi similar, en rates Wistar amb artritis adjuvant alimentades amb una dieta amb un 5 o un 10% de cacau, la dieta evita la disminució de limfòcits Treg sanguinis i el desequilibri en els ganglis limfàtics inguinals entre les poblacions cel·lulars NK CD8⁺ i NK CD8⁻ provocada per l'artritis adjuvant [15]. En un altre estudi en rates Louvain amb artritis induïda per col·lagen, la dieta de cacau va ser capaç de modular la resposta d'anticossos, la proporció de limfòcits T i també la síntesi de mediadors proinflamatoris, tot i que no va modificar significativament el desenvolupament de l'edema articular [16]. Respecte a l'efecte d'una dieta amb un 5% de cacau en un model de colitis induït en rata Wistar, malgrat que el cacau no va modificar les

manifestacions clíniques de la colitis, si que va disminuir el TNF- α sèric, la activitat de la NO sintasa i la infiltració cel·lular [13].

En relació a estudis clínics, els resultats són més contradictoris i es refereixen a l'efecte antiinflamatori del cacau. Per una banda, Mathur *et al* [220] han demostrat que una suplementació amb productes de cacau (651 mg de procianidines/dia; 6 setmanes) en persones sanes no afecta a marcadors inflamatoris com IL-1 β , IL-6, TNF- α , proteïna C-reactiva o la P-selectina en sang. En canvi un estudi transversal demostra que el consum regular de xocolata negra redueix les concentracions plasmàtiques de proteïna C-reactiva [221]. També s'ha descrit que el consum de cacau durant quatre setmanes redueix les molècules d'adhesió involucrades en el reclutament de cèl·lules inflamatòries [222]. Recentment s'ha determinat en voluntaris sans que al cap de 6 hores de rebre 40 g de cacau en pols, hi ha una disminució en l'activació de NF- κ B i una reducció en la concentració de molècules d'adhesió sèriques, com la E-selectina o la molècula d'adhesió intracel·lular 1 (*intercellular adhesion molecule 1*, ICAM-1)[223].

Resultats

preliminars

Per tal de desenvolupar el primer objectiu es van assajar diferents procediments experimentals que permetessin assolir un model adequat de pèrdua de tolerància oral a l'ovoal·búmina (OVA) i que comportés la formació d'anticossos IgE.

En total es van realitzar 6 protocols diferents [224] que es resumeixen cronològicament a la **taula 9**:

Taula 9. Disseny experimental previs

Disseny	Soca	Protocol (via)	Resultat
1	Lewis (femelles, 8 setmanes)	OVA + TC (p.o.)	55% animals sensibilitzats, IgE específica negativa
2	Lewis (femelles, 8 setmanes)	OVA + Al(OH) ₃ (i.p.) + OVA (p.o.)	100% animals sensibilitzats, IgE específica negativa
3	Brown Norway (femelles, 5 setmanes)	OVA (p.o.)	27% animals sensibilitzats, IgE específica negativa
4	Brown Norway (50%-50%, 3 setmanes)	OVA + TC (p.o.)	100% animals sensibilitzats, IgE específica negativa
5	Brown Norway (50%-50%, 4 setmanes)	OVA + tBp + Al(OH) ₃ (i.p.)	100% animals sensibilitzats, IgE específica positiva
6	Brown Norway (50%-50%, 4 setmanes)	OVA + tBp + Al(OH) ₃ (i.p.) + OVA (p.o.)	100% animals sensibilitzats, IgE específica positiva

Hidròxid d'alumini: Al(OH)₃; i.p.: administració per via intraperitoneal; OVA: ovoal·búmina; p.o.: administració per via oral; tBp: toxina de *Bordetella pertussis*; TC: toxina colèrica

Disseny experimental 1: Aquest procediment es va realitzar en rates femelles Lewis adultes que van rebre per via oral una solució d'OVA (100 mg/rata) amb toxina colèrica (30 µg/rata) dues vegades per setmana durant tres setmanes. Passat aquest temps es va determinar el desenvolupament d'anticossos anti-OVA i es va estudiar el seu isotip. L'èxit de sensibilització va ser del 55% i cap dels animals va sintetitzar IgE específica

Disseny experimental 2: El segon procediment també es va realitzar en rates femelles Lewis adultes que van ser immunitzades intraperitonealment amb una emulsió d'OVA (0,1 mg/rata) i hidròxid d'alumini. Catorze dies després van rebre per via oral una solució d'OVA (1 mg/rata) sense adjuvant durant

tres setmanes. L'èxit de sensibilització, a dia 35, va ser del 100%, però cap animal va sintetitzar IgE específica.

Disseny experimental 3: Aquest procediment es basa en el descrit per Knippels [225,226], es va dur a terme en rates femelles Brown Norway joves. Aquests animals van rebre per via oral una solució d'OVA (1 mg/rata), sense adjuvant, diàriament durant sis setmanes. La formació d'anticossos es va determinar després de 42 dies i l'èxit de sensibilització aconseguit va ser del 27% i, a més, cap dels animals va sintetitzar IgE específica.

Disseny experimental 4: A continuació, es va aplicar un procediment en rates Brown Norway joves (50% femelles, 50% mascles) que van rebre per via oral una solució d'OVA (100 o 30 mg/rata) amb toxina colèrica (30 µg/rata) dues vegades per setmana i durant tres setmanes. També es va provar un tercer procediment on els animals van rebre un dia per setmana una solució d'OVA (100 mg/rata) amb toxina colèrica (30 µg/rata) per via oral i, la resta de dies, una solució d'OVA (1 mg/rata) sense adjuvant durant el mateix període de temps. L'èxit de sensibilització en els diferents procediments, a dia 21, va ser del 100%. Cap dels animals va sintetitzar IgE específica.

Disseny experimental 5: Aquest procediment es va realitzar en rates Brown Norway joves (50% femelles, 50% mascles) immunitzades intraperitonealment amb una emulsió d'OVA (0,5 mg/rata) amb toxina de *Bordetella pertussis* i hidròxid d'alumini. Es va introduir la toxina com a adjuvant per promoure la síntesi d'IgE [227]. L'èxit de sensibilització va ser del 100% amb síntesi d'IgE específica.

L'assoliment de resultats positius en relació a formació d'IgE específica amb aquest darrer procediment, malgrat que la inducció no fos per via oral, va permetre realitzar dos tipus d'aproximacions que van ser importants per a la continuïtat de la tesi:

- Per una banda, va permetre avaluar l'efecte d'una dieta rica en cacau en animals al·lèrgics ja que desenvolupaven anticossos específics d'isotip IgE. Els resultats obtinguts es recullen a l'**article 1**.
- Per altra banda, va permetre posar a punt el procediment de provocació oral per tal d'induir una resposta anafilàctica i avaluar

variables que poguessin ser útils com a indicadores d'aquesta resposta. Els resultats es recullen a l'**article 2**.

Disseny experimental 6: A partir dels resultats obtinguts en el disseny 5 i del procediment descrit per Ogawa [228], es va intentar perfeccionar el model d'al·lèrgia amb l'objectiu que l'administració oral de l'al·lèrgogen provoqués una resposta immunitària. Aleshores es va assajar un procediment en rates Brown Norway joves (50% femelles, 50% mascles) immunitzades intraperitonealment amb una emulsió d'OVA (0,05 mg/rata), amb toxina de *Bordetella pertussis* i hidròxid d'alumini. Catorze dies més tard van rebre una solució d'OVA (1 mg/rata), per via oral sense adjuvant, durant tres setmanes. L'èxit de sensibilització va ser del 100% amb síntesi d'IgE específica i, a més, els animals van desenvolupar una resposta anafilàctica després de la provocació oral, quantificable mitjançant els indicadors que prèviament s'havien establert.

Així doncs, es van assolir els **objectius 1 i 2** plantejats a la tesi i els resultats es troben a l'**article 3**.

Finalment, a partir del procediment del disseny 6, es va avaluar l'efecte d'una dieta enriquida amb cacau convencional i també amb un extracte de cacau no fermentat ric en flavonoides que van permetre el desenvolupament dels **objectius 3-6** de la tesi. Els resultats constitueixen l'**article 4**.

Aquests resultats s'han presentat a:

- 15th International Congress of Mucosal Immunology, 2011 (Paris, França). *A rat model of food allergy using intraperitoneal sensitization and oral exposure to ovalbumin*. Format: Pòster.
- 5è Congrés de la Societat Catalana d'Immunologia, 2011 (Barcelona, Espanya). *Obtenció d'un model experimental d'al·lèrgia alimentària en rata*. Format: Oral.
- 6th Immunonutrition Workshop, 2012 (Palma de Mallorca, Espanya). *Induction of a food allergy model in Brown Norway rats*. Format: Pòster.

Resultats

ARTICLE 1

“A diet enriched with cocoa prevents IgE synthesis in a rat allergy model”

“Una dieta enriquida amb cacau evita la síntesi d'IgE en un model d'al·lèrgia en rata”

Mar Abril-Gil, Malén Massot-Cladera, Francisco J. Pérez-Cano,
Cristina Castellote, Àngels Franch, Margarida Castell

***Pharmacological Research* 2012; 65:603–608**

Índex de impacte (JCR): 3,976

Categoria: 38/256 (Q1) en *Pharmacology and Pharmacy*

Resultats presentats a:

- 5th International Conference on Polyphenols and Health, 2011 (Sitges, Espanya). *A diet enriched with cocoa flavonoids prevents IgE synthesis in a rat allergy model*. Format: Pòster talk.
- 11th European Nutrition Conference, 2011 (Madrid, Espanya). *Cocoa anti-allergic effects in a rat experimental model*. Format: Pòster.

Resum

Objectiu: Establir l'efecte de la ingesta d'una dieta enriquida amb cacau sobre la síntesi d'anticossos IgE específics en un model d'al·lèrgia en rata i determinar la influència de la dieta en la resposta immunitària Th2.

Material i mètodes: L'estudi es va realitzar en rates Brown Norway (50% femelles, 50% mascles) de 3 setmanes d'edat. El model d'al·lèrgia es va induir mitjançant una immunització, per via intraperitoneal, amb una emulsió d'ovoalbúmina (OVA) -com al·lèrgogen- juntament amb toxina de *Bordetella pertussis* i hidròxid d'alumini -com adjuvants-. Des del dia de la immunització i durant 4 setmanes, els animals van ser alimentats amb una dieta estàndard o amb una dieta enriquida amb un 10% de cacau (amb un 0,2% de flavonoides). Durant l'estudi es va quantificar la concentració sèrica d'anticossos específics anti-OVA dels isotips IgG1, IgG2a, IgG2b i IgE, i també la concentració d'IgE total. A dia final, es van aïllar els limfòcits de ganglis limfàtics mesentèrics i es va quantificar la producció de citocines secretades *in vitro* després de la seva estimulació amb OVA.

Resultats: La dieta enriquida amb cacau va provocar una disminució en la síntesi d'anticossos específics d'isotip IgG1 i IgG2a, relacionats amb la resposta immunitària Th2 en rata, mentre que no es van observar diferències en la concentració d'anticossos anti-OVA d'isotip IgG2b, associats a la resposta Th1 en rata. El fet més rellevant va ser que la ingesta de cacau va inhibir la producció d'IgE, tant específica com total, isotip característic de les respostes al·lèrgiques. Pel que fa a la secreció de citocines per part de limfòcits aïllats de ganglis limfàtics mesentèrics, els resultats van mostrar una reducció tant del factor de necrosi tumoral α com de la interleucina (IL) 10, però no es va modificar la secreció d'IL-4, representativa de la resposta immunitària Th2.

Conclusions: La ingesta d'una dieta enriquida amb un 10% de cacau presenta un efecte immunomodulador, ja que evita la síntesi d'IgE, fet que suggereix el seu potencial en la prevenció o tractament de malalties al·lèrgiques.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Pharmacological Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yphrs



A diet enriched with cocoa prevents IgE synthesis in a rat allergy model

Mar Abril-Gil^a, Malén Massot-Cladera^a, Francisco J. Pérez-Cano^{a,b}, Cristina Castellote^{a,b}, Àngels Franch^{a,b}, Margarida Castell^{a,b,*}

^a Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, E-08028 Barcelona, Spain

^b Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), E-08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 January 2012

Received in revised form 1 February 2012

Accepted 2 February 2012

Keywords:

Cocoa

Flavonoid

IgE

Allergy

Rat

Th2 immune response

ABSTRACT

Previous studies in young rats reported the impact of cocoa intake on healthy immune status and allow suggesting it may have a role in the prevention of some immune-mediated diseases. The aim of this study was to ascertain the effect of a cocoa diet in a model of allergy in young rats. Three-week-old Brown Norway rats were immunized by i.p. injection of ovalbumin (OVA) with alum as adjuvant and *Bordetella pertussis* toxin. During the next 4 weeks rats received either a cocoa diet (containing 0.2% polyphenols, w/w) or a standard diet. Animals fed a standard diet showed high concentrations of anti-OVA IgG1, IgG2a, IgG2b and high anti-OVA IgE titres, which is the antibody involved in allergic response. In contrast, animals fed a cocoa diet showed significantly lower concentrations of anti-OVA IgG1 and IgG2a antibodies. Interestingly, the cocoa diet prevented anti-OVA IgE synthesis and decreased total serum IgE concentration. Analysis of cytokine production in lymph node cells at the end of the study revealed that, in this compartment, the cocoa diet decreased the tumor necrosis factor (TNF)- α and the interleukin (IL)-10 secretion but not IL-4 production. In conclusion, a cocoa-enriched diet in young rats produces an immunomodulatory effect that prevents anti-allergen IgE synthesis, suggesting a potential role for cocoa flavonoids in the prevention or treatment of allergic diseases.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Allergy is a common form of hypersensitivity with an incidence that has increased dramatically in the developed world during the last 50 years and, at present, it affects more than 25% of the population in these countries [1]. Atopic individuals show a dysregulated immune response to non-pathogenic proteins, called allergens, present either in the environment (i.e., dust, pollen, etc.) or in food (i.e., eggs, milk, nuts, etc.). This response starts, like any acquired immune response, with antigenic sensitization. Allergen is taken by dendritic cells and presented to specific Th cells

by means of major histocompatibility complex (MHC) class II and co-stimulatory molecules (CD80, CD86, etc.) thus performing the immunological synapse [2]. Activated allergen-specific Th cells, which usually polarize in the Th1 or Th2 effector populations, differentiate and expand into a Th2 subpopulation. Activated Th2 cells produce cytokines such as interleukin (IL)-4, IL-5, IL-10, and IL-13 which are important in switching antibody production from B cells to predominantly IgE production against the allergen, as well as stimulating mast cells and eosinophils. Specific IgE binds then to IgE receptors (Fc ϵ R1) in mast cells; when allergen crosslinks to mast cell-bound IgE, a large number of preformed and newly synthesized mediators and proteases are released and they are responsible for allergic manifestations [3]. Symptoms of allergy affect the skin, respiratory and gastrointestinal systems or even the nervous and cardiovascular systems. The most severe form of allergy is the anaphylaxis, which involves two or more organic systems, sometimes producing an anaphylactic shock with hypotension that can result in death.

At present, the majority of pharmacological agents available for allergies (corticosteroids and antihistamines) are aimed at treating different allergic symptoms. Although they are highly effective, numerous factors, such as the dose and the route of administration, account for the efficacy of these treatments, and adverse effects are sometimes associated with a chronic use of these drugs [4].

Abbreviations: AU, arbitrary units; BSA, albumin from bovine serum; CBA, cytometric bead array; FBS, fetal bovine serum; IFN, interferon; IL, interleukin; MLN, mesenteric lymph nodes; OPD, o-phenylenediamine; OVA, ovalbumin; PBS-Tw, phosphate-buffered saline containing 0.05% Tween 20; RT, room temperature; tBP, *Bordetella pertussis* toxin; TNF, tumor necrosis factor.

* Corresponding author at: Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av Joan XXIII s/n, Edifici B, 3^è planta, E-08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 402 45 05; fax: +34 93 403 59 01.

E-mail addresses: maridelmar.abril@ub.edu (M. Abril-Gil), malen.massot@ub.edu (M. Massot-Cladera), franciscoperez@ub.edu (F.J. Pérez-Cano), cristinacastellote@ub.edu (C. Castellote), angelsfranch@ub.edu (À. Franch), margaridacastell@ub.edu (M. Castell).

Therefore, research into new anti-allergic therapy must be performed in order to make it effective from the prevention of allergic sensitization until the alleviation of allergy symptoms. Recent studies have highlighted different nutritional interventions that can impact on allergic diseases [5]. Dietary polyphenols have been found among these emerging nutraceuticals [6].

Flavonoids are products of the secondary metabolism of plants that are regularly ingested in small quantities in many edible plants. Chemically, they have a polyphenolic structure showing antioxidant activities. These properties have aroused an increasing interest in assessing their possible beneficial role in the prevention of various diseases, as evidenced by the large number of studies focused on the effect of flavonoids on health over the last decade [7,8]. Considering the role of flavonoids in the immune system, most studies are performed *in vitro*, and those reports focusing on acquired immune response suggest that flavonoids produce an inhibitory effect on lymphocyte activation [9–11]. These studies show that flavonoids can affect both early and late phases of the immune response, including Th1 and Th2 effector responses, although a skewed effect of flavonoids favouring or inhibiting Th1 or Th2 responses has not been clearly established. Most preclinical studies on flavonoids in the acquired immune response use an antigen sensitization model followed by a challenge through different routes, searching to provoke a harmful immune response. Different types of flavonoids show the potential to suppress these damaging responses [12–14].

Cocoa is a rich source of polyphenols, particularly flavonoids such as (–)-epicatechin and (+)-catechin as well as procyanidins, the polymers derived from these monomers [15]. Previous studies demonstrated that a cocoa-enriched diet in rats was able to modify the composition and functionality of several lymphoid tissues [16–19], decreasing serum IgG, IgM and IgA concentrations [16]. In addition, a cocoa diet in rats immunized with ovalbumin (OVA) attenuated anti-OVA IgG1 (the main isotype associated with the Th2 immune response in rats), IgG2a, IgG2c and IgM concentrations but led to higher amounts of anti-OVA IgG2b (the isotype linked to the Th1 response) [18]. Similarly, a cocoa diet was able to attenuate the specific antibody response in a rat model of chronic inflammation [19].

In light of this background which demonstrates the modulatory effect of cocoa on the immune system, the aim of this study was to ascertain whether a cocoa-enriched diet could also attenuate the synthesis of IgE in a rat allergy model.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

The Natural Forastero cocoa (Nutrexpa, Barcelona, Spain) used in this study presented a total polyphenol content of about 22 mg/g with 2.2 mg/g (–)-epicatechin, 0.74 mg/g (+)-catechin and 1.7 mg/g procyanidin B2. Ovalbumin (OVA, grade V), albumin from bovine serum (BSA), gelatine, peroxidase-conjugated extravidin, o-phenylenediamine (OPD), and toxin from *Bordetella pertussis* (tBP) came from Sigma–Aldrich (Madrid, Spain). Imject® alum was obtained from Pierce (Rockford, IL, USA). Purified rat IgE, anti-rat IgE monoclonal antibody and biotin-conjugated anti-rat IgG1, IgG2a, IgG2b and IgE monoclonal antibodies, and rat standard, capture bead and detection reagent for interleukin (IL)-2, IL-4, IL-10, interferon (IFN)- γ and tumor necrosis factor (TNF)- α were purchased from BD Biosciences (Heidelberg, Germany). The biotin protein labelling kit used was from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). RPMI 1640 medium, foetal bovine serum (FBS), L-glutamine, streptomycin and penicillin were obtained from PAA

(Pasching, Austria). β -Mercaptoethanol was provided by Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Diets

The AIN-93G formulation (Harlan) was used as the standard diet. Previous studies have demonstrated that this diet does not contain detectable amounts of polyphenols [20]. A 10% cocoa diet was produced with a modification of the AIN-93G formula, consisting of subtracting the amount of carbohydrates, proteins, lipids and fibre provided by the corresponding percentage of cocoa as previously described [16]. Consequently, the resulting chow was isoenergetic with the standard diet.

2.3. Experimental design and induction of rat allergy model

Brown Norway rats were purchased from Janvier (France) and maintained in the animal facilities of the Faculty of Pharmacy under conditions of controlled temperature and humidity in a 12:12 light:dark cycle. At weaning (day 21 of life) the rats were housed in polycarbonate cages (three to four per cage) and were randomized into two dietary groups: the cocoa group, formed by animals fed chow containing 10% cocoa starting at weaning and continuing until the end of the study (4 weeks later), and the reference group, formed by animals fed standard chow.

At weaning, the rat allergy model was induced using OVA as allergen and tBp to promote IgE synthesis [21]. Each rat was injected i.p. with 0.5 mL of an emulsion containing 0.5 mg of OVA together with 50 ng of tBp emulsified with Imject® (3:1 OVA:Alum). Blood samples were collected at the beginning of the study (before induction) and at 3 and 4 weeks after allergy induction. At week fourth, mesenteric lymph nodes (MLN) were obtained. Lymphocytes from MLN were immediately isolated in sterile conditions by passing the tissue through a mesh (100 μ m, BD Biosciences). The cell suspension was left on ice for 10 min to remove tissue debris by sedimentation. Later, cells were centrifuged (600 \times g, 5 min, 4 $^{\circ}$ C) and resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 100 IU/mL streptomycin–penicillin, 2 mM L-glutamine, and 0.05 mM 2-mercaptoethanol. MLN cells were cultured at 5×10^6 cells in 1 mL with OVA (50 μ g/mL) for 72 h (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂). Supernatants were then collected to assess cytokine concentrations.

Experimental procedures were reviewed and approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the University of Barcelona.

2.4. Quantification of anti-OVA IgG1, IgG2a and IgG2b antibodies

Serum anti-OVA IgG1, IgG2a and IgG2b concentrations were quantified by ELISA as previously described [18]. In brief, 96-well polystyrene plates (Nunc MaxiSorp, Wiesbaden, Germany) were coated with OVA (10 μ g/mL in PBS) and, after blocking with 0.5% gelatine, appropriate diluted samples (ranging from 1/50 to 1/500,000) were added. After washing, biotin-conjugated anti-rat IgG1, IgG2a or IgG2b antibodies and subsequently, peroxidase-conjugated extravidin were added. An OPD-H₂O₂ solution was used for the detection of bound peroxidase. OD was measured on a microtiter plate photometer (Labsystems Multiskan, Helsinki, Finland) at 492 nm. Data were interpolated by means of Ascent v.2.6 software (Thermo Fisher Scientific, S.L.U., Barcelona, Spain). The relative concentration of each anti-OVA isotype was calculated by comparison with a pool of OVA-immunized rat sera to which arbitrary units (AU) were assigned according to the dilution of the serum samples used for each isotype determination (100,000 AU/mL for IgG1 and IgG2a; 10,000 AU/mL for IgG2b).

2.5. Quantification of anti-OVA IgE antibodies

To detect OVA-specific IgE, an ELISA based on that described by Knipples et al. [22] was applied. In brief, 96-well polystyrene plates (Nunc MaxiSorp) were coated with mouse anti-rat IgE antibody (0.5 mg/mL overnight, 4 °C) and blocked with 0.5% gelatine in PBS (1 h). After washing, appropriately diluted serum samples (1/2 to 1/100) were added for 3 h at room temperature (RT). Then, an OVA–biotin complex obtained after conjugation of OVA with biotin was incubated (2 h, RT). Thereafter, peroxidase-conjugated extravidin and OPD solution were subsequently added as detailed above. The relative concentration of anti-OVA IgE was calculated by comparison with a pool of OVA-immunized rat sera to which 10 AU/mL were assigned.

2.6. Quantification of total IgE

Serum IgE concentration was quantified by a sandwich ELISA using anti-rat IgE antibody as capture reagent and biotin-conjugated anti-rat IgE antibody as detection reagent. Thereafter, peroxidase-conjugated extravidin and OPD–H₂O₂ were added as detailed above. IgE standard was applied in a concentration range of 0.15–20 ng/mL and samples were diluted to between 1/20 and 1/200.

2.7. Determination of cytokines by cytometric bead array immunoassay

IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ and TNF- α cytokine concentrations were measured using the BD™ CBA Rat Soluble Protein Flex Set (Madrid, Spain). Briefly, samples or standards were incubated with a mix of specific fluorescent beads for each analyte (1 h, RT, darkness). Later, a mix with the detection antibodies conjugated with phycoerythrin was added and incubated for 2 h under the same conditions. Samples were washed by centrifugation at 200 \times g for 5 min and analyzed using a BD FACSAria™ (BD Biosciences) cytometer and the FCAP Array™ Software (BD Biosciences). The minimum detectable concentrations were 0.46 pg/mL for IL-2, 3.4 pg/mL for IL-4, 19.4 pg/mL for IL-10, 6.8 pg/mL for IFN- γ and 27.7 pg/mL for TNF- α .

2.8. Statistical analysis

The software package SPSS 18.0 (PASW Statistics, SPSS, Chicago, IL) was used for statistical analysis. The Levene's and Kolmogorov–Smirnov's tests were applied to assess variance equality and normal distribution, respectively. The parametric *t*-Student test was used to assess significance. Differences were considered statistically significant for *p*-values < 0.05.

3. Results

3.1. Body weight

At the beginning of the study rats weighed 44.75 \pm 6.79 g (mean \pm S.E.M.). Body weight was monitored throughout the study and its time course was similar between both groups. At the end of the study, body weight was 99.31 \pm 24.17 g [64.3–123.8 g] and 107.91 \pm 15.19 g [90.4–135.3 g] in the reference and cocoa groups, respectively.

3.2. Serum anti-OVA IgG1, IgG2a and IgG2b antibodies

The serum concentrations of specific anti-OVA antibodies belonging to the IgG1, IgG2a and IgG2b isotypes are summarized in Fig. 1. Three weeks after OVA injection, the reference group showed high concentrations of anti-OVA IgG1 and IgG2a, which increased about 6-fold 1 week later (Fig. 1A and B). The cocoa group showed much lower anti-OVA IgG1 and IgG2a concentrations than the reference group both at 3 weeks (80- and 30-fold for anti-OVA IgG1 and IgG2a, respectively) and 4 weeks (500- and 200-fold for anti-OVA IgG1 and IgG2a, respectively) from allergy induction (*p* < 0.001). The anti-OVA IgG2b concentrations in both groups were much lower than the other IgG isotypes and there were no significant differences between the diets (Fig. 1C).

3.3. Serum anti-OVA IgE and total IgE antibodies

The serum concentrations of anti-OVA IgE antibodies and total IgE are summarized in Fig. 2. The reference animals produced high titres of specific anti-OVA IgE after 3 weeks of allergy induction, which increased 6-fold 1 week later (Fig. 2A). The animals fed the

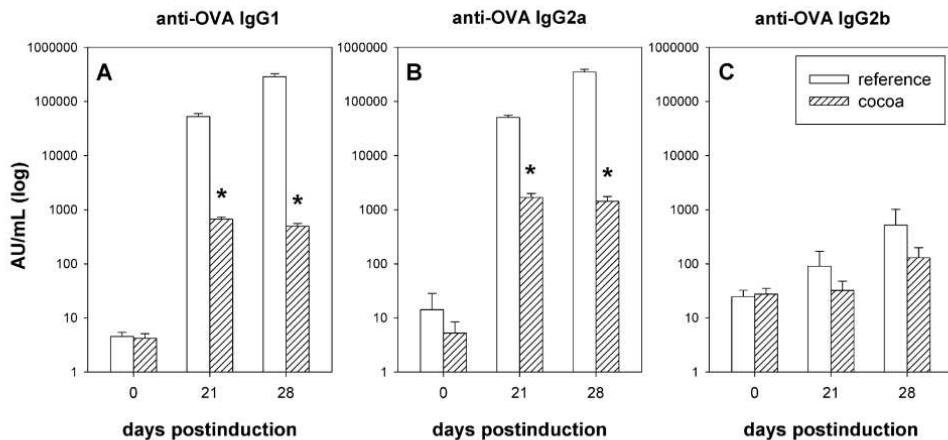


Fig. 1. Concentration of serum anti-OVA IgG1 (A), IgG2a (B) and IgG2b (C) antibodies in reference (white bars) and cocoa groups (striped bars) at 3 and 4 weeks from allergy induction. Results are expressed as mean plus standard error of AU/mL logarithm. **p* < 0.001 between reference and cocoa groups.

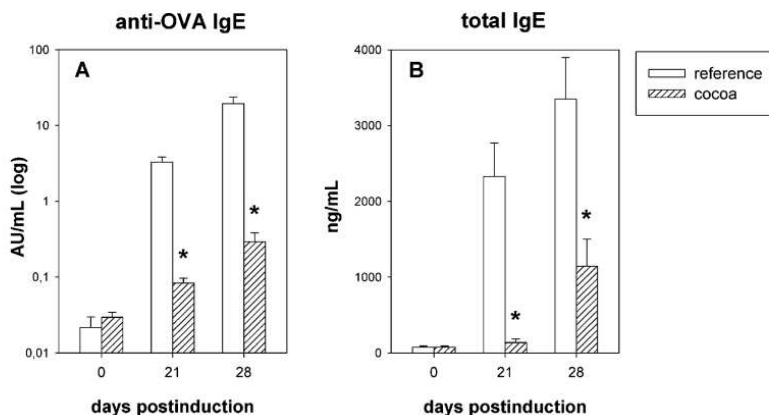


Fig. 2. Concentration of serum anti-OVA IgE (A) and total IgE (B) in reference (white bars) and cocoa groups (striped bars) at 3 and 4 weeks from allergy induction. Results are expressed as mean plus standard error of AU/mL logarithm in anti-OVA IgE and as mean plus standard error of total IgE concentration (ng/mL). * $p < 0.01$ between reference and cocoa groups.

cocoa diet did not produce such high anti-OVA IgE titres either at 3 weeks (40-fold lower) or 4 weeks (60-fold lower) after allergy induction ($p < 0.001$).

The effect of cocoa diet on IgE was also apparent in the total serum IgE concentration (Fig. 2B). Values of IgE before allergy induction were 75.55 ± 15.45 ng/mL and 74.57 ± 16.78 ng/mL (mean \pm standard error) in the reference and cocoa groups, respectively. In the reference animals, serum IgE concentration increased up to about 3300 ng/mL after 4 weeks of allergy induction (Fig. 2). The cocoa diet prevented total IgE increase at 3 and 4 weeks from allergy induction ($p < 0.01$).

3.4. Cytokine production

At the end of the study, cells from MLN were incubated to establish a cytokine pattern (Table 1). After OVA stimulation, cells obtained from the cocoa group secreted lower concentrations of TNF- α and IL-10 but higher IL-4 than those from the reference group. No difference was observed in IL-2 values and IFN- γ production was non-detectable ($p < 0.05$).

The same cytokines were tested in serum in the third week of the study. Non-detectable values were obtained in these samples from both the reference and cocoa groups.

4. Discussion

This study demonstrates that a diet containing 10% cocoa is able, in young rats, to prevent the synthesis of antibodies involved in allergic reaction. This result suggests that cocoa could be used as a nutraceutical in allergic diseases.

Previous studies demonstrated that cocoa diets attenuated antibody synthesis in Wistar rats after immunization [18,19]. These results prompted us to ascertain what happens in an allergy model.

In this study we induced the IgE synthesis by injecting *Bordetella pertussis* toxin together with ovalbumin (OVA) and alum adjuvant into Brown Norway allergy-prone rats. A similar model in Brown Norway rats was applied by Dong et al. [21] and that involved high titres of anti-OVA IgE, 3 weeks after injection. In this study, we demonstrate that young rats that were fed a diet containing 10% cocoa produced drastically less anti-OVA IgE and, moreover, showed lower concentrations of anti-OVA IgG1 and IgG2a, Th2-related antibodies in rats. From these results, lower mast cell sensitization and a reduction of mediators released from these cells after allergen challenge would be expected. Therefore, it possible to suggest that cocoa has the potential to prevent allergic manifestations.

The cocoa compounds responsible for these effects are still to be ascertained, but flavonoids are good candidates. Cocoa has a relatively high content of flavanols such as catechin and epicatechin and unique long procyanidins which, while most of them cannot be directly absorbed, are metabolized by microbiota to phenolic metabolites that are eventually absorbed [23]. Cocoa also contains lower amounts of flavonols such as quercetin, flavones such as luteolin, and flavanones such as naringenin [15,24]. Some preclinical studies show the effect of dietary flavonoids on specific IgE production and allergic manifestations. In a model of food allergy induced in mice with OVA, the intake of apple condensed tannins, which are rich oligomeric flavanols, decreased serum OVA-specific IgE and IgG1 synthesis and inhibited the development of oral OVA sensitization [25]. Single flavonoids such as quercetin and silibinin administered p.o. have also demonstrated attenuating activity on specific IgE synthesis [26,27]. In addition, in an allergy model, mice treated daily p.o. with an extract of *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae), which contains quercetin derivatives among other flavonoids, reduced the production of specific IgE and were protected against fatal allergenic challenge [28].

Table 1

Cytokine concentration in MLN cell supernatants after stimulation with OVA. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean.

Groups	IL-2 (pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
Reference	6.72 ± 0.61	n.d. ^a	1677.34 ± 234.08	5.74 ± 1.39	226.88 ± 38.61
Cocoa	6.72 ± 0.86	n.d.	266.65 ± 45.12	11.69 ± 2.05	94.22 ± 15.11
p-Value	NS	-	<0.005	<0.005	<0.05

^a Non-detectable values.

The cocoa diet partially prevented the increase of total IgE in serum that occurs after allergy induction. These results are in line with some studies using flavanol- or flavone-enriched diets. In first case, a leaf extract rich in the flavanol myricitrin decreased total IgE in an allergy model in transgenic mice [29]. The flavones chrysin and apigenin suppressed total IgE concentrations whereas IgG, IgM and IgA concentrations were not affected [30] but later studies show that apigenin in a mice model of atopic dermatitis decreased serum total IgG1 and IgE concentrations, without modifying significantly specific antibodies, and ameliorated the development of skin lesions [12].

The mechanism involved in the regulation of IgE synthesis by cocoa flavonoids is still to be clarified. As IgE antibodies are associated with Th2-effector cells, a lower production of cytokines by these cells was expected. However, results in supernatants of mesenteric lymph node (MLN) cells did not totally confirm this hypothesis. The production of Th2-cytokines IL-4 and IL-10 by MLN cells increased and decreased, respectively, in animals fed cocoa. As IL-4 is the major inducer for class-switching to IgE biosynthesis in B lymphocytes, the decrease in serum IgE in cocoa-fed rats should be associated with lower IL-4 production. It is noteworthy that although some authors reported low levels of IL-4 after flavonoid treatment [30,31] others did not find any difference [12]. On the other hand, previous studies with a similar cocoa diet in rats noted a decrease of IL-4 production in spleen [16,18] but not in MLN cells [18]. Therefore, a systemic compartment, such as the spleen, could perhaps better reflect the Th2-specific effect of cocoa than cells from the intestinal immune system, such as MLN lymphocytes. Moreover, it would be interesting to investigate the production of cytokines earlier in the process, when IgE production is not yet decreased. In any case, the effect of the cocoa diet on IL-10 and TNF- α production, which were the most abundant cytokines among those considered, should be noted. The cocoa diet decreased IL-10 secretion by about 60% and TNF- α production about 85%. Inhibition of IL-10 production can reflect the downregulation of Th2-cell function. With regard to TNF- α , this can be secreted by mast cells and could be implicated in Th2-mediated allergic inflammation promoting the homing of Th2 cells to the site of allergic inflammation [32]. Similar effects on IL-10 and TNF α mediated by flavonoids given in allergic conditions have been reported [28,33,34]. In addition, the inhibitory effect of a cocoa diet on TNF- α synthesis has been described [16,35].

Apart from the influence of flavonoids on allergen-specific IgE and cytokine production, it is well established that some flavonoids are able to act directly on mast cells and inhibit their degranulation. In this regard, Maeda-Yamamoto et al. [36] demonstrated the inhibitory effect of some tea catechins (very similar to those in cocoa) on mast cell activation, and established the intracellular mechanisms involved. More recently, Tamura et al. [37] reported the downregulatory effect of epigallocatechins on the surface expression of Fc ϵ R1 in mast cells, and Venkatesh et al. [38] demonstrated with *ex vivo* studies the inhibitory effect of extracts rich in catechin on mast cell activation. In this study, *ex vivo* mast cell function was not assessed, but the direct effect of cocoa flavonoids on these cells cannot be disregarded. In any case, it seems that some flavonoids, including those present in cocoa, could be an adjuvant or an alternative to anti-allergic treatment, and this suggestion has driven some human trials. Flavonoids, such as apple polyphenols, Pycnogenol[®] and isoquercitrin, have been applied in the prevention of seasonal allergy [39–41]. Although the cohort of the studies was small, flavonoid intake over a long period seems to be effective for the relief of allergic symptoms [39–41]. In the case of cocoa, further studies need to be performed to establish its anti-allergic dose in humans, although following the conversion of animal doses into human equivalent doses [42], the 10% cocoa diet was equivalent to 0.908 g cocoa/kg human per day. Moreover, the polyphenolic

composition of cocoa also needs to be also considered as this depends on cocoa's origin and method of processing and can impact in its nutraceutical potential [43].

5. Conclusion

In conclusion, a cocoa-enriched diet in young rats produces an immunomodulatory effect that prevents anti-allergen IgE synthesis and other Th2-associated antibodies. This diet also reduces TNF- α secretion, which can play a role in allergic inflammation. All these results suggest a potential role for cocoa flavonoids in the prevention or treatment of allergic diseases.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Spanish Ministry of Science and Innovation (AGL2008-02790). The authors declare they have no conflicting interests. The authors wish to thank Nutrexpa S.L. for providing cocoa. The authors would also like to thank Alba Garcia-Just for her technical support.

References

- [1] Larché M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006;6:761–71.
- [2] Valenta R, Ball T, Focke M, Linhart B, Mothes N, Niederberger V, et al. Immunotherapy of allergic disease. *Adv Immunol* 2004;82:105–53.
- [3] Amim K. The role of mast cells in allergic inflammation. *Resp Med* 2012;106:9–14.
- [4] Coureau B, Bussières JF, Tremblay S. Cushing's syndrome induced by misuse of moderate-to high-potency topical corticosteroids. *Ann Pharmacother* 2008;42:1903–7.
- [5] Kalliomäki M, Antoinette JM, Herz U, Rijkers GT, Wells JM, Mercenier A. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: prevention and management of allergic diseases by probiotic. *J Nutr* 2010;140:S713–21.
- [6] Singh A, Holvoet S, Mercenier A. Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases. *Clin Exp Allergy* 2011;41:1346–59.
- [7] Masuoka N, Matsuda M, Kubo I. Characterisation of the antioxidant activity of flavonoids. *Food Chem* 2012;131:541–5.
- [8] Han X, Shen T, Lou H. Dietary polyphenols and their biological significance. *Int J Mol Sci* 2007;8:950–88.
- [9] Miles EA, Zoubouli P, Calder PC. Effects of polyphenols on human Th1 and Th2 cytokine production. *Clin Nutr* 2005;24:780–4.
- [10] Yu ES, Min HJ, An SY, Won HY, Hong JH, Hwang ES. Regulatory mechanisms of IL-2 and IFN γ suppression by quercetin in T helper cells. *Biochem Pharmacol* 2008;76:70–8.
- [11] Ramiro-Puig E, Castell M. Cocoa: antioxidant and immunomodulator. *Br J Nutr* 2009;101:931–40.
- [12] Yano S, Umeda D, Yamashita S, Yamada K, Tachibana H. Dietary apigenin attenuates the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *J Nutr Biochem* 2009;20:876–81.
- [13] Iwamura C, Shinoda K, Yoshimura M, Watanabe Y, Ohata A, Nakayama T. Naringenin chalcone suppresses allergic asthma by inhibiting the type-2 function of CD4 T cells. *Allergol Int* 2010;59:67–73.
- [14] Sakai T, Furoku S, Nakamoto M, Shuto E, Hosaka T, Nishioka Y, et al. The soy isoflavone equol enhances antigen-specific IgE production in ovalbumin-immunized BALB/c mice. *J Nutr Sci Vitaminol* 2010;56:72–6.
- [15] Borchers A, Keen C, Hannum S, Gershwin E. Cocoa and chocolate: composition, bioavailability, and health implications. *J Med Food* 2000;3:77–105.
- [16] Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Ramírez-Santana C, Castellote C, Izquierdo-Pulido M, Permayner J, et al. Spleen lymphocyte function modulated by a cocoa-enriched diet. *Clin Exp Immunol* 2007;149:535–42.
- [17] Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Ramos-Romero S, Pérez-Berezo T, Castellote C, Permayner J, et al. Intestinal immune system of young rats influenced by cocoa-enriched diet. *J Nutr Biochem* 2008;19:555–65.
- [18] Pérez-Berezo T, Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Permayner J, Franch A, et al. Influence of a cocoa-enriched diet on specific immune response in ovalbumin-sensitized rats. *Mol Nutr Food Res* 2009;53:389–97.
- [19] Ramos-Romero S, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Castell M, Franch A. Effect of cocoa-enriched diets on lymphocytes involved in adjuvant arthritis in rats. *Br J Nutr* 2012;107:378–87.
- [20] Ramiro-Puig E, Urpi-Sardá M, Pérez-Cano FJ, Franch A, Castellote C, Andrés-Lacueva C, et al. Cocoa-enriched diet enhances antioxidant enzyme activity and modulates lymphocyte composition in thymus from young rats. *J Agric Food Chem* 2007;55:6431–8.
- [21] Dong W, Selgrade MJ, Gilmour MI. Systemic administration of *Bordetella pertussis* enhances pulmonary sensitization to house dust mite in juvenile rats. *Toxicol Sci* 2003;72:113–21.

- [22] Knipples LMJ, Penninks AH, Spanhaak S, Houben GF. Oral sensitization to food proteins: a Brown Norway rat model. *Clin Exp Allergy* 1998;28:368–75.
- [23] Monagas M, Urpi-Sarda M, Sánchez-Patán F, Llorach R, Garrido I, Gómez-Cordovés C, et al. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food Funct* 2010;1:233–53.
- [24] Sánchez-Rabáneda F, Jauregui O, Casals I, Andrés-Lacueva C, Izquierdo-Pulido M, Lamuela-Raventós RM. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *J Mass Spectrom* 2003;38:35–42.
- [25] Akiyama H, Sato Y, Watanabe T, Nagaoka MH, Yoshioka Y, Shoji T, et al. Dietary unripe apple polyphenol inhibits the development of food allergies in murine models. *FEBS Lett* 2005;579:4485–91.
- [26] Shishehbor F, Behroo L, Broujerdnia MG, Namjoyan F, Latifi SM. Quercetin effectively quells peanut-induced anaphylactic reactions in the peanut sensitized rats. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2010;9:27–34.
- [27] Kuo FH, Jan TR. Siliibinin attenuates antigen-specific IgE production through the modulation of Th1/Th2 balance in ovalbumin-sensitized BALB/c mice. *Phytomedicine* 2009;16:271–6.
- [28] Cruz EA, Da-Silva SA, Muzitano MF, Silva PM, Costa SS, Rossi-Bergmann B. Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock. *Int Immunopharmacol* 2008;8:1616–21.
- [29] Shimosaki S, Tsurunaga Y, Itamura H, Nakamura M. Anti-allergic effect of the flavonoid myricitrin from *Myrica rubra* leaf extracts *in vitro* and *in vivo*. *Nat Prod Res* 2011;25:374–80.
- [30] Yano S, Umeda D, Yamashita T, Ninomiya Y, Sumida M, Fujimura Y, et al. Dietary flavones suppresses IgE and Th2 cytokines in OVA-immunized BALB/c mice. *Eur J Nutr* 2007;46:257–63.
- [31] Hazlewood LC, Wood LG, Hansbro PM, Foster PS. Dietary lycopene supplementation suppresses Th2 responses and lung eosinophilia in a mouse model of allergic asthma. *J Nutr Biochem* 2011;22:95–100.
- [32] Iwasaki M, Saito K, Takemura K, Sekikawa H, Fujii H, Yamada Y, et al. TNF- α contributes to the development of allergic rhinitis in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:134–40.
- [33] Jung WK, Choi I, Oh S, Park SG, Seo SK, Lee SW, et al. Anti-asthmatic effect of marine red alga (*Laurencia undulata*) polyphenolic extracts in a murine model of asthma. *Food Chem Toxicol* 2009;47:293–7.
- [34] Cruz EA, Reuter S, Martin H, Dehzad N, Muzitano MF, Costa SS, et al. *Kalanchoe pinnata* inhibits mast cell activation and prevents allergic airway disease. *Phytomedicine* 2012;19:115–21.
- [35] Ramos-Romero S, Pérez-Cano FJ, Pérez-Berezo T, Castellote C, Franch A, Castell M. Effect of a cocoa flavonoid-enriched diet on experimental autoimmune arthritis. *Br J Nutr* 2012;107:523–32.
- [36] Maeda-Yamamoto M, Inagaki N, Kitaoura J, Chikumoto T, Kawahara H, Kawakami Y, et al. O-methylated catechins from tea leaves inhibit multiple protein kinases in mast cells. *J Immunol* 2004;172:4486–92.
- [37] Tamura S, Yoshihira K, Fujiwara K, Murakami N. New inhibitors for expression of IgE receptor on human mast cell. *Bioorg Med Chem Lett* 2010;20:2299–302.
- [38] Venkatesh P, Mukherjee PK, Kumar NS, Bandyopadhyay A, Fukui H, Mizuguchi H, et al. Anti-allergic activity of standardized extract of *Albizia lebeck* with reference to catechin as a phytomarker. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2010;32:272–6.
- [39] Enomoto T, Nagasako-Akazome Y, Kanda T, Ikeda M, Dake Y. Clinical effects of apple polyphenols on persistent allergic rhinitis: a randomized double-blind placebo-controlled parallel arm study. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2006;16:283–9.
- [40] Wilson D, Evans M, Guthrie N, Sharma P, Baisley J, Schonlau F, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled exploratory study to evaluate the potential of Pycnogenol[®] for improving allergic rhinitis symptoms. *Phytother Res* 2010;24:1115–9.
- [41] Hirano T, Kawai M, Arimitsu J, Ogawa M, Kuwahara Y, Hagihara K, et al. Preventative effect of a flavonoid, enzymatically modified isoquercitrin on ocular symptoms of Japanese cedar pollinosis. *Allergol Int* 2009;58:373–82.
- [42] Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2008;22:659–61.
- [43] Rusconi M, Conti A. *Theobroma cacao* L., the food of the gods: a scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacol Res* 2010;61:5–13.

ARTICLE 2

**“Motor activity as an unbiased variable to assess
anaphylaxis in allergic rats”**

**“L’activitat motora com a variable objectiva per avaluar l’anafilaxi en
rates al·lèrgiques”**

Mar Abril-Gil, Alba Garcia-Just, Trinitat Cambras,
Francisco J. Pérez-Cano, Cristina Castellote, Àngels Franch,
Margarida Castell

Experimental Biology and Medicine 2015; en premsa

Índex de impacte (JCR) : 2,226

Categoria: 61/124 (Q2) en *Medicine, Research and Experimental*

Resultats presentats a:

- 7è Congrés de la Societat Catalana d'Immunologia, 2013 (Barcelona, Espanya). *Study of anaphylactic response in Brown Norway rats*.
Format: Pòster.

Resum

Objectiu: Establir variables que permetin quantificar de forma objectiva la resposta anafilàctica després d'una provocació oral en un model d'al·lèrgia en rata.

Material i mètodes: L'estudi es va dur a terme en rates femelles Brown Norway de 4 setmanes d'edat. La inducció del model d'al·lèrgia es va realitzar amb una sola immunització, per via intraperitoneal, amb una emulsió d'ovoalbúmina (OVA) com al·lèrgogen juntament amb toxina de *Bordetella pertussis* i hidròxid d'alumini com adjuvants. Quaranta dies després, els animals van rebre una dosi elevada d'OVA (200 mg/rata) per via oral amb el fi de provocar una resposta anafilàctica. Per tal d'evidenciar el desenvolupament d'anafilaxi es va monitoritzar l'activitat motora durant els primers 21 minuts després de la-provocació oral, es va mesurar la temperatura corporal durant 2 hores i es va quantificar en sèrum la proteasa II alliberada de mastòcits (RMCP-II) durant el mateix període.

Resultats: La provocació oral va comportar una davallada de la temperatura corporal, que es va mantenir durant almenys 2 hores. Així mateix, l'anafilaxi va causar un increment de RMCP-II en sèrum durant aquest període. Per altra banda, els animals amb al·lèrgia van mostrar una reducció en el nombre de moviments enregistrats durant els primers minuts després de la inducció de l'anafilaxi, disminució que es va correlacionar inversament amb la concentració sèrica de RMCP-II.

Conclusions: El resultats demostren que la monitorització de l'activitat motora és una eina objectiva i fiable per avaluar la resposta anafilàctica i, per tant, útil per al cribratge preclínic de nous fàrmacs antial·lèrgics.

Original Research Brief Communication

Motor activity as an unbiased variable to assess anaphylaxis in allergic rats

Mar Abril-Gil¹, Alba Garcia-Just¹, Trinitat Cambras¹, Francisco J Pérez-Cano^{1,2}, Cristina Castellote^{1,2}, Àngels Franch^{1,2} and Margarida Castell^{1,2}

¹Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, E-08028 Barcelona, Spain; ²Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), E-08028 Barcelona, Spain
Corresponding author: Margarida Castell. Email: margaridacastell@ub.edu

Abstract

The release of mediators by mast cells triggers allergic symptoms involving various physiological systems and, in the most severe cases, the development of anaphylactic shock compromising mainly the nervous and cardiovascular systems. We aimed to establish variables to objectively study the anaphylactic response (AR) after an oral challenge in an allergy model. Brown Norway rats were immunized by intraperitoneal injection of ovalbumin with alum and toxin from *Bordetella pertussis*. Specific immunoglobulin (Ig) E antibodies were developed in immunized animals. Forty days after immunization, the rats were orally challenged with the allergen, and motor activity, body temperature and serum mast cell protease concentration were determined. The anaphylaxis induced a reduction in body temperature and a decrease in the number of animal movements, which was inversely correlated with serum mast cell protease release. In summary, motor activity is a reliable tool for assessing AR and also an unbiased method for screening new anti-allergic drugs.

Keywords: Allergy, anaphylaxis, mast cell, motor activity, rat

Experimental Biology and Medicine 2015; 0: 1–5. DOI: 10.1177/1535370215573393

Introduction

IgE against allergens is the antibody responsible for most allergies. IgE coats the surface of mast cells and the subsequent exposure to the same allergen triggers the release of the mast cell intragranular content – mainly histamine, proteases and other enzymes – and later mediators such as cytokines and leukotrienes, which lead to the allergic manifestations. As well known, the release of mediators produces physiological changes such as vasodilatation, an increase in vascular permeability, and smooth muscle contraction, which affects the skin, respiratory and gastrointestinal systems or even the nervous and cardiovascular systems.^{1,2} The most severe form of allergic reaction is anaphylaxis, which affects at least two organic systems, sometimes resulting in an anaphylactic shock, which is characterized by cardiovascular and nervous disorders including hypotension, an increase in heart rate and hypothermia, which can result in death.^{3,4}

Animal models are extremely valuable for the assessment of allergenic potential and for the screening of anti-allergic drugs. In this context, Brown Norway (BN) rats have been described as a high-IgE responder strain and, to a degree, resemble atopic humans in their predisposition

to react more readily to antigens with an overproduction of IgE.^{3,5,6} Anaphylaxis can be studied in rodents by measuring ear-swelling response, body temperature, and respiration patterns and through blood pressure monitoring, as well as changes in the animals' behaviour using scoring systems or, in the most severe cases, the number of deaths. Likewise, different mediators such as histamine or mast cell protease release, or serum-specific IgG and IgE have been determined.^{5,7} In this study, we aimed to establish an unbiased variable that would allow us to objectively assess the anaphylactic response (AR) after an oral challenge with ovalbumin (OVA) in BN rats, focusing on changes in animal behaviour.

Materials and methods

Rat allergy induction and ethical approval

Three-week-old female Brown Norway (BN) rats (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) were maintained under conditions of controlled temperature and humidity in a 12:12 light:dark cycle. After a one-week acclimation period, the rats were randomized into two groups: allergy and reference ($n = 8$ in each one). The allergy was induced using an emulsion of ovalbumin (OVA, grade V, Madrid, Sigma-

Aldrich, Spain) as allergen, in alum (Imject®; Pierce, Rockford, IL, USA) as adjuvant and toxin from *Bordetella pertussis* (tBp; Sigma-Aldrich) to promote IgE synthesis.⁸ Each rat received only one intraperitoneal (i.p.) injection with 0.5 mL of the emulsion containing 50 µg of OVA, 50 ng of tBp, and 2.5 mg of Imject® (Figure 1a). Before this injection and five weeks later, blood samples were collected from the saphenous vein to determine specific IgE concentration. Forty days from the beginning of the study, anaphylaxis was induced. Two days later, rats were sacrificed and blood samples were obtained by heart puncture. Experimental procedures were reviewed and approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the University of Barcelona (ref. 359/12).

Induction of anaphylaxis

The day before anaphylaxis induction, both groups were deprived of food overnight. The rats received 2 mL of OVA (100 mg/mL) orally to induce an AR. Motor activity was immediately assessed for 21 min. Rectal temperature was determined (digital thermometer, OMRON Healthcare Hoofddorp, the Netherlands). Blood was collected before oral challenge and every 30 min up to 2 h post-AR induction from the saphenous vein to determine serum rat mast cell protease II (RMCP-II) concentration (Figure 1(b)).

Measurement of motor activity

Motor activity was measured by using individual cages in an isolated room, with an activity meter that included two perpendicular infrared beams, which crossed the cage 6 cm

above the floor as has been reported previously⁹ (Figure 1(b)). Two motor activity measures were performed: the first (basal) 24 h before and the second immediately after the oral challenge. Activity counts were recorded using time frames of 1 min for 21 min. To stimulate rat movements, 8 min after the beginning of the measurement the lights were turned off for 5 min and then turned on until the end of the measurement. The results refer to the movements in three time phases: pre-darkness, darkness, and post-darkness, as well as the entire period. The percentage of motor activity decreases after AR induction was calculated with respect to the basal measurement in each studied phase and the whole period.

Quantification of anti-OVA IgE antibodies

OVA-specific IgE concentrations were quantified in serum samples collected before allergy induction, and five and six weeks later by ELISA as previously described.¹⁰

Quantification of rat mast cell protease

Serum RMCP-II concentration was measured using a commercial ELISA set (Moredun Animal Health, Edinburgh, UK) with slight modifications. In brief, ELISA plates were coated with anti-RMCP-II antibody (overnight, 4°C). After blocking and washing, appropriately diluted serum samples were incubated for 3 h. After washing, peroxidase-conjugated anti-RMCP-II antibody was incubated for 2 h. Finally, a 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution (with H₂O₂) was added and the optical density (OD) was

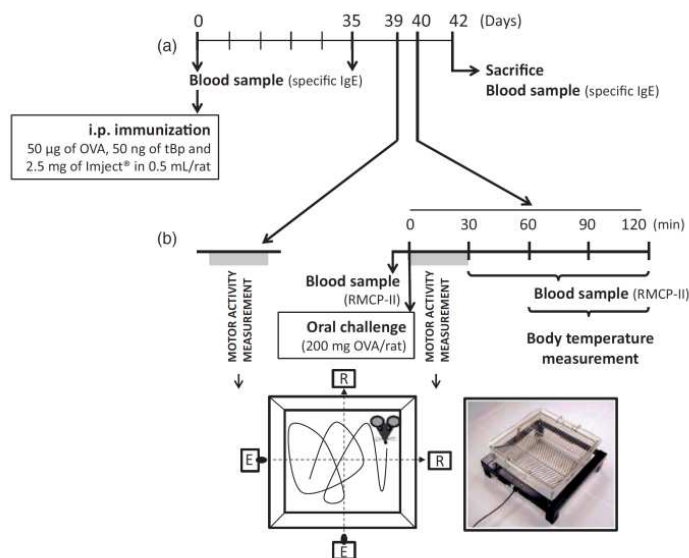


Figure 1 Experimental protocol. (a) Time-course of the experimental design including the points of sample collection. (b) Motor activity assessment 24 h before (day 39) and immediately after the induction of anaphylaxis (day 40) with the determinations carried out. Two kinds of infrared beams are represented: E is the emitter and R is the receiver

measured (microtiter plate photometer, Labsystems Multiskan, Helsinki, Finland).

Statistical analysis

The software package IBM SPSS Statistics 20 (SPSS Inc., Chigago, IL, USA) was used. The Levene's and the Kolmogorov-Smirnov tests were applied to assess variance equality and normal distribution, respectively. One- and two-way ANOVA tests were used to study the effect of group and group × time interaction, respectively. The motor activity data were analysed by two-way ANOVA for repeated measures considering the group (allergy group vs. reference group) and time as the interacting factors followed by Bonferroni's *post hoc* test. To evaluate the correlation among studied variables, Pearson's coefficient (ρ) was applied. To analyse the results from anti-OVA IgE concentration, a non-parametric test (Mann-Whitney U) was used due to non-variance homogeneity. RMCP-II and body temperature results were analysed by one-way ANOVA. Differences were considered statistically significant for $p < 0.05$.

Results

Serum anti-OVA IgE antibodies

Before immunization, both reference and allergy groups had no detectable OVA-specific IgE antibodies (Figure 2). Five weeks after immunization (before AR induction), the allergy group had remarkable anti-OVA IgE titres ($P < 0.001$), and at day 42 these values remained high.

Serum mast cell-released mediators

After AR induction, the RMCP-II concentration in reference animals was about 1266.51 ± 19.90 ng/mL (mean \pm S.E.M.). The allergy group showed about a threefold increase in RMCP-II concentration (4052.69 ± 20.48 ng/mL) compared to that in reference animals ($P < 0.0001$). This increase was already observed at 30 min post-challenge and remained for at least 2 h (Figure 3(a)). There was a direct correlation between the amount of RMCP-II 30 min after AS and the

concentration of specific IgE antibodies at days 35 ($\rho = 0.873$, $P < 0.01$) and 42 ($\rho = 0.716$, $P < 0.05$).

Body temperature

The body temperature in the allergy group was about 2° lower than that of the reference group ($P < 0.05$) over 2 h after AR induction (Figure 3(b)).

Motor activity

One day before AR induction, motor activity data showed that animals from the allergy group had fewer movements than those in the reference group throughout the whole studied period and taking into account the three established phases (pre-darkness, darkness and post-darkness, $P < 0.01$, Figure 4a). Both groups presented the maximal activity in the first minutes, and the longer the measurement time, the quieter the animals were ($P < 0.0001$ for time). There was no significant effect in the interaction group × time.

After AR induction, both groups exhibited lower motor activity (Figure 4(b)) than that observed in the previous

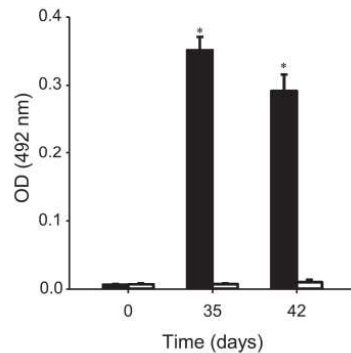


Figure 2 Serum OVA-specific IgE antibodies in allergy (black bars) and reference (white bars) groups during post-immunization period. Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 8$). * $P < 0.001$ between both groups

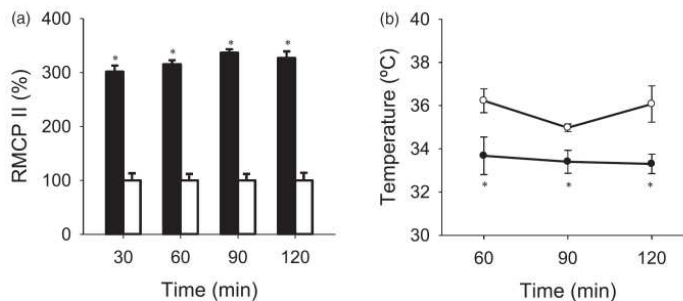


Figure 3 (a) Serum RMCP-II relative concentration after AS induction in allergy (black bars) and reference (white bars) groups. Each bar represents the mean \pm SEM ($n = 8$). (b) Body temperature after AS induction in allergy (•) and reference (○) groups. Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 8$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.0001$ between both groups

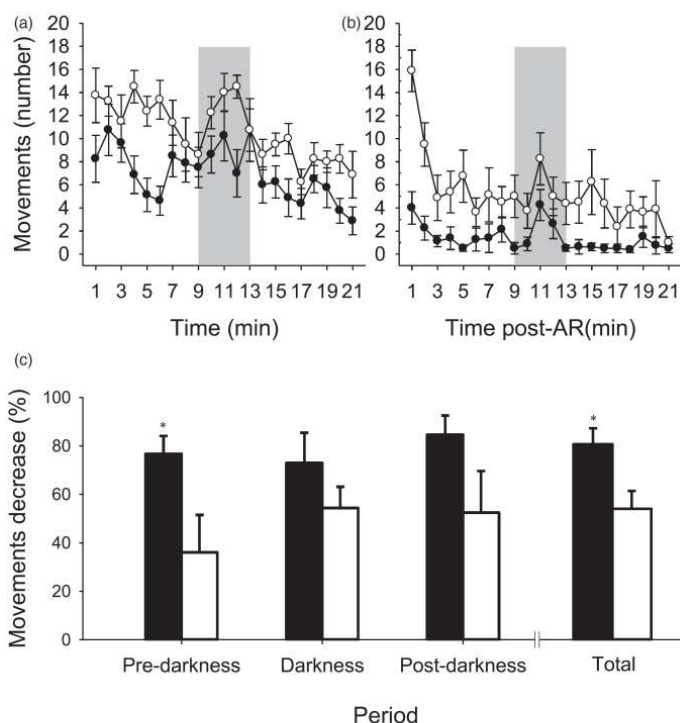


Figure 4 Motor activity results during the 21-min period: (a) 24 h before the AS induction; (b) immediately after AS induction; and (c) percentage of motor activity decrease after AS induction referring to pre-darkness, darkness, post-darkness, and the whole period. Allergy group (● or black bars) and reference group (○ or white bars). Results are expressed as mean ± SEM (n = 8). *P < 0.05 between both groups. In (a) and (b), shadow period corresponds to darkness

measurement (Figure 4(a)). For the whole studied period and for each established phase, the allergy group showed a decrease in the number of movements compared to the reference group ($P < 0.0001$ for groups). In the pre-darkness phase but not later, a relevant interaction group × time was observed ($P < 0.05$). There was an inverse correlation between the number of movements and the amount of RMCP-II released 30 min after oral challenge ($\rho = -0.788$, $P < 0.01$).

With regard to the percentage of motor activity decrease after AR induction (Figure 4(c)), reference animals presented a reduction of about 40–60% whereas this reduction was significantly higher in the animals with anaphylaxis, which achieved a decrease of around 80% ($P < 0.05$ for the entire period and the pre-darkness phase).

Discussion

In the current study, an anaphylaxis was induced in allergic rats and this was objectively assessed by changes in rat behaviour, such as motor activity, together with a decrease in body temperature and the appearance of mast cell mediators in serum. In Brown Norway (BN) rats, the immunization with ovalbumin (OVA) plus adjuvant together with toxin from *Bordetella pertussis* allows an allergy rat model

to be obtained that is characterized by high and permanent serum anti-OVA IgE production as reported previously.¹⁰ After 5–6 weeks of immunization, oral administration of high amounts of OVA could challenge an anaphylaxis that caused changes in several physiological systems.

The anaphylaxis is a systemic response of the immune system due to a general mast cell release of mediators and affects multiple target organs, including the cardiovascular and nervous systems. Systemic anaphylaxis can be monitored by quantifying mast cell mediators in serum. A good mast cell mediator in the current study, in agreement with others,^{11,12} was mast cell protease II (RMCP-II). This enzyme could be quantified in healthy animals and it increased threefold in allergic animals, remaining for at least 2 h after challenge. The release of mast cell mediators produces vasodilatation and increases vascular permeability,⁴ which lowers body temperature.^{1,3} In the current study, mast cell degranulation in orally challenged animals could also be assessed by means of a drop in body temperature that lasted for at least 2 h after challenge. These results agree with others showing the correlation between changes in body temperature and anaphylaxis symptom scores.¹²

On the other hand, it has long been established that allergy is associated with behavioural changes. Mast cells found in

the brain are able to regulate many physiological functions within the central nervous system.¹³ In this sense, it has been described that the allergen challenge in rodents with a respiratory allergy induces an anxiety-like behaviour and a reduction in social interactions.¹⁴ As a part of the evaluation of anaphylaxis in rodents, some variables concerning animal behaviour have been reported. Such variables include scratching or rubbing around the nose or head, and wheezing or abdominal cramping, which are usually evaluated by means of scoring systems with other manual or subjective indexes.¹⁵ These methods require the observation of each animal and this can be subject to personal interpretation. Here, a new system is introduced to assess an AR in rodents that consists in recording objectively the number of movements by means of an activity meter. This method allows behaviour changes related to the reduction in activity in anaphylaxis-induced animals to be quantified in an objective way. It also has the advantage of having monitored a higher number of isolated animals at the same time.

In the current study, we aimed to quantify movements after AR induction and, in order to establish basal data, animal movements were recorded 24 h before the allergen challenge. Surprisingly, we could notice that the immunized animals showed fewer movements than the reference rats even before the anaphylaxis induction. The reason of such decrease cannot be explained from the data in the current study, but it could be related to the relationship between allergy and behaviour.^{13,16,17} After allergen challenge, there was a decrease in the number of movements of both reference and allergic rats compared to those produced the day before in the same conditions. This general decrease could be attributed to the blood sample collection carried out minutes before oral challenge in every animal. However, this decrease was significantly higher in allergic rats than in non-immunized animals, showing therefore the anaphylaxis response, and was more patent in the first few minutes after challenge, when animals were placed in a new cage and then explored the new environment. The movements recorded after the anaphylaxis induction inversely correlate with the release of RMCP-II from mast cells measured in samples obtained few minutes later, suggesting that the higher the mast-cell degranulation, the quieter the animals were.

In conclusion, this study offers a new objective variable, motor activity, for assessing the AR in an allergy model induced in rodents. This tool represents a reliable and unbiased way to screen new anti-allergic drugs.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dr Antoni Díez-Noguera for lending us the activity meters and Malen Massot-Cladera for her technical assistance. This study was supported by grants from the Spanish Ministries of Science and Innovation (AGL2008-02790) and Economy and Competitiveness (AGL2011-24279).

Author contributions: FPC, CC, AF, and MC were responsible for designing the study, and MAG, AGJ, AF, and MC

carried out the experiments. TC was responsible for the activity motor assessment. All authors approved the final version of the manuscript.

REFERENCES

- Makabe-Kobayashi Y, Hori Y, Adachi T, Ishigaki-Suzuki S, Kikuchi Y, Kagaya Y, Shirato K, Nagy A, Ujike A, Takai T, Watanabe T, Ohtsu H. The control effect of histamine on body temperature and respiratory function in IgE-dependent systemic anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2002;**110**:298-303
- Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature* 2008;**454**:445-54
- Bellou A, Saint-Laudy J, Knippels L, Montémont C, Vauthier E, Gerard P, Pellegrom H, Koerkamp EK, Lesesve JF, Guéant JL, Lambert H, Mallié JP. Brown Norway rat ovalbumin-specific immunoglobulin E antibodies increase the human basophil expression of CD63 marker. *Scand J Immunol* 2003;**57**:271-8
- Simons FE. Anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2010;**125**:S161-81
- Jia XD, Li N, Wu YN, Yang XG. Studies on BN rats model to determine the potential allergenicity of proteins from genetically modified foods. *World J Gastroenterol* 2005;**11**:5381-4
- Li Z, Gao Y, Wang H, Liu Z. A rat model of Shuang Huang Lian injection-induced anaphylaxis. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2010;**28**:185-91
- Akiyama H, Sato Y, Watanabe T, Nagaoka MH, Yoshioka Y, Shoji T, Kanda T, Yamada K, Totsuka M, Teshima R, Sawada J, Goda Y, Maitani T. Dietary unripe apple polyphenol inhibits the development of food allergies in murine models. *FEBS Lett* 2005;**579**:4485-91
- Dong W, Selgrade MK, Gilmour MI. Systemic administration of *Bordetella pertussis* enhances pulmonary sensitization to house dust mite in juvenile rats. *Toxicol Sci* 2003;**72**:113-21
- Albert N, da Silva C, Díez-Noguera A, Cambras T. Different adaptation of the motor activity rhythm to chronic phase shifts between adolescent and adult rats. *Behav Brain Res* 2013;**252**:347-55
- Abril-Gil M, Massot-Cladera M, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Franch A, Castell M. A diet enriched with cocoa prevents IgE synthesis in a rat allergy model. *Pharmacol Res* 2012;**65**:603-8
- Saavedra Y, Vergara P. Hypersensitivity to ovalbumin induces chronic intestinal dysmotility and increases the number of intestinal mast cells. *Neurogastroenterol Motil* 2005;**17**:112-22
- Khodoun M, Strait R, Orekov T, Hogan S, Hogan S, Karasuyama H, Herbert DR, Köhl J, Finkelman FD. Peanuts can contribute to anaphylactic shock by activating complement. *J Allergy Clin Immunol* 2009;**123**:342-51
- Silver R, Curley JP. Mast cells on the mind: new insights and opportunities. *Trends Neurosci* 2013;**36**:513-21
- Tonelli LH, Katz M, Kovacsics CE, Gould TD, Joppy B, Hoshino A, Hoffman G, Komarow H, Postolache TT. Allergic rhinitis induces anxiety-like behavior and altered social interaction in rodents. *Brain Behav Immun* 2009;**23**:784-93
- Li XM, Serebrisky D, Lee SY, Huang CK, Bardina L, Schofield BH, Stanley JS, Burks AW, Bannon GA, Sampson HA. A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *J Allergy Clin Immunol* 2000;**106**:150-8
- Basso AS, Pinto FA, Russo M, Britto LR, de Sá-Rocha LC, Palermo Neto J. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. *J Neuroimmunol* 2003;**140**:69-77
- Costa-Pinto FA, Basso AS, De Sá-Rocha LC, Britto LR, Russo M, Palermo-Neto JJ. Neural correlates of IgE-mediated allergy. *Ann N Y Acad Sci* 2006;**1088**:116-31

(Received July 9, 2014, Accepted December 30, 2014)

ARTICLE 3

“Development and characterization of an effective food allergy model in Brown Norway rats”

“Desenvolupament i caracterització d’un model d’al·lèrgia alimentària eficaç en rates Brown Norway”

Mar Abril-Gil, Alba Garcia-Just, Francisco J. Pérez-Cano, Àngels Franch,
Margarida Castell

***Plos One* 2015, 10(4): e0125314**

Índex de impacte (JCR) : 3,534

Categoria: 8/55 (Q1) en *Multidisciplinary Sciences*

Resultats presentats a:

- 5è Congrés de la Societat Catalana d'Immunologia, 2011 (Barcelona, Espanya). *Obtenció d'un model experimental d'al·lèrgia alimentària en rata*. Format: Oral.
- 6th Immunonutrition Workshop, 2012 (Palma de Mallorca, Espanya). *Induction of a food allergy model in Brown Norway rats*. Format: Pòster.

Resum

Objectiu: Desenvolupar i caracteritzar un model d'al·lèrgia alimentària en rata i avaluar la resposta anafilàctica després d'una provocació oral.

Material i mètodes: L'estudi es va realitzar en rates femelles Brown Norway de 4 setmanes d'edat. La inducció d'al·lèrgia alimentària va consistir en una primera immunització -per via intraperitoneal (i.p.)- amb ovoal·búmina (OVA), toxina de *Bordetella pertussis* i hidròxid d'alumini i, catorze dies després, en l'administració diària i durant 3 setmanes d'una solució d'OVA (1 mg/rata) per via oral. De forma paral·lela, es va disposar d'un grup que només va rebre la immunització i.p. Quaranta dies des de la primera immunització, els animals van rebre per via oral una dosi elevada d'OVA (200 mg/rata) per tal de provocar una resposta anafilàctica. Per evidenciar el desenvolupament de l'anafilaxi es va mesurar l'activitat motora, canvis en la temperatura corporal, alteracions en la permeabilitat intestinal i es va quantificar la proteasa II mastocitària (RMCP-II) en sèrum. Al llarg de tot l'estudi es va determinar la concentració sèrica d'anticossos específics d'isotip IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b i IgA. A dia final, es va quantificar la secreció de citocines per part d'esplenòcits, la composició fenotípica de limfòcits aïllats de plaques de Peyer i de ganglis limfàtics mesentèrics i, finalment, l'expressió gènica i la concentració d'anticossos IgA específics a nivell intestinal.

Resultats: L'administració d'OVA per via oral va exacerbar la síntesi d'anticossos específics sèrics d'isotip IgG1 i IgG2a i, en menor grau, la d'IgG2b i IgA desenvolupada per la immunització i.p. De forma rellevant, també es va potenciar la producció d'IgE específica durant la primera setmana d'administració oral d'OVA. La inducció de la resposta anafilàctica va produir una disminució de la temperatura corporal i de l'activitat motora, i va incrementar la permeabilitat intestinal. Aquests canvis es van evidenciar tant en el grup amb al·lèrgia alimentària com en el grup que només va ser immunitzat per via i.p. En canvi, la concentració de RMCP-II en sèrum va ser sis vegades superior en els animals amb al·lèrgia alimentària. A més, a nivell intestinal, la immunització oral va incrementar l'expressió gènica de RMCP-II i la síntesi d'IgA específica.

Conclusions: La combinació de la immunització i.p. i l'administració oral d'OVA a rates Brown Norway indueix un model d'al·lèrgia alimentària eficaç i

relativament ràpid donat que es potencia la síntesi d'anticossos específics, sobretot durant la primera setmana d'administració oral d'OVA, i també l'alliberament de RMCP-II així com la seva expressió gènica a nivell intestinal.

RESEARCH ARTICLE

Development and Characterization of an Effective Food Allergy Model in Brown Norway Rats

Mar Abril-Gil^{1,2*}, Alba Garcia-Just^{1,2*}, Francisco J. Pérez-Cano^{1,2*}, Àngels Franch^{1,2*}, Margarida Castell^{1,2*}

1 Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **2** Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària, Universitat de Barcelona (INSA-UB), Barcelona, Spain

✉ Current address: *Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain*

* margaridacastell@ub.edu


 OPEN ACCESS

Citation: Abril-Gil M, Garcia-Just A, Pérez-Cano FJ, Franch À, Castell M (2015) Development and Characterization of an Effective Food Allergy Model in Brown Norway Rats. PLoS ONE 10(4): e0125314. doi:10.1371/journal.pone.0125314

Academic Editor: Lucienne Chatenoud, Université Paris Descartes, FRANCE

Received: November 12, 2014

Accepted: March 17, 2015

Published: April 29, 2015

Copyright: © 2015 Abril-Gil et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All figure files are available from the figshare database (accession number <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.1297737>).

Funding: This study was supported by grants from the Spanish Ministries of Science and Innovation (AGL2008-02790) and Economy and Competitiveness (AGL2011-24279). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Background

Food allergy (FA) is an adverse health effect produced by the exposure to a given food. Currently, there is no optimal animal model of FA for the screening of immunotherapies or for testing the allergenicity of new foods.

Objective

The aim of the present study was to develop an effective and rapid model of FA in Brown Norway rats. In order to establish biomarkers of FA in rat, we compared the immune response and the anaphylactic shock obtained in this model with those achieved with only intraperitoneal immunization.

Methods

Rats received an intraperitoneal injection of ovalbumin (OVA) with alum and toxin from *Bordetella pertussis*, and 14 days later, OVA by oral route daily for three weeks (FA group). A group of rats receiving only the i.p. injection (IP group) were also tested. Serum anti-OVA IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b and IgA antibodies were quantified throughout the study. After an oral challenge, body temperature, intestinal permeability, motor activity, and mast cell protease II (RMCP-II) levels were determined. At the end of the study, anti-OVA intestinal IgA, spleen cytokine production, lymphocyte composition of Peyer's patches and mesenteric lymph nodes, and gene expression in the small intestine were quantified.

Results

Serum OVA-specific IgG1, IgG2a and IgG2b concentrations rose with the i.p. immunization but were highly augmented after the oral OVA administration. Anti-OVA IgE increased two-fold during the first week of oral OVA gavage. The anaphylaxis in both IP and FA groups

decreased body temperature and motor activity, whereas intestinal permeability increased. Interestingly, the FA group showed a much higher RMCP II serum protein and intestinal mRNA expression.

Conclusions

These results show both an effective and relatively rapid model of FA assessed by means of specific antibody titres and the high production of RMCP-II and its intestinal gene expression.

Introduction

Food allergy (FA) is 'an adverse health effect arising from a specific immune response that occurs reproducibly on exposure to a given food' [1]. Nowadays it is a major public health problem and the only therapy available consists of avoiding the causative foods [2]. An American retrospective study showed that the economic burden of FA reactions and anaphylaxis treatments is near to \$300 million [3]. Despite the fact that more than 170 foods have been reported to cause IgE-mediated hypersensitivity [4], most of the allergic reactions are attributed to a limited number of foods, cow's milk, egg, nuts and seafood being the most common in Europe [5], whereas they share prominence with wheat, soy and peanut in the USA [6]. Although the exact prevalence of FA remains uncertain, data supports that its prevalence is increasing with current rates around 5% in adults and approaching 8% in the child population [7].

In healthy conditions, the intestinal barrier, constituted by the epithelium covered with mucus, enzymes and bile salts together with extreme pH, acts as a physical barrier preventing the passage of harmful pathogens, as well as a selective filter, allowing essential dietary nutrients to pass into the circulation [8,9]. In general, food ingestion results in oral tolerance: when dendritic cells, the professional antigen-presenting cells, capture food antigen in the lamina propria (LP) and Peyer's patches (PP), they carry them to the mesenteric lymph nodes (MLN) where they induce regulatory T (Treg) cells that migrate back to the LP. The resident macrophages in the LP can expand Treg cells, suppressing Th2 cytokines and IgE as well as the effector functions of mast cells and basophils, thus inhibiting allergic inflammation and food hypersensitivity [8,10]. In contrast, patients with FA have lost the immune mechanisms responsible for oral tolerance, and recognize some food antigens as harmful molecules. In this population, alterations in Treg cell function and environmental factors, such as microbiota, have been suggested to be important contributors to food sensitization and allergy [11].

Animal models, such as those described in dogs, swine, guinea pigs, mice and rats, have been used for assessment of allergenicity of foods, although the optimal model has not been reached [12–18]. In the case of dogs, the gut anatomy, physiology and nutritional requirements are similar to humans and in swine the anatomy, physiology and immunology of skin and gastrointestinal tract are also comparable to humans [19], but in both animal species there are some disadvantages in comparison with rodents, such as the expense incurred by animal maintenance, the limited availability of strains, the lack of commercially available immunological reagents, and the long process to sensitization (18 months for dogs) [20]. Studies related to cow's milk allergy commonly use guinea pigs for oral sensitization [21,22]. However, it is not an appropriate model for the assessment of allergenicity of novel proteins because the immunological reactions to proteins differ from those in humans [22], there are a lack of available tools to

study the guinea pig immune system and, for FA research, there are significant differences in the immunophysiology in comparison with other species [19].

Regarding the use of mice in allergy research, the transcriptional analysis approach has shown remarkable consistency between murine and human samples, and studies in atopic dermatitis showed a high degree of homology in the gene expression profile [23]. In addition, their small size, short breeding cycle and well-characterized immunology are certainly key factors. Several allergy models performed in mice differ in the strain, the sensitization route, the type of allergen, the dosage, or the use of an adjuvant [16,24–27]. Nevertheless, the natural complexity of the allergic reactions makes it difficult to find a single reliable marker to quantify the sensitization potential of a protein [28]. Finally, the use of rats has a number of advantages compared with other animal models, particularly with respect to being one of the most commonly used species in toxicity testing [29]. Brown Norway (BN) rats have been widely studied because this strain is a high IgE responder, similar to atopic humans. BN rats have been used as a model of FA in the presence or absence of an adjuvant. In this latter condition, Knippels et al. have demonstrated oral sensitization and have evaluated the influence of rat strain [30] and dosage [31,32]. However, the model of oral sensitization without an adjuvant requires a long process of sensitization (six weeks) and, although it has been used in several studies [33–36], success after oral sensitization was not always achieved in a high percentage of rats [37] and/or the sensitization does not always induce the synthesis of IgE antibodies [20,30,38,39]. This limitation makes it difficult to use this model for the screening of new therapies or allergenicity studies. Regarding the use of other sensitization routes and an adjuvant to induce FA in BN rats, the administration of two to three intraperitoneal (i.p.) injections of allergen and, in some cases, the oral gavage of the same allergen has been applied [40–42]. The present study aimed to develop an effective and more rapid model of FA in BN rats based on that reported by Ogawa et al. [43] with only one i.p. injection of the allergen with alum together with toxin from *Bordetella pertussis* (tBp) to promote IgE synthesis [44], and two weeks later the oral administration of soluble allergen. In order to establish biomarkers of FA in rat, we compared the specific immune and the anaphylactic responses obtained in this model with those achieved with only an i.p. immunization.

Material and Methods

Animals and experimental design

Three-week-old female BN rats obtained from Janvier (Saint-Berthevin, France) were maintained on an OVA-free diet and water *ad libitum*. The parent rats had followed the SSNIFF S8189-S105 diet, free of egg proteins. The rats were housed in cages under conditions of controlled temperature and humidity in a 12:12 h light-dark cycle. After an acclimatization period of one week, the rats were randomized into three groups: reference (RF) group, intraperitoneal (IP) group and food allergy (FA) group (n = 8 per group). The FA induction was carried out by combining an i.p. immunization with OVA mixed with alum and tBp followed, 14 days later, by oral OVA administration for three weeks; five days later, an oral challenge was given to cause an anaphylactic response (AR). The AR was evaluated by means of body temperature, protease release of mast cells, intestinal permeability and also by motor activity assessment [45]. Finally, rats were sacrificed on day 42, two days after the oral challenge, to collect tissue samples. During the study, the body weight was registered and blood samples were collected weekly to determine specific antibodies production.

Experimental design was repeated twice in order to get representative results of an enough number of animals per group.

Experimental procedures in rats were reviewed and approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation at the University of Barcelona (ref.359/12).

Food allergy induction

An emulsion of OVA (grade V, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) as allergen, in alum (Imject, Pierce, IL, USA) as an adjuvant and tBp (Sigma-Aldrich) was prepared. Each rat from the IP group received by i.p. route 0.5 mL of the emulsion containing 50 µg of OVA, 2.5 mg of Imject and 50 ng of tBp. In the FA group, in addition to the i.p. injection as administered in the case of the IP group, the animals received, starting 14 days later, 1 mL of OVA solution in sodium bicarbonate (1 mg per rat) by oral gavage five days/week for three weeks. As a control, the IP and RF groups received 1 mL of sodium bicarbonate by oral gavage for the same period.

Anaphylaxis induction

Forty days after OVA i.p. immunization, the animals were deprived of food overnight and then received 2 mL of OVA (200 mg per rat) orally. Blood was collected every 30 min up to 2 h post-AR induction from the saphenous vein. During this period rectal temperature was measured using a digital thermometer (OMRON Healthcare Europe, the Netherlands).

In order to determine the intestinal barrier integrity, 30 min after the challenge each rat received 100 mg/mL of β-lactoglobuline (βLG, Sigma-Aldrich) by oral gavage [31], details are described in the "Quantification of intestinal permeability" section

Motor activity measurement

Motor activity was assessed for 21 min using individual cages in an isolated room, with an activity meter that included two perpendicular infrared beams, which crossed the cage 6 cm above the floor. These facilities have been commonly used to study rat motor activity in different conditions [46,47]. Two motor activity measures were performed: the first was measured 24 h before anaphylaxis induction to determine the basal movements, and the second immediately after the oral challenge to establish the changes produced by anaphylaxis induction. Activity counts were recorded using time frames of 1 min for 21 min. To stimulate rat movements, 8 min after the beginning of the measurement, the lights were turned off for 5 min and then turned on until the end of the measurement. The results refer to the movements in three time phases (pre-darkness, darkness and post-darkness) as well as the entire period. The area under the curve (AUC) for the 21-min period and the percentage of decrease in motor activity after AS induction with respect to the basal measurement in each studied phase as well as in the whole period were also calculated.

Sacrifice and sample processing

Two days after AR the rats were anaesthetized with ketamine (90 mg/kg) (Merial Laboratories S.A, Barcelona, Spain) and xylazine (10 mg/kg) (Bayer A.G, Leverkusen, Germany). Blood was obtained by heart puncture. MLN and spleen were also dissected for immediate lymphocyte isolation. From the middle of the small intestine (SI), a small piece (0.5 cm) was excised and kept in RNA later (Ambion, Life Technologies, Austin, USA) until gene expression analysis by real-time PCR, the procedure is detailed in the "Quantification of gene expression in small intestine" section. From the distal part of the SI, visible PP were collected for immediate lymphocyte isolation, and gut washes were obtained for quantification of specific IgA.

Peyer's patches lymphocyte isolation and gut wash obtention

The processing of these samples was performed as previously described [48,49]. Briefly, PP were incubated with complete culture medium containing Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, Sigma-Aldrich), 10% fetal bovine serum (FBS), 100 IU/mL streptomycin-penicillin, 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich), and 0.05 mM 2- β -mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, Germany) with 1 mM of dithiothreitol (Sigma-Aldrich) (5 min, 37°C). Thereafter, PP were washed with RPMI medium and passed through a cell strainer (40 μ m, BD Biosciences, Madrid, Spain).

The remaining distal SI tissue (without PP) was cut into 5 mm pieces, weighed and used to obtain the gut wash by shaking in phosphate-buffered saline (PBS) (37°C, 10 min). Gut washes were conserved at -20°C for anti-OVA IgA determination.

Ovalbumin-specific stimulation of mesenteric lymph nodes and spleen lymphocytes

MLN and spleen cell suspensions were obtained as previously described [48] by passing the tissue through a cell strainer (40 μ m, BD Biosciences). Erythrocytes from the spleen were eliminated by osmotic lysis. MLN and spleen cells were cultured at 5×10^6 cells in 1 mL of medium with or without OVA (50 μ g/mL) for 96 h. Supernatants from spleen cultures were collected to assess cytokine concentrations. MLN cells were used to establish changes in lymphocyte composition after specific stimulation.

Assessment of lymphocyte composition in Peyer's patches and mesenteric lymph nodes

Peyer's patches and MLN lymphocytes were stained with the following mouse anti-rat monoclonal antibodies (mAb) conjugated to fluorescein isothiocyanate, phycoerythrin or allophycocyanin: anti-TCR $\alpha\beta$ (R73), anti-CD4 (OX-35), anti-CD8 α (OX-8), anti-CD45RA (OX-33), anti-NKR-P1A (10/78), anti-CD25 (OX-39) (BD Biosciences) and anti-IgA (Abcam, Cambridge, UK). Cells were labeled with saturating concentrations of conjugated mAb in PBS containing 1% FBS and 0.09% Na₃N as previously described [50]. Negative control staining using isotype-matched mAb was included for each sample.

Analyses were performed using a FC 500 Series Flow Cytometer (Beckman Coulter, FL, USA), and data were assessed by the FlowJo v7.6.5 software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). Lymphocyte populations were defined as: B (CD45RA⁺CD4⁺), B expressing IgA (IgA⁺CD45RA⁺), T (TCR $\alpha\beta$ ⁺), Th (TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺), Tc (TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8⁺) and activated Th (TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD25⁺) cells. Results are expressed as percentages of positive cells in the lymphocyte population previously selected according to their forward scatter and side scatter characteristics.

Quantification of serum mast cell protease II

In serum samples obtained during the AR, rat mast cell protease II (RMCP-II) concentration was quantified using a commercial ELISA set (Moredun Animal Health, Edinburgh, UK) with slight modifications. In brief, 96-well ELISA plates (Nunc Maxisorp, Wiesbaden, Germany) were coated with anti-rat RMCP-II antibody (overnight, 4°C). After blocking and washing, appropriately diluted serum samples were incubated for 3 h. Peroxidase-conjugated anti-rat RMCP-II antibody was incubated for 2 h and, finally, a 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution with H₂O₂ was added, and optical density (OD) was measured on a microtiter plate photometer.

(Labsystems Multiskan, Helsinki, Finland). Data were interpolated by means of Ascent v.2.6 software (Thermo Fisher Scientific, S.L.U., Barcelona, Spain).

Quantification of intestinal permeability

To assess intestinal permeability, a method previously described in BN rats was used [30,51]. In this method, β LG was orally given 30 min after the OVA challenge and then were quantified by ELISA in serum obtained every 30 min during anaphylaxis. In brief, ELISA plates were coated with rabbit anti-bovine β LG antibody (A10-125A, Bethyl, Montgomery, USA) and incubated overnight at room temperature. The plates were then blocked with bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) in TRIS-buffered saline containing 0.05% Tween 20, and after washing, appropriate diluted samples and standard dilutions were added. Finally, an adequate dilution of peroxidase-conjugate anti-bovine β LG antibody (A10-125P, Bethyl) was incubated and an o-phenylenediamine dihydrochloride solution was added for detection of β LG from samples. OD was measured as detailed above.

Determination of cytokines released from spleen lymphocytes

IL-2, IL-4, IL-10 and IFN- γ cytokines released from spleen cell cultures were measured using the BD Cytometric Beads Assay Rat Soluble Protein Flex Set (BD Biosciences). Briefly, samples and standards were incubated with a mix of specific fluorescent beads for each cytokine. Then, a mix containing the detection antibodies conjugated with phycoerythrin was incubated and, after that, samples were washed. Analysis was carried out by a BD FACSAria (BD Biosciences) cytometer and the FCAP Array Software (BD Biosciences). The limits of detection were 0.46 pg/mL for IL-2, 3.4 pg/mL for IL-4, 19.4 pg/mL for IL-10 and 6.8 pg/mL for IFN- γ .

Quantification of gene expression in small intestine

For RNA isolation, samples from the SI were processed as previously described [52]. Tissue samples were homogenized in a FastPrep (MP Biomedicals, Illkirch, France) for 30 s. Total RNA was isolated with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Madrid, Spain) following the manufacturer's recommendations. The quality of the RNA was assessed by the Agilent 2100 Bioanalyzer with the RNA 6000 LabChip kit (Agilent Technologies, Madrid, Spain). Two micrograms of total RNA were converted to cDNA using random hexamers (Life Technologies). The specific PCR TaqMan primers and probes (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) used were: *Iga* (331943, made to order), *Fcer1a* (Rn00562369_m1, inventoried (I)), *Il2* (Rn00587673_m1, I), *Il4* (Rn01456866_m1, I), *Il10* (Rn00563409_m1, I), *Ifng* (Rn00594078_m1, I) and *Mcpt2* (Rn00756479_g1, I). Quantification of the genes of interest was normalized to the endogenous control *Hprt1* (Rn01527840_m1, I). Real-time PCR assays were performed in duplicate using an ABI Prism 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems). The SDS software (version 2.4) was used to analyze the expression data.

The amount of target mRNA relative to HPRT expression and relative to values from the RF group was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, as previously described [53]. C_t is the cycle number at which the fluorescence signal of the PCR product crosses an arbitrary threshold set within the exponential phase of the PCR. Results are expressed considering gene expression in the RF group as 100%.

Anti-OVA antibody quantification

Anti-OVA IgG1, IgG2a, IgG2b and IgA antibody concentrations were quantified using an indirect ELISA, and OVA-specific IgE concentration by an antibody-capture ELISA as previously

described [54]. The relative concentration of each anti-OVA Ig isotype was calculated by comparison with a pool of OVA-immunized rat sera to which arbitrary units (AU) were assigned according to the dilution of the serum samples used for each isotype determination. The AU/mL assigned were 100000 AU/mL for IgG1 and IgG2a, 10000 AU/mL for IgG2b, 50 AU/mL for IgA, and 10 AU/mL for IgE.

Statistical analysis

The software package IBM SPSS Statistics 20 (SPSS Inc., USA) was used. The Levene and the Kolmogorov-Smirnov tests were applied to assess variance equality and normal distribution, respectively. Two-way ANOVA tests were used to study the effect of group and group x time interaction. The motor activity data were analyzed by two-way ANOVA for repeated measures considering the group (FA vs. IP vs. RF group) and time as the interacting factor, followed by Bonferroni's *post hoc* test. To evaluate the correlation among studied variables, Pearson's coefficient (ρ) was applied. To analyze the results from anti-OVA antibodies, RMCP-II, β LG and cytokine concentrations, body temperature, relative gene expression, AUC of motor activity, and lymphocyte composition, non-parametric tests (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U) were used due to non-variance homogeneity. Differences were considered statistically significant for p values < 0.05 .

Results

Body weight and mortality

Rats weighed 66.6 ± 3.68 g (mean \pm S.E.M.) at the beginning of the study. Rat growth was monitored throughout the study and was similar among groups. At the end of the study, body weight was 137.1 ± 6.88 g [127.2–146.2], 136.7 ± 4.49 g [130.5–141.6], and 138.4 ± 3.22 g [135.1–143.7] in the RF, IP and FA groups, respectively. No death was produced after the oral challenge in any of the experimental groups.

Serum and intestinal anti-OVA antibodies

Sera from the RF group did not contain anti-OVA antibodies of any isotype (data not shown). The i.p. immunization caused the synthesis of anti-OVA IgG1, IgG2a and IgG2b antibodies in the IP and FA groups that were already detectable 14 days after OVA immunization (Fig 1A–1C). The oral administration of the allergen boosted the synthesis of anti-OVA IgG isotypes, which increased in the FA group more than tenfold for IgG1 and IgG2a, remaining elevated until the end of the study (Fig 1A and 1B; $p < 0.05$). This increase was also produced in anti-OVA IgG2b, but to a lower degree (Fig 1C; $p < 0.05$).

Regarding serum anti-OVA IgE antibodies (Fig 1D) the OVA immunization also induced their synthesis in both the IP and FA groups. Nevertheless, the oral administration of OVA for a week magnified the production of this antibody in the FA group, increasing almost twofold the levels of specific IgE with respect to the IP group ($p < 0.05$). Afterwards, however, anti-OVA IgE underwent a progressive decrease in both the IP and FA groups.

With regards to the anti-OVA IgA concentrations measured in serum and gut wash samples, the i.p. immunization did not induce the synthesis of this antibody in either compartment (Fig 1E and 1F). In contrast, the oral OVA administration in the FA group induced the synthesis of anti-OVA IgA antibodies (Fig 1E) and they were also found in gut washes at the end of the study (Fig 1F).

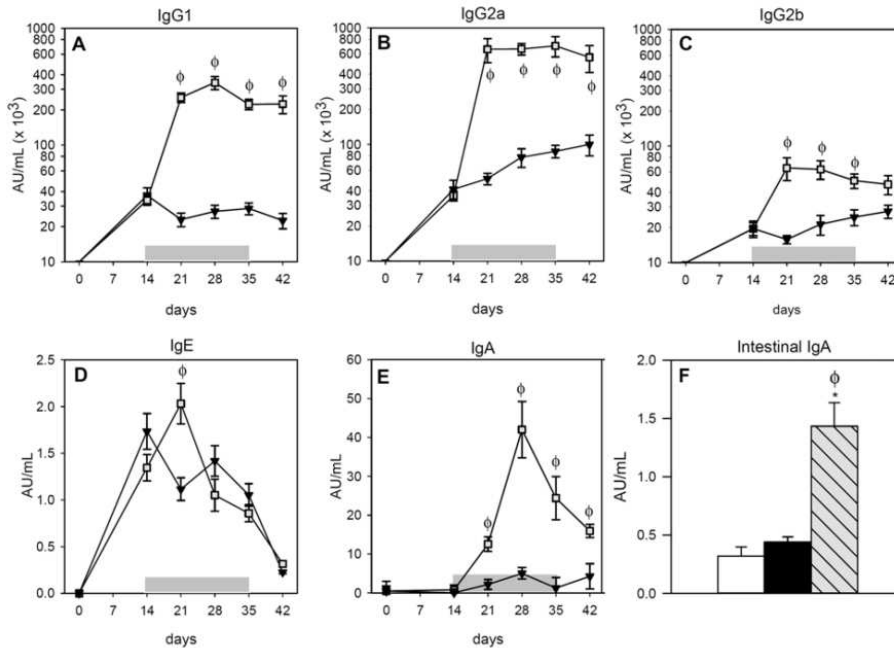


Fig 1. Concentrations of OVA-specific antibodies during post-immunization period. A) serum IgG1, B) serum IgG2a, C) serum IgG2b, D) serum IgE, E) serum IgA and F) intestinal IgA. White bars represent RF group, ▼ or black bars represent IP group and ■ or grey-striped bars represent FA group. Shadow period corresponds to oral administration of OVA in FA group. Results are expressed as mean ± S.E.M. (n = 8). **p* < 0.05 vs. RF group and **p* < 0.05 vs. IP group.

doi:10.1371/journal.pone.0125314.g001

Assessment of anaphylaxis

Body temperature, RMCP-II concentration and intestinal permeability, together motor activity, allowed to quantify anaphylaxis in rats after oral OVA challenge.

The body temperature, registered during the 2 h after oral challenge in intervals of 30 min, revealed that there was a decrease of about 2°C in both the IP and FA groups compared to the RF group throughout the whole studied period (Fig 2A; *p* < 0.05). No significant differences were observed between the IP and FA groups.

After AR induction, the IP group showed about a threefold increase in serum RMCP-II concentration compared to that in RF animals (Fig 2B; *p* < 0.01). However, in the FA group the increase was much higher. The FA animals underwent a rise about 18 times (*p* < 0.01) higher than that of the RF animals and six times higher compared with the IP group (*p* < 0.01). This effect lasted for at least 2 h post-challenge.

βLG given orally 30 min after AR induction, quantified in sera as a measure of intestinal permeability, increased significantly at 30 min from oral protein administration (60 min after AR induction) in both IP and FA groups (Fig 2C; *p* < 0.05). Later, IP rats kept the serum βLG concentration whereas the FA rats showed a faster decrease, although at the end of the studied period, both groups had significantly higher levels compared to RF animals (*p* < 0.05).

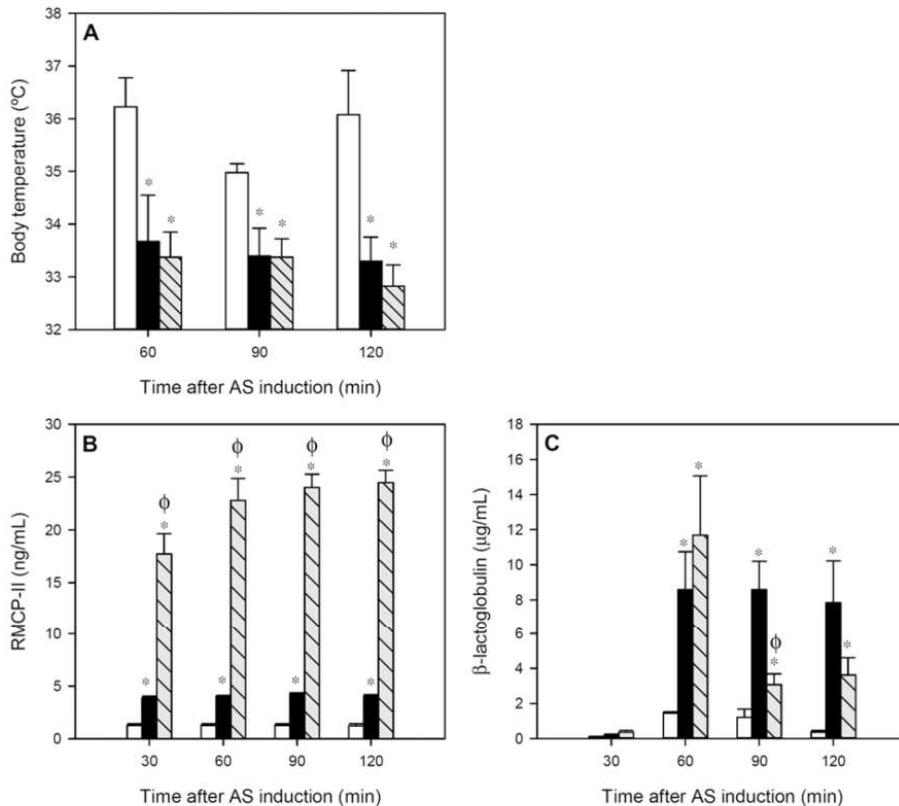


Fig 2. Variables measured during 2 h after anaphylactic shock induction: A) body temperature, B) serum RMCP-II concentration and C) serum β LG concentration. White bars represent RF group, black bars represent IP group and grey-striped bars represent FA group. Results are expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 8$). * $p < 0.05$ vs. RF group and $\phi p < 0.05$ vs. IP group.

doi:10.1371/journal.pone.0125314.g002

Motor activity

Rat motor activity was measured for 21 min at 24 h before (Fig 3A) and immediately after (Fig 3C) AR induction to obtain basal values and data representative of AR-induced behavioral changes, respectively. With regards to basal motor activity, the pattern of movements during the time showed that the three groups became quieter over the 21 min period (Fig 3A; $p < 0.05$ for time) although motor activity increased when the lights were turned off ($p < 0.05$ for RF and FA groups). The motor activity of the IP group was lower than that of the RF group, looking at the whole period and the three established phases (pre-darkness, darkness and post-darkness) ($p < 0.05$). Similarly, in the basal pattern, FA rats also made a lower number of movements than RF animals, taking into account the whole period ($p < 0.001$) and also the pre- and post-darkness phases ($p < 0.05$). The differences among basal groups' movements in

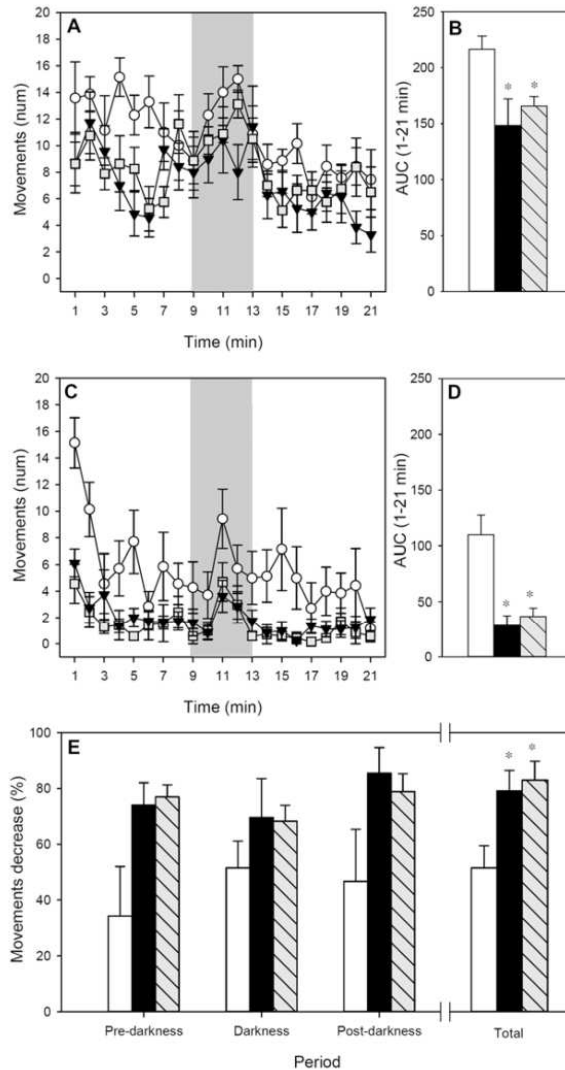


Fig 3. Motor activity for 21-min period. **A)** Basal motor activity assessed 24 h before the AR induction; **B)** area under the curve from the whole studied period before AR induction; **C)** motor activity assessed immediately after AR induction; **D)** area under the curve from the whole studied period after AR induction; **E)** percentage of motor activity decrease after AR induction referring to pre-darkness, darkness, post-darkness and the whole period. \circ or white bars represent RF group, \blacktriangledown or black bars represent IP group and \blacksquare or grey-striped bars represent FA group. In A and C, shadow period corresponds to darkness. Results are expressed as mean \pm S.E.M. (n = 8). *p < 0.05 vs. RF group.

doi:10.1371/journal.pone.0125314.g003

the whole studied period can also be observed when AUC was calculated (Fig 3B; $p < 0.05$ IP and FA groups vs. RF).

The motor activity registered after AR induction showed a similar pattern to the basal one, the animals being quieter during the pre-darkness phases and more active in the darkness period (Fig 3C; $p < 0.05$). However, the three studied groups showed a lower number of movements than those observed in basal conditions. Interestingly, for those animals belonging to the IP and FA groups, the AR induction produced a more noticeable decrease in the motor activity than in the RF group ($p < 0.001$), which can also be observed when considering the AUC of the whole period (Fig 3D; $p < 0.05$ IP and FA groups vs. RF).

The reduction in motor activity resulting from AR induction was also calculated as the percentage of motor activity decrease between basal and post-AR induction in each phase (Fig 3E). RF animals reduced by about 35–50% their number of movements; however, both IP and FA groups underwent a 70–85% reduction of motor activity ($p < 0.05$ in the whole studied period).

There was a correlation between the percentage of decrease in motor activity and the body temperature after AR ($\rho = -0.615$, $p < 0.05$ at 90 min; $\rho = -0.601$, $p < 0.05$ at 120 min) meaning that the higher the percentage of decrease, the lower the animal's body temperature.

Lymphocyte composition in Peyer's patches and mesenteric lymph nodes

The percentage of TCR $\alpha\beta$ cells, Tc and Th subsets, activated Th cells, B cells and B IgA⁺ subset from PP and MLN lymphocytes in the three studied groups is summarized in Fig 4. No differences between the groups were observed either in PP or MLN (Fig 4A and 4B), showing that both i.p. immunization and FA induction did not produce significant changes in the considered cell populations in either intestinal compartments.

After 96 h of OVA stimulation, the composition of MLN cells from RF animals did not significantly change (Fig 4C). Interestingly, in the IP group there was an increase in the TCR $\alpha\beta$ cell proportion after OVA stimulation ($p < 0.05$). This increase corresponded to Tc and activated Th cells ($p < 0.05$). In cells from the FA group, no significant variations were observed in any of the studied MLN subsets after OVA stimulation.

Cytokine production by spleen cells

The cytokine quantification of supernatants obtained from spleen cells isolated after two days of AR induction and cultured for four days with or without OVA was carried out. Those samples that had concentrations below the cutoff received a value corresponding to one-half the cutoff value, as previously described [55]. Spleen cells from RF animals did not produce detectable amounts of the studied cytokines (Table 1). After OVA stimulation, cells from the IP group increased their IL-2, IL-4 and IL-10 production with respect to that in the RF group ($p < 0.05$). On the contrary, the concentrations of cytokines from cells obtained from FA animals did not significantly differ from that of RF group, which could be due to the fact that IL-2 and IL-4 cytokines were only detected in 25% of FA animals, and IL-10 and IFN- γ in 50% and 75% of these animals, respectively. In comparison with the IP group, FA rats produced significantly lower amounts of IL-10 ($p < 0.05$).

Small intestine gene expression

The gene expression of IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, IgA, RMCP-II and Fc ϵ RI was analyzed in the SI at the end of the study (Fig 5). In both the IP and FA groups, IFN- γ and IL-10 gene expression was down-regulated whereas IgA mRNA levels increased but these changes did not

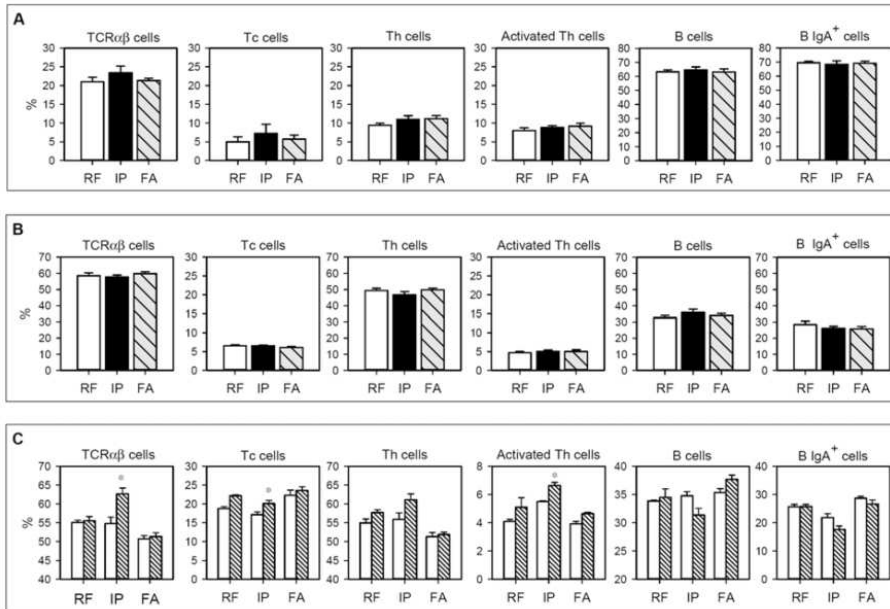


Fig 4. Lymphocyte composition isolated from A) Peyer's patches, B) mesenteric lymph nodes, and C) mesenteric lymph nodes after culturing for 96 h in the presence or absence of OVA. In A and B, white bars represent RF group, black bars represent IP group and grey-striped bars represent FA group. In C, white bars summarize values without stimulus and striped bars represent values after OVA stimulation. Results are expressed as mean \pm S.E.M. (n = 8). * $p < 0.05$ vs. non stimulated condition.

doi:10.1371/journal.pone.0125314.g004

achieve statistical significance. In the IP group a significant up-regulation of FcεRI gene expression was found in comparison with RF animals ($p < 0.05$) and RMCP-II mRNA levels also increased but not significantly. Regarding the FA group, the gene expression of RMCP-II increased about fourfold with respect to RF animals ($p < 0.05$), but no changes were detected in FcεRI. No significant amounts of mRNA of IL-2 and IL-4 were expressed in the small intestine wall from either the reference or immunized animals.

Table 1. Cytokine production by spleen cells after stimulation with OVA.

Groups	IL-2 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	IFN-γ (pg/mL)
Reference	0.23	1.70	9.70	3.40
Intraperitoneal	54.18 \pm 9.94*	104.34 \pm 40.93*	803.3 \pm 300.5*	26.94 \pm 10.08
Food allergy	68.17 \pm 25.32	38.97 \pm 15.25	61.25 \pm 33.54 [†]	7.55 \pm 4.15

Results are expressed as mean \pm S.E.M.

* $p < 0.05$ vs. RF group.

[†] $p < 0.05$ vs. IP group.

doi:10.1371/journal.pone.0125314.t001

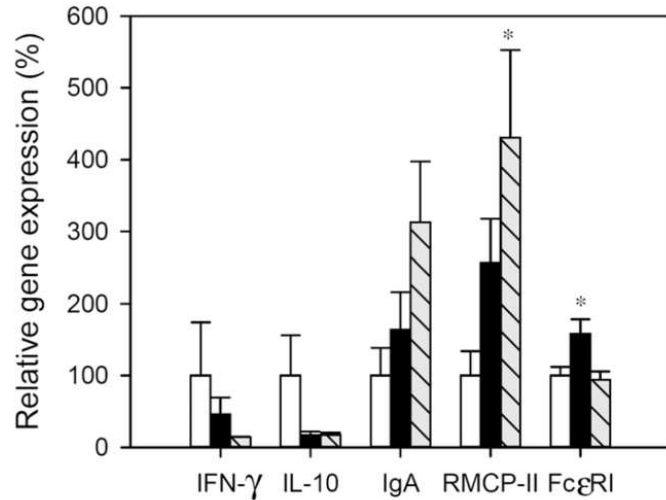


Fig 5. Relative gene expression in small intestine. Expression levels were normalized using HPRT as the endogenous housekeeping gene and were expressed as percentage in comparison with the RF group, which was considered as 100% gene expression. White bars represent RF group, black bars represent IP group and grey-striped bars represent FA group. Results are expressed as mean \pm S.E.M. (n = 8). * p < 0.05 vs. RF group.

doi:10.1371/journal.pone.0125314.g005

Discussion

The present study provides the set-up and characterization of a FA model in BN rats, including the induction of an AR, carried out following the previous i.p. immunization with the allergen, OVA, together with alum and tBp and a subsequent daily oral administration of OVA for a period of three weeks. In order to establish specific biomarkers of FA, we compared the anti-allergen immune response and the AR obtained in this model with those achieved with only the i.p. immunization.

For the screening of drugs, nutritional interventions or immunotherapies to fight against allergies or for testing the allergenicity of new foods, many rat models of FA have been described, including those that only use the oral route [30–32], those that only use the i.p. route without adjuvant [40,56] and those that combine i.p. and oral administration [42]. Although BN rats are high IgE responders, similar to atopic humans, experimental procedures in this rat strain to induce oral sensitization without adjuvant are time-consuming and are not always able to generate a reproducible and effective FA model [20,30,37–39]. In fact, we previously tested a model in BN rats administered only by oral route and the result was that a few animals were sensitized and none produced specific IgE [39]. In contrast, other studies using several i.p. immunization protocols, with or without adjuvant, reported a successful production of specific IgE [40,56,57]. It is for this reason that we applied here an i.p. immunization with alum and tBp previous to the oral allergen administration.

As described in previous studies [54], the i.p. immunization of BN rats with OVA, alum and tBp induces the synthesis of specific antibodies in 100% of the animals, especially those isotypes related to Th2 immune response in rat, such as IgE, IgG1 and IgG2a [18,36,58]. The anti-OVA

antibody profile, including specific IgE, is not surprising and can be attributed to both alum adjuvant and tBp which favor IgE synthesis [59,60]. Interestingly, when two weeks later a daily OVA solution was given orally, the specific antibody response was strengthened. This pattern was observed for serum IgG isotypes, which rose steeply during the first week of oral gavage, demonstrating that anti-OVA immune response was rapidly boosted by oral OVA administration. Similarly, OVA-specific IgE antibodies increased nearly twofold after one week of oral gavage but, however, when longer oral OVA administration was carried out, IgE serum concentrations decreased, following the same pattern as those that only received i.p. immunization. These results regarding serum anti-OVA antibody kinetics agree with those reported by Golias et al. [61] in a mouse model of FA obtained by two i.p. immunizations (two weeks apart) and oral feeding 14 days later every two days. In particular, this last study found that specific IgE response was already present before oral OVA administration, peaked during the first week after oral gavage and decreased later. Therefore, from the overall results concerning specific IgE, it could be suggested that only the first doses of the allergen administered are responsible for an exacerbation of the IgE synthesis and this response is lost with time. Overall, from the results concerning anti-OVA antibodies, it could be concluded that an effective FA model had been achieved because it produced the synthesis of specific antibodies in 100% of the animals and was relatively rapid since the highest specific IgE and IgG levels were reached one week after oral allergen administration, which was sooner than other reported models [34,37].

The FA model proposed here produced the synthesis of serum and intestinal anti-OVA IgA antibodies, which were not found when only i.p. immunization was carried out, thus demonstrating the stimulation of gut-associated lymphoid tissue. Although intestinal IgA is thought to contribute to gut homeostasis by limiting the uptake of oral antigens and it has been considered to have a protective role against oral sensitization [62], its role in food allergy is still controversial. In human FA, it has been reported that specific IgA2 levels (isotype mainly found in mucosa surfaces such as those of the intestine) increased when children became tolerant [63]. However, other authors reported that increased specific IgA was associated with a later FA [64] and that serum allergen-specific IgA seems not to be associated with food tolerance [65]. From our results, although oral challenge was performed with a high dose of oral OVA, the protective effect of intestinal IgA antibodies in the FA group was not observed because the measurement of AR provided similar results in both the FA and IP groups.

After AR induction, the FA model was characterized by a high increase in serum RMCP-II concentration, which again might reflect the stimulation of gut-associated lymphoid tissue because this protease is typical of activated mucosal mast cells [66]. In addition, other mediators released from mast cells produce vasodilatation and are responsible for the decrease in body temperature [67,68]. Animals immunized with only OVA by i.p. route and those immunized by i.p. route and subsequent oral OVA administration underwent a similar drop in body temperature after AR induction. There was no correlation between body temperature and the serum RMCP-II concentration, suggesting that other mast cells different from those in the intestinal mucosa could contribute to AR-induced hypothermia. On the other hand, AR caused an increase in intestinal permeability in both IP and FA groups, which must reflect the disrupted intestinal barrier after OVA immunization. It has been demonstrated that repeated OVA oral gavage produces an accumulation of RMCP-II in the intestine leading to altered motor responses in both the small intestine and the colon [69,70]. Nevertheless, it has been reported that an i.p. immunization produced a higher increase in intestinal permeability than an oral sensitization without an adjuvant, and this was attributed to the release of RMCP-II, among other mediators, which could increase the absorption by paracellular route [31]. From the results obtained here, rats with FA (i.p. and oral sensitization) seem to absorb β LG faster

than the IP group because serum protein concentration tended to be higher at 30 min after β LG oral administration (60 min after AR induction) and disappeared faster. The collection of samples earlier than 30 min should confirm this suggestion and can shed some light as to whether there is any difference in intestinal permeability when OVA is given orally after the i.p. immunization. AR-induced behavioral changes were quantified by the decrease in motor activity as performed in a previous study [45], instead of using the classical score systems which require the subjective validation by the investigator [71,72]. The results after AR induction revealed a clear decrease of movements in comparison with the basal ones. However, when comparing the motor activity between the IP and FA groups, it could be observed that the decrease in motor activity induced by AR was similar in both groups. Therefore, from the results obtained after AR induction, it could be concluded that only the serum concentrations of RMCP-II, which were highly increased by oral OVA, clearly indicated the development of an FA model. Further studies on intestinal permeability should be directed to elucidate changes induced by oral allergen administration in this FA model. However, the decrease in body temperature and also in motor activity did not differ between IP and FA rats, which could be attributed to the similar serum IgE levels present at the end of the study.

Tissue samples obtained two days after AR induction allowed the detailed characterization of the FA process in comparison with the i.p. immunization. The study of lymphocyte composition in PP and MLN shows that neither the i.p. immunization nor the oral OVA administration changed the proportion of the main lymphocyte subsets in these intestinal compartments, at least at the moment when these samples were collected. These results did not agree with those of Ogawa et al. [43], which reported the accumulation of T lymphocytes in PP in a model of FA. Further studies carried out at different times could help to clarify this controversy, but from our results, it could be suggested that the characterization of lymphocyte phenotype in PP and MLN did not constitute a biomarker of FA induction. On the other hand, we observed that the proportion of T cells increased when MLN lymphocytes isolated from the IP group were specifically stimulated *in vitro*, but these results were not found in the FA group. These data could suggest the lymphocyte responsiveness in the IP group in contrast to the lymphocyte unresponsiveness after oral gavage of OVA for three weeks. This suggestion agrees with the cytokine results obtained from OVA-stimulated spleen cells, which show that only in the IP group was the amount of IL-4 and IL-10 released from spleen cells higher than that observed in the RF group, whereas the concentration of cytokines released by the FA group did not differ from reference values. In this sense, although some authors describe an increase of IL-4 and IL-10 in supernatants of spleen cultures of FA animals [34,73,74], other authors do not [42], and none of them compare the changes between i.p. immunization alone and i.p. together with an oral allergen administration. From these results it could be suggested that cytokines released from spleen cells collected after three weeks of allergen gavage did not reflect the oral sensitization process present in FA. Studies carried out in a previous phase of FA induction could better represent this response. In addition, other conditions of spleen cell incubation, such as a shorter stimulation and higher stimulus concentration, among others, could be better conditions for releasing representative cytokines. Nevertheless, it could be speculated that, at the end of the study, the continuous oral OVA administration produced a certain tolerance. This lack of response would not be reflected in the great synthesis of antibodies that occurred throughout the process, but would be only observed in the specific stimulation of cells collected at the end of the study.

Finally, the study of gene expression on intestinal tissue could reflect changes induced locally by oral OVA administration. We found that the gene expression of RMCP-II was significantly increased in FA animals, and these results agree with serum concentrations of this mediator and also with changes reported concerning the gene expression of this molecule in mice and

rats with food allergies [33,35,43]. However, surprisingly the gene expression of FcεRI did not change with FA induction, although it did after i.p. immunization alone. It has been reported in mouse mast cells that the internalization of FcεRI is a mechanism of antigen-specific desensitization [75]. Therefore, the comparison of the results obtained in the FcεRI gene expression in IP and FA groups could endorse the idea that the FA group developed a certain tolerance from the continuous oral allergen administration.

In conclusion, by means of the combination of i.p. immunization followed by the oral gavage of the food allergen, we have established a rat model of FA that is effective because it was able to induce the synthesis of specific Th2-related antibodies, especially IgE, and consequently an AR after oral challenge in all animals. This fact represents a great advantage with respect to FA models only induced by oral route, which did not provide effective and reproducible results in all experiments. In addition, the allergic response development is faster than in other FA models described because one week after the oral administration of allergen i.e., three weeks after i.p. immunization, high levels of specific IgE were produced. In comparison with only i.p. immunization, the developed model provides much higher levels of specific IgG antibodies, achieving high amounts of Th2-related antibodies in rat (IgG1 and IgG2a), and also anti-OVA IgE, although the anaphylactic response after five weeks was similar in both groups. In addition, the levels of RMCP-II released after the anaphylaxis induction and the intestinal gene expression of this protease with respect to those of the i.p. immunization are the best biomarkers of the FA process. The results from *in vitro* antigen-specific activation of lymphocytes from spleen and mesenteric lymph nodes suggest a certain unresponsiveness state of these cells possibly induced by repeated oral doses of the allergen. Nevertheless, although further studies must confirm this hypothesis, the specific antibody response kinetics suggest that the best FA model could be obtained after only a week of oral OVA administration.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Antoni Diez-Noguera and Dra. Trinitat Cambras for lending us the activity metres and Malén Massot-Cladera for her technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FPC AF MC. Performed the experiments: MAG AGJ. Analyzed the data: MAG AGJ FPC AF MC. Contributed reagents/materials/analysis tools: MAG FPC AF MC. Wrote the paper: MAG AF MC.

References

1. Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: summary of the NIAID-Sponsored Expert Panel report. *J Am Acad Dermatol* 2011; 64:175–192. doi: [10.1016/j.jaad.2010.11.020](https://doi.org/10.1016/j.jaad.2010.11.020) PMID: [21167411](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21167411/)
2. Fox M, Mugford M, Voordouw J, Cornelisse-Vermaat J, Antonides G, de la Hoz Caballer B, et al. Health sector costs of self-reported food allergy in Europe: a patient-based cost of illness study. *Eur J Public Health* 2013; 23:757–762. doi: [10.1093/eurpub/ckt010](https://doi.org/10.1093/eurpub/ckt010) PMID: [23402805](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23402805/)
3. Patel D, Holdford D, Edwards E, Carroll N V. Estimating the economic burden of food-induced allergic reactions and anaphylaxis in the United States. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128:110–115. doi: [10.1016/j.jaci.2011.03.013](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.03.013) PMID: [21489610](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21489610/)
4. Burks WA, Tang M, Sicherer S, Muraro A, Eigenmann PA, Ebisawa M, et al. ICON: food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129:906–920. doi: [10.1016/j.jaci.2012.02.001](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.02.001) PMID: [22365653](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22365653/)
5. Nwaru BI, Hickstein L, Panesar SS, Roberts G, Muraro A, Sheikh A, et al. Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy* 2014; 69:992–1007. doi: [10.1111/all.12423](https://doi.org/10.1111/all.12423) PMID: [24816523](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24816523/)
6. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:S470–475. PMID: [16455349](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16455349/)

7. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133:291–307; quiz 308. doi: [10.1016/j.jaci.2013.11.020](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.11.020) PMID: [24388012](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24388012/)
8. Ruiter B, Shreffler WG. The role of dendritic cells in food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129:921–928. doi: [10.1016/j.jaci.2012.01.080](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.01.080) PMID: [22464669](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22464669/)
9. Blikslager AT, Moeser AJ, Gookin JL, Jones SL, Odle J. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev* 2007; 87:545–564. PMID: [17429041](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17429041/)
10. Pabst O, Mowat AM. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol* 2012; 5:232–239. doi: [10.1038/mi.2012.4](https://doi.org/10.1038/mi.2012.4) PMID: [22318493](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22318493/)
11. Oyoshi MK, Oettgen HC, Chatila TA, Geha RS, Bryce PJ. Food allergy: Insights into etiology, prevention, and treatment provided by murine models. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133:309–317. doi: [10.1016/j.jaci.2013.12.1045](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.12.1045) PMID: [24636470](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24636470/)
12. Buchanan BB, Frick OL. The dog as a model for food allergy. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 964:173–183. PMID: [12023204](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12023204/)
13. Helm RM, Furuta GT, Stanley JS, Ye J, Cockrell G, Connaughton C, et al. A neonatal swine model for peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109:136–142. PMID: [11799380](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11799380/)
14. Teuber SS, del Val G, Morigasaki S, Jung HR, Eisele PH, Frick OL, et al. The atopic dog as a model of peanut and tree nut food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:921–927. PMID: [12464960](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12464960/)
15. Piacentini GL, Vicentini L, Bodini A, Mazzi P, Peroni DG, Maffei C, et al. Allergenicity of a hydrolyzed rice infant formula in a guinea pig model. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003; 91:61–64. PMID: [12877451](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12877451/)
16. Ganeshan K, Neilsen C V, Hadsaitong A, Schleimer RP, Luo X, Bryce PJ. Impairing oral tolerance promotes allergy and anaphylaxis: a new murine food allergy model. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123:231–238. doi: [10.1016/j.jaci.2008.10.011](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.10.011) PMID: [19022495](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19022495/)
17. Vinje NE, Larsen S, Lovik M. A mouse model of lupin allergy. *Clin Exp Allergy* 2009; 39:1255–1266. doi: [10.1111/j.1365-2222.2009.03269.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03269.x) PMID: [19438583](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19438583/)
18. Sun N, Zhou C, Pu Q, Wang J, Huang K, Che H. Allergic reactions compared between BN and Wistar rats after oral exposure to ovalbumin. *J Immunotoxicol* 2013; 10:67–74. doi: [10.3109/1547691X.2012.693546](https://doi.org/10.3109/1547691X.2012.693546) PMID: [23110332](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23110332/)
19. Ahuja V, Quatchadze M, Ahuja V, Stelter D, Albrecht A, Stahlmann R. Evaluation of biotechnology-derived novel proteins for the risk of food-allergic potential: advances in the development of animal models and future challenges. *Arch Toxicol* 2010; 84:909–917. doi: [10.1007/s00204-010-0582-0](https://doi.org/10.1007/s00204-010-0582-0) PMID: [20842347](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20842347/)
20. Kimber I, Dearman RJ, Penninks AH, Knippels LMJ, Buchanan RB, Hammerberg B, et al. Assessment of protein allergenicity on the basis of immune reactivity: animals models. *Environ Health Perspect* 2002; 111:1125–1130.
21. Kitagawa S, Zhang S, Harari Y, Castro GA. Relative allergenicity of cow's milk and cow's milk-based formulas in an animal model. *Am J Med Sci* 1995; 310:183–187. PMID: [7485221](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7485221/)
22. Fritsché R. Animal models in food allergy: assessment of allergenicity and preventive activity of infant formulas. *Toxicol Lett* 2003; 140–141:303–309.
23. Ando T, Matsumoto K, Namiranian S, Yamashita H, Glatthorn H, Kimura M, et al. Mast cells are required for full expression of allergen/SEB-induced skin inflammation. *J Invest Dermatol* 2013; 133:2695–2705. doi: [10.1038/jid.2013.250](https://doi.org/10.1038/jid.2013.250) PMID: [23752044](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23752044/)
24. Fattouh R, Pouladi MA, Alvarez D, Johnson JR, Walker TD, Goncharova S, et al. House dust mite facilitates ovalbumin-specific allergic sensitization and airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:314–321. PMID: [15879422](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15879422/)
25. Li X-M, Schofield BH, Huang C, Kleiner GI, Sampson HA. A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:206–214. PMID: [9949309](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9949309/)
26. Bailón E, Cueto-Sola M, Utrilla P, Rodríguez-Ruiz J, Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, et al. A shorter and more specific oral sensitization-based experimental model of food allergy in mice. *J Immunol Methods* 2012; 381:41–49. doi: [10.1016/j.jim.2012.04.007](https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.04.007) PMID: [22542400](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22542400/)
27. Sun J, Arias K, Alvarez D, Fattouh R, Walker T, Goncharova S, et al. Impact of CD40 ligand, B cells, and mast cells in peanut-induced anaphylactic responses. *J Immunol* 2007; 179:6696–6703. PMID: [17982059](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17982059/)
28. Aldemir H, Bars R, Herouet-Guichenev C. Murine models for evaluating the allergenicity of novel proteins and foods. *Regul Toxicol Pharmacol* 2009; 54:S52–57. doi: [10.1016/j.yrtph.2008.11.004](https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2008.11.004) PMID: [19100305](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19100305/)
29. Penninks AH, Knippels LM. Determination of protein allergenicity: studies in rats. *Toxicol Lett* 2001; 120:171–180. PMID: [11323175](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11323175/)

30. Knippels LM, Penninks AH, van Meeteren M, Houben GF. Humoral and cellular immune responses in different rat strains on oral exposure to ovalbumin. *Food Chem Toxicol* 1999; 37:881–888. PMID: [10506012](#)
31. Knippels LMJ, Penninks AH, Smit JJ, Houben GF. Immune-mediated effects upon oral challenge of ovalbumin-sensitized Brown Norway rats: further characterization of a rat food allergy model. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 156:161–169. PMID: [10222308](#)
32. Knippels LM, Penninks AH, Houben GF. Continued expression of anti-soy protein antibodies in rats bred on a soy protein-free diet for one generation: the importance of dietary control in oral sensitization research. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101:815–820. PMID: [9648709](#)
33. Zhong Y, Huang J, Tang W, Chen B, Cai W. Effects of probiotics, probiotic DNA and the CpG oligodeoxynucleotides on ovalbumin-sensitized Brown-Norway rats via TLR9/NF- κ B pathway. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012; 66:71–82. doi: [10.1111/j.1574-695X.2012.00991.x](#) PMID: [22612777](#)
34. Huang J, Zhong Y, Cai W, Zhang H, Tang W, Chen B. The effects of probiotics supplementation timing on an ovalbumin-sensitized rat model. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; 60:132–141. doi: [10.1111/j.1574-695X.2010.00727.x](#) PMID: [20846358](#)
35. Cao S, He X, Xu W, Luo Y, Ran W, Liang L, et al. Potential allergenicity research of Cry1C protein from genetically modified rice. *Regul Toxicol Pharmacol* 2012; 63:181–187. doi: [10.1016/j.yrtph.2012.03.017](#) PMID: [22504668](#)
36. De Jonge JD, Baken KA, Konings J, Pennings JL, Ezendam J, Van Loveren H. Gene expression changes in the mesenteric lymph nodes of rats after oral peanut extract exposure. *J Immunotoxicol* 2008; 5:385–394. doi: [10.1080/15476910802586126](#) PMID: [19404872](#)
37. Pilegaard K, Madsen C. An oral Brown Norway rat model for food allergy: comparison of age, sex, dosing volume, and allergen preparation. *Toxicology* 2004; 196:247–257. PMID: [15036751](#)
38. Dearman RJ, Caddick H, Stone S, Basketter DA, Kimber I. Characterization of antibody responses induced in rodents by exposure to food proteins: influence of route of exposure. *Toxicology* 2001; 167:217–231. PMID: [11578801](#)
39. Camps-Bossacoma M, Abril-Gil M, Franch A, Pérez-Cano FJ, Castell M. Induction of a model of oral sensitization in rat. *Clin Immunol Endocr Metab Drugs* 2015; in press.
40. Bøgh KL, Kroghsbo S, Dahl L, Rigby NM, Barkholt V, Mills ENC, et al. Digested Ara h 1 has sensitizing capacity in Brown Norway rats. *Clin Exp Allergy* 2009; 39:1611–1621. doi: [10.1111/j.1365-2222.2009.03333.x](#) PMID: [19689460](#)
41. Kroghsbo S, Bøgh KL, Rigby NM, Mills ENC, Rogers A, Madsen CB. Sensitization with 7S globulins from peanut, hazelnut, soy or pea induces IgE with different biological activities which are modified by soy tolerance. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 155:212–224. doi: [10.1159/000321200](#) PMID: [21282960](#)
42. Ahrens B, Quarcoo D, Buhner S, Reese G, Vieths S, Hamelmann E. Development of an animal model to evaluate the allergenicity of food allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2014; 164:89–96. doi: [10.1159/000363109](#) PMID: [24903216](#)
43. Ogawa T, Miura S, Tsuzuki Y, Ogino T, Teramoto K, Inamura T, et al. Chronic allergy to dietary ovalbumin induces lymphocyte migration to rat small intestinal mucosa that is inhibited by MAdCAM-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286:G702–710. PMID: [14670821](#)
44. Dong W, Selgrade MK, Gilmour MI. Systemic administration of *Bordetella pertussis* enhances pulmonary sensitization to house dust mite in juvenile rats. *Toxicol Sci* 2003; 72:113–121. PMID: [12604840](#)
45. Abril-Gil M, Garcia-Just A, Cambras T, Pérez-Cano FJ, Cristina C, Franch A, et al. Motor activity as unbiased variable to assess anaphylactic shock in allergic rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2015; 1535370215573393, first published on February 25.
46. Chiesa JJ, Cambras T, Carpentieri AR, Diez-Noguera A. Arrhythmic rats after SCN lesions and constant light differ in short time scale regulation of locomotor activity. *J Biol Rhythms* 2010; 25:37–46. doi: [10.1177/0748730409352843](#) PMID: [20075299](#)
47. Albert N, da Silva C, Diez-Noguera A, Cambras T. Different adaptation of the motor activity rhythm to chronic phase shifts between adolescent and adult rats. *Behav Brain Res* 2013; 252:347–355. doi: [10.1016/j.bbr.2013.06.025](#) PMID: [23792134](#)
48. Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Ramos-Romero S, Pérez-Berezo T, Castellote C, Permanyer J, et al. Intestinal immune system of young rats influenced by cocoa-enriched diet. *J Nutr Biochem* 2008; 19:555–565. PMID: [18061430](#)
49. Pérez-Berezo T, Franch A, Ramos-Romero S, Castellote C, Pérez-Cano FJ, Castell M. Cocoa-enriched diets modulate intestinal and systemic humoral immune response in young adult rats. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55:S56–66. doi: [10.1002/mnfr.201000588](#) PMID: [21462334](#)
50. Pérez-Berezo T, Ramírez-Santana C, Franch A, Ramos-Romero S, Castellote C, Pérez-Cano FJ, et al. Effects of a cocoa diet on an intestinal inflammation model in rats. *Exp Biol Med* 2012; 237:1181–1188. doi: [10.1258/ebm.2012.012083](#) PMID: [23104506](#)

51. Sakamoto Y, Ohtsuka T, Yoshida H, Ohto K, Onobori M, Matsumoto T, et al. Time course of changes in the intestinal permeability of food-sensitized rats after oral allergen challenge. *Pediatr Allergy Immunol* 1998; 9:20–24. PMID: [9560838](#)
52. Massot-Cladera M, Pérez-Berezo T, Franch A, Castell M, Pérez-Cano FJ. Cocoa modulatory effect on rat faecal microbiota and colonic crosstalk. *Arch Biochem Biophys* 2012; 527:105–112. doi: [10.1016/j.abb.2012.05.015](#) PMID: [22663919](#)
53. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25:402–408. PMID: [11846609](#)
54. Abril-Gil M, Massot-Cladera M, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Franch A, Castell M. A diet enriched with cocoa prevents IgE synthesis in a rat allergy model. *Pharmacol Res* 2012; 65:603–608. doi: [10.1016/j.phrs.2012.02.001](#) PMID: [22342543](#)
55. Zanardo V, Golin R, Amato M, Trevisanuto D, Favaro F, Faggian D, et al. Cytokines in human colostrum and neonatal jaundice. *Pediatr Res* 2007; 62:191–194. PMID: [17597660](#)
56. Bøgh KL, Barkholt V, Madsen CB. The sensitising capacity of intact β -lactoglobulin is reduced by co-administration with digested β -lactoglobulin. *Int Arch Allergy Immunol* 2013; 161:21–36. doi: [10.1159/000351238](#) PMID: [23689241](#)
57. Bellou A, Saint-Laudy J, Knippels L, Montémont C, Vauthier E, Gerard P, et al. Brown Norway rat ovalbumin-specific immunoglobulin E antibodies increase the human basophil expression of CD63 marker. *Scand J Immunol* 2003; 57:271–278. PMID: [12641656](#)
58. Gracie JA, Bradley JA. Interleukin-12 induces interferon- γ -dependent switching of IgG alloantibody subclass. *Eur J Immunol* 1996; 8:1217–1221.
59. Terhune TD, Deth RC. How aluminum adjuvants could promote and enhance non-target IgE synthesis in a genetically-vulnerable sub-population. *J Immunotoxicol* 2013; 10:210–222. doi: [10.3109/1547691X.2012.708366](#) PMID: [22967010](#)
60. Saavedra Y, Vergara P. Hypersensitivity to ovalbumin induces chronic intestinal dysmotility and increases the number of intestinal mast cells. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17:112–122. PMID: [15670271](#)
61. Golias J, Schwarzer M, Wallner M, Kverka M, Kozakova H, Srutkova D, et al. Heat-induced structural changes affect OVA-antigen processing and reduce allergic response in mouse model of food allergy. *PLoS One* 2012; 7: e37156. doi: [10.1371/journal.pone.0037156](#) PMID: [22629361](#)
62. Berin MC, Mayer L. Immunophysiology of experimental food allergy. *Mucosal Immunol* 2009; 2:24–32. doi: [10.1038/mi.2008.72](#) PMID: [19079331](#)
63. Konstantinou GN, Nowak-Węgrzyn A, Bencharitwong R, Bardina L, Sicherer SH, Sampson HA. Egg-white-specific IgA and IgA2 antibodies in egg-allergic children: is there a role in tolerance induction? *Pediatr Allergy Immunol* 2014; 25:64–70. doi: [10.1111/pai.12143](#) PMID: [24118158](#)
64. Orivuori L, Mustonen K, Roudit C, Braun-Fahrlander C, Dalphin J-C, Genuneit J, et al. Immunoglobulin A and immunoglobulin G antibodies against β -lactoglobulin and gliadin at age 1 associate with immunoglobulin E sensitization at age 6. *Pediatr Allergy Immunol* 2014; 25:329–337. doi: [10.1111/pai.12246](#) PMID: [24953294](#)
65. Vazquez-Ortiz M, Pascal M, Juan M, Alsina L, Martín-Mateos MA, Plaza AM. Serum allergen-specific IgA is not associated with natural or induced tolerance to egg in children. *Allergy* 2013; 68:1327–1332. doi: [10.1111/all.12217](#) PMID: [24004369](#)
66. Gibson S, Mackeller A, Newlands G, Miller H. Phenotypic expression of mast cell granule proteinases. Distribution of mast cell proteinases I and II in the rat digestive system. *Immunology* 1987; 62:621–627. PMID: [3323033](#)
67. Makabe-Kobayashi Y, Hori Y, Adachi T, Ishigaki-Suzuki S, Kikuchi Y, Kagaya Y, et al. The control effect of histamine on body temperature and respiratory function in IgE-dependent systemic anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:298–303. PMID: [12170272](#)
68. Khodoun M, Strait R, Orekov T, Hogan S, Karasuyama H, Herber DR, et al. Peanuts can contribute to anaphylactic shock by activating complement. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123:342–351. doi: [10.1016/j.jaci.2008.11.004](#) PMID: [19121857](#)
69. Traver E, Torres R, de Mora F, Vergara P. Mucosal mast cells mediate motor response induced by chronic oral exposure to ovalbumin in the rat gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22: e34–43. doi: [10.1111/j.1365-2982.2009.01377.x](#) PMID: [19682267](#)
70. Jardi F, Martínez V, Vergara P. NGF is involved in oral ovalbumin-induced altered colonic contractility in rats: evidence from the blockade of TrkA receptors with K252a. *Neurogastroenterol Motil* 2012; 24: e580–590. doi: [10.1111/nmo.12027](#) PMID: [23072452](#)
71. Leonard SA, Martos G, Wang W, Nowak-Węgrzyn A, Berin MC. Oral immunotherapy induces local protective mechanisms in the gastrointestinal mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129:1579–1587. doi: [10.1016/j.jaci.2012.04.009](#) PMID: [22554705](#)

72. Shindo T, Kanazawa Y, Saito Y, Kojima K, Ohsawa M, Teshima R. Effective induction of oral anaphylaxis to ovalbumin in mice sensitized by feeding of the antigen with aid of oil emulsion and salicylate. *J Toxicol Sci* 2012; 37:307–315. PMID: [22467021](#)
73. Duncker SC, Philippe D, Martin-Paschoud C, Moser M, Mercenier A, Nutten S. *Nigella sativa* (black cumin) seed extract alleviates symptoms of allergic diarrhea in mice, involving opioid receptors. *PLoS One* 2012; 7:e39841. doi: [10.1371/journal.pone.0039841](#) PMID: [22768141](#)
74. Okada Y, Oh-oka K, Nakamura Y, Ishimaru K, Matsuoka S, Okumura K, et al. Dietary resveratrol prevents the development of food allergy in mice. *PLoS One* 2012; 7:e44338. doi: [10.1371/journal.pone.0044338](#) PMID: [22962611](#)
75. Oka T, Rios EJ, Tsai M, Kalesnikoff J, Galli SJ. Rapid desensitization induces internalization of antigen-specific IgE on mouse mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132:922–32. doi: [10.1016/j.jaci.2013.05.004](#) PMID: [23810240](#)

ARTICLE 4

“Modulation of food allergy in Brown Norway rats through cocoa-enriched diet”

“Modulació de l'al·lèrgia alimentària en rates Brown Norway mitjançant una dieta enriquida amb cacau”

Mar Abril-Gil, Francisco J. Pérez-Cano, Àngels Franch, Margarida Castell

Sotmés a publicació

Resultats presentats a:

- 3rd International Lymphoid Tissue, 2013 (Rotterdam, Països Baixos). *Changes on the intestinal intraepithelial lymphocyte composition in food allergic rats and after a polyphenol nutritional intervention.* Format: Pòster.
- 7th Immunonutrition Workshop, 2014 (Brindisi, Itàlia). *A cocoa diet attenuates IgE synthesis and induces changes in gut intraepithelial lymphocytes in food allergic rats.* Format: Pòster.
- 7th Immunonutrition Workshop, 2014 (Brindisi, Itàlia). *Effect of polyphenols nutrition intervention on thymocytes from allergic rats.* Format: Pòster.
- 8th World Congress on Polyphenols Applications, 2014 (Lisboa, Portugal). *Anti-allergic effect of cocoa polyphenols in a food allergy rat model.* Format: Pòster.
- 8è Congrés de la Societat Catalana d'Immunologia, 2014 (Barcelona, Espanya). *Intestinal gene expression in a model of food allergy in Brown Norway rats.* Format: Pòster.

Resum

Objectiu: Establir els efectes de la ingesta d'una dieta enriquida amb cacau sobre la resposta immunitària Th2 i sobre la resposta anafilàctica en un model d'al·lèrgia alimentària en rata. A més, determinar la intervenció dels flavonoides en els efectes de la dieta rica en cacau.

Material i mètodes: L'estudi es va realitzar en rates Brown Norway (50% femelles, 50% mascles) de 3 setmanes d'edat. El model d'al·lèrgia alimentària es va induir mitjançant una primera immunització per via intraperitoneal (i.p.) amb ovoalbúmina (OVA), toxina de *Bordetella pertussis* i hidròxid d'alumini i, catorze dies després, l'administració diària i durant una setmana d'una solució d'OVA (1 mg/rata) per via oral. Es va disposar de 3 grups d'animals que van rebre, des del primer dia de l'estudi, una dieta estàndard, una dieta enriquida amb un 10% de cacau convencional (CC) que contenia un 0,4% de flavonoides, o bé una dieta enriquida amb cacau no fermentat (NFC) amb una quantitat equivalent de flavonoides. Vint-i-set dies després de la primera immunització, els animals van rebre per via oral una dosi elevada d'OVA (200 mg/rata) per tal de provocar una resposta anafilàctica. Per avaluar aquesta resposta es va mesurar l'activitat motora, la temperatura corporal i la permeabilitat intestinal, i es va quantificar l'hematòcrit i la concentració de proteasa II mastocitària (RMCP-II) en sèrum.

Al llarg de l'estudi es va determinar la concentració sèrica d'anticossos específics d'isotip IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b i IgA. A dia final, es va quantificar la secreció de citocines per part de limfòcits aïllats de ganglis limfàtics mesentèrics i de melsa, la concentració plasmàtica d'hormones metabòliques i es van avaluar els possibles canvis estructurals i l'expressió gènica a nivell intestinal.

Resultats: La dieta CC va ser capaç d'inhibir la síntesi d'anticossos anti-OVA d'isotip IgG1 i IgG2a, relacionats amb la resposta Th2 induïda per l'al·lèrgia alimentària i, de forma rellevant, la producció d'IgE específica, isotip característic de les respostes al·lèrgiques. D'altra banda, la dieta CC va inhibir parcialment l'alliberament de RMCP-II produït durant la resposta anafilàctica però no va aconseguir evitar, de forma significativa, les alteracions relatives a l'activitat motora, temperatura corporal, permeabilitat intestinal o hematòcrit. La dieta NFC va produir un efecte similar al de la dieta CC, però

menys potent, en la inhibició de la síntesi d'anticossos específics i de RMCP-II.

Pel que fa a la secreció limfocitària de citocines, ambdues dietes CC i NFC van ser capaces d'evitar l'increment d'IL-4, IL-5 i IL-13, citocines alliberades durant la resposta immunitària Th2 en els compartiments estudiats.

Conclusions: La dieta enriquida amb cacau convencional és capaç d'inhibir la resposta de tipus Th2, fet que es demostra per la disminució d'anticossos específics IgG1, IgG2a i, amb més rellevància, d'IgE, i també d'evitar l'increment de citocines com IL-4, IL-5 i IL-13. A més, el cacau atenua l'alliberament de mediadors de la resposta anafilàctica com la RMCP-II. Aquests efectes són més potents que els observats amb la dieta NFC, el que suggereix que, a part dels flavonoides, el cacau conté altres components bioactius responsables de la modulació de la resposta al·lèrgica.

Modulation of food allergy in Brown Norway rats through a cocoa-enriched diet

Mar Abril-Gil, Francisco J. Pérez-Cano, Àngels Franch, Margarida Castell

Affiliations:

Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona,
Av. Joan XXIII s/n, E-08028, Barcelona, Spain

Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), E-08028,
Barcelona, Spain

e-mail addresses: mariadelmar.abril@ub.edu; franciscoperez@ub.edu;
angelsfranch@ub.edu; margaridacastell@ub.edu

Corresponding author: Margarida Castell, PhD

Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona
Av Joan XXIII s/n

E-08028, Barcelona, Spain

Phone: +34 93 402 45 05

Fax: +34 93 403 59 01

e-mail address: margaridacastell@ub.edu

Abbreviations: AB: Applied Biosystems ; AR: anaphylactic response; AU: arbitrary units; AUC: area under the curve; β LG: β -lactoglobulin; BN: Brown Norway; CC: conventional cocoa; FA: food allergy; FA-CC: food allergy group fed with a conventional cocoa diet; FA-NFC: food allergy group fed with a non-fermented cocoa diet; FA-RF: food allergy group with a reference diet; Fc ϵ RI: high-affinity IgE receptor; GLP-1: glucagon-like peptide 1; H-RF: healthy group fed with a reference diet; i.p.: intraperitoneal; MLN: mesenteric lymph nodes; NFC: non-fermented cocoa; OVA: ovalbumin; RMCP-II: rat mast cell protease II; RF: reference; SI: small intestine; tBp: toxin from *Bordetella pertussis*; TGF- β : transforming growth factor- β ; Th: T helper

Keywords: anaphylaxis, cytokines, flavonoids, IgE, mast cell protease

Abstract

Scope: Previous studies have demonstrated that cocoa intake decreased Th2 immune-related antibodies in rats. The aim of the present study was to assess the effect of cocoa intake on food allergy (FA) and anaphylactic response in a rat model.

Methods and Results: Brown Norway rats were fed either a standard diet or diets containing conventional cocoa (CC) or non-fermented cocoa (NFC). FA to ovalbumin (OVA) was induced and, later, an anaphylactic response was provoked. The synthesis of anti-OVA IgE and other Th2-related antibodies was inhibited by CC diet. In addition, the release of mast cell protease II after anaphylaxis was partially prevented by CC, although other variables were not modified. The CC diet also attenuated the increase of some Th2-related cytokines released from stimulated mesenteric lymph node and spleen cells, and modulated the intestinal gene expression of molecules involved in allergic response. The effects of the CC diet were stronger than those of NFC, suggesting that cocoa components other than flavonoids play a role in cocoa's action.

Conclusion: Cocoa-enriched diet in rats with FA exhibited a protective effect against Th2 immune response and partially in anaphylaxis, making this a food of high interest to the fields of health and immunonutrition.

1 Introduction

Cocoa has a relatively high content of antioxidant flavonoids, mainly flavanols such as epicatechin, catechin and procyanidins [1]. Its immunomodulatory effects in healthy rats have been demonstrated by its modification of the composition and functionality of spleen B and T lymphocytes [2], its promotion of T cell maturation [3] and its ability to decrease the intestinal IgM and IgA secretion [4]. Moreover, in ovalbumin-(OVA) immunized rats, the intake of a cocoa-enriched diet decreases specific IgG1, IgG2a, IgG2c and IgM concentrations [5].

Allergy is an immune disease which is caused by innocuous allergens, mainly mediated by IgE. Allergen-specific T lymphocytes differentiate and expand into T helper (Th) 2 cells characterized by producing cytokines such as IL-4, IL-5, IL-10, and IL-13, which switch B cell antibody production against the allergen to predominantly IgE [6]. IgE coats the surface of mast cells, binding to the high-affinity IgE receptors (FcεRI), producing their sensitization. Later exposure to the same allergen triggers the mast cell releasing of mediators such as histamine, proteases and cytokines, which produce allergic symptoms involving the skin, respiratory and gastrointestinal systems or even the nervous and cardiovascular systems [7]. Several studies suggest the preventive role of flavonoids in allergic reactions. Thus, in a respiratory allergy model in rodent, chrysin, baicalin or quercetin, can suppress the airway hyperresponsiveness, decrease the inflammatory cells in the bronchoalveolar lavage fluid and mucus production, as well as decrease the total or specific IgE synthesis [8-10]. In mice with allergic rhinitis, the administration of KOB03, mainly containing baicalin, improves the rhinitis symptoms and inhibits the mast cell activation, the release of allergic mediators and the production of inflammatory cytokines [11]. In addition, we have previously reported the inhibitory effect of a cocoa-enriched diet on

specific IgE and other Th2-related antibodies in sensitized Brown Norway rats [12]. In humans, a clinical trial in persistent allergic rhinitis patients demonstrates the ability of apple polyphenols to ameliorate clinical symptoms [13]. Focusing on the food allergy (FA), the prevention of the development of FA in mice through the intake of apple polyphenol has been described, providing protection against a decrease in body temperature, inhibiting the histamine release and decreasing the specific IgE antibody levels [14-16]. Based on these antecedents, the present study aimed to assess the effect of a cocoa-enriched diet on a FA rat model and, in addition, to establish the role of cocoa flavonoids in these effects.

2 Material and methods

2.1 Diets

Three types of diets were elaborated (**Table 1**): reference diet with no polyphenols (RF) and two cocoa-enriched diets either including conventional cocoa (CC) or cocoa flavonoids from non-fermented cocoa (NFC), both containing 0.4% of polyphenols. The CC diet was made up from Natural Forastero cocoa containing 40.18 mg/g of polyphenols provided by Nutrexp S.L. The NFC diet was elaborated with an ethanol extract of non-fermented and non-roasted cocoa beans containing 510 mg/g of polyphenols (Naturex, France). The addition of 100 g/kg of conventional Natural Forastero cocoa and 8.7 g/kg of NFC was established in order to obtain final isocaloric diets with 0.4% of polyphenols and the same proportion of macronutrients as the reference diet. The diets were prepared from a basal mix diet and particular components were supplied by Teklad Global Diets (Harlan, Indianapolis, IN, USA) and provided *ad libitum*.

Table 1. Composition of reference (RF), conventional cocoa (CC) and non-fermented (NFC) cocoa diets

Components	RF diet (g/kg)	CC diet (g/kg)	NFC diet (g/kg)
Casein	124.3	99.5	124.3
L-Cystine	1.8	1.4	1.8
Corn starch	419.5	432.1	419.5
Maltodextrin	148.6	116.8	148.6
Sucrose	102.7	108.7	102.7
Soybean oil	38.3	26.2	38.3
Cellulose	50	24.5	50
Minerals	35.3	27.8	35.3
Vitamins	2.0	7.2	2.0
Choline bitartrate	9.1	2.0	9.1
Cocoa powder	-	100	8.7
Protein	-	22	1.13
Carbohydrate	-	16	0.82
Lipid	-	11	0.56
Fiber (insoluble/soluble)	-	34 (25.5/8.5)	1.75 (1.31/0.44)
Total polyphenols	-	4	4
Polyphenols provided by cocoa powder:			
Catechin	-	0.073	0.040
Epicatechin	-	0.204	0.689
Isoquercetin	-	0.0053	n.d.
Quercetin	-	0.0029	n.d.
Procyanidin B1	-	n.d.	0.127
Procyanidin B2	-	0.167	0.356
Total procyanidins	-	n.d.	3.897

n.d. means non-determined.

2.2 Induction of food allergy and anaphylaxis

Dams with 14-day-old Brown Norway (BN) rat litters (50% male, 50% female) were obtained from Janvier (Saint-Berthevin, France). After a one-week acclimation period, the weaned rats were randomized into four groups: healthy sham rats fed RF diet (H-RF), FA rats fed RF diet (FA-RF), FA rats fed CC diet (FA-CC) and FA rats fed NFC diet (FA-NFC) (**Fig. 1**). The FA induction was performed as previously described [17]. Briefly, rats received

intraperitoneally (i.p.) 50 µg of ovalbumin (OVA, grade V, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) as allergen, 2.5 mg of Alum (Imject®; Pierce, IL, USA) and 50 ng of toxin from *Bordetella pertussis* (tBp; Sigma-Aldrich) as adjuvants. Fourteen days later, animals daily received 1 mL of OVA solution in mineral water (1 mg per rat) by oral gavage for one week. H-RF group received 1 mL of vehicle. Every 2-3 days water intake and food consumption were registered, body weight was measured and blood samples were collected weekly (**Fig. 1**).

Five days after finishing the oral OVA administration, the animals were fasted overnight and then received 2 mL of 100 mg/mL of OVA orally in order to induce an anaphylactic response (AR). Blood was collected at 0, 30, 60, 90, and 120 min from the saphenous vein to determine hematocrit and RMCP-II concentration. In order to determine the intestinal barrier integrity [238], 30 min after the challenge each rat received 2 mL of β-lactoglobulin (βLG, Sigma-Aldrich) (100 mg/rat) by oral gavage. During AR, rectal temperature was measured using a digital thermometer (Acorn® Temp TC Thermocouple Thermometer, Oakton, IL, USA). Three days after the AR induction rats were sacrificed and biological samples were obtained (**Fig. 1**).

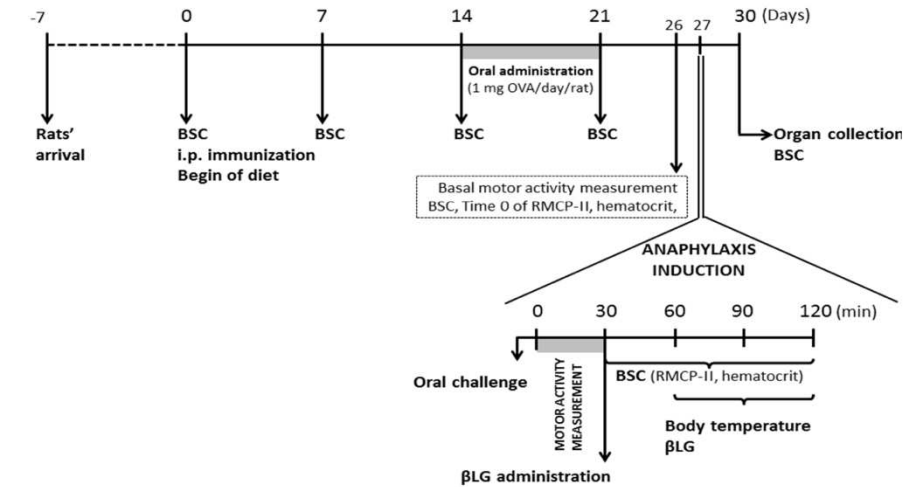


Figure 1. Experimental design. Time-course of the experimental protocol including the points of sample collection and the anaphylaxis induction. BSC: blood sample collection

The experimental design was repeated three times in order to acquire representative results from a sufficient number of animals per group ($n=4$ per group in each experiment, $n=12$ per group at the end of the study). Experimental procedures were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation at the University of Barcelona (ref.494/14).

2.3 Motor activity measurement

Motor activity was determined as previously described with slight modifications [19]. Briefly, two motor activity measurements were performed to establish the basal movements and the changes induced by AR: the first was measured 24 h before anaphylactic induction, and the second immediately after the oral challenge. Motor activity movement counts were recorded using time frames from 1 min to 21 min. To stimulate rat

movements, 10 min after the beginning of the measurement, the lights were turned off for 6 min and then turned on until the end of the measurement. The results refer to the movements in three time phases: pre-darkness, darkness and post-darkness, as well as the entire period. The area under the curve (AUC) for the 21 min period, and the percentage of motor activity decrease after AR induction with respect to the basal measurement in each studied phase and the whole period were calculated.

2.4 Quantification of mast cell mediators and intestinal permeability during anaphylaxis

In serum samples obtained during the AR, RMCP-II concentration was quantified using an ELISA set (Moredun Animal Health, Edinburgh, UK) as previously described [19]. To assess intestinal permeability, β LG was quantified in serum obtained during AR by ELISA as previously reported [17].

2.5 Sample processing

Three days after the AR induction, mesenteric lymph nodes (MLN) and spleen were dissected for immediate lymphocyte isolation. From the middle of the small intestine (SI), a piece (0.5 cm) was kept in RNA later® (Ambion, Life Technologies, Austin, USA) until gene expression analysis and another little piece was separated for histology. Gut washes were obtained from the distal half of the SI for quantification of total and specific IgA [17].

2.6 Determination of cytokines released from MLN and spleen cells

Spleen and MLN cell suspensions were obtained and cultured (2.5×10^6 /mL) with or without OVA (10 μ g/mL) as previously described [17]. After 96 h, supernatants were collected to assess representative Th1 and Th2 cytokine concentrations using the Bio-Plex Pro™ Rat Cytokine Th1/Th2 Assay

according to the manufacturer's instructions. Analysis was carried out with the Bio-Plex® MAGPIX™ Multiplex Reader and the Bio-Plex Data Pro™ software (Bio-Rad, Madrid, Spain). The limits of quantification can be found in the Supporting Information.

2.7 Quantification of metabolic hormones in serum

At the end of the study, serum concentrations of ghrelin, glucagon, glucagon-like peptide (GLP)-1 and leptin were determined using the Bio-Plex Pro™ Diabetes Assay (Bio-Rad) as detailed above. The limits of quantification can be found in the Supporting Information.

2.8 Quantification of gene expression in small intestine

For RNA isolation, SI pieces were processed as previously described [17]. Two micrograms of total RNA were converted to cDNA using random hexamers (Applied Biosystems (AB), CA, USA). The specific PCR TaqMan® primers and probes (AB) used were: Iga (331943, made to order), Fcgr1a (Rn00562369_m1, inventoried (I)), Mcpt2 (Rn00756479_g1, I), Tgfb1 (Rn00572010_m1, I), Muc2 (Rn01498195_m1, I) and Ocln (Rn00580064_m1, I). Quantification of the genes of interest was normalized to the endogenous control actb (Rn00667869_m1, I). Real-time PCR assays were performed in duplicate using an ABI Prism 7900HT sequence detection system (AB).

The amount of target mRNA relative to actb expression and relative to H-RF animals was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, as previously described [20]. Ct is the cycle number at which the fluorescence signal of the PCR product crosses an arbitrary threshold set within the exponential phase of the PCR.

2.9 Small intestine histological analysis

Histological samples were processed as previously described [4]. Next, sections were stained with hematoxylin-eosin and goblet cells were counted from each complete villus observed using light microscopy at 100x magnifications.

2.10 Anti-OVA antibody quantification

Anti-OVA IgG1, IgG2a, IgG2b and IgA antibody concentrations were quantified using an indirect ELISA, and OVA-specific IgE concentration by an antibody-capture ELISA as previously described [17]. The relative concentration of each anti-OVA antibody isotype is expressed in arbitrary units (AU), which were assigned using a positive pool of OVA-immunized rat serum as standard. The AU/mL assigned were 100,000 AU/mL for IgG1 and IgG2a, 10,000 AU/mL for IgG2b, and 10 AU/mL for IgE. For intestinal anti-OVA IgA, since no positive samples were available, data are expressed by means of OD values. Intestinal IgA antibodies were determined by sandwich ELISA as previously described [21].

2.11 Statistical analysis

The software package IBM SPSS Statistics 20 (SPSS Inc., USA) was used. Levene's and Kolmogorov-Smirnov tests were applied to assess variance equality and normal distribution, respectively. Two-way ANOVA tests were used to study the effect of group and group x time interaction. The motor activity data were analyzed by two-way ANOVA for repeated measures considering the group and time as the interacting factors followed by Bonferroni's post hoc test.

To analyze the results from antibodies, metabolic hormones, RMCP-II, β LG and cytokine concentration, body weight, food consumption, water intake, decrease of movements, AUC from motor activity measurement, hematocrit, body temperature, relative gene expression, and number of goblet cells, non-parametric tests (Kruskal–Wallis and Mann–Whitney U) were used due to non-variance homogeneity. Differences were considered statistically significant for p values <0.05.

3 Results

3.1 Body weight, food and water intake and metabolic hormones

At the end of the study, body weight from the FA-RF group was similar to that of the H-RF (**Table 2**). However, in the FA-CC group but not in the FA-NFC group the body weight was lower ($p<0.05$). Food and water intake was monitored throughout the study and no significant differences among groups were found (**Table 2**).

The last day of the study, serum ghrelin concentrations showed no significant differences between groups (**Table 2**). However, GLP-1 and leptin levels were significantly increased by the FA induction ($p<0.05$). Both increases were prevented by the CC diet, and it also produced a decrease in the glucagon levels ($p<0.05$). The NFC diet prevented the GLP-1 increase.

Table 2. Body weight, food consumption, water intake and metabolic hormones in H-RF, FA-RF, FA-CC and FA-NFC groups. Results are expressed as mean \pm SEM (n = 6-12).

	H-RF	FA-RF	FA-CC	FA-NFC
Weight day 0 (g)	36.43 \pm 1.01	35.82 \pm 0.76	36.1 \pm 0.79	35.14 \pm 0.86
Weight day 30 (g)	115.99 \pm 9.31	102.98 \pm 4.59	81.30 \pm 4.23* ^φ	110.70 \pm 4.03 [#]
Chow consumption (g/rat)^a	204.45 \pm 20.36	185.32 \pm 10.17	176.14 \pm 15.16	202.12 \pm 10.79
Water intake (mL/rat)^a	306.03 \pm 14.09	297.31 \pm 23.50	325.04 \pm 28.92	333.77 \pm 16.82
Metabolic hormones				
Ghrelin (ng/mL)	19.61 \pm 4.30	10.27 \pm 2.03	12.98 \pm 3.72	13.94 \pm 2.12
Glucagon (pg/mL)	115.08 \pm 7.82	127.70 \pm 10.75	92.04 \pm 2.99* ^φ	126.65 \pm 12.72 [#]
GLP-1 (pg/mL)	79.67 \pm 9.03	137.55 \pm 10.99*	91.35 \pm 4.71 ^φ	80.95 \pm 16.60 ^φ
Leptin (pg/mL)	367.62 \pm 80.22	586.91 \pm 88.74*	367.24 \pm 53.45 ^φ	569.68 \pm 75.45 [#]

*p<0.05 vs. H-RF group; ^φp<0.05 vs. FA-RF group; #p<0.05 vs. FA-CC group.

^a Food and water intake corresponds to the total consumption per animal during the entire experimental procedure.

3.2 Serum specific anti-OVA antibodies

Sera from the H-RF group did not contain anti-OVA antibodies of any isotype (**Fig. 2**). The i.p. OVA administration induced the synthesis of anti-OVA IgG1, IgG2a, IgG2b and IgE antibodies that were already detectable on day 7. The oral administration of the allergen on days 14-21, boosted the antibody synthesis of IgG1 and IgG2a in the FA-RF group by about 30 times (**Fig. 2A** and **2B**). These increases were completely prevented by the CC diet. In animals from the FA-NFC group, anti-OVA IgG1 and IgG2a antibodies only increased 8-9 fold at day 21 and were significantly lower than those in the FA-RF group.

The FA induction produced lower specific IgG2b antibodies production than IgG1 and IgG2a isotypes and the oral administration on days 14-21 did not increase it (**Fig. 2C**). Nevertheless, at day 14, their levels were significantly higher in the FA-CC group than in the FA-RF rats.

Regarding specific IgE antibodies (**Fig. 2D**), the oral administration of OVA from day 14 to day 21 increased anti-OVA IgE fourfold in the FA-RF group. The CC diet prevented the synthesis of anti-OVA IgE, whereas the NFC diet reduced these antibodies when oral administration was finished.

3.3 Intestinal IgA and specific anti-OVA IgA antibodies

At the end of the study, the levels of total intestinal IgA were similar between the H-RF and FA-RF groups (**Fig. 2E**). In both groups fed with cocoa flavonoids, total IgA was significantly decreased, the strongest effect being found in FA-CC animals. Intestinal anti-OVA IgA (**Fig. 2F**), significantly rose in the FA-RF group and this increase was prevented by the CC diet but not by the NFC diet.

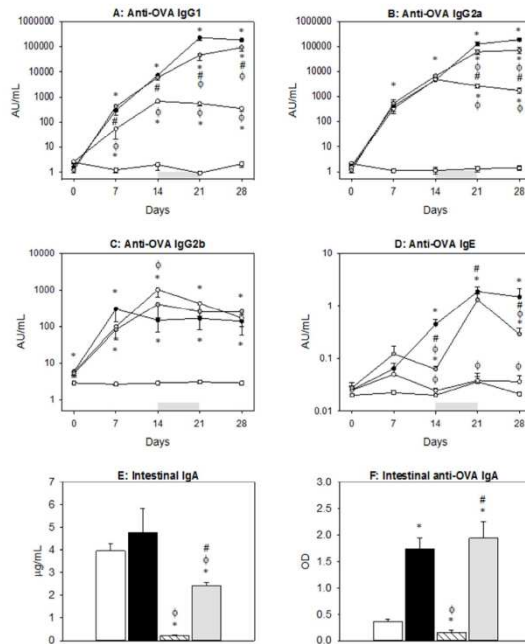


Figure 2. Concentrations of serum anti-OVA antibodies during the study: A) IgG1, B) IgG2a, C) IgG2b, D) IgE, and E) intestinal IgA and F) intestinal anti-OVA IgA. White bars or □ represent H-RF group, black bars or ● represent FA-RF group, white-striped bars or ○ represent FA-CC group and grey bars or ◐ represent FA-NFC group. Shadow period corresponds to oral administration of OVA in FA groups. Results are expressed as mean ± SEM (n = 12). * $p < 0.05$ vs. H-RF group, and $\phi p < 0.05$ vs. FA-RF group and # $p < 0.05$ vs. FA-CC group.

3.4 Assessment of anaphylaxis

Changes in motor activity, body temperature, hematocrit, serum RMCP-II and β LG concentrations were determined immediately after oral challenge to assess anaphylaxis.

Basal values of motor activity showed that FA-CC animals had a lower number of movements in comparison with the rest of the groups ($p < 0.05$; **Fig. 3A-B**). After AR induction, all the FA animals showed a significant decrease in the number of movements ($p < 0.05$; **Fig. 3C-D**). The decrease

percentage between basal and post-AR induction was calculated for the whole period and for each phase (Fig. 3E). There was a significant decrease of almost 70% in the motor activity of all the FA groups (in the pre-darkness and the whole studied period).

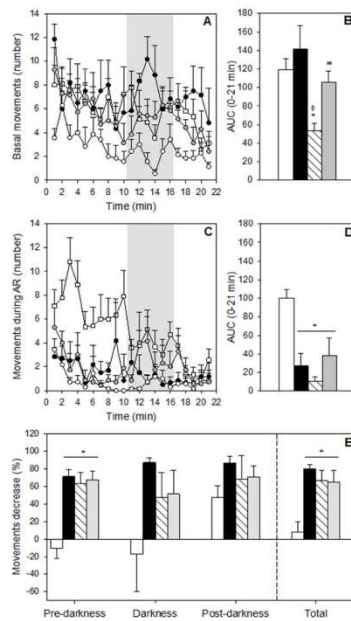


Figure 3. Motor activity for 21-min period: A) basal motor activity and B) area under the curve assessed 24 h before the AR induction; C) motor activity and D) area under the curve assessed immediately after AR induction; E) percentage of motor activity decrease after AR induction referring to pre-darkness, darkness, post-darkness and the whole period. White bars or □ represent H-RF group, black bars or ● represent FA-RF group, white-striped bars or ○ represent FA-CC group and grey bars or ○ represent FA-NFC group. In A and C, shadow period corresponds to darkness. Results are expressed as mean ± SEM (n = 12). * $p < 0.05$ vs. H-RF group, and ° $p < 0.05$ vs. FA-RF group and # $p < 0.05$ vs. FA-CC group.

The body temperature dropped in all FA animals during the anaphylaxis period ($p < 0.05$) without differences due to diet (Fig. 4A). Inversely, hematocrit increased in the three FA groups in comparison with H-RF

animals ($p < 0.05$; **Fig. 4B**), but after 2 h of the oral challenge, both cocoa groups partially recovered healthy values ($p < 0.05$). In parallel, serum RMCP-II concentration (**Fig. 4C**) rose after the oral challenge in the FA-RF group, and this increase was partially prevented in the FA-CC group. Nevertheless, intestinal permeability augmented in all animals with FA, regardless of the diet (**Fig. 4D**).

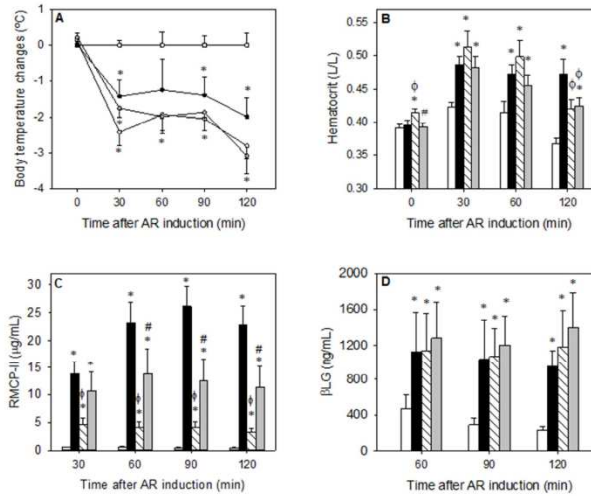


Figure 4. Variables measured during 2 h after anaphylaxis induction: A) changes in body temperature, B) hematocrit, C) serum RMCP-II and D) β LG concentrations. White bars or \square represent H-RF group, black bars or \bullet represent FA-RF group, white-striped bars or \circ represent FA-CC group and grey bars or \circ represent FA-NFC group. Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 12$). * $p < 0.05$ vs. H-RF group, and $^{\circ}p < 0.05$ vs. FA-RF group and $^{\#}p < 0.05$ vs. FA-CC group.

3.5 Intestinal structure and small intestine gene expression

Intestinal histology (**Fig. 5A**) in the animals of the FA-RF group did not reveal a clear inflammation with the exception of certain crypt elongation. Both cocoa flavonoid diets induced slight villous atrophy (**Fig. 5A**) and a lower number of goblet cells (**Fig. 5B**).

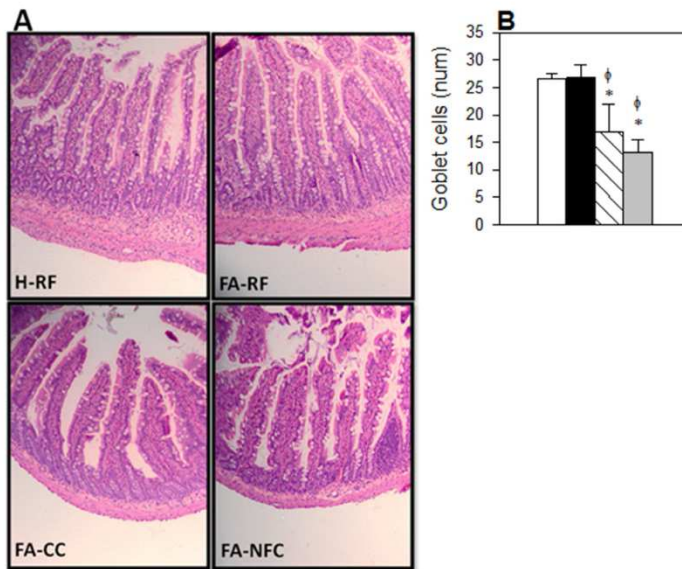


Figure 5. Intestinal structure. A) Representative intestinal sections from H-RF, FA-RF, FA-CC and FA-NC groups stained with hematoxylin-eosin (100X magnification) and B) number of goblet cells. Results are expressed as mean \pm SEM (n = 6). * $p < 0.05$ vs. H-RF group, and $\spadesuit p < 0.05$ vs. FA-RF group.

The relative gene expression of IgA, Fc ϵ RI, RMCP-II, TGF- β 1, occludin and mucin 2 was quantified in the SI (**Fig. 6**). In the FA-RF group, the FA induction produced a significant increase in the IgA gene expression in comparison with the H-RF group ($p < 0.05$), whereas both cocoa diets prevented this increase ($p < 0.05$); the FA-CC group even reduced the IgA mRNA levels with respect to the H-RF animals ($p < 0.05$). In addition, the FA-CC group, but not the FA-NFC group, also had lower gene expression of Fc ϵ RI, RMCP-II and TGF- β 1 in comparison with H-RF and FA-RF animals ($p < 0.05$). With regard to the mRNA levels of occludin and mucin 2, no significant changes were observed due to FA or cocoa diets.

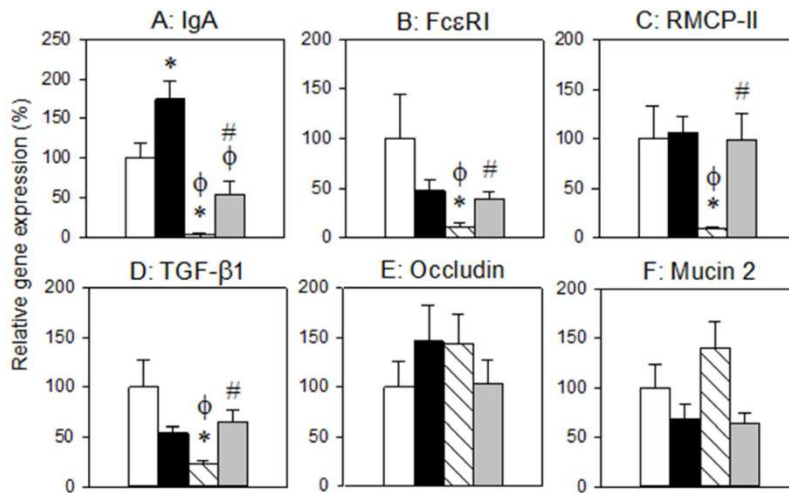


Figure 6. Relative gene expression of several molecules in small intestine. Expression levels were normalized using *actb* as the endogenous housekeeping gene and were expressed as percentage in comparison with the H-RF group, which was considered as 100% gene expression. White bars represent H-RF group, black bars represent FA-RF group, white-striped bars represent FA-CC group and grey bars represent FA-NFC group. Results are expressed as mean \pm SEM (n = 12). * p <0.05 vs. H-RF group, and ϕ p <0.05 vs. FA-RF group and # p <0.05 vs. FA-CC group.

3.6 Cytokine production by MLN and spleen cells

MLN cells from the FA-RF group produced significantly higher levels of IL-4, IL-5 and IL-13 in comparison with cells from the H-RF group (p <0.05) (**Fig. 7A**). Both cocoa diets prevented the increase in IL-5 and IL-13 (p <0.05 vs. FA-RF group). In addition, the MLN cytokine pattern from animals fed cocoa diets underwent several other changes. Cells from the FA-CC group decreased the secretion of IL-1 α , IL-1 β and IFN- γ with respect to the H-RF and FA-RF group. The FA-NFC group decreased IL-1 α and GM-CSF secretion in comparison with the H-RF and FA-CC groups (p <0.05).

Regarding the cytokine production from splenocytes (**Fig. 7B**), FA induction significantly increased the release of IL-2, IL-4 and IL-13 in the FA-RF group

($p < 0.05$ vs H-RF group). However, cells from FA-CC rats did not increase IL-2 and IL-4, and showed higher IL-6 production ($p < 0.05$ vs RF groups). Splenocytes from the FA-NFC group showed a similar increase in IL-4 and IL-13 and higher levels of IL-6, IL-10 and IFN- γ ($p < 0.05$) than the FA-RF group.

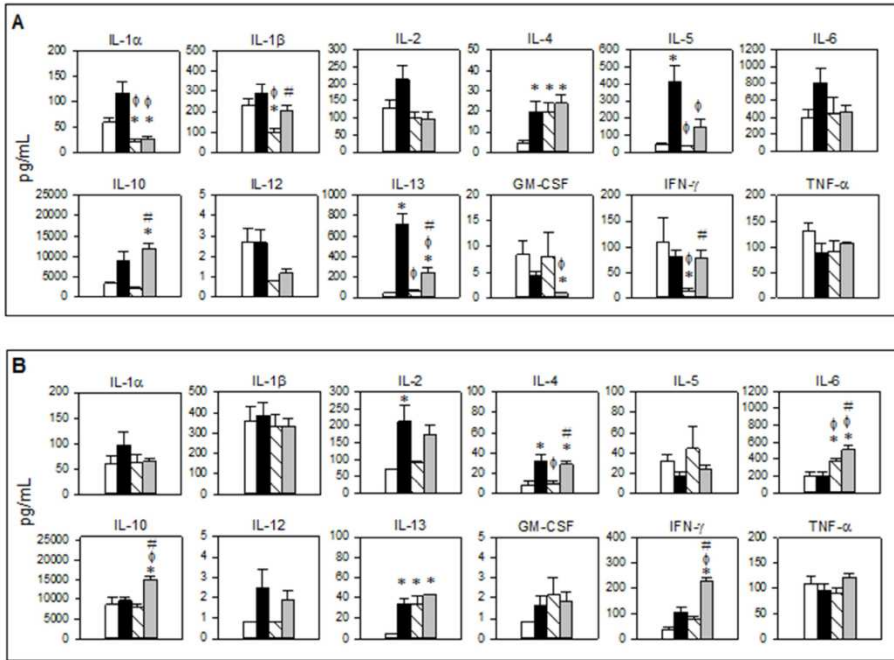


Figure 7. Cytokine production from A) mesenteric lymph nodes and B) spleen cells after OVA-stimulation. White bars represent H-RF group, black bars represent FA-RF group, white-striped bars represent FA-CC group and grey bars represent FA-NFC GROUP. Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 6-8$). * $p < 0.05$ vs. H-RF group, and $\phi p < 0.05$ vs. FA-RF group and # $p < 0.05$ vs. FA-CC group.

4. Discussion

Previous studies concerning the effect of a cocoa diet on the immune system in rats reveal the ability of a cocoa diet to attenuate serum and intestinal immunoglobulin synthesis [2–5,22,23]. More interestingly, a diet containing 10% of cocoa in a rat allergy model induced by only an i.p. immunization demonstrates an important inhibition in Th2-specific antibodies [12]. These results prompted us to ascertain the effect of this diet on a FA model. In addition, in order to learn about the role of cocoa flavonoids, a diet containing more pure polyphenols obtained from unfermented cocoa was included.

In a rat model of FA, we demonstrated here that a diet with CC that began at the same time as allergy induction was also able to modulate those specific IgG antibodies associated with Th2-immune response (IgG1 and IgG2a), without affecting those related to Th1 cell activation (IgG2b). More interestingly, CC diet in FA rats prevented completely the synthesis of specific IgE. Although some studies using polyphenol-enriched diets show a similar effect [24,25], our results with the NFC diet on specific antibodies allow the suggestion that flavonoids are only partially responsible for the attenuating effect on Th2-antibody synthesis and other compounds in CC must enhance this effect. In agreement with this suggestion, a previous study in healthy Lewis rats shows that a diet containing 0.8% of polyphenols from NFC produced the same immunomodulatory effect as a diet containing 0.2% of polyphenols from CC that also contains higher cocoa fiber and methylxanthines than NFC [22]. On the other hand, FA induction caused an increase in intestinal anti-allergen IgA synthesis as quantified by protein levels and also by IgA gene expression. Although IgA is considered an important intestinal barrier, it has been shown that the induction of

tolerance in FA mice is associated with an inhibition of specific intestinal IgA [26]. The CC diet reduced total intestinal IgA protein and gene expression in agreement with previous studies [4,21], thus avoiding the specific IgA synthesis. Results from the NFC diet again suggest that other compounds and/or particular flavonoids in the CC must play a role in its attenuating effects on the gut immune system. With regard to the mechanisms involved in CC-induced intestinal IgA decrease, we studied TGF- β 1 gene expression and found that CC, but not NFC, down-regulated this cytokine that promotes IgA synthesis [27,28].

In order to look into the influence of cocoa diets in FA in more depth, Th1 and Th2 cytokines were assessed in OVA-stimulated MLN and spleen cells, as intestinal and systemic representative tissues. Consistently, FA increased the release of Th2 cytokines such as IL-4, IL-5 and IL-13 from MLN cells. Although IL-4 plays an essential role in the antibody class-switching to IgE synthesis [29,30], it was not lowered in MLN from cocoa-fed animals, which agrees with previous studies on cocoa-fed allergic rats [12]. Interestingly, both cocoa diets showed a protective role against the increase of other Th2-cytokines such as IL-5 and IL-13, and the CC diet also decreased the release of the Th1-cytokines IL-1 α , IL-1 β and IFN- γ from MLN cells. The modulatory effect of cocoa on these Th1 cytokines could be beneficial in FA because IL-1 has been involved in the inflammatory process of allergic diseases [31]. In spleen cells, FA also increased the release of IL-4 and IL-13. Although cocoa diets were unable to avoid the increase in IL-13, the CC diet, but not the NFC diet, prevented the increase of IL-4, a result that could explain the high inhibition of IgE synthesis by the CC diet. These results partially agree with decreased splenic IL-4 production in immunized mice fed with chrysin and apigenin [32] and suggest that particular flavonoids have different immunomodulatory effects. In addition, it must be added that the NFC diet

increased the production of IL-10 in both tissues and IFN- γ in splenocytes, whereas it decreased the production of GM-CSF in MLN cells; on the other hand, both cocoa diets increased the levels of IL-6 in spleen cells. Taken together, these results evidence the complex modulatory effects of flavonoids and also other compounds present in cocoa on immune function and shed some light on the IgE-regulatory role of the cocoa diet.

In this study we also focused on the intestinal changes induced by FA in the gene expression of barrier molecules such as mucin 2 and occludin. The FA, regardless of the cocoa diets, did not modify the gene expression of either barrier molecules involved in luminal protection of the intestine. This fact must be attributed to the method of FA induction, which, unlike other models [33], does not use mucosal adjuvants such as cholera toxin. Mucin 2 is secreted by goblet cells [34] and, from the histology sections, we counted less goblet cells after CC intake, although this was not confirmed by PCR. More research should be focused on confirming these results and the mechanism involved.

The most severe response of FA is anaphylaxis after allergen intake, induced by the fast degranulation of mast cells. In our FA model this can be quantified by high serum RMCP-II concentrations. We have found that this increase in RF-FA animals was greatly prevented by the CC diet, whereas NFC intake only showed a certain effect. This protective response by cocoa could be a consequence of lower specific IgE levels and also to the down-regulation of Fc ϵ RI gene expression, both effects found here. *In vitro* studies have demonstrated the inhibitory effects of flavonoids on Fc ϵ RI surface molecule or gene expression [35,36]. Although mast cells were not determined histologically in the intestine, from these results we can hypothesize that cocoa intake would reduce mast cell accumulation in the intestine and/or down-regulate Fc ϵ RI, producing, in any case, a lower RMCP-II release after

allergen intake. As the NFC diet did not produce the same effects, compounds of cocoa other than flavonoids must be responsible for, or enhance, such actions.

Anaphylactic response was also assessed by a fall in body temperature, an increase in hematocrit and intestinal permeability, and a reduction of motor activity. Surprisingly these alterations were not prevented by either the CC or the NFC diet, with the exception of a faster recuperation of hematocrit. As body temperature fall is due to a massive vasodilatation induced by mast cell mediators [37], the recognized vasodilator properties of cocoa [38] could explain the lack of effect of cocoa intake on this variable. Despite this fact, there is no a clear explanation when considering a local intestinal modification, such as intestinal permeability increase, or a systemic repercussion such as motor activity. Therefore, the insufficient protection against intestinal and systemic repercussions demonstrates that the reduction of anti-allergen IgE and also the down-regulation of FcεRI and RMCP-II gene expression by cocoa diet were not enough to control the anaphylactic response after the oral challenge with the allergen.

Finally, although food intake did not differ among groups, the CC diet produced a decrease in the body weight without modifying food intake as we previously reported [23,39], and this fact prompted us to determine some metabolic hormones. The FA process and later anaphylaxis induction caused increased levels of leptin and GLP-1, both prevented by CC diet. The interaction between obesity, asthma and leptin has long been studied [40], and some studies have reported the association of higher leptin levels with some allergic status [41,42]. In agreeing with these studies we show here that FA can also increase serum leptin in rats together with GLP-1, which has not been described in previous studies. The CC diet prevented these increases and also produced lower glucagon levels, effects that deserve

further studies in line with those demonstrating the influence of cocoa diet on metabolism [43].

In conclusion, a cocoa-enriched diet suppresses the Th2 immune response and is also able to attenuate the release of mast cell mediators, becoming a potential nutrient in the prevention of FA. This effect is stronger in CC than NFC, suggesting that components other than flavonoids take part in this response after the induction of anaphylaxis. Further studies to clarify which components present in cocoa are responsible for this action should be developed. Although cocoa seems not to have a protective role in the face of anaphylaxis response, the inhibition of serum allergen-specific antibodies as well as the RMCP-II release supposes the cornerstone of its protective properties, making this a food of high interest in the field of health and immunonutrition.

Author contributions

All experiments were performed at the Department of Physiology in the Faculty of Pharmacy at the University of Barcelona. Conception and design of experiments: MC, AF, FJPC; collection, analysis and interpretation of data: MAG, AGJ, MC, AF, FJPC; manuscript writing: MAG, AF, MC. All authors have approved the final manuscript version to be published.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (AGL2011-24279). The authors would like to thank Dr. Antoni Díez-Noguera and Dr. Trinitat Cambras for lending us the activity meters and Maria Pérez-Cano, Malén Massot-Cladera, Filipa Vicente, and Sònia Sánchez for their technical assistance.

Conflict of interests

None declared

5. References

- [1] Rusconi M, Conti A. Theobroma cacao L., the food of the gods: a scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacol Res* 2010;61:5–13.
- [2] Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Ramírez-Santana C, Castellote C, *et al.* Spleen lymphocyte function modulated by a cocoa-enriched diet. *Clin Exp Immunol* 2007;149:535–542.
- [3] Ramiro-Puig E, Urpí-Sardà M, Pérez-Cano FJ, Franch À, *et al.* Cocoa-enriched diet enhances antioxidant enzyme activity and modulates lymphocyte composition in thymus from young rats. *J Agric Food Chem* 2007;55:6431–6438.
- [4] Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Ramos-Romero S, Pérez-Berezo T, *et al.* Intestinal immune system of young rats influenced by cocoa-enriched diet. *J Nutr Biochem* 2008;19:555–565.
- [5] Pérez-Berezo T, Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Castellote C, *et al.* Influence of a cocoa-enriched diet on specific immune response in ovalbumin-sensitized rats. *Mol Nutr Food Res* 2009;53:389–397.
- [6] Larché M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006;6:761–771.
- [7] Amin K. The role of mast cells in allergic inflammation. *Respir Med* 2012;106:9–14.
- [8] Jung H-S, Kim MH, Gwak N-G, Im Y-S, *et al.* Antiallergic effects of *Scutellaria baicalensis* on inflammation in vivo and in vitro. *J Ethnopharmacol* 2012;141:345–349.
- [9] Du Q, Gu X, Cai J, Huang M, Su M. Chrysin attenuates allergic airway inflammation by modulating the transcription factors T-bet and GATA-3 in mice. *Mol Med Rep* 2012;6:100–104.
- [10] Cruz EA, Reuter S, Martin H, Dehzad N, *et al.* *Kalanchoe pinnata* inhibits mast cell activation and prevents allergic airway disease. *Phytomedicine* 2012;19:115–121.
- [11] Won Jung H, Jung J-K, Weon Cho C, Kang J-S, Park Y-K. Antiallergic effect of KOB03, a polyherbal medicine, on mast cell-mediated allergic responses in

- ovalbumin-induced allergic rhinitis mouse and human mast cells. *J Ethnopharmacol* 2012;142:684–693.
- [12] Abril-Gil M, Massot-Cladera M, Pérez-Cano FJ, Castellote C, *et al.* A diet enriched with cocoa prevents IgE synthesis in a rat allergy model. *Pharmacol Res* 2012;65:603–608.
- [13] Enomoto T, Nagasako-Akazome Y, Kanda T, Ikeda M, Dake Y. Clinical effects of apple polyphenols on persistent allergic rhinitis: A randomized double-blind placebo-controlled parallel arm study. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2006;16:283–289.
- [14] Akiyama H, Sato Y, Watanabe T, Nagaoka MH, *et al.* Dietary unripe apple polyphenol inhibits the development of food allergies in murine models. *FEBS Lett* 2005;579:4485–4491.
- [15] Zuercher AW, Holvoet S, Weiss M, Mercenier A. Polyphenol-enriched apple extract attenuates food allergy in mice. *Clin Exp Allergy* 2010;40:942–950.
- [16] Singh A, Demont A, Actis-Goretta L, Holvoet S, *et al.* Identification of epicatechin as one of the key bioactive constituents of polyphenol-enriched extracts that demonstrate an anti-allergic effect in a murine model of food allergy. *Br J Nutr* 2014;112:358–368.
- [17] Abril-Gil M, Garcia-Just A, Pérez-Cano FJ, Franch À, Castell M. Development and characterization of an effective food allergy model in Brown Norway rats. *PLoS One* 2015, *in press*.
- [18] Knippels LMJ, Penninks AH, Smit JJ, Houben GF. Immune-mediated effects upon oral challenge of ovalbumin-sensitized Brown Norway rats: further characterization of a rat food allergy model. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;156:161–169.
- [19] Abril-Gil M, Garcia-Just A, Cambras T, Pérez-Cano FJ, *et al.* Motor activity as unbiased variable to assess anaphylactic shock in allergic rats. *Exp Biol Med* 2015. doi: 10.1177/1535370215573393, *in press*.
- [20] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402–408.
- [21] Massot-Cladera M, Abril-Gil M, Torres S, Franch À, *et al.* Impact of cocoa polyphenol extracts on the immune system and microbiota in two strains of young rats. *Br J Nutr* 2014;112:1944–1954.
- [22] Massot-Cladera M, Franch À, Castellote C, Castell M, Pérez-Cano FJ. Cocoa flavonoid-enriched diet modulates systemic and intestinal immunoglobulin synthesis in adult Lewis rats. *Nutrients* 2013;5:3272–3286.

- [23] Pérez-Berezo T, Franch A, Ramos-Romero S, Castellote C, *et al.* Cocoa-enriched diets modulate intestinal and systemic humoral immune response in young adult rats. *Mol Nutr Food Res* 2011;55:S56–66.
- [24] Cruz EA, Da-Silva SAG, Muzitano MF, Silva PMR, *et al.* Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock. *Int Immunopharmacol* 2008;8:1616–1621.
- [25] Horiuchi M, Seyama Y. Improvement of the antiinflammatory and antiallergic activity of *Bidens pilosa* L. var. *radiata* SCHERFF treated with enzyme (Cellulosine). *J Heal Sci* 2008;54:294–301.
- [26] Perrier C, Thierry A-C, 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;40:153–162.
- [27] Cazac BB, Roes J. TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity* 2000;13:443–451.
- [28] Stavnezer J, Kang J. The surprising discovery that TGF beta specifically induces the IgA class switch. *J Immunol* 2008;182:5–7.
- [29] Paludan SR. Interleukin-4 and interferon-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship. *Scand J Immunol* 1998;48:459–468.
- [30] Boothby M, Mora AL, Aronica MA, Youn J, *et al.* IL-4 signaling, gene transcription regulation, and the control of effector T cells. *Immunol Res* 2001;23:179–191.
- [31] Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, *et al.* Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:701–21.e1–70.
- [32] Yano S, Umeda D, Yamashita T, Ninomiya Y, *et al.* Dietary flavones suppresses IgE and Th2 cytokines in OVA-immunized BALB/c mice. *Eur J Nutr* 2007;46:257–263.
- [33] Camps-Bossacoma M, Abril-Gil M, Franch À, Pérez-Cano FJ, Castell M. Induction of a model of oral sensitization in rat. *Clin Immunol Endocr Metab Drugs* 2014, *in press*.
- [34] Johansson ME V, Sjövall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:352–361.

- [35] Yano S, Tachibana H, Yamada K. Flavones suppress the expression of the high-affinity IgE receptor FcεRI in human basophilic KU812 cells. *J Agric Food Chem* 2005;53:1812–1817.
- [36] Nakano N, Nishiyama C, Tokura T, Nagasako-Akazome Y, *et al.* Procyanidin C1 from apple extracts inhibits FcεRI-mediated mast cell activation. *Int Arch Allergy Immunol* 2008;147:213–221.
- [37] Simons FER. Anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:S161–181.
- [38] Sudano I, Flammer AJ, Roas S, Enseleit F, *et al.* Cocoa, blood pressure, and vascular function. *Curr Hypertens Rep* 2012;14:279–284.
- [39] Massot-Cladera M, Pérez-Berezo T, Franch A, Castell M, Pérez-Cano FJ. Cocoa modulatory effect on rat faecal microbiota and colonic crosstalk. *Arch Biochem Biophys* 2012;527:105–112.
- [40] Yuksel H, Sogut A, Yilmaz O, Onur E, Dinc G. Role of adipokines and hormones of obesity in childhood asthma. *Allergy Asthma Immunol Res* 2012;4:98–103.
- [41] Guler N, Kirerleri E, Ones U, Tamay Z, *et al.* Leptin: does it have any role in childhood asthma? *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:254–259.
- [42] Sood A, Ford ES, Camargo Jr CA. Association between leptin and asthma in adults. *Thorax* 2006;61:300–305.
- [43] Ali F, Ismail A, Kersten S. Molecular mechanisms underlying the potential antiobesity-related diseases effect of cocoa polyphenols. *Mol Nutr Food Res* 2014;58:33–48.

Supporting information

Cytokines (pg/mL)		
	LLOQ	ULOQ
IL-1α	7.82	31953.56
IL-1β	8.26	31999.96
IL-2	145.58	32188.31
IL-4	0.84	15954.37
IL-5	7.79	8068.31
IL-6	35.36	32600.93
IL-10	32.31	31999.8
IL-2p70	1.64	32202.1
IL-13	6.87	34692.34
GM- CSF	1.71	30927.75
IFN-γ	8.51	33143.52
TNF-α	1.55	8171.98
Metabolic hormones (pg/mL)		
Ghrelin	159.58	155595.25
Glucagon	23.43	1316.37
GLP-1	8.44	1999.39
Leptin	123.73	130750.77

Lower (LLOQ) and upper limits of quantification (ULOQ) for cytokines and metabolic hormones according to the Bioplex-Pro assay applied

Discussió

El cacau en pols, procedent de les llavors de l'arbre *Theobroma cacao*, constitueix una font important de flavonoides com epicatequina, catequina i procianidines. Estudis previs realitzats pel grup d'Autoimmunitat i Tolerància han posat de manifest l'efecte immunomodulador d'una dieta enriquida amb cacau en rata [210]. Així, s'ha demostrat que l'administració d'una dieta rica en cacau promou la maduració limfocitària en el timus [8], disminueix la proporció de cèl·lules T col·laboradores (*T helper*, Th) en la melsa, ganglis limfàtics mesentèrics (GLM) i plaques de Peyer (PP) [7,9], i atenua la secreció d'anticossos, tant a nivell sistèmic com intestinal [7,9,12,17,219]. En base a aquests resultats, la hipòtesi de partida d'aquesta tesi ha estat que la capacitat immunomoduladora del cacau pot ser útil per controlar el desenvolupament de malalties mitjançades per d'anticossos com és el cas de les al·lèrgies i, particularment, l'al·lèrgia alimentària, que involucra directament a la immunitat intestinal i fenòmens de pèrdua de la tolerància oral. Per tant, l'objectiu general de la tesi va ser establir la capacitat reguladora dels flavonoides presents al cacau en una resposta al·lèrgica, emprant un model d'al·lèrgia alimentària en rata. Per assolir aquest objectiu, en primer lloc ha estat necessari disposar d'un model d'al·lèrgia alimentària i també establir variables indicatives de la gravetat del procés que fossin susceptibles de ser modificades per la dieta rica en cacau. D'aquesta manera, els primers esforços es van dirigir a l'obtenció d'un model d'al·lèrgia alimentària en rata i, de forma paral·lela, a l'avaluació de l'efecte d'una dieta enriquida amb cacau sobre la síntesi d'IgE específica.

Knippels *et al.* [225] van descriure un model d'al·lèrgia alimentària que consisteix en l'administració de l'al·lèrgogen sense adjuvant, diàriament i per via oral. Es tracta d'un procediment de llarga durada, ja que la immunització requereix sis setmanes. Tot i que ha estat utilitzada en alguns estudis [229–232], aquest model no és massa reproduïble [233] ja que no sempre aconsegueix estimular la síntesi d'IgE específica [234,235]. Hi ha altres models d'al·lèrgia alimentària amb més èxit en els que l'al·lèrgogen alimentari s'administra, amb o sense adjuvant, a través de tres injeccions per via intraperitoneal [236–239]. Per tal d'involucrar el sistema immunitari intestinal i provocar la pèrdua de tolerància oral és millor, però, incorporar l'administració oral de l'al·lèrgogen [240].

En aquesta tesi es van realitzar una sèrie d'estudis preliminars abans no es va aconseguir el model d'al·lèrgia alimentària acompanyat de la formació

d'anticossos IgE específics (primer objectiu). Concretament, la inducció es va realitzar en dues soques de rates emprant diferents vies d'administració de l'al·lergogen i l'addició o no d'adjuvant [224]. Durant aquest procés, es va aconseguir desenvolupar un model d'al·lèrgia, mitjançant una única injecció per via intraperitoneal d'una suspensió d'ovoalbúmina (OVA) en hidròxid d'alumini i la incorporació de toxina de *Bordetella pertussis* com a adjuvant. L'hidròxid d'alumini és capaç d'adsorbir l'antigen d'interès, potenciar la resposta immunitària conseqüent a la immunització i estimular la formació d'IgE [241]. La toxina de *Bordetella pertussis* potencia la síntesi d'interleucina (IL)-4 [242] i l'expressió de molècules coestimuladores de limfòcits B [243] i, per tant, dirigeix la resposta immunitària cap a la de tipus Th2 [227]. D'aquesta manera, amb només una única immunització intraperitoneal, es va aconseguir desenvolupar un model d'al·lèrgia a OVA en rates de la soca Brown Norway (BN), caracteritzat per la síntesi d'anticossos IgE contra aquest al·lergogen. En aquest model es van establir variables indicatives de resposta anafilàctica i es va avaluar l'efecte d'una dieta enriquida amb un 10% de cacau sobre la resposta immunitària de tipus Th2.

Així doncs, en el model desenvolupat es van establir variables indicatives d'estat al·lèrgic i, mitjançant la provocació per via oral amb l'al·lergogen, es va induir i quantificar la resposta anafilàctica (**article 2**). Concretament, el model es va desenvolupar en rates BN que van rebre una única dosi intraperitoneal de la suspensió d'OVA, hidròxid d'alumini i toxina de *Bordetella pertussis*. Després de 40 dies, es va provocar una resposta anafilàctica mitjançant l'administració oral d'una dosi elevada d'OVA. La resposta anafilàctica és una resposta molt ràpida deguda a la unió de l'al·lergogen a la IgE que està fixada a la superfície dels mastòcits. Aquesta unió provoca la desgranulació d'aquestes cèl·lules i també l'alliberament de mediadors de nova síntesi que, en conjunt, provoquen vasodilatació i incrementen la permeabilitat vascular [238,244,245].

Per avaluar la resposta anafilàctica sovint s'utilitzen sistemes de puntuació centrats en els canvis de comportament que experimenta l'animal immediatament després d'una provocació. Aquests canvis sovint són valorats subjectivament per part de l'investigador. En general es consideren comportaments com el gratament o fregament, sibilàncies, rampes abdominals, disminució o increment de l'activitat amb reducció de la freqüència respiratòria, entre altres [246,247]. En aquesta tesi es va avaluar

el nombre de moviments de cada animal, de forma individual, com a alternativa objectiva a aquests sistemes de puntuació. El procediment utilitzat per enregistrar els moviments ha estat utilitzat en estudis previs de comportament animal [248,249] i s'ha dut a terme gràcies a la col·laboració de la Dra. Trinitat Cambras i el Dr. Antoni Díez, professors del Departament de Fisiologia de la Facultat de Farmàcia. Els resultats de l'activitat motora mostren que la provocació oral redueix el nombre de moviments en rates al·lèrgiques, sobretot durant els primers minuts després de la provocació. Per tant, es van quantificar objectivament els canvis de comportament induïts per la resposta anafilàctica en els minuts posteriors a la seva inducció (**article 2**). Aquesta mesura ha demostrat ser reproducible en els diferents assajos i, posteriorment, ha resultat útil per avaluar la resposta anafilàctica en el model d'al·lèrgia alimentària (**articles 3 i 4**). Per altra banda, la resposta anafilàctica també s'ha quantificat mitjançant l'increment en la concentració sèrica de la proteasa mastocitària II (RMCP-II) alliberada durant la desgranulació, que es va mantenir elevada durant almenys dues hores després de la provocació. En canvi, es va intentar determinar la histamina i la β -hexoaminidasa, dos mediadors alliberats també durant la desgranulació mastocitària, i els resultats en mostres plasmàtiques obtingudes als 30 minuts de la provocació oral van ser negatius. En alguns estudis s'ha demostrat un increment d'histamina als 5–10 minuts després d'una provocació [250,251] si bé, altres autors descriuen una concentració elevada als 30 minuts [252–254]. Els resultats negatius obtinguts en aquesta tesi, però, concorden amb els resultats de Bellou *et al.* [238] els quals no detecten increments d'histamina als 15 min després de la provocació. Per altra banda, l'augment de RMCP-II trobat en sèrum es correlaciona amb la disminució de l'activitat motora, resultant ser, per tant, un bon indicador de la resposta anafilàctica dels animals. Un altre indicador d'aquesta resposta és la davallada de temperatura corporal, que va ser de l'ordre de 2°C tant en els animals amb al·lèrgia a OVA induïda per via intraperitoneal, com en el model d'al·lèrgia alimentària. La reducció de la temperatura corporal es pot atribuir a l'alliberament massiu de mediadors vasodilatadors [238,245]. Així doncs, es va desenvolupar un model d'al·lèrgia amb síntesi d'IgE i susceptible a la inducció d'una resposta anafilàctica quantificable a través de mediadors alliberats (RMCP-II), manifestacions immediates sistèmiques (hipotèrmia) i també alteracions en el comportament (activitat motora) (**article 2**).

La recerca d'un model d'al·lèrgia alimentària que impliqués la participació directa del sistema immunitari intestinal (primer objectiu) va donar lloc a combinar la sensibilització inicial per via intraperitoneal (una dosi d'OVA, hidròxid d'alumini i toxina de *Bordetella pertussis*) amb la posterior administració oral de l'al·lergogen durant tres setmanes. Per tal d'evidenciar els canvis conseqüents únicament a la sensibilització oral, durant aquest procediment es va avaluar també la resposta obtinguda en animals que havien estat sensibilitzats amb només una administració per via intraperitoneal. Els resultats van demostrar que tots els animals immunitzats per via intraperitoneal van desenvolupar anticossos específics, especialment els relacionats amb la resposta Th2 en rata (IgE, IgG1 i IgG2a) i la seva síntesi va augmentar quan van rebre l'OVA per via oral (**article 3**). Aquest increment provocat per l'administració oral molt evident per als anticossos d'isotip IgG1, IgG2a específics, i més discret en el cas d'IgE, tot i que l'increment només va durar la primera setmana d'administració de l'al·lergogen. Això va comportar que, posteriorment, l'aplicació d'aquest model es limités a una setmana d'administració oral de l'al·lergogen (**article 4**). A més, l'administració oral de l'al·lergogen va induir, de forma específica, la síntesi d'IgA anti-OVA, la qual es va quantificar en sèrum i rentat intestinal. En aquest sentit, tot i que la IgA es considera una immunoglobulina protectora en processos de sensibilització oral [255], hi ha certa controvèrsia en relació a la seva funció en al·lèrgia alimentària. Alguns autors han descrit que el seu increment està relacionat amb una predisposició a desenvolupar posteriorment la malaltia [256], mentre que d'altres mostren que el seu increment, a nivell de mucosa intestinal, s'associa amb el desenvolupament de tolerància [257]. En resum, la inducció d'un model d'al·lèrgia alimentària - mitjançant l'administració combinada d'una primera dosi per via intraperitoneal d'OVA amb hidròxid d'alumini i toxina de *Bordetella pertussis*, amb dosis repetides d'OVA per via oral- va estimular el sistema immunitari intestinal i va generar una resposta considerable en anticossos IgE i isotips IgG relacionats amb la resposta Th2, juntament amb anticossos IgA (**article 3**). Aquest model representa una millora respecte a d'altres models publicats. Per una banda, es tracta d'un model eficaç i reproduïble gràcies a la sensibilització intraperitoneal, ja que en comparació amb els models que únicament s'indueixen oralment, a part de requerir l'administració diària a llarg termini (sis setmanes), aquests no aconsegueixen el 100% d'èxit de sensibilització. A més, la immunització

únicament requereix una única injecció intraperitoneal, en lloc de les tres emprades en altres models descrits. D'altra banda, l'administració oral de l'al·lèrgen fa patent l'al·lèrgia alimentària després d'una setmana d'administració i s'aconsegueix, d'aquesta manera, un model a les tres setmanes d'inici de l'estudi. Per tot això es va considerar un model vàlid d'al·lèrgia alimentària. Aquests aspectes permeten confirmar que es tracta d'un model experimental d'al·lèrgia alimentària, vàlid, eficaç i reproduïble.

A continuació, es va procedir a induir una resposta anafilàctica en aquest model d'al·lèrgia alimentària. Després de tres setmanes de sensibilització oral diària amb OVA i cinc dies de descans, es va realitzar una provocació oral amb el mateix al·lèrgen per tal d'induir una resposta anafilàctica i quantificar-la mitjançant les variables establertes prèviament i, a més, amb un marcador de permeabilitat intestinal. Es va observar que, les rates amb al·lèrgia alimentària alliberaven més RMCP-II que les que únicament havien rebut la dosi intraperitoneal (**article 3**). Això indica que, de nou, l'administració oral d'OVA es capaç d'estimular el teixit limfoide associat a l'intestí ja que la RMCP-II quantificada procedeix de mastòcits mucosals [258]. Pel que fa als canvis en la temperatura corporal, aquesta va decaure de forma similar en ambdós grups. Per altra banda, l'estudi de permeabilitat de la barrera intestinal va revelar un increment en els dos grups, si bé en els animals amb al·lèrgia alimentària l'augment va ser més agut. Els resultats coincideixen amb els descrits per Knippels *et al.* [259] i Traver *et al.* [260]. Els primers demostren que la immunització via intraperitoneal produeix un increment de la permeabilitat intestinal superior al que s'observa quan la sensibilització es fa únicament per via oral sense adjuvant. Els segons van observar que l'administració repetida d'OVA per via oral produeix acumulació de mastòcits a l'intestí. A més a més, s'ha descrit que l'alliberament de RMCP-II, juntament amb altres mediadors, podria incrementar l'absorció a través de la ruta paracel·lular [261]. Així doncs, el model que combina tant la immunització intraperitoneal com la administració oral continuada de l'al·lèrgen comporta un increment de la permeabilitat de la barrera intestinal. En relació als canvis en l'activitat motora després de la provocació, els resultats van revelar una clara davallada en el nombre de moviments en els animals al·lèrgics, tot i que no es van observar diferències significatives entre els animals que només van rebre una dosi intraperitoneal i els que van rebre, a més, l'OVA per via oral.

D'altra banda, dos dies després de la inducció de la resposta anafilàctica es van obtenir mostres tissulars dels animals per avaluar el fenotip limfocitari en GLM i PP, l'expressió gènica de diverses molècules en teixit intestinal i la secreció de citocines per part de limfòcits esplènics (**article 3**). L'estudi de les proporcions de limfòcits T, Th, Th activats, Tc, B i B IgA+ en GLM i PP no va evidenciar canvis provocats per la sensibilització, ni oral ni intraperitoneal i, per tant, no es va considerar un bon marcador d'al·lèrgia almenys en el dia d'estudi realitzat. També es van estudiar aquestes poblacions en limfòcits estimulats de GLM i només es van observar canvis significatius en les cèl·lules procedents d'animals immunitzats amb una dosi intraperitoneal. En el mateix sentit, les citocines esplèniques de tipus Th2, com la interleucina IL-4 i la IL-10, només van augmentar després de la inducció única intraperitoneal. Aquests darrers resultats, juntament amb la davallada dels nivells d'IgE específica, van suggerir que l'administració oral continuada durant 3 setmanes, podria induir un estat de tolerància o anergia, produïda per l'administració oral perllongada de l'al·lèrgen tal com s'ha observat en ratolins [262]. Malgrat aquests resultats, l'expressió gènica de RMCP-II en l'intestí dels animals amb al·lèrgia alimentària estava incrementada, coincidint amb les elevades concentracions d'aquesta proteasa quantificada en sèrum durant la resposta anafilàctica.

En resum, es van assolir el primer i el segon objectius, ja que és va es va desenvolupar un model d'al·lèrgia alimentària en rata, amb implicació del sistema immunitari intestinal i capaç de generar una resposta anafilàctica després de la provocació oral amb el mateix al·lèrgen.

Els objectius 3-6 de la tesi, globalment, consistien en avaluar l'efecte d'una dieta enriquida amb cacau sobre el model d'al·lèrgia alimentària. De forma prèvia, però, es va establir l'efecte del cacau en la resposta al·lèrgica induïda per una única dosi intraperitoneal de l'al·lèrgen (al·lèrgia no alimentària) (**article 1**). La dieta enriquida amb cacau va ser efectiva, ja que va inhibir la producció d'anticossos d'isotip IgG relacionats amb la resposta immunitària Th2 (IgG1 i IgG2a) [263] i no va produir canvis en la síntesi d'anticossos específics IgG2b, associats a la de tipus Th1 en rata [264]. De forma més important, la dieta enriquida amb cacau va ser capaç d'inhibir la resposta en anticossos de la classe IgE, tant específics com totals. Malgrat aquests resultats positius en la resposta immunitària humoral, quan es va avaluar la producció de citocines secretades per limfòcits de GLM estimulats amb OVA,

el cacau no va reduir la secreció d'IL-4, però sí que va inhibir la secreció d'IL-10 i TNF- α , com s'havia descrit prèviament per efecte del cacau [7,9] i també en altres estudis relacionats amb al·lèrgia i flavonoides [81,265,266]. El TNF- α , tot i ser una citocina de tipus Th1 clàssica, està implicada en processos inflamatoris al·lèrgics i és necessària per a la producció de citocines de tipus Th2 [267]. D'altra banda, la IL-10, tot i ser una citocina supressora de la resposta Th2 es va trobar també disminuïda.

En el model d'al·lèrgia alimentària posat a punt, es va procedir al desenvolupament dels objectius 3-6 de la tesi, és a dir, establir l'efecte del cacau sobre el model d'al·lèrgia alimentària i sobre la resposta anafilàctica, i determinar la contribució dels flavonoides del cacau en aquests efectes (**article 4**). Per l'acompliment d'aquesta fita, es va induir el model d'al·lèrgia alimentària prèviament establert (**article 3**) i es va reduir el temps d'administració oral de l'al·lergogen a una setmana. El mateix dia de la inducció del model, els animals van iniciar una dieta estàndard sense flavonoides, una dieta enriquida amb un 10% de cacau convencional (CC, que proporcionava un 0,4% de flavonoides), o bé una dieta amb cacau no fermentat (NFC) molt ric en flavonoides [268] que proporcionava la mateixa quantitat de flavonoides que CC però menys proporció d'altres components de cacau.

En relació a la producció d'anticossos, la immunització intraperitoneal va induir la síntesi d'anticossos específics però amb l'administració oral es va potenciar aquesta síntesi, com ja s'havia observat anteriorment (**article 3**). La dieta CC va atenuar l'increment en les concentracions d'IgG1, d'IgG2a i va inhibir totalment la formació d'IgE específica, de la mateixa forma que s'havia observat amb l'administració intraperitoneal de l'al·lergogen (**article 1**). Així mateix, la dieta CC va reduir la IgA intestinal com s'havia observat en anteriors estudis [9,219]. La dieta NFC, amb la mateixa quantitat de flavonoides, va tenir un efecte molt més discret, el que permet suggerir que l'efecte immunomodulador del cacau no és degut únicament al seu contingut en flavonoides. Aquests resultats concorden amb els efectes observats sobre les immunoglobulines plasmàtiques en rates Lewis no immunitzades [17]. En base a aquests resultats, l'efecte modulador del cacau podria atribuir-se a l'efecte de flavonoides concrets que podrien estar en el CC (per exemple procianidines) i no en el NFC (ric sobre tot en epicatequina) o bé a altres components bioactius del CC com la fibra o les metilxantines.

En aquest estudi d'intervenció nutricional, també es va portar a terme la inducció d'una resposta anafilàctica similar a la realitzada anteriorment (**article 3**) i es va quantificar l'activitat motora i d'altres variables establertes (**article 2**). Cap de les dues dietes enriquides amb cacau va tenir un efecte protector enfront la davallada del nombre de moviments i de temperatura corporal, ni van ser capaces d'evitar l'increment de la permeabilitat intestinal ni de l'hematòcrit. Cal destacar, però, que la dieta CC va ser capaç de protegir davant de la desgranulació mastocitària, com es reflecteix per una reducció de la concentració de RMCP-II durant la resposta anafilàctica.

A dia final d'estudi, es van quantificar les citocines sintetitzades per limfòcits de GLM i esplenòcits estimulats amb OVA. En GLM, la inducció de l'al·lèrgia alimentària va incrementar la secreció de citocines relacionades amb la resposta de tipus Th2 (IL-4, IL-5 i IL-13). Tant la dieta CC com la NFC van ser capaces d'inhibir l'increment d'IL-5 i IL-13 però no el de la IL-4, malgrat ser una citocina clau en al·lèrgia, aquest resultat ja s'havia observat en estudis previs [269]. També s'ha descrit que la IL-1, una citocina tipus Th1, està relacionada amb processos d'inflamació en malalties al·lèrgiques [53] i, tot i que la inducció de l'al·lèrgia no va provocar el seu increment, les dietes enriquides amb cacau van disminuir la concentració d'IL-1 α , fet que suggereix un efecte protector davant d'aquest procés. La dieta CC, a més a més, també va inhibir la secreció d'IL-1 β . Així que, conjuntament, les dietes riques en cacau tenen una funció protectora davant la síntesi de citocines del tipus Th1 i Th2 implicades en al·lèrgia en el compartiment estudiat. De la mateixa manera, la inducció de l'al·lèrgia alimentària va comportar l'increment d'IL-4 i IL-13 encara que, aquesta vegada, la dieta CC va ser capaç d'inhibir la secreció d'IL-4, però no la d'IL-13, mentre que la dieta NFC no va ser capaç d'evitar l'increment de cap de les dues citocines. Cal assenyalar que la dieta NFC va incrementar la secreció d'IFN- γ i IL-10. L'IFN- γ és clau en la inhibició de la diferenciació cel·lular cap a tipus Th2 i la IL-10 té una funció protectora en al·lèrgia i s'ha descrit que es troba reduïda en pacients amb malalties al·lèrgiques [53] de manera que, segons els resultats obtinguts, novament les dietes riques en cacau exerceixen una funció beneficiosa sobre la patologia en melsa.

Els resultats obtinguts en l'estudi dels canvis en l'expressió gènica van coincidir amb els observats a nivell sèric. Tant l'expressió de RMCP-II com de

FcεRI es van veure reduïdes en els animals que van rebre la dieta CC, de manera similar a la concentració sèrica de RMCP-II. Aquest mateix efecte també es va observar en l'expressió d'IgA, tant per la dieta CC com per la dieta NFC, coincidint novament amb el resultat obtingut en la síntesi d'anticossos a nivell intestinal. En canvi, l'expressió de molècules relacionades amb la integritat de la barrera intestinal, mucina-2 i ocludina, no va ser modificada ni per la inducció del model d'al·lèrgia alimentària ni per cap de les dues dietes. Tot i això, l'estudi histològic va revelar que les dietes enriquides amb cacau disminuïen el nombre de cèl·lules secretores de mucina, anomenades cèl·lules caliciformes, encara que a nivell d'expressió gènica intestinal no es va confirmar.

Per últim, com a resum general dels resultats obtinguts, cal destacar el potencial beneficiós del cacau sobre l'al·lèrgia alimentària, ja que és capaç d'inhibir, en el model d'al·lèrgia alimentària desenvolupat en rata, la resposta de tipus Th2, especialment mitjançant la disminució en la síntesi de la immunoglobulina clau en al·lèrgia, la IgE. A més, durant la inducció de la resposta anafilàctica, és capaç de reduir l'alliberament de proteasa II per part dels mastòcits activats. Aquesta funció immunomoduladora no és pot atribuir exclusivament als flavonoides, ja que la dieta enriquida amb cacau no fermentat ric en flavonoides presenta uns efectes menys potents. Això demostra que hi ha altres components presents al cacau responsables de la modulació de la resposta al·lèrgica i li confereixen un lloc important en el camp de la immunonutrició com a potencial nutraceutic.

Conclusions

Els resultats obtinguts en aquesta tesi permeten extreure les següents conclusions:

- En un model d'al·lèrgia en rata Brown Norway induït per una única immunització intraperitoneal amb ovoalbúmina, toxina de *Bordetella pertussis* i hidròxid d'alumini, una dieta enriquida amb un 10% de cacau -iniciada al mateix temps que la immunització- atenua la síntesi d'anticossos específics d'isotip IgE, IgG1 i IgG2a relacionats amb la resposta immunitària Th2 i modula la secreció de citocines inflamatòries alliberades per limfòcits de ganglis limfàtics mesentèrics.
- La provocació d'una resposta anafilàctica per via oral en un model d'al·lèrgia en rata Brown Norway, induït per una única immunització intraperitoneal, es pot quantificar per la reducció de l'activitat motora durant els primers minuts després de la provocació, la qual es correlaciona inversament amb l'alliberament de proteasa II mastocitària.
- La combinació d'una primera immunització intraperitoneal amb ovoalbúmina, toxina de *Bordetella pertussis* i hidròxid d'alumini seguida de l'administració oral diària d'ovoalbúmina -iniciada dues setmanes més tard i durant un mínim d'una setmana- constitueix un model d'al·lèrgia alimentària. Aquest model es caracteritza per una concentració sèrica elevada d'anticossos específics relacionats amb la resposta Th2, particularment, IgE, IgG1, IgG2a i també per un increment de la síntesi d'IgA. El model d'al·lèrgia alimentària ja és patent a les tres setmanes de l'inici de l'estudi.
- En un model d'al·lèrgia alimentària -induït per la combinació d'una immunització intraperitoneal i, catorze dies després, l'administració oral diària de l'al·lergogen durant un setmana- la ingesta d'una dieta enriquida amb cacau durant quatre setmanes, iniciada al mateix temps que la immunització, es capaç d'atenuar la síntesi d'anticossos específics d'isotip IgE, IgG1 i IgG2a (relacionats amb la resposta immunitària Th2), la producció d'IgA intestinal (total i específica) i

també la secreció de citocines de tipus Th2 -tant en ganglis limfàtics mesentèrics com de melsa-. La dieta enriquida amb cacau protegeix parcialment de la resposta anafilàctica induïda per una provocació oral, ja que redueix la síntesi i alliberament de la proteasa mastocitària.

- En el model d'al·lèrgia alimentària, la ingesta d'una dieta enriquida amb extracte de cacau no fermentat ric en flavonoides durant quatre setmanes, iniciada al mateix temps que la immunització, atenua la secreció de citocines de tipus Th2 i parcialment la síntesi d'anticossos específics relacionats amb aquesta resposta. Aquest efecte és menys potent que l'observat amb la dieta rica en cacau convencional. Per tant, els flavonoides del cacau no són els únics responsables del poder modulador del cacau sobre la resposta Th2.

Bibliografia

- [1] World Allergy Organization.
http://www.worldallergy.org/professional/allergic_diseases_center/nomenclature/english.php. USA 2015 [consultada Abril 2015].
- [2] Pawankar R, Holgate ST, Canonica GW, Lockey RF, Blaiss MS, World Allergy Organization. White Book on Allergy. 2013.
- [3] Perry TT, Pesek RD. Clinical manifestations of food allergy. *Pediatr Ann* 2013;42:96–101. doi:10.3928/00904481-20130522-09.
- [4] Ramiro-Puig E, Castell M. Cocoa: antioxidant and immunomodulator. *Br J Nutr* 2009;101:931–40. doi:10.1017/S0007114508169896.
- [5] Corti R, Flammer AJ, Hollenberg NK, Lüscher TF. Cocoa and cardiovascular health. *Circulation* 2009;119:1433–41. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.827022.
- [6] Ramiro-Puig E, Franch À, Castellote C, Pérez-Cano FJ, Permanyer J, Izquierdo-Pulido M, et al. Flavonoids from *Theobroma cacao* down-regulate inflammatory mediators. *J Agric Food Chem* 2005;53:8506–11.
- [7] Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Ramírez-Santana C, Castellote C, Izquierdo-Pulido M, Permanyer J, et al. Spleen lymphocyte function modulated by a cocoa-enriched diet. *Clin Exp Immunol* 2007;149:535–42. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03430.x.
- [8] Ramiro-Puig E, Urpí-Sardà M, Pérez-Cano FJ, Franch À, Castellote C, Andrés-Lacueva C, et al. Cocoa-enriched diet enhances antioxidant enzyme activity and modulates lymphocyte composition in thymus from young rats. *J Agric Food Chem* 2007;55:6431–8. doi:10.1021/jf070487w.
- [9] Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Ramos-Romero S, Pérez-Berezo T, Castellote C, Permanyer J, et al. Intestinal immune system of young rats influenced by cocoa-enriched diet. *J Nutr Biochem* 2008;19:555–65.
- [10] Ramos-Romero S, Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Franch A, Castell M. Anti-inflammatory effects of cocoa in rat carrageenin-induced paw oedema. *Proc Nutr Soc* 2008;67:8511. doi:10.1017/S0029665108006745.

- [11] Pérez-Berezo T, Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Permanyer J, Franch À, et al. Influence of a cocoa-enriched diet on specific immune response in ovalbumin-sensitized rats. *Mol Nutr Food Res* 2009;53:389–97. doi:10.1002/mnfr.200700396.
- [12] Pérez-Berezo T, Franch A, Ramos-Romero S, Castellote C, Pérez-Cano FJ, Castell M. Cocoa-enriched diets modulate intestinal and systemic humoral immune response in young adult rats. *Mol Nutr Food Res* 2011;55:S56–66.
- [13] Pérez-Berezo T, Ramírez-Santana C, Franch A, Ramos-Romero S, Castellote C, Pérez-Cano FJ, et al. Effects of a cocoa diet on an intestinal inflammation model in rats. *Exp Biol Med* 2012;237:1181–8.
- [14] Ramos-Romero S, Pérez-Cano FJ, Ramiro-Puig E, Franch A, Castell M. Cocoa intake attenuates oxidative stress associated with rat adjuvant arthritis. *Pharmacol Res* 2012;66:207–12. doi:10.1016/j.phrs.2012.05.009.
- [15] Ramos-Romero S, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Castell M, Franch À. Effect of cocoa-enriched diets on lymphocytes involved in adjuvant arthritis in rats. *Br J Nutr* 2012;107:378–87. doi:10.1017/S0007114511003035.
- [16] Ramos-Romero S, Pérez-Cano FJ, Pérez-Berezo T, Castellote C, Franch A, Castell M. Effect of a cocoa flavonoid-enriched diet on experimental autoimmune arthritis. *Br J Nutr* 2012;107:523–32. doi:10.1017/S000711451100328X.
- [17] Massot-Cladera M, Franch À, Castellote C, Castell M, Pérez-Cano FJ. Cocoa flavonoid-enriched diet modulates systemic and intestinal immunoglobulin synthesis in adult Lewis rats. *Nutrients* 2013;5:3272–86. doi:10.3390/nu5083272.
- [18] Turk JL. Von Pirquet, allergy and infectious diseases: a review. *J R Soc Med* 1987;80:31–3.
- [19] Schneider Chafen JJ, Newberry SJ, Riedl MA, Bravata DM, Maglione M, Suttorp MJ, et al. Diagnosis and managing common food allergies. *J Am Med Assoc* 2014;303:1848–56.
- [20] Arshad SH, Karmaus W, Raza A, Kurukulaaratchy RJ, Matthews SM, Holloway JW, et al. The effect of parental allergy on childhood allergic

- diseases depends on the sex of the child. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:427–34.e6. doi:10.1016/j.jaci.2012.03.042.
- [21] Żukiewicz-sobczak W, Krasowska E, Zwoliński J, Sobczak P, Chmielewska-badora J, Wróblewska P, et al. Allergic diseases – current state of knowledge. *Postępy Dermatologii i Alergol Dermatologia Allergol* 2012;29:451–6. doi:10.5114/pdia.2012.32393.
- [22] Johansson SGO, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:832–6. doi:10.1016/j.jaci.2003.12.591.
- [23] Rindsjö E, Scheynius A. Mechanisms of IgE-mediated allergy. *Exp Cell Res* 2010;316:1384–9. doi:10.1016/j.yexcr.2010.02.038.
- [24] Larché M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006;6:761–71. doi:10.1038/nri1934.
- [25] Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature* 2008;454:445–54. doi:10.1038/nature07204.
- [26] Davis CM. Food allergies: clinical manifestations, diagnosis, and management. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2009;39:236–54. doi:10.1016/j.cppeds.2009.09.003.
- [27] Ishizaka K, Ishizaka T. Identification of gamma-E-antibodies as a carrier of reaginic activity. *J Immunol* 1967;99:1187–98.
- [28] Johansson SGO, Bennich H, Wide L. A new class of immunoglobulin in human serum. *Immunology* 1968;14:265–72.
- [29] Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:1–16. doi:10.1016/j.jaci.2009.11.017.IgE.
- [30] MacGlashan D. IgE receptor and signal transduction in mast cells and basophils. *Curr Opin Immunol* 2008;20:717–23. doi:10.1016/j.coi.2008.08.004.

- [31] Blank U, Rivera J. The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. *Trends Immunol* 2004;25:266–73. doi:10.1016/j.it.2004.03.005.
- [32] Kraft S, Kinet J-PP. New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol* 2007;7:365–78. doi:10.1038/nri2072.
- [33] Beaven MA. Our perception of the mast cell from Paul Ehrlich to now. *Eur J Immunol* 2009;39:11–25. doi:10.1002/eji.200838899.
- [34] Silver R, Curley JP. Mast cells on the mind: new insights and opportunities. *Trends Neurosci* 2013;36:513–21. doi:10.1016/j.tins.2013.06.001.
- [35] Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F, Wu H. Oral tolerance. *Immunol Rev* 2011;241:241–59. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01017.x.
- [36] Pabst O, Mowat AM. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol* 2012;5:232–9.
- [37] Nauta AJ, Engels F, Knippels LM, Garssen J, Nijkamp FP, Redegeld FA. Mechanisms of allergy and asthma. *Eur J Pharmacol* 2008;585:354–60. doi:10.1016/j.ejphar.2008.02.094.
- [38] Tsuji NM, Kosaka A. Oral tolerance: intestinal homeostasis and antigen-specific regulatory T cells. *Trends Immunol* 2008;29:532–40. doi:10.1016/j.it.2008.09.002.
- [39] Rabinovich GA. A sweet path toward tolerance in the gut. *Nat Med* 2010;16:1076–7. doi:10.1038/nm1010-1076.
- [40] Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, et al. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006;212:8–27. doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00427.x.
- [41] Siewert C, Lauer U, Cording S, Bopp T, Schmitt E, Hamann A, et al. Experience-driven development: effector/memory-like αE+Foxp3⁺ regulatory T cells originate from both naive T cells and naturally occurring naive-like regulatory T cells. *J Immunol* 2008;180:146–55. doi:10.4049/jimmunol.180.1.146.

- [42] Koenecke C, Czeloth N, Bubke A, Schmitz S, Kissenpfennig A, Malissen B, et al. Alloantigen-specific de novo-induced Foxp3⁺ Treg revert in vivo and do not protect from experimental GVHD. *Eur J Immunol* 2009;39:3091–6. doi:10.1002/eji.200939432.
- [43] Berin MC, Shreffler WG. T(H)2 adjuvants: implications for food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1311–20; quiz 1321–2. doi:10.1016/j.jaci.2008.04.023.
- [44] Oyoshi MK, Oettgen HC, Chatila TA, Geha RS, Bryce PJ. Food allergy: insights into etiology, prevention, and treatment provided by murine models. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:309–17.
- [45] Jutel M, Akdis M, Akdis CA. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1786–800. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03374.x.
- [46] O’Mahony L, Akdis M, Akdis CA. Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:1153–62. doi:10.1016/j.jaci.2011.06.051.
- [47] Wang X, Lupardus P, Laporte SL, Garcia KC. Structural biology of shared cytokine receptors. *Annu Rev Immunol* 2009;27:29–60. doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090616.
- [48] O’Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4⁺ T cells. *Science* 2010;327:1098–102. doi:10.1126/science.1178334.
- [49] Singh VK, Mehrotra S, Agarwal SS. The paradigm of Th1 and Th2 cytokines. *Immunol Res* 1999:147–61.
- [50] Packard KA, Khan MM. Effects of histamine on Th1/Th2 cytokine balance. *Int Immunopharmacol* 2003;3:909–20. doi:10.1016/S1567-5769(02)00235-7.
- [51] Ngoc LP, Gold DR, Tzianabos AO, Weiss ST, Celedón JC. Cytokines, allergy, and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005:161–6.
- [52] Ruitter B, Shreffler WG. Innate immunostimulatory properties of allergens and their relevance to food allergy. *Semin Immunopathol* 2012;34:617–32. doi:10.1007/s00281-012-0334-8.

- [53] Akdis M, Burgler S, Crameri R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:701–21.e1–70. doi:10.1016/j.jaci.2010.11.050.
- [54] Pejler G, Rönnerberg E, Waern I, Wernersson S. Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood* 2011;115:4981–90. doi:10.1182/blood-2010-01-257287.
- [55] Pejler G, Åbrink M, Ringvall M, Wernersson S. Mast cell proteases. *Adv Immunol* 2007;95:167–255. doi:10.1016/S0065-2776(07)95006-3.
- [56] Murray JJ, Tonnel AB, Brash AR, Robert LJ 2nd, Gosset P, Workman R, et al. Release of prostaglandin D2 into human airways during acute antigen challenge. *N Engl J Med* 1986;315:800–4.
- [57] Matsuoka T. Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma. *Science* 2000;287:2013–7. doi:10.1126/science.287.5460.2013.
- [58] Kunikata T, Yamane H, Segi E, Matsuoka T, Sugimoto Y, Tanaka S, et al. Suppression of allergic inflammation by the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nat Immunol* 2005;6:524–31. doi:10.1038/ni1188.
- [59] Sheibanie AF, Yen JH, Khayrullina T, Emig F, Zhang M, Tuma R, et al. The proinflammatory effect of prostaglandin E2 in experimental inflammatory bowel disease is mediated through the IL-23→IL-17 axis. *J Immunol* 2007;178:8138–47.
- [60] Vane J, Corin R. Prostacyclin: a vascular mediator. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003;26:571–8. doi:10.1016/S1078-5884(03)00385-X.
- [61] Lewis RA, Austen KF, Soberman RJ. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N Engl J Med* 1990;323:645–55.
- [62] Ogawa Y, Calhoun WJ. The role of leukotrienes in airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:789–98; quiz 799–800. doi:10.1016/j.jaci.2006.08.009.
- [63] Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-

- nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med* 2000;192:1197–204. doi:10.1084/jem.192.8.1197.
- [64] Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, et al. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med* 2002;196:1025–37. doi:10.1084/jem.20020760.
- [65] Janssen LJ. Isoprostanes and lung vascular pathology. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;39:383–9. doi:10.1165/rcmb.2008-0109TR.
- [66] Dworski R, Murray JJ, Roberts LJ, Oates JA, Morrow JD, Fisher L, et al. Allergen-induced synthesis of F2-isoprostanes in atopic asthmatics: evidence for oxidant stress. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1947–51.
- [67] Chapman JA, Bernstein IL, Lee RE, Oppenheimer J, Nicklas RA, Portnoy JM, et al. Food allergy: a practice parameter. *Ann Allergy, Asthma Immunol* 2006;96:S1–68. doi:10.1016/S1081-1206(10)60926-X.
- [68] Sicherer SH. Food protein-induced enterocolitis syndrome: case presentations and management lessons. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:149–56. doi:10.1016/j.jaci.2004.09.033.
- [69] Bahna SL. Adverse food reactions by skin contact. *Allergy* 2004;59:66–70.
- [70] Ellman LK, Chatchatee P, Sicherer SH, Sampson HA. Food hypersensitivity in two groups of children and young adults with atopic dermatitis evaluated a decade apart. *Pediatr Allergy Immunol* 2002;13:295–8. doi:pai1s061 [pii].
- [71] Ramirez DA, Bahna SL. Food hypersensitivity by inhalation. *Clin Mol Allergy* 2009;7:4. doi:10.1186/1476-7961-7-4.
- [72] Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2009;2:270–8. doi:10.4161/oxim.2.5.9498.
- [73] Scapagnini G, Davinelli S, Di Renzo L, De Lorenzo A, Olarte HH, Micali G, et al. Cocoa bioactive compounds: significance and potential for

the maintenance of skin health. *Nutrients* 2014;6:3202–13.
doi:10.3390/nu6083202.

- [74] Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79:727–47.
- [75] Molinari R. Sull'azione antiallergica ed antiistaminica comparativa di alcune vitamine sulla cute umana; sull'azione antiallergica ed antiistaminica comparativa sulla cute umana di un prodotto ad azione vitaminica P (idro P2) e della vitamina C (acido ascorbico). *Dermosifilografo (Torino)* 1949;24:543–60.
- [76] Clark WG, MacKay EM. Effect of flavonoid (vitamin P-like) substances on histamine toxicity, anaphylactic shock, histamine-enhanced capillary permeability to dye, and bleeding time; with data on the toxicity of flavonoids. *J Allergy* 1950;21:133–47.
- [77] Rosa L, Cenciotti L. Allergia e sostanze ad azione vitaminica P. *Arch Sci Med (Torino)* 1950;89:467–514.
- [78] Pautrizel R, Pautrizel-Bezian A, Teyeau F. Substances vitaminiques P et anaphylaxie. *J Physiol (Paris)* 1950;42:702–5.
- [79] Yano S, Umeda D, Maeda N, Fujimura Y, Yamada K, Tachibana H. Dietary apigenin suppresses IgE and inflammatory cytokines production in C57BL/6N mice. *J Agric Food Chem* 2006;54:5203–7. doi:10.1021/jf0607361.
- [80] Yano S, Umeda D, Yamashita T, Ninomiya Y, Sumida M, Fujimura Y, et al. Dietary flavones suppresses IgE and Th2 cytokines in OVA-immunized BALB/c mice. *Eur J Nutr* 2007;46:257–63. doi:10.1007/s00394-007-0658-7.
- [81] Cruz EA, Da-Silva SAG, Muzitano MF, Silva PMR, Costa SS, Rossi-Bergmann B. Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock. *Int Immunopharmacol* 2008;8:1616–21. doi:10.1016/j.intimp.2008.07.006.
- [82] Sakai T, Furoku S, Nakamoto M, Shuto E, Hosaka T, Nishioka Y, et al. The soy isoflavone equol enhances antigen-specific IgE production in ovalbumin-immunized BALB/c mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2010;56:72–6.

- [83] Castell M, Pérez-Cano FJ, Abril-Gil M, Franch À. Flavonoids on allergy. *Curr Pharamceutical Des* 2014;20:973–87.
- [84] Lee N-K, Choi S-H, Park S-H, Park E-K, Kim D-H. Antiallergic activity of hesperidin is activated by intestinal microflora. *Pharmacology* 2004;71:174–80. doi:10.1159/000078083.
- [85] Park S-H, Park E-K, Kim D-H. Passive cutaneous anaphylaxis-inhibitory activity of flavanones from *Citrus unshiu* and *Poncirus trifoliata*. *Planta Med* 2005;71:24–7. doi:10.1055/s-2005-837746.
- [86] Itoh T, Hori Y, Atsumi T, Toriizuka K, Nakamura M, Maeyama T, et al. Hot water extract of adzuki (*Vigna angularis*) suppresses antigen-stimulated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells and passive cutaneous anaphylaxis reaction in mice. *Phytother Res* 2012;26:1003–11. doi:10.1002/ptr.3660.
- [87] Choi YH, Yan GH. Pycnogenol inhibits immunoglobulin E-mediated allergic response in mast cells. *Phytother Res* 2009;23:1691–5. doi:10.1002/ptr.2812.
- [88] Matsumoto T, Horiuchi M, Kamata K, Seyama Y. Improvement of the antiinflammatory and antiallergic activity of *Bidens pilosa* L. var. *radiata* SCHERFF treated with enzyme (Cellulosine). *J Heal Sci* 2008;54:294–301. doi:10.1248/jhs.54.294.
- [89] Lee J-H, Kim J-W, Ko N-Y, Mun S-H, Kim D-K, Kim J-D, et al. *Camellia japonica* suppresses immunoglobulin E-mediated allergic response by the inhibition of Syk kinase activation in mast cells. *Clin Exp Allergy* 2008;38:794–804. doi:10.1111/j.1365-2222.2008.02936.x.
- [90] Kim JW, Lee JH, Hwang BY, Mun SH, Ko NY, Kim DK, et al. Morin inhibits Fyn kinase in mast cells and IgE-mediated type I hypersensitivity response in vivo. *Biochem Pharmacol* 2009;77:1506–12. doi:10.1016/j.bcp.2009.01.019.
- [91] Won Jung H, Jung J-K, Weon Cho C, Kang J-S, Park Y-K. Antiallergic effect of KOB03, a polyherbal medicine, on mast cell-mediated allergic responses in ovalbumin-induced allergic rhinitis mouse and human mast cells. *J Ethnopharmacol* 2012;142:684–93. doi:10.1016/j.jep.2012.05.039.

- [92] Venkatesh P, Mukherjee PK, Kumar NS, Bandyopadhyay A, Fukui H, Mizuguchi H, et al. Anti-allergic activity of standardized extract of *Albizia lebeck* with reference to catechin as a phytomarker. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2010;32:272–6. doi:10.3109/08923970903305481.
- [93] Das M, Ram a, Ghosh B. Luteolin alleviates bronchoconstriction and airway hyperreactivity in ovalbumin sensitized mice. *Inflamm Res* 2003;52:101–6.
- [94] Du Q, Gu X, Cai J, Huang M, Su M. Chrysin attenuates allergic airway inflammation by modulating the transcription factors T-bet and GATA-3 in mice. *Mol Med Rep* 2012;6:100–4. doi:10.3892/mmr.2012.893.
- [95] Park H, Lee C-M, Jung ID, Lee JS, Jeong Y, Chang JH, et al. Quercetin regulates Th1/Th2 balance in a murine model of asthma. *Int Immunopharmacol* 2009;9:261–7. doi:10.1016/j.intimp.2008.10.021.
- [96] Chandrakant NC, Joshi AA. Anti-asthmatic and anti-anaphylactic activity of *Helicanthus elastica* Desr. *Pharmacologyonline* 2010;2:14–31.
- [97] Joskova M, Franova S, Sadlonova V. Acute bronchodilator effect of quercetin in experimental allergic asthma. *Bratislava Med J* 2011;112:9–12.
- [98] Medeiros KCP, Figueiredo CAV, Figueredo TB, Freire KRL, Santos FAR, Alcantara-Neves NM, et al. Anti-allergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice. *J Ethnopharmacol* 2008;119:41–6. doi:10.1016/j.jep.2008.05.036.
- [99] Medeiros KCP, Faustino L, Borduchi E, Nascimento RJB, Silva TMS, Gomes E, et al. Preventive and curative glycoside kaempferol treatments attenuate the Th2-driven allergic airway disease. *Int Immunopharmacol* 2009;9:1540–8. doi:10.1016/j.intimp.2009.09.005.
- [100] Wu M-Y, Hung S-K, Fu S-L. Immunosuppressive effects of fisetin in ovalbumin-induced asthma through inhibition of NF- κ B activity. *J Agric Food Chem* 2011;59:10496–504. doi:10.1021/jf202756f.
- [101] Kim J-J, Jiang J, Shim D-W, Kwon S-C, Kim T-J, Ye S-K, et al. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of *Agrimonia pilosa* Ledeb

- extract on murine cell lines and OVA-induced airway inflammation. *J Ethnopharmacol* 2012;140:213–21. doi:10.1016/j.jep.2011.12.035.
- [102] Franova S, Joskova M, Sutovska M, Novakova E, Adamicova K, Pechanova O, et al. The efficiency of polyphenolic compounds on allergen induced hyperreactivity of the airways. *Biomed Prev Nutr* 2011;1:232–5. doi:10.1016/j.bionut.2010.09.002.
- [103] Kim S-H, Kim B-K, Lee Y-C. Antiasthmatic effects of hesperidin, a potential Th2 cytokine antagonist, in a mouse model of allergic asthma. *Mediators Inflamm* 2011;2011:485402. doi:10.1155/2011/485402.
- [104] Wei D, Ci X, Chu X, Wei M, Hua S, Deng X. Hesperidin suppresses ovalbumin-induced airway inflammation in a mouse allergic asthma model. *Inflammation* 2012;35:114–21. doi:10.1007/s10753-011-9295-7.
- [105] Shi Y, Dai J, Liu H, Li R-R, Sun P-L, Du Q, et al. Naringenin inhibits allergen-induced airway inflammation and airway responsiveness and inhibits NF-kappaB activity in a murine model of asthma. *Can J Physiol Pharmacol* 2009;87:729–35. doi:10.1139/y09-065.
- [106] Funaguchi N, Ohno Y, La BLB, Asai T, Yuhgetsu H, Sawada M, et al. Narirutin inhibits airway inflammation in an allergic mouse model. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34:766–70. doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04636.x.
- [107] Hosseini S, Pishnamazi S, Sadrzadeh SMH, Farid F, Farid R, Watson RR. Pycnogenol® in the management of asthma. *J Med Food* 2001;4:201–9. doi:10.1089/10966200152744472.
- [108] Lau BHS, Riesen SK, Truong KP, Lau EW, Rohdewald P, Barreta RA. Pycnogenol® as an adjunct in the management of childhood asthma. *J Asthma* 2004;41:825–32. doi:10.1081/JAS-200038433.
- [109] Belcaro G, Luzzi R, Cesinaro Di Rocco P, Cesarone MR, Dugall M, Feragalli B, et al. Pycnogenol® improvements in asthma management. *Panminerva Med* 2011;53:57–64.
- [110] Watson RR, Zibadi S, Rafatpanah H, Jabbari F, Ghasemi R, Ghafari J, et al. Oral administration of the purple passion fruit peel extract reduces

wheeze and cough and improves shortness of breath in adults with asthma. *Nutr Res* 2008;28:166–71. doi:10.1016/j.nutres.2008.01.003.

- [111] Hu G, Walls RS, Bass D, Bullock R, Grayson D, Jones M, et al. The Chinese herbal formulation biminne in management of perennial allergic rhinitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, 12-week clinical trial. *Ann Allergy, Asthma Immunol* 2002;88:478–87. doi:10.1016/S1081-1206(10)62386-1.
- [112] Takano H, Osakabe N, Sanbongi C, Yanagisawa R, Inoue K, Yasuda A, et al. Extract of *Perilla frutescens* enriched for rosmarinic acid, a polyphenolic phytochemical, inhibits seasonal allergic rhinoconjunctivitis in humans. *Exp Biol Med* 2004;229:247–54.
- [113] Kishi K, Saito M, Saito T, Kumemura M, Okamatsu H, Okita M, et al. Clinical efficacy of apple polyphenol for treating cedar pollinosis. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005;69:829–32. doi:10.1271/bbb.69.829.
- [114] Enomoto T, Nagasako-Akazome Y, Kanda T, Ikeda M, Dake Y. Clinical effects of apple polyphenols on persistent allergic rhinitis: a randomized double-blind placebo-controlled parallel arm study. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2006;16:283–9.
- [115] Wilson D, Evans M, Guthrie N, Sharma P, Baisley J, Schonlau F, et al. A randomized, double-blind, placebo controlled exploratory study to evaluate the potential of Pycnogenol® for improving allergic rhinitis symptoms. *Phyther Res* 2010;24:1115–9.
- [116] Segawa S, Takata Y, Wakita Y, Kaneko T, Kaneda H, Watari J, et al. Clinical effects of a hop water extract on Japanese cedar pollinosis during the pollen season: a double-blind, placebo-controlled trial. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007;71:1955–62. doi:10.1271/bbb.70157.
- [117] Kawai M, Hirano T, Arimitsu J, Higa S, Kuwahara Y, Hagihara K, et al. Effect of enzymatically modified isoquercitrin, a flavonoid, on symptoms of Japanese cedar pollinosis: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;149:359–68. doi:10.1159/000205582.
- [118] Hirano T, Kawai M, Arimitsu J, Ogawa M, Kuwahara Y, Hagihara K, et al. Preventative effect of a flavonoid, enzymatically modified isoquercitrin on ocular symptoms of Japanese cedar pollinosis. *Allergol Int* 2009;58:373–82. doi:10.2332/allergolint.08-OA-0070.

- [119] Yoshimura M, Enomoto T, Dake Y, Okuno Y, Ikeda H, Cheng L, et al. An evaluation of the clinical efficacy of tomato extract for perennial allergic rhinitis. *Allergol Int* 2007;56:225–30. doi:10.2332/allergolint.O-06-443.
- [120] La Vecchia C, Decarli A, Pagano R. Vegetable consumption and risk of chronic disease. *Epidemiology* 1998;9:208–10.
- [121] Butland BK, Strachan DP, Anderson H. Fresh fruit intake and asthma symptoms in young British adults: confounding or effect modification by smoking? *Eur Respir J* 1999;13:744–50. doi:10.1034/j.1399-3003.1999.13d08.x.
- [122] Nurmatov U, Nwaru BI, Devereux G, Sheikh A. Confounding and effect modification in studies of diet and childhood asthma and allergies. *Allergy* 2012;67:1041–59. doi:10.1111/j.1398-9995.2012.02858.x.
- [123] Cook DG, Carey IM, Whincup PH, Papacosta O, Chirico S, Bruckdorfer KR, et al. Effect of fresh fruit consumption on lung function and wheeze in children. *Thorax* 1997;52:628–33.
- [124] Forastiere F, Pistelli R, Sestini P, Fortes C, Renzoni E, Rusconi F, et al. Consumption of fresh fruit rich in vitamin C and wheezing symptoms in children. *Thorax* 2000;55:283–8. doi:10.1136/thorax.55.4.283.
- [125] Farchi S, Forastiere F, Agabiti N, Corbo G, Pistelli R, Fortes C, et al. Dietary factors associated with wheezing and allergic rhinitis in children. *Eur Respir J* 2003;22:772–80. doi:10.1183/09031936.03.00006703.
- [126] Antova T, Pattenden S, Nikiforov B, Leonardi GS, Boeva B, Fletcher T, et al. Nutrition and respiratory health in children in six Central and Eastern European countries. *Thorax* 2003;58:231–6. doi:10.1136/thorax.58.3.231.
- [127] Tabak C, Wijga AH, de Meer G, Janssen NAH, Brunekreef B, Smit HA. Diet and asthma in Dutch school children (ISAAC-2). *Thorax* 2006;61:1048–53. doi:10.1136/thx.2005.043034.
- [128] Chatzi L, Apostolaki G, Bibakis I, Skypala I, Bibaki-Liakou V, Tzanakis N, et al. Protective effect of fruits, vegetables and the Mediterranean diet on asthma and allergies among children in Crete. *Thorax* 2007;62:677–83. doi:10.1136/thx.2006.069419.

- [129] Chatzi L, Torrent M, Romieu I, Garcia-Esteban R, Ferrer C, Vioque J, et al. Diet, wheeze, and atopy in school children in Menorca, Spain. *Pediatr Allergy Immunol* 2007;18:480–5. doi:10.1111/j.1399-3038.2007.00596.x.
- [130] Fitzsimon N, Fallon U, O’Mahony D, Loftus BG, Bury G, Murphy AW, et al. Mothers’ dietary patterns during pregnancy and risk of asthma symptoms in children at 3 years. *Ir Med J* 2007;100:S27–32.
- [131] Miyake Y, Sasaki S, Tanaka K, Hirota Y. Consumption of vegetables, fruit, and antioxidants during pregnancy and wheeze and eczema in infants. *Allergy* 2010;65:758–65. doi:10.1111/j.1398-9995.2009.02267.x.
- [132] Lewis SA, Antoniak M, Venn AJ, Davies L, Goodwin A, Salfield N, et al. Secondhand smoke, dietary fruit intake, road traffic exposures, and the prevalence of asthma: a cross-sectional study in young children. *Am J Epidemiol* 2005;161:406–11. doi:10.1093/aje/kwi059.
- [133] Shaheen SO, Sterne JAC, Thompson RL, Songhurst CE, Margetts BM, Burney PGJ. Dietary antioxidants and asthma in adults: population-based case-control study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1823–8.
- [134] Garcia V, Arts ICW, Sterne JAC, Thompson RL, Shaheen SO. Dietary intake of flavonoids and asthma in adults. *Eur Respir J* 2005;26:449–52. doi:10.1183/09031936.05.00142104.
- [135] Butland BK, Fehily AM, Elwood PC. Diet, lung function, and lung function decline in a cohort of 2512 middle aged men. *Thorax* 2000;55:102–8. doi:10.1136/thorax.55.2.102.
- [136] Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* 2002;76:560–8.
- [137] Dillinger TL, Barriga P, Escárcega S, Jimenez M, Salazar Lowe D, Grivetti LE. Food of the gods: cure for humanity? A cultural history of the medicinal and ritual use of chocolate. *J Nutr* 2000;130:2057S – 72S.
- [138] Anderson EN. Chocolate in mesoamerica: a cultural history of cacao. *Am Anthropol* 2008;110:71–8. doi:10.1353/lag.2008.0000.

- [139] Ackar D, Valek Lendić K, Valek M, Šubarić D, Miličević B, Babić J, et al. Cocoa polyphenols: can we consider cocoa and chocolate as potential functional food? *J Chem* 2013;2013:1–7. doi:10.1155/2013/289392.
- [140] Rössner S. Chocolate--divine food, fattening junk or nutritious supplementation? *Eur J Clin Nutr* 1997;51:341–5. doi:10.1038/sj.ejcn.1600409.
- [141] Meursing EH. deZaan™ cocoa and chocolate manual. 40th ed. Switzerland: ADM cocoa; 2009.
- [142] Vinson JA, Proch J, Zubik L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: cocoa, dark chocolate, and milk chocolate. *J Agric Food Chem* 1999;47:4821–4. doi:10.1021/jf990312p.
- [143] Jalil A, Ismail A. Polyphenols in cocoa and cocoa products: is there a link between antioxidant properties and health? *Molecules* 2008;13:2190–219. doi:10.3390/molecules13092190.
- [144] Andújar I, Recio MC, Giner RM, Ríos JL. Cocoa polyphenols and their potential benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev* 2012;2012. doi:10.1155/2012/906252.
- [145] Wollgast J, Anklam E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? *Food Res Int* 2000;33:449–59.
- [146] Pura Naik J. Improved high-performance liquid chromatography method to determine theobromine and caffeine in cocoa and cocoa products. *J Agric Food Chem* 2001;49:3579–83. doi:10.1021/jf000728z.
- [147] Smit HJ, Blackburn RJ. Reinforcing effects of caffeine and theobromine as found in chocolate. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;181:101–6. doi:10.1007/s00213-005-2209-3.
- [148] Pietta P-G. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000;63:1035–42. doi:10.1021/np9904509.
- [149] Galleano M, Oteiza PI, Fraga CG. Cocoa, chocolate and cardiovascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009;54:483–90. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.

- [150] Schramm DD, Karim M, Schrader HR, Holt RR, Kirkpatrick NJ, Polagruto JA, et al. Food effects on the absorption and pharmacokinetics of cocoa flavanols. *Life Sci* 2003;73:857–69. doi:10.1016/S0024-3205(03)00373-4.
- [151] Serafini M, Bugianesi R, Maiani G, Valtuena S, De Santis S, Crozier A. Plasma antioxidants from chocolate. *Nature* 2003;424:1013. doi:10.1038/4241013a.
- [152] Neilson AP, Sapper TN, Janle EM, Rudolph R, Matusheski N V., Ferruzzi MG. Chocolate matrix factors modulate the pharmacokinetic behavior of cocoa flavan-3-ol phase II metabolites following oral consumption by Sprague-Dawley Rats. *J Agric Food Chem* 2010;58:6685–91. doi:10.1021/jf1005353.
- [153] Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 2005;81:230S – 242S. doi:81/1/230S [pii].
- [154] Spencer JP, Chaudry F, Pannala AS, Srai SK, Debnam E, Rice-Evans C. Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:236–41. doi:10.1006/bbrc.2000.2749.
- [155] Rios LY, Bennett RN, Lazarus SA, Rémésy C, Scalbert A, Williamson G. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am J Clin Nutr* 2002;76:1106–10.
- [156] Lapidot T, Walker MD, Kanner J. Antioxidant and prooxidant effects of phenolics on pancreatic beta-cells in vitro. *J Agric Food Chem* 2002;50:7220–5. doi:10.1021/jf020615a.
- [157] Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM. Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicol Vitro* 2004;18:555–61. doi:10.1016/j.tiv.2003.12.012.
- [158] Sanbongi C, Suzuki N, Sakane T. Polyphenols in chocolate, which have antioxidant activity, modulate immune functions in humans *in vitro*. *Cell Immunol* 1997;177:129–36. doi:10.1006/cimm.1997.1109.
- [159] Costa S, Utan A, Cervellati R, Speroni E, Guerra MC. Catechins: natural free-radical scavengers against ochratoxin A-induced cell damage in a

- pig kidney cell line (LLC-PK1). *Food Chem Toxicol* 2007;45:1910–7. doi:10.1016/j.fct.2007.04.008.
- [160] Rodríguez-Ramiro I, Ramos S, Bravo L, Goya L, Martín MÁ. Procyanidin B2 and a cocoa polyphenolic extract inhibit acrylamide-induced apoptosis in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress and activation of JNK pathway. *J Nutr Biochem* 2011;22:1186–94. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.10.005.
- [161] Corcuera LA, Amézqueta S, Arbillaga L, Vettorazzi A, Touriño S, Torres JL, et al. A polyphenol-enriched cocoa extract reduces free radicals produced by mycotoxins. *Food Chem Toxicol* 2012;50:989–95. doi:10.1016/j.fct.2011.11.052.
- [162] Martín MÁ, Serrano ABG, Ramos S, Pulido MI, Bravo L, Goya L. Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. *J Nutr Biochem* 2010;21:196–205. doi:10.1016/j.jnutbio.2008.10.009.
- [163] Ramiro-Puig E, Casadesús G, Lee H, Zhu X, McShea A, Perry G, et al. Neuroprotective effect of cocoa flavonoids on *in vitro* oxidative stress. *Eur J Nutr* 2009;48:54–61. doi:10.1007/s00394-008-0761-4.
- [164] Martín MÁ, Fernández-Millán E, Ramos S, Bravo L, Goya L. Cocoa flavonoid epicatechin protects pancreatic beta cell viability and function against oxidative stress. *Mol Nutr Food Res* 2014;58:447–56. doi:10.1002/mnfr.201300291.
- [165] Rozan P, Hidalgo S, Nejdí A, Bisson JF, Lalonde R, Messaoudi M. Preventive antioxidant effects of cocoa polyphenolic extract on free radical production and cognitive performances after heat exposure in Wistar rats. *J Food Sci* 2007;72:S203–6. doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00297.x.
- [166] Pandurangan AK, Saadatdoust Z, Mohd Esa N, Hamzah H, Ismail A. Dietary cocoa protects against colitis-associated cancer by activating the Nrf2/Keap1 pathway. *Biofactors* 2015;41:1–14. doi:10.1002/biof.1195.
- [167] Gu Y, Yu S, Lambert JD. Dietary cocoa ameliorates obesity-related inflammation in high fat-fed mice. *Eur J Nutr* 2014;53:149–58. doi:10.1007/s00394-013-0510-1.

- [168] Scheid L, Reusch A, Stehle P, Ellinger S. Antioxidant effects of cocoa and cocoa products *ex vivo* and *in vivo*: is there evidence from controlled intervention studies? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010;13:737–42. doi:10.1097/MCO.0b013e32833ec45c.
- [169] Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG. Epicatechin in human plasma: *in vivo* determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J Nutr* 2000;130:2109S – 14S. doi:10.1136/bmj.f7198.
- [170] Zhu QY, Schramm DD, Gross HB, Holt RR, Kim SH, Yamaguchi T, et al. Influence of cocoa flavanols and procyanidins on free radical-induced human erythrocyte hemolysis. *Clin Dev Immunol* 2005;12:27–34. doi:10.1080/17402520512331329514.
- [171] Sarriá B, Martínez-López S, Sierra-Cinos JL, García-Diz L, Mateos R, Bravo L. Regular consumption of a cocoa product improves the cardiometabolic profile in healthy and moderately hypercholesterolaemic adults. *Br J Nutr* 2014;111:122–34. doi:10.1017/S000711451300202X.
- [172] Allgrove J, Farrell E, Gleeson M, Williamson G, Cooper K. Regular dark chocolate consumption's reduction of oxidative stress and increase of free-fatty-acid mobilization in response to prolonged cycling. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2011;21:113–23.
- [173] Pucciarelli DL. Cocoa and heart health: a historical review of the science. *Nutrients* 2013;5:3854–70. doi:10.3390/nu5103854.
- [174] Kurosawa T, Itoh F, Nozaki A, Nakano Y, Katsuda SI, Osakabe N, et al. Suppressive effect of cocoa powder on atherosclerosis in Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic rabbits. *J Atheroscler Thromb* 2005;12:20–8.
- [175] Cienfuegos-Jovellanos E, Quiñones M del M, Muguerza B, Moulay L, Miguel M, Aleixandre A. Antihypertensive effect of a polyphenol-rich cocoa powder industrially processed to preserve the original flavonoids of the cocoa beans. *J Agric Food Chem* 2009;57:6156–62. doi:10.1021/jf804045b.
- [176] Persson IAL, Persson K, Hägg S, Andersson RGG. Effects of cocoa extract and dark chocolate on angiotensin-converting enzyme and nitric oxide in human endothelial cells and healthy volunteers--a

- nutrigenomics perspective. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011;57:44–50. doi:10.1097/FJC.0b013e3181fe62e3.
- [177] Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacol Res* 2013;68:125–31. doi:10.1016/j.phrs.2012.10.018.
- [178] Katz DL, Doughty K, Ali A. Cocoa and chocolate in human health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2011;15:2779–811. doi:10.1089/ars.2010.3697.
- [179] De Caterina R, Zampolli A, Del Turco S, Madonna R, Massaro M. Nutritional mechanisms that influence cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2006;83:421–6. doi:83/2/421S [pii].
- [180] Rein D, Paglieroni TG, Wun T, Pearson DA, Schmitz HH, Gosselin R, et al. Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am J Clin Nutr* 2000;72:30–5.
- [181] McCullough ML, Chevaux K, Jackson L, Preston M, Martinez G, Schmitz HH, et al. Hypertension, the Kuna, and the Epidemiology of Flavanols. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;47:S103–9. doi:10.1097/00005344-200606001-00003.
- [182] K Hollenberg N. Vascular action of cocoa flavanols in humans: the roots of the story. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;47:S99–102. doi:10.1097/00005344-200606001-00002.
- [183] Fisher NDL, Hollenberg NK. Aging and vascular responses to flavanol-rich cocoa. *J Hypertens* 2006;24:1575–80. doi:10.1097/01.hjh.0000239293.40507.2a.
- [184] Schnorr O, Brossette T, Momma TY, Kleinbongard P, Keen CL, Schroeter H, et al. Cocoa flavanols lower vascular arginase activity in human endothelial cells in vitro and in erythrocytes in vivo. *Arch Biochem Biophys* 2008;476:211–5. doi:10.1016/j.abb.2008.02.040.
- [185] Karim M, McCormick K, Tissa Kappagoda C. Effects of cocoa extracts on endothelium-dependent relaxation. *J Nutr* 2000;130:2105S – 8S.
- [186] Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Takizawa T, Terao J, Kondo K. Catechins and their oligomers linked by C4 → C8 bonds are major

cacao polyphenols and protect low-density lipoprotein from oxidation in vitro. *Exp Biol Med* 2002;227:51–6.

- [187] Osakabe N, Natsume M, Adachi T, Yamagishi M, Hirano R, Takizawa T, et al. Effects of cacao liquor polyphenols on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation in hypercholesterolemic rabbits. *J Atheroscler Thromb* 2000;7:164–8.
- [188] Osakabe N, Baba S, Yasuda A, Iwamoto T, Kamiyama M, Takizawa T, et al. Daily cocoa intake reduces the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation as demonstrated in healthy human volunteers. *Free Radic Res* 2001;34:93–9.
- [189] Hirano R, Osakabe N, Iwamoto T, Matsumoto A, Natsume M, Takizawa T, et al. Antioxidant effects of polyphenols in chocolate on low-density lipoprotein both *in vitro* and *ex vivo*. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2000;46:199–204.
- [190] Vinson JA, Proch J, Bose P, Muchler S, Taffera P, Shuta D, et al. Chocolate is a powerful *ex vivo* and *in vivo* antioxidant, an antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American diets. *J Agric Food Chem* 2006;54:8071–6. doi:10.1021/jf062175j.
- [191] Yasuda A, Natsume M, Sasaki K, Baba S, Nakamura Y, Kanegae M, et al. Cacao procyanidins reduce plasma cholesterol and increase fecal steroid excretion in rats fed a high-cholesterol diet. *BioFactors* 2008;33:211–23. doi:10.1002/biof.5520330307.
- [192] Mursu J, Voutilainen S, Nurmi T, Rissanen TH, Virtanen JK, Kaikkonen J, et al. Dark chocolate consumption increases HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1351–9. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.002.
- [193] Baba S, Osakabe N, Kato Y, Natsume M, Yasuda A, Kido T, et al. Continuous intake of polyphenolic compounds containing cocoa powder reduces LDL oxidative susceptibility and has beneficial effects on plasma HDL-cholesterol concentrations in humans. *Am J Clin Nutr* 2007;85:709–17.
- [194] Sarriá B, Martínez-López S, Sierra-Cinos JL, Garcia-Diz L, Goya L, Mateos R, et al. Effects of bioactive constituents in functional cocoa

- products on cardiovascular health in humans. *Food Chem* 2015;174:214–8. doi:10.1016/j.foodchem.2014.11.004.
- [195] Farouque HMO, Leung M, Hope SA, Baldi M, Schechter C, Cameron JD, et al. Acute and chronic effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in subjects with coronary artery disease: a randomized double-blind placebo-controlled study. *Clin Sci (Lond)* 2006;111:71–80. doi:10.1042/CS20060048.
- [196] Bordeaux B, Yanek LR, Moy TF, White LW, Becker LC, Faraday N, et al. Casual chocolate consumption and inhibition of platelet function. *Prev Cardiol* 2007;10:175–80. doi:10.1111/j.1520-037X.2007.06693.x.
- [197] Heiss C, Dejam A, Kleinbongard P, Schewe T, Sies H, Kelm M. Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *JAMA* 2003;290:1030–1. doi:10.1001/jama.290.8.1030.
- [198] EFSA. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to cocoa flavanols and protection of lipids from oxidative damage (ID 652 , 1372, 1506, 3143), and maintenance of normal blood pressure (ID 1507) pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA J* 2010;8:1–21. doi:10.2903/j.efsa.2010.1792.
- [199] EFSA. Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to cocoa flavanols and maintenance of normal endothelium-dependent vasodilation pursuant to Article 13 (5) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA J* 2012;10:1–21. doi:10.2903/j.efsa.2012.2809.
- [200] Mackenzie GG, Carrasquedo F, Delfino JM, Keen CL, Fraga CG, Oteiza PI. Epicatechin, catechin, and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF-kappaB activation at multiple steps in Jurkat T cells. *FASEB J* 2004;18:167–9.
- [201] Yamagishi M, Osakabe N, Natsume M, Adachi T, Takizawa T, Kumon H, et al. Anticlastogenic activity of cacao: inhibitory effect of cacao liquor polyphenols against mitomycin C-induced DNA damage. *Food Chem Toxicol* 2001;39:1279–83. doi:10.1016/S0278-6915(01)00076-X.
- [202] Carnésecchi S, Schneider Y, Lazarus SA, Coehlo D, Gossé F, Raul F. Flavanols and procyanidins of cocoa and chocolate inhibit growth and polyamine biosynthesis of human colonic cancer cells. *Cancer Lett* 2002;175:147–55. doi:10.1016/S0304-3835(01)00731-5.

- [203] Cho ES, Lee KW, Lee HJ. Cocoa procyanidins protect PC12 cells from hydrogen-peroxide-induced apoptosis by inhibiting activation of p38 MAPK and JNK. *Mutat Res* 2008;640:123–30. doi:10.1016/j.mrfmmm.2007.12.012.
- [204] Ohno M, Sakamoto KQ, Ishizuka M, Fujita S. Crude cacao *Theobroma cacao* extract reduces mutagenicity induced by benzo[a]pyrene through inhibition of CYP1A activity in vitro. *Phytother Res* 2009;23:1134–9. doi:10.1002/ptr.2762.
- [205] Lee DE, Kang NJ, Lee KM, Lee BK, Kim JH, Lee KW, et al. Cocoa polyphenols attenuate hydrogen peroxide-induced inhibition of gap-junction intercellular communication by blocking phosphorylation of connexin 43 via the MEK/ERK signaling pathway. *J Nutr Biochem* 2010;21:680–6. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.03.014.
- [206] Oleaga C, García M, Solé A, Ciudad CJ, Izquierdo-Pulido M, Noé V. CYP1A1 is overexpressed upon incubation of breast cancer cells with a polyphenolic cocoa extract. *Eur J Nutr* 2012;51:465–76. doi:10.1007/s00394-011-0231-2.
- [207] Amin I, Koh BK, Asmah R. Effect of cacao liquor extract on tumor marker enzymes during chemical hepatocarcinogenesis in rats. *J Med Food* 2004;7:7–12. doi:10.1089/109662004322984635.
- [208] Bisson J-F, Guardia-Llorens M-A, Hidalgo S, Rozan P, Messaoudi M. Protective effect of Acticoa powder, a cocoa polyphenolic extract, on prostate carcinogenesis in Wistar-Unilever rats. *Eur J Cancer Prev* 2008;17:54–61. doi:10.1097/CEJ.0b013e3280145b33.
- [209] Rodríguez-Ramiro I, Ramos S, López-Oliva E, Agis-Torres A, Gómez-Juaristi M, Mateos R, et al. Cocoa-rich diet prevents azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in rats by restraining oxidative stress and cell proliferation and inducing apoptosis. *Mol Nutr Food Res* 2011;55:1895–9. doi:10.1002/mnfr.201100363.
- [210] Pérez-Cano FJ, Massot-Cladera M, Franch À, Castellote C, Castell M. The effects of cocoa on the immune system. *Front Pharmacol* 2013;4:1–12. doi:10.3389/fphar.2013.00071.
- [211] Al-Hanbali M, Ali D, Bustami M, Abdel-Malek S, Al-Hanbali R, Alhussainy T, et al. Epicatechin suppresses IL-6, IL-8 and enhances IL-

- 10 production with NF- κ B nuclear translocation in whole blood stimulated system. *Neuroendocrinol Lett* 2009;30:131–8.
- [212] Mao TK, Van De Water J, Keen CL, Schmitz HH, Gershwin ME. Effect of cocoa flavanols and their related oligomers on the secretion of interleukin-5 in peripheral blood mononuclear cells. *J Med Food* 2002;5:17–22.
- [213] Kenny TP, Keen CL, Schmitz HH, Gershwin ME. Immune effects of cocoa procyanidin oligomers on peripheral blood mononuclear cells. *Exp Biol Med* 2007;232:293–300.
- [214] Ono K, Takahashi T, Kamei M, Mato T, Hashizume S, Kamiya S, et al. Effects of an aqueous extract of cocoa on nitric oxide production of macrophages activated by lipopolysaccharide and interferon- γ . *Nutrition* 2003;19:681–5. doi:10.1016/S0899-9007(03)00092-3.
- [215] Mao TK, Powell JJ, Van De Water J, Keen CL, Schmitz HH, Gershwin ME. Influence of cocoa procyanidins on the transcription of interleukin-2 in peripheral blood mononuclear cells. *Int J Immunother* 1999;15:23–9.
- [216] Mao T, Van De Water J, Keen CL, Schmitz HH, Gershwin ME. Cocoa procyanidins and human cytokine transcription and secretion. *J Nutr* 2000;130:2093S – 9S.
- [217] Ramiro E, Franch À, Castellote C, Andrés-Lacueva C, Izquierdo-Pulido M, Castell M. Effect of *Theobroma cacao* flavonoids on immune activation of a lymphoid cell line. *Br J Nutr* 2005;93:859–66. doi:10.1079/BJN20051443.
- [218] Jenny M, Santer E, Klein A, Ledochowski M, Schennach H, Ueberall F, et al. Cacao extracts suppress tryptophan degradation of mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cells. *J Ethnopharmacol* 2009;122:261–7. doi:10.1016/j.jep.2009.01.011.
- [219] Massot-cladera M, Abril-Gil M, Torres S, Franch À, Castell M, Pérez-Cano FJ. Impact of cocoa polyphenol extracts on the immune system and microbiota in two strains of young rats. *Br J Nutr* 2014;112:1944–54. doi:10.1017/S0007114514003080.

- [220] Mathur S, Devaraj S, Grundy SM, Jialal I. Cocoa products decrease low density lipoprotein oxidative susceptibility but do not affect biomarkers of inflammation in humans. *J Nutr* 2002;132:3663–7.
- [221] Di Giuseppe R, Di Castelnuovo A, Centritto F, Zito F, De Curtis A, Costanzo S, et al. Regular consumption of dark chocolate is associated with low serum concentrations of C-reactive protein in a healthy Italian population. *J Nutr* 2008;138:1939–45.
- [222] Monagas M, Khan N, Andres-Lacueva C, Casas R, Urpí-Sardà M, Llorach R, et al. Effect of cocoa powder on the modulation of inflammatory biomarkers in patients at high risk of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2009;90:1144–50.
doi:10.3945/ajcn.2009.27716.
- [223] Vázquez-Agell M, Urpi-Sarda M, Sacanella E, Camino-López S, Chiva-Blanch G, Llorente-Cortés V, et al. Cocoa consumption reduces NF- κ B activation in peripheral blood mononuclear cells in humans. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013;23:257–63.
doi:10.1016/j.numecd.2011.03.015.
- [224] Camps-Bossacoma M, Abril-Gil M, Franch À, Pérez-Cano FJ, Castell M. Induction of a model of oral sensitization in rat. *Clin Immunol Endocr Metab Drugs* 2014.
- [225] Knippels LM, Penninks a H, Spanhaak S, Houben GF. Oral sensitization to food proteins: a Brown Norway rat model. *Clin Exp Allergy* 1998;28:368–75.
- [226] Knippels LM, Houben GF, Spanhaak S, Penninks a H. An oral sensitization model in Brown Norway rats to screen for potential allergenicity of food proteins. *Methods* 1999;19:78–82.
doi:10.1006/meth.1999.0830.
- [227] Dong W, Selgrade MK, Gilmour MI. Systemic administration of *Bordetella pertussis* enhances pulmonary sensitization to house dust mite in juvenile rats. *Toxicol Sci* 2003;72:113–21.
- [228] Ogawa T, Miura S, Tsuzuki Y, Ogino T, Teramoto K, Inamura T, et al. Chronic allergy to dietary ovalbumin induces lymphocyte migration to rat small intestinal mucosa that is inhibited by MAdCAM-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G702–10.

- [229] De Jonge JD, Baken KA, Konings J, Pennings JL, Ezendam J, Van Loveren H. Gene expression changes in the mesenteric lymph nodes of rats after oral peanut extract exposure. *J Immunotoxicol* 2008;5:385–94.
- [230] Huang J, Zhong Y, Cai W, Zhang H, Tang W, Chen B. The effects of probiotics supplementation timing on an ovalbumin-sensitized rat model. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010;60:132–41. doi:10.1111/j.1574-695X.2010.00727.x.
- [231] Cao S, He X, Xu W, Luo Y, Ran W, Liang L, et al. Potential allergenicity research of Cry1C protein from genetically modified rice. *Regul Toxicol Pharmacol* 2012;63:181–7.
- [232] Zhong Y, Huang J, Tang W, Chen B, Cai W. Effects of probiotics, probiotic DNA and the CpG oligodeoxynucleotides on ovalbumin-sensitized Brown-Norway rats via TLR9/NF- κ B pathway. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012;66:71–82.
- [233] Pilegaard K, Madsen C. An oral Brown Norway rat model for food allergy: comparison of age, sex, dosing volume, and allergen preparation. *Toxicology* 2004;196:247–57.
- [234] Knippels LM, Penninks AH, Houben GF. Continued expression of anti-soy protein antibodies in rats bred on a soy protein-free diet for one generation: the importance of dietary control in oral sensitization research. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:815–20.
- [235] Dearman RJ, Caddick H, Stone S, Basketter DA, Kimber I. Characterization of antibody responses induced in rodents by exposure to food proteins: influence of route of exposure. *Toxicology* 2001;167:217–31.
- [236] Bøgh KL, Kroghsbo S, Dahl L, Rigby NM, Barkholt V, Mills ENC, et al. Digested Ara h 1 has sensitizing capacity in Brown Norway rats. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1611–21.
- [237] Kroghsbo S, Bøgh KL, Rigby NM, Mills ENC, Rogers A, Madsen CB. Sensitization with 7S globulins from peanut, hazelnut, soy or pea induces IgE with different biological activities which are modified by soy tolerance. *Int Arch Allergy Immunol* 2011;155:212–24.

- [238] Bellou A, Saint-Laudy J, Knippels L, Montémont C, Vauthier E, Gerard P, et al. Brown Norway rat ovalbumin-specific immunoglobulin E antibodies increase the human basophil expression of CD63 marker. *Scand J Immunol* 2003;57:271–8.
- [239] Bøgh KL, Barkholt V, Madsen CB. The sensitising capacity of intact β -lactoglobulin is reduced by co-administration with digested β -lactoglobulin. *Int Arch Allergy Immunol* 2013;161:21–36. doi:10.1159/000343042.
- [240] Ahrens B, Quarcoo D, Buhner S, Reese G, Vieths S, Hamelmann E. Development of an animal model to evaluate the allergenicity of food allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2014;164:89–96. doi:10.1159/000363109.
- [241] Gupta RK. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;32:155–72. doi:10.1016/S0169-409X(98)00008-8.
- [242] Mu HH, Sewell WA. Regulation of DTH and IgE responses by IL-4 and IFN- γ in immunized mice given pertussis toxin. *Immunology* 1994;83:639–45.
- [243] Ryan M. *Pertussis* toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7- 1, B7-2 and CD28. *Int Immunol* 1998;10:651–62. doi:10.1093/intimm/10.5.651.
- [244] Makabe-Kobayashi Y, Hori Y, Adachi T, Ishigaki-Suzuki S, Kikuchi Y, Kagaya Y, et al. The control effect of histamine on body temperature and respiratory function in IgE-dependent systemic anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:298–303.
- [245] Simons FER. Anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:S161–81. doi:10.1016/j.jaci.2009.12.981.
- [246] Li XM, Serebrisky D, Lee SY, Huang CK, Bardina L, Schofield BH, et al. A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:150–8. doi:10.1067/mai.2000.107395.
- [247] Vinje NE, Larsen S, Løvik M. A mouse model of lupin allergy. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1255–66.

- [248] Cambras T, Castejón L, Díez-Noguera A. Social interaction with a rhythmic rat enhances the circadian pattern of the motor activity and temperature of LL-induced arrhythmic rats. *Physiol Behav* 2012;105:835–40. doi:10.1016/j.physbeh.2011.10.027.
- [249] Albert N, da Silva C, Díez-Noguera A, Cambras T. Different adaptation of the motor activity rhythm to chronic phase shifts between adolescent and adult rats. *Behav Brain Res* 2013;252:347–55. doi:10.1016/j.bbr.2013.06.025.
- [250] Sato Y, Akiyama H, Matsuoka H, Sakata K, Nakamura R, Ishikawa S, et al. Dietary carotenoids inhibit oral sensitization and the development of food allergy. *J Agric Food Chem* 2010;58:7180–6. doi:10.1021/jf100519x.
- [251] Jung HW, Jung J, Park Y. Original article Antiallergic effect of *Ostericum koreanum* root extract on ovalbumin-induced allergic rhinitis mouse model and mast cells 2011:338–48.
- [252] Li Z, Gao Y, Wang H, Liu Z. Original article A rat model of Shuang Huang Lian injection-induced anaphylaxis n.d.:185–92.
- [253] Chen H-J, Lo Y-C, Chiang W. Inhibitory effects of adlay bran (*Coix lachryma-jobi* L. var. ma-yuen Stapf) on chemical mediator release and cytokine production in rat basophilic leukemia cells. *J Ethnopharmacol* 2012;141:119–27. doi:10.1016/j.jep.2012.02.009.
- [254] Sun N, Zhou C, Pu Q, Wang J, Huang K, Che H. Allergic reactions compared between BN and Wistar rats after oral exposure to ovalbumin. *J Immunotoxicol* 2013;10:67–74.
- [255] Berin MC, Mayer L. Immunophysiology of experimental food allergy. *Mucosal Immunol* 2009;2:24–32.
- [256] Orivuori L, Mustonen K, Roduit C, Braun-Fahrländer C, Dalphin J-C, Genuneit J, et al. Immunoglobulin A and immunoglobulin G antibodies against β -lactoglobulin and gliadin at age 1 associate with immunoglobulin E sensitization at age 6. *Pediatr Allergy Immunol* 2014;25:329–37.
- [257] Konstantinou GN, Nowak-Węgrzyn A, Bencharitiwong R, Bardina L, Sicherer SH, Sampson HA. Egg-white-specific IgA and IgA2 antibodies

in egg-allergic children: is there a role in tolerance induction? *Pediatr Allergy Immunol* 2014;25:64–70.

- [258] Gibson S, Mackeller A, Newlands G, Miller H. Phenotypic expression of mast cell granule proteinases. Distribution of mast cell proteinases I and II in the rat digestive system. *Immunology* 1987;62:621–7.
- [259] Knippels LMJ, Penninks AH, Smit JJ, Houben GF. Immune-mediated effects upon oral challenge of ovalbumin-sensitized Brown Norway rats: further characterization of a rat food allergy model. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;156:161–9.
- [260] Traver E, Torres R, de Mora F, Vergara P. Mucosal mast cells mediate motor response induced by chronic oral exposure to ovalbumin in the rat gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil* 2010;22:e34–43.
- [261] Scudamore CL, Thornton EM, McMillan L, Newlands GF, Miller HR. Release of the mucosal mast cell granule chymase, rat mast cell protease-II, during anaphylaxis is associated with the rapid development of paracellular permeability to macromolecules in rat jejunum. *J Exp Med* 1995;182:1871–81. doi:10.1084/jem.182.6.1871.
- [262] Oka T, Rios EJ, Tsai M, Kalesnikoff J, Galli SJ. Rapid desensitization induces internalization of antigen-specific IgE on mouse mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:922–32.e1–16.
- [263] Binder J, Graser E, Hancock WW, Wasowska B, Sayegh MH, Volk - HD, et al. Downregulation of intragraft IFN- γ expression correlates with increased IgG1 alloantibody response following intrathymic immunomodulation of sensitized rat recipients. *Transplantation* 1995;60:1516–24.
- [264] Gracie JA, Bradley JA. Interleukin-12 induces interferon- γ -dependent switching of IgG alloantibody subclass. *Eur J Immunol* 1996;8:1217–21.
- [265] Jung W-K, Choi I, Oh S, Park S-G, Seo S-K, Lee S-W, et al. Anti-asthmatic effect of marine red alga (*Laurencia undulata*) polyphenolic extracts in a murine model of asthma. *Food Chem Toxicol* 2009;47:293–7. doi:10.1016/j.fct.2008.11.012.
- [266] Cruz EA, Reuter S, Martin H, Dehzad N, Muzitano MF, Costa SS, et al. *Kalanchoe pinnata* inhibits mast cell activation and prevents allergic

airway disease. *Phytomedicine* 2012;19:115–21.
doi:10.1016/j.phymed.2011.06.030.

- [267] Artis D, Humphreys NE, Bancroft AJ, Rothwell NJ, Potten CS, Grecis RK. Tumor necrosis factor alpha is a critical component of interleukin 13-mediated protective T helper cell type 2 responses during helminth infection. *J Exp Med* 1999;190:953–62.
doi:10.1084/jem.190.7.953.
- [268] Cienfuegos-Jovellanos E, Pasamar MA, Fritz J, Arcos FJ, Ramon D, Castilla Y. Proceso para la obtención de polvo de cacao rico en polifenoles y bajo contenido en materia grasa y polvo de cacao obtenido. ES 2 280 141 A1, 2007.
- [269] Abril-Gil M, Massot-Cladera M, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Franch À, Castell M. A diet enriched with cocoa prevents IgE synthesis in a rat allergy model. *Pharmacol Res* 2012;65:603–8.

