



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudio del efecto antiasmático de cacao nativo de Perú en un modelo experimental en rata

Marta Périz Torres

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.

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

Departament de Bioquímica i Fisiologia

Secció de Fisiologia

Estudio del efecto antiasmático de cacao nativo de Perú en un modelo experimental en rata

Marta Périz Torres

Barcelona, 2022



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació
Departament de Bioquímica i Fisiologia
Secció de Fisiologia

Programa de doctorat
ALIMENTACIÓ I NUTRICIÓ

Estudio del efecto antiasmático de cacao nativo de Perú en un modelo experimental en rata

Memòria presentada per MARTA PÉRIZ TORRES per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Aquesta tesi ha estat realitzada al grup d'*Autoimmunitat, Immunonutrició i Tolerància*
sota la supervisió de la Dra. **Margarida Castell Escuer** i la Dra. **Malén Massot Cladera**

Dra. Margarida Castell Escuer
Directora i tutora de la tesi

Dra. Malén Massot Cladera
Directora de la tesi

Marta Pérez Torres
doctoranda

Aquesta tesi ha estat finançada pel:

Fondo Nacional de Desarrollo Tecnológico e Innovación Tecnológica (FONDECYT) de Perú en col·laboració amb la Universitat de Barcelona.

La doctoranda ha gaudit d'una **Beca de col·laboració en projectes de recerca** (Fundació Bosch i Gimpera) durant el període 2018 - 2020



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Farmàcia
i Ciències de l'Alimentació

Grup d'Autoimmunitat, Immunonutrició i Tolerància
Secció de Fisiologia
Departament de Bioquímica i Fisiologia
Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació
Edifici B, 3a planta
Av. Joan XXIII, 27-31, 08028 Barcelona

Dra. Margarida Castell Escuer, catedràtica, i **Dra. Malén Massot Cladera**, professora lectora, de la Secció de Fisiologia del Departament de Bioquímica i Fisiologia de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació de la Universitat de Barcelona,

INFORMEN

Que la memòria titulada ***Estudio del efecto antiasmático de cacao nativo de Perú en un modelo experimental en rata*** presentada per **MARTA PERIZ TORRES** per optar al Títol de Doctor per la Universitat de Barcelona, ha estat realitzada sota la nostra direcció a la Secció 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, 20 de setembre de 2022

Dra. Margarida Castell Escuer

Secció de Fisiologia
Departament de Bioquímica i Fisiologia
Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació
Universitat de Barcelona

Dra. Malén Massot Cladera

Secció de Fisiologia
Departament de Bioquímica i Fisiologia
Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació
Universitat de Barcelona

Índice

Resumen	1
Introducción.....	5
1. El cacao.....	7
1.1 El árbol del cacao: <i>Theobroma cacao</i> L.	8
1.2 Obtención del cacao	11
1.3 Composición.....	16
1.4 Efectos de los compuestos bioactivos del cacao sobre la salud	23
2. Asma alérgica	29
2.1 Epidemiología	29
2.2 Etiopatogenia del asma alérgica	30
2.3 Tratamiento del asma.....	40
Objetivos	45
Resultados.....	49
Artículo 1	1
Artículo 2	1
Artículo 3	1
Discusión	117
Conclusión.....	131
Bibliografía	135

Abreviaturas

APC	Célula presentadora de antígenos
AUC	<i>Area under the curve</i>
BALF	<i>Bronchoalveolar lavage fluid</i>
BN	Brown Norway
CysLT	Leucotrienos cisteínicos
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
DC	Célula dendrítica
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FcεRI	Receptor de IgE de alta afinidad
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HDL	Lipoproteína de alta densidad
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
i.n.	Intranasal
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
i.p.	Intraperitoneal
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LPS	Lipopolisacárido
LT	Leucotrienos
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
NO	Óxido nítrico
OVA	Ovoalbúmina
PG	Prostaglandina
RMCP	Proteasa de mastocito de rata
ROS	Especies reactivas de oxígeno
tBp	Toxina de <i>Bordetella pertussis</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Th	Linfocito T <i>helper</i>
TLR	Receptor toll-like
TNF	<i>Factor de necrosis tumoral</i>
Treg	Linfocito T regulador

RESUMEN

Debido al incremento sostenido de la prevalencia del asma y la presencia de fenotipos graves, resulta de interés el desarrollo de modelos animales que permitan estudiar nuevos tratamientos y coadyuvantes. En los últimos años, el cacao ha demostrado influir en el sistema inmunitario, modificando la composición de linfocitos y la producción de anticuerpos y citocinas.

En base a estos factores, el objetivo de la presente tesis ha sido establecer el efecto antiasmático del cacao, en particular de cuatro cacaos nativos del Perú procedentes de distintas regiones del país: Blanco de Piura (BPC), Amazonas Perú (APC), Criollo de Montaña (CMC) y Chunchu (CCC).

Para lograr este objetivo, se desarrolló un modelo de asma alérgica que permitiera la inducción y la cuantificación objetiva de una respuesta anafiláctica utilizando ovoalbúmina como alérgeno y alum y toxina *Bordetella pertussis* como adyuvantes. Paralelamente se determinaron los compuestos bioactivos de los cacaos y se estudió el efecto *in vitro* en células del sistema inmune, macrófagos peritoneales y linfocitos del bazo. Los resultados mostraron una mayor concentración de polifenoles, metilxantinas, capacidad antioxidante y efecto antiinflamatorio en los cacaos Amazonas Perú y Criollo de Montaña, por lo que fueron seleccionados para su estudio en el modelo de asma alérgica desarrollado.

A continuación, se determinó el efecto de una dieta enriquecida al 10% de cacao Amazonas Perú, Criollo de Montaña o un cacao ordinario no autóctono en el modelo de asma alérgica establecido. Los resultados demuestran que las dietas ricas en cacao son capaces de reducir la síntesis de anticuerpos asociados a la respuesta inmunitaria Th2, sin embargo, el cacao ordinario mostró un efecto mayor que los cacaos nativos, siendo capaz de reducir la concentración de IgE sistémica y respiratoria. La dieta con Criollo de Montaña disminuyó la concentración de IgE en lavado broncoalveolar, con una tendencia en suero, y la dieta con Amazonas Perú solo mostró un cierto efecto a nivel respiratorio. Resultados similares se observaron en la concentración de proteasa mastocitaria II, indicativa de la degranulación mastocitaria. Las tres dietas ricas en cacao redujeron la producción de IgG1 sistémica y eosinófilos y leucotrienos en la vía respiratoria de forma similar, mientras que la dieta con Amazonas Perú mostró un efecto mayor que el resto de las dietas en la reducción de IgG2a. Las dietas con cacao Criollo de Montaña y cacao ordinario, pero no dieta con Amazonas Perú, disminuyeron la concentración de IgA mucosal.

Por consiguiente, los cacaos fueron capaces de paliar la respuesta inmunitaria Th2, especialmente la síntesis de IgE y la degranulación de los mastocitos, aunque se observaron diferencias entre los cacaos que no se pueden atribuir a un solo compuesto bioactivo, debiendo influir tanto el contenido en teobromina como la concentración y perfil de flavonoides de cada cacao, que varía según su origen.

INTRODUCCIÓN

1. El cacao

Los primeros datos disponibles sobre el consumo del cacao se sitúan hacia los años 1700 a.C. por parte de la civilización Olmeca, pueblos indígenas situados en las tierras bajas de la costa oriental del golfo de México desde el siglo XVIII a.C (1). Los usos del cacao fueron posteriormente adaptados y expandidos por la civilización maya (ca 1000 a.C.- 1521 d.C.) (2). Según su religión, el cacao (*kakaw*) fue descubierto por los dioses junto con otros alimentos deliciosos en una montaña y les fue entregado por el dios Soberano Serpiente Emplumada. El pueblo maya honraba al dios del cacao Ek Chuah celebrando un festival anual en abril con sacrificios de animales, ofrendas de cacao, plumas e incienso y un intercambio de regalos (3). Siglos después, los mexicas (aztecas) (ca. 1200-1521 d.C) llegaron al valle central de México, asimilaron los usos del cacao, y el término *kakaw* derivó a *cacahuatl* (4). Su religión le otorgó un origen muy similar al de los mayas, donde el dios Quetzalcoatl (también llamado Serpiente Emplumada) lo descubrió en una montaña entre otros vegetales. A cambio, como sacrificio a los dioses les ofrecían regularmente cacao bañado por la sangre de sacerdotes (3).

Durante la época colonial española, tras su llegada a la zona en 1519, se elaboraron un seguido de manuscritos que reflejan el uso del cacao como medicina en la cultura mexicana. El *Codex Badianus* (1552), el *Codex Florentine* (1590) y el *Tractado Breve de Medicina* (1592) explican detalladamente las preparaciones y aplicaciones que los indígenas daban al cacao para tratar un amplio abanico de dolencias, ya fuera como único ingrediente o en combinación con otras plantas. Se administraba principalmente a pacientes demacrados que requerían aumentar de peso, para estimular el sistema nervioso de pacientes apáticos, fatigados o débiles, y para mejorar la digestión y la función intestinal, aliviar el estreñimiento y estimular el funcionamiento de los riñones. El cacao también se empleaba como vehículo para administrar otras medicinas o para mejorarles el sabor. Como alimento, el cacao era considerado de gran valor y tan solo se preparaba en forma de bebida. Estaba reservado a los varones adultos de la nobleza, como sacerdotes, altos funcionarios, militares y guerreros distinguidos y, en ocasiones, se ofrecía a las futuras víctimas de sacrificios rituales en las vísperas del festival para reconfortarlas. La facilidad de fraccionar el cacao en semillas, y por tanto su fácil transporte, hizo que incluso llegara a ser utilizado como moneda de cambio en los mercados. Adquirió tal relevancia que ni los esfuerzos

de la corona española para imponer su moneda consiguieron eliminarlos por completo y se siguió usando en transacciones comerciales hasta mediados del siglo XIX (2).

La bebida de cacao, el chocolate, y sus usos llegaron a la corte española en 1544. Los frailes dominicanos que se encontraban de misión en la actual región de Guatemala y Belice organizaron un encuentro entre la realeza española (el rey Carlos I y el príncipe Felipe II) y nobles del pueblo maya Kekchi, que les ofrecieron chocolate a los monarcas como regalo. Desde entonces y hasta la actualidad, médicos y farmacéuticos se sirven del chocolate como vehículo para administrar una gran variedad de medicinas. Poco tiempo tras la llegada a España, la bebida de cacao se popularizó entre la realeza y las clases sociales altas y posteriormente entre el resto de la población. A través de los comerciantes extranjeros que visitaban España, la bebida de cacao se introdujo en numerosos países europeos como Italia, Francia, Bélgica y Países Bajos. En tan solo un siglo, la demanda de cacao en Europa Occidental se había extendido de tal forma que España estableció plantaciones en su colonia de Filipinas y Francia en el Caribe. Ya en la década de 1880, Inglaterra estableció el cultivo comercial de cacao en su colonia del golfo de Guinea en África occidental (2,3)

Actualmente, la población indígena de Centro y Sudamérica sigue considerado el árbol del cacao una planta sagrada que los curanderos emplean en ceremonias y preparaciones medicinales (2).

1.1 El árbol del cacao: *Theobroma cacao* L.

En 1753 Carlos Linneo, padre de la ecología y creador de la taxonomía, otorgó al árbol del cacao el género *Theobroma*, “alimento de los dioses” en griego, y el término maya *cacao* para la especie. Pertenece a la familia *Malvaceae*, subfamilia *Sterculioideae* y aunque diversas especies del género *Theobroma* se cultivan y consumen a nivel local tan solo *Theobroma cacao* lo es a nivel mundial (5,6).

El árbol *Theobroma cacao* precisa de unas condiciones ambientales muy particulares. Crece a una latitud de 20° norte y sur del ecuador, a 1000 m de altitud sobre el nivel del mar, a temperaturas que oscilan entre 18 y 32°C con sombra, humedad relativa cercana al 100% y

lluvias anuales de 1500 – 2800 mm . Sus dimensiones en cultivo oscilan entre los 4 y los 8 m de altura y 20 a 25 cm de diámetro de tronco, del que crecen directamente las flores y los frutos (caulifloria) (6). El fruto es una drupa ovalada denominada vaina o mazorca de pericarpio duro color amarillo-rojizo que guarda de 16 a 60 semillas (granos o habas) de cacao de color blanco a violeta, rodeadas por una pulpa carnosa y mucilaginosa blanca (Fig. 1) (7,8).

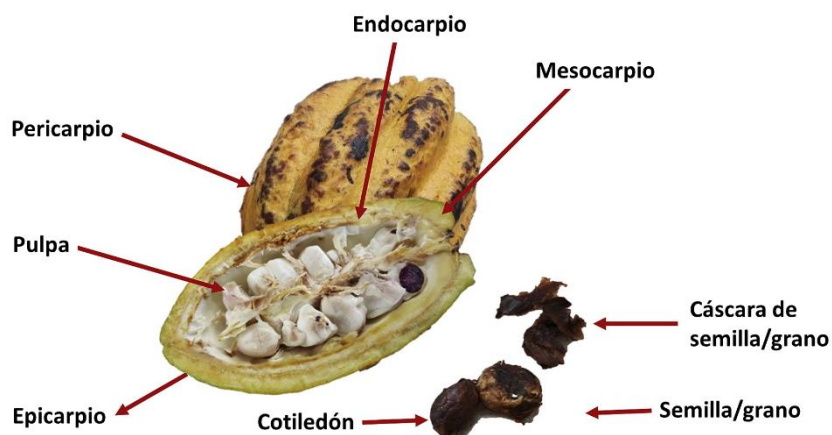


Fig. 1| Estructura del fruto de cacao (adaptada de (9))

1.1.1 Variedades

La especie *Theobroma cacao* está formada por dos subespecies (subsp.) que engloban una gran diversidad de formas y poblaciones, *Theobroma cacao* L. subsp. Cacao y *Theobroma cacao* L. subsp. Sphaerocarpum. Acorde con la clasificación tradicional del cacao, basada en la diversidad morfológica, la subsp. Cacao corresponde a la variedad Criollo y la subsp. Sphaerocarpum a la variedad Forastero (6,10). La hibridación entre ambas ha dado lugar a la variedad Trinitario. Las características principales de las tres variedades de cacao son:

- **Criollo:** Se considera la variedad domesticada en Mesoamérica hace unos 3600 años (11). El término “criollo” se traduce como “nativo” y engloba tanto las formas típicas de Criollo como los cultivos tradicionales. Fue el cultivo de cacao más común hasta

mediados del siglo XVIII. En la actualidad tan solo representa el 5-10% de la producción mundial y sigue cultivándose principalmente en las zonas de origen: Venezuela, México, Nicaragua, Guatemala y Colombia. Los árboles son delgados, los frutos tienen una cubierta fina con pigmentación rojiza y los cotiledones presentan colores de blanco a violeta claro. Suele dar un menor rendimiento y es más susceptible a plagas (6,8).

- **Forastero:** Originario de la cuenca superior del Amazonas. Representa el 80% de la producción mundial de cacao y se cultiva mayoritariamente en Brasil, África Occidental, América Central y el Caribe. Se caracteriza por tener frutos verdes, pericarpio grueso y cotiledones de color violeta (6).

- **Trinitario:** Surgido a mediados del siglo XVIII por la hibridación de Criollo y Forastero en las zonas productoras de cacao de Trinidad y Tobago (4,8). Actualmente se cultiva en diversas regiones del mundo como Venezuela, Ecuador, Camerún Sri Lanka y Nueva Guinea, entre otras, y es la segunda variedad de mayor producción mundial (10 - 15%)(12). Es un grupo con una alta heterogeneidad genética y morfológica. Las plantas suelen ser muy robustas con frutos de color verdes y cotiledones de distintas tonalidades violeta (6).

Sin embargo, hoy en día la mayoría del cacao cultivado a nivel mundial corresponde a formas híbridas que no pueden ser completamente incluidas dentro de esta división clásica.

Aunque la domesticación de *Theobroma cacao* se produjo en Mesoamérica, se considera que tiene su origen en la zona amazónica entre Perú y Ecuador (13,14). Sin embargo, el cultivo en Perú no se inició hasta el siglo XVIII, cuando se introdujeron cultivos procedentes del Caribe, Centroamérica y Ecuador, los cuales derivaron en los cultivos tradicionales peruanos (Criollo). A mediados del siglo XX, se introdujeron en el país formas de variedad Forastero procedentes de Ecuador que hibridaron con los cultivos tradicionales peruanos y se extendieron por varios territorios. Actualmente en Perú, se pueden encontrar tanto los cultivos tradicionales como los híbridos, englobando una gran variedad genética (6).

A pesar de la gran explotación del cultivo de cacao a nivel mundial, se estima que tan solo el 30% son variedades de cacao seleccionadas, el resto son cultivos tradicionales, es decir, formas de cacao que ya se cultivaban antes del 1950 (6).

1.2 Obtención del cacao

El cultivo y el procesado de cacao (**Fig. 2**) son etapas cruciales que influyen notablemente en las características nutricionales y organolépticas del producto y que siguen realizándose, en gran parte, de forma tradicional.

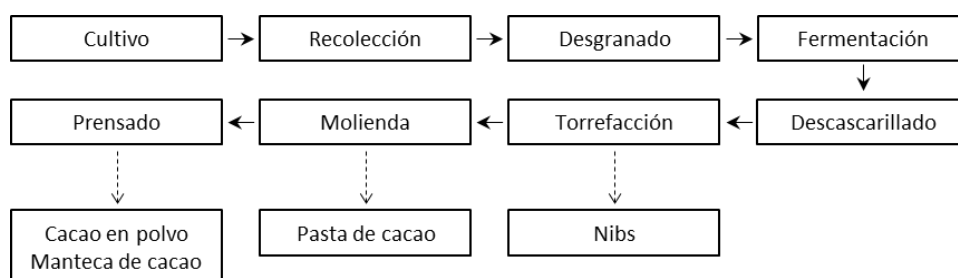


Fig. 2 | Resumen del proceso de obtención de productos del cacao.

I. Recolección

Cuando están maduras, las vainas de cacao se recolectan manualmente cortando el pedúnculo con un cuchillo sin dañar el resto del árbol y se almacenan durante un máximo de 7 días. Es un proceso laborioso que suele producirse durante dos periodos del año: abril-junio y octubre, dependiendo de la zona y el clima (15).

II. Desgranado

La vaina de cacao se abre longitudinalmente de forma manual o mecánica y se extraen los granos junto con la pulpa. El interior de la vaina sana es un ambiente favorable para el

crecimiento microbiano, pero tan solo cuenta con una pequeña cantidad de levaduras hasta su abertura (16). El desgranado conlleva la trasmisión de microorganismos que contribuyen a la fermentación espontánea del conjunto (17–19).

III. Fermentación y curado

Los granos con la pulpa se dejan reposar en montones cubiertos con hojas de plátano, en cestas o en un sistema de cajas de madera. El método varía según las tradiciones de la región y los recursos disponibles.

La fermentación de la pulpa tiene lugar por la actividad microbiana, principalmente por parte de levaduras, bacterias ácido-lácticas (BAL) y acetobacterias (AAB). El tiempo de fermentación depende de la variedad de cacao, con una media de 1-3 días para la variedad Criollo y de unos 5-7 días para el Forastero. El proceso elimina la pulpa y facilita el secado del grano, evita su germinación, genera precursores del color y los aromas característicos del cacao y reduce su astringencia y amargor (17).

Durante la primera etapa fermentativa (24-48h), las levaduras anaeróbicas depectinizan la pulpa, licuándola y reduciendo su viscosidad, lo que permite la entrada de aire. La reacción enzimática convierte los glúcidos, principalmente glucosa, en etanol y generan como subproductos CO₂ y glicerol. La temperatura de la masa aumenta unos 10-15°C. También se producen ácidos orgánicos como el acetato y succinato, alcoholes aldehídos, cetonas y esteres de ácidos grasos, precursores de los aromas del cacao (17,20,21).

A medida que la pulpa drena y va entrando aire en la masa de pulpa-grano, la presencia de BAL incrementa progresivamente hasta ser la actividad fermentativa principal (24-72/96 h). Inicialmente dominan especies microaeroflicas, tolerantes al ácido y al etanol, y tras estas proliferan las heterofermentativas. La fermentación de los glúcidos todavía presentes produce ácido láctico, ácido acético, CO₂ y/o etanol. Al final de la etapa, la fuente de energía se agota y la concentración de alcohol y la temperatura siguen aumentando. En consecuencia, las BAL van dejando paso a las AAB que dominan el proceso tras 72-112 h. Estas bacterias oxidan el etanol y el ácido láctico presentes a ácido acético que, a su vez, es oxidado a CO₂ y agua. La naturaleza

exotérmica de las reacciones incrementa la temperatura de la masa hasta los 50°C o más, lo que finalmente reduce el contenido de microorganismos (22).

A lo largo del proceso de fermentación se produce una disminución del pH de la masa hasta llegar a 4,8 debido a la presencia de etanol y ácido acético que, junto con las altas temperaturas, deterioran la estructura interna de grano. En consecuencia, se activan, se liberan y se mezclan enzimas y compuestos que se almacenaban en distintos compartimentos de los cotiledones. Como resultado, las proteínas de reserva son hidrolizadas a péptidos y aminoácidos libres por acción de las proteasas, y los glúcidos reaccionan con glucosidasas e invertasas dando lugar principalmente, a la formación de glucosa y fructosa. Además, se producen compuestos orgánicos volátiles como los aldehídos, alcoholes y cetonas entre otros, precursores del característico sabor a cacao (22,23). Las células pigmentarias de los cotiledones también se rompen liberando los polifenoles de su interior. Estos también se mezclan con enzimas y sufren reacciones de oxidación, polimerización e hidrólisis que reducen su solubilidad y su astringencia a la vez que proporcionan el característico color marrón al cacao. Este proceso que tiene lugar en el grano se conoce como curado (22).

IV. Secado

Tradicionalmente se aplica el secado al sol de los granos fermentados para reducir la humedad lo que mejora su vida útil al impedir la contaminación microbiológica, a la vez que facilita su almacenaje y transporte. Asimismo, durante esta fase de secado los niveles de acetato disminuyen lo que comporta una disminución de la acidez del grano, mientras que la concentración de monosacáridos aumenta (23).

V. Limpieza y descascarillado

En este paso se eliminan los restos orgánicos como piedras o tierra y las semillas se parten y airean para retirar la cubierta externa, la cual puede ser usada como abono (24).

VI. Torrefacción - Nibs

Esta etapa es esencial para el desarrollo del aroma y color del cacao. Con el paso del tiempo se han desarrollado diferentes técnicas de tostado más eficientes y adaptadas a las características de los diversos tipos de semilla (25).

Los precursores aromáticos propiciados durante la fermentación y el secado se desarrollan durante el tostado, principalmente mediante el pardeamiento no enzimático o reacción de Maillard (22,23). Se inicia con la condensación del grupo amino de los péptidos y aminoácidos libres con los azúcares reductores, la glucosa y la fructosa, producidos durante la fermentación, y desencadena una reacción en cascada que acaba produciendo los compuestos aromáticos policíclicos responsables, en gran parte, del aroma y sabor del cacao. A su vez, los lípidos pueden oxidarse y reaccionar con grupos amino que producen una reacción en cascada y el desarrollo de compuestos volátiles similares a los producidos en la reacción de Maillard. En total, se han identificado más de 600 sustancias que contribuyen al aroma y sabor del cacao, entre ellas destacan, con un 40%, las pirazinas. Durante la oxidación de los lípidos, también se propicia el desarrollo de aminas biógenas, como serotonina y dopamina, compuestos no volátiles que no proporcionan ni aroma ni sabor al cacao pero que pueden ejercer un efecto en el sistema nervioso central. Los polifenoles también se oxidan con el aumento de la temperatura y, junto con los productos derivados de la reacción de Maillard, oscurecen los granos (26).

El proceso de torrefacción puede darse antes o después de la limpieza y descascarillado. Los granos limpios, tostados y sin cáscara, llamados nibs, son el primer producto de cacao listo para el consumo.

En la industria alimentaria actual, los nibs son sometidos a una esterilización previa a su comercialización y pueden ser sometidos a un proceso de alcalinización o “Dutching” (proceso holandés). Este consiste en la adición de una solución alcalina, como carbonato potásico o cálcico, que reduce la acidez y la astringencia a la vez que intensifica el color. Puede aplicarse tanto en los nibs como en la torta o el polvo de cacao (25).

VII. Molienda – Licor o pasta

Los nibs tradicionalmente se molían a la piedra, pero actualmente la molienda se realiza mediante rodillos de granito o acero. Como resultado se obtiene una pasta, también llamada licor de cacao, que era la base de las bebidas y medicinas tradicionales de las culturas mesoamericanas. Aunque en la actualidad la pasta de cacao sigue siendo la base para la elaboración de tabletas de chocolate, la industria chocolatera suele añadir otros productos de cacao más procesados, como el cacao en polvo y la manteca.

VIII. Prensado – torta y manteca

La pasta de cacao se somete a prensas hidráulicas que separan la fracción grasa, obteniendo por un lado la manteca de cacao y, por el otro, la torta de cacao. La manteca se filtra para eliminar impurezas y se atempera, mientras que la torta se quiebra y pulveriza para obtener el cacao en polvo.

La pasta de cacao se mezcla con la manteca, azúcar y otros ingredientes para elaborar tabletas de chocolate. Asimismo, el cacao en polvo puede emplearse en la elaboración de bebidas solubles de cacao y productos de pastelería, entre otros. La manteca de cacao se puede volver a añadir a preparados de cacao o destinarse a la formulación de cosméticos (27).

1.3 Composición

La composición nutricional del cacao depende de la variedad, origen geográfico y cultivo, así como de su procesado. La **Tabla 1** muestra el promedio de nutrientes de los tres productos principales derivados de las semillas.

Tabla 1 | Información nutricional media por 100 g de cacao (adaptada de (27)).

<i>Nutrientes</i>	<i>Pasta</i>	<i>Polvo</i>	<i>Manteca</i>
Valor energético	2180 kJ 521 kcal	862 kJ 206 kcal	3495 kJ 835 kcal
Agua	1 g	4 g	0,1 g
Lípidos	55 g	11 g	99,9 g
Saturados	34 g	6,8 g	62 g
Monoinsaturados	19 g	3,8 g	35 g
Poliinsaturados	1,9 g	0,4	3,5 g
Glúcidos	7 g	14 g	0 g
Azúcares	0,5 g	1 g	-
Almidón	6,5 g	13 g	-
Fibra	17 g	34 g	0 g
Proteínas	12 g	22 g	0 g
Vitaminas			
A (retinol)	< 15 µg	< 15 µg	27 µg
B1 (tiamina)	0,1 mg	0,1 mg	-
B2 (riboflavina)	0,3 mg	0,5 mg	-
B3 (niacina)	1,0 mg	2,0 mg	-
B5 (ácido pantoténico)	2,1 mg	4,0 mg	-
C (ácido ascórbico)	< 0,1 mg	< 0,1 mg	-
E (tocoferol)	12 mg	2,3 mg	32 mg
Minerales			
Potasio (K)	1000 mg	2000 mg	20 mg
Calcio (Ca)	80 mg	150 mg	0,25 mg
Magnesio (Mg)	300 mg	550 mg	0,5 mg
Fósforo (P)	400 mg	700 mg	25 mg
Hierro (Fe)	18 mg	35 mg	0,03 mg
Zinc (Zn)	4 mg	7 mg	-
Cobre (Cu)	2 mg	4 mg	0,01 mg
Metilxantinas			
Teobromina	1,1 g	2,1 mg	-
Cafeína	0,1 g	0,2 mg	-

Macronutrientes

I. Lípidos

Los lípidos representan el nutriente mayoritario del grano de cacao con un 40-50% de su peso en seco y una media del 55% en la pasta de cacao. Aproximadamente, el 60% son ácidos grasos saturados (ácido esteárico y ácido palmítico), el 37% son monoinsaturados (ácido oleico) y tan solo un 3% son poliinsaturados (ácido linoleico) (**Tabla 2**). Más de un 70% están formando triglicéridos (TG) y hasta un 90% son simétricos (saturado, insaturado, saturado) (28,29). Al ser una grasa vegetal, el aporte de colesterol es de tan solo del 3% (27).

La composición y organización específica de los ácidos grasos confieren a la manteca de cacao unas propiedades de cristalización y de fusión particulares. Además, la baja concentración de ácidos grasos poliinsaturados y la presencia de vitamina E le proporcionan una alta resistencia a la oxidación a temperaturas de hasta 80°C. Estas características son muy apreciadas en la industria alimentaria, tanto a nivel tecnológico como organoléptico (28,30).

Tabla 2 | Perfil de ácidos grasos de la manteca de cacao (adaptada de (31)).

<i>Tipo de ácidos grasos</i>	<i>%</i>
AG. Saturados	57 – 64
A. esteárico (C18:0)	34 – 40
A. palmítico (C16:0)	25 – 34
A. araquídico (C20:0)	1
A. mirístico (C14:0)	0 – 4
A. láurico (C12:0)	0 – 1
AG. Monoinsaturados	33 – 40
A. oleico (18:1)	26 – 35
A. palmitoleico (C16:1)	0 – 4
AG. Poliinsaturados	2 – 5
A. linoleico (18:2)	2 – 3
A. α -linolénico (C18:3)	0 – 1
Otros	1 – 2

II. Glúcidos

Si el procesado de los granos de cacao ha sido adecuado, la presencia de monosacáridos y disacáridos en los productos es residual. El glúcido principal es el almidón, un polisacárido de reserva de la planta con un 36% de amilosa y 64% de amilopectina aproximadamente (32). En la pasta de cacao los glúcidos representan alrededor de un 7% (27).

III. Fibra

La fibra cumple una función estructural en las plantas y, por tanto, se encuentra en cantidades considerables en la mayoría de los alimentos vegetales, incluido el cacao.

La mayor parte se concentra en la cáscara del grano, que está formada por hasta el 90% de fibra. En consecuencia, la cantidad presente en los productos del cacao dependerá, en parte, del grado de descascarillado del grano. Los granos de cacao pueden contener hasta un 60% de fibra, pero se puede ver reducido a un 17% en la pasta por la pérdida de cáscara durante el proceso (33). El porcentaje de fibra en el cacao en polvo dependerá de la porción lipídica extraída. Si se compara con alimentos como las frutas (1-3%), las verduras (0,6-16%), las legumbres (2-18%) y los cereales (0,7-17%), el cacao es un alimento rico en fibra (34).

En cuanto a las características de la fibra de cacao, la fracción insoluble representa casi el 88% del total de fibra (TF) en la cáscara del grano, compuesta por lignina Klason (35%) y polisacáridos no amiláceos, principalmente celulosa (22%) y, en menor cantidad, hemicelulosa. Aproximadamente el 12% restante es fibra soluble formada en su mayoría por pectinas (35,36). La composición de fibra en el cacao en polvo es similar con aproximadamente un 83% de fibra soluble, formada mayormente por lignina Klason (65%), celulosa y hemicelulosas procedentes de restos de cáscara. Algo menos del 17% restante es fibra soluble, en su mayoría pectinas (69%) (33).

IV. Proteínas

La cantidad de proteínas de los granos de cacao puede oscilar entre un 10 y un 16%, dependiendo de factores genéticos y geográficos. Habitualmente, el cacao Criollo suele

contener alrededor de un 10% de proteína, el Forastero un 10-11% y el Trinitario un 9-11%. Tanto la cantidad como la calidad proteica se ven influenciadas por las prácticas agrarias del procesado. Los nibs suelen contener un 12,5% de proteína media, valor muy similar al de la pasta de cacao con un 12%. Las proteínas de reserva vicilina y albúmina son las más abundantes de la semilla, con un 3,9% y 11,5% del contenido total respectivamente (37).

Micronutrientes

Las vitaminas hidrosolubles más abundantes en el cacao son la riboflavina (B₂), con una media de 0,5 mg/100 g de cacao en polvo (36% VRN) o 0,3 mg/100 g de pasta de cacao (21% VRN), y el ácido pantoténico (B₅), con 4 mg/100 g de cacao en polvo (67% VRN) o 2,1 mg/100g de pasta de cacao (35% VRN) (27,38). En la manteca de cacao se encuentran, además, las vitaminas liposolubles A, E y D, en concentraciones variables dependiendo del origen del cacao, la variedad y el procesamiento al que ha sido sometido. La vitamina E es la más abundante con concentraciones que oscilan entre los 10-30 mg/100 g de grasa (83-250% VRN) o 12 mg/100 g de pasta de cacao (100% VRN). El isómero mayoritario es el γ -tocoferol (85%), seguido del α -tocoferol (10%) y el δ -tocoferol. En la semilla, la vitamina E cumple la función de prevenir la oxidación de los ácidos grasos (28,38–40). En cuanto a la vitamina D en el cacao, prácticamente su totalidad se encuentra en forma de vitamina D₂, con valores de 4,3 μ g/100g de manteca (86% VRN), 2,3 μ g/100g de pasta de cacao (46% VRN) y 1,6 μ g/100g de cacao en polvo (32% VRN)(38,41). Si se compara con alimentos como la yema de huevo (5,58 μ g/100g) y el atún (4,54 μ g/100g), el cacao también podría ser considerado una buena fuente de vitamina D. La presencia de esta vitamina en la semilla se debe a la contaminación fúngica durante el procesado. Esto aumenta la presencia de ergosterol que, posteriormente, se convierte a vitamina D₂ por la acción de la luz solar y se acumula en la fracción grasa del grano. Por lo tanto, la concentración de vitamina D₂ depende, en gran medida, de las condiciones del procesado, variando según la contaminación fúngica durante la manipulación y el tiempo de exposición e intensidad de la irradiación solar en el secado (41).

En cuanto a los minerales, la pasta de cacao (55% MG) aporta una media (por 100 g) de 1000 mg de K (50% VRN), 80 mg de Ca (10% VRN), 300 mg de Mg (80% VRN), 400 mg de P (57% VRN),

18 mg de Fe (128% VRN), 4 mg de Zn (40% VRN) y 2 mg de Cu (200% VRN) (27,38). Si se compara con otras fuentes de minerales de origen vegetal como los cereales (445 mg K; 44 mg Ca; 120 mg Mg; 580 mg P; 8,3 mg Fe; 5,45 mg Zn y 0,74 Cu por 100 g), se observa que el cacao contiene cantidades importantes de minerales (42).

Compuestos fenólicos

Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas almacenados en las células pigmentarias de los cotiledones. Proporcionan coloraciones amarillas, rojizas y moradas a una gran variedad de flores, frutas, verduras y cereales. Además, participan en funciones clave para la planta, como el crecimiento, reproducción y protección frente a patógenos y radiación UV (43). Los polifenoles se caracterizan por tener múltiples grupos fenol que suelen encontrarse unidos a glúcidos (glucósidos), dando lugar a más de 8000 compuestos bioactivos. Según su estructura química, pueden dividirse en dos grandes grupos, no-flavonoides y flavonoides.

Dentro de los no-flavonoides, los ácidos fenólicos constituyen el grupo principal. Estos pueden clasificarse en los derivados del ácido benzoico o del ácido cinámico (44). Los flavonoides, son los polifenoles más abundantes y se subdividen en isoflavonas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles y antocianinas (**Fig. 3**) (45).

En las semillas de cacao, los flavonoides son los polifenoles más abundantes. Se encuentran en forma de proantocianidinas (58%, formas oligómeras de flavonoides), flavanoles como (-)-epicatequina (35%) y, en menor proporción, (+)-catequinas y antocianinas (4%). En cuanto a los polifenoles no-flavonoides, las semillas contienen derivados del ácido hidroxibenzoico, como el ácido gálico y p-hidroxibenzoico, y del ácido hidroxicinámico, principalmente ácido cafeico y felúrico (12).

La cantidad total de polifenoles presentes en el cacao depende de varios factores, como la variación genética inter e intravarietal e incluso individual. La zona geográfica y región de cultivo determinan las condiciones ambientales (como el suelo y el clima) y las prácticas agrarias, que influyen en el cultivo, la recolección y el procesado del cacao. El resultado es una maduración, tamaño de la vaina y composición química de la semilla particulares (45,46).

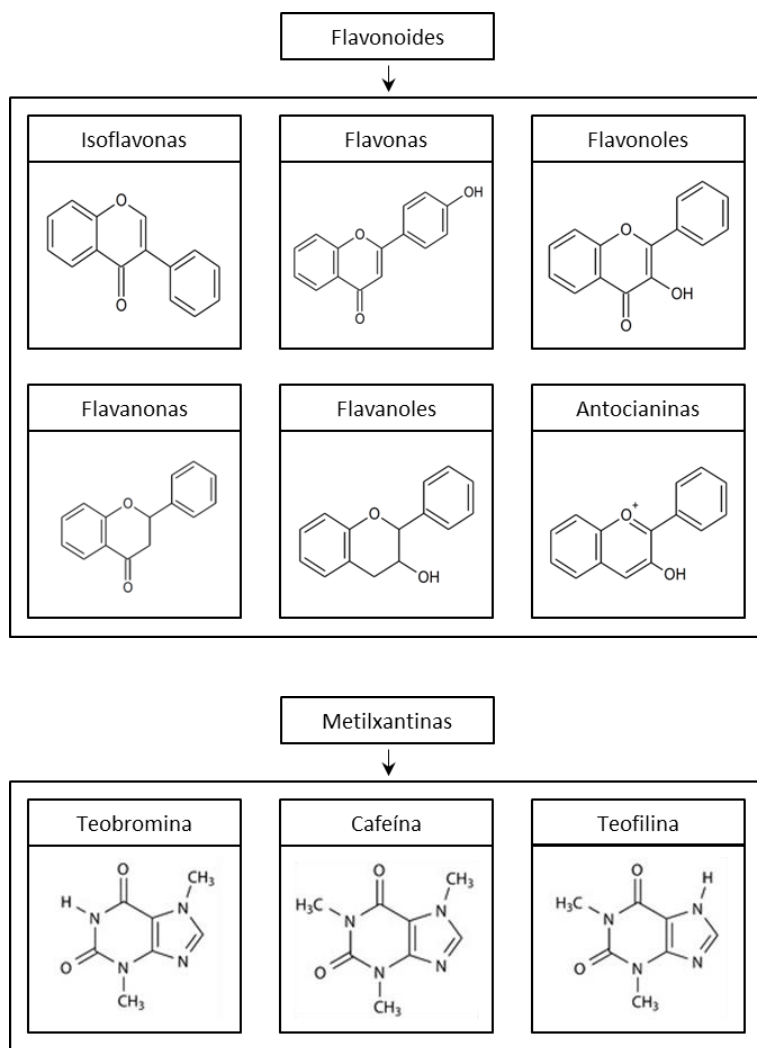


Fig. 3 | Flavonoides y metilxantinas.

En cualquier caso, la mayor concentración de polifenoles se encuentra cuando el fruto está verde y va disminuyendo al madurar y durante el procesado de las semillas. La fermentación produce pérdida de polifenoles. Las (+)-catequinas, (-)- epicatequinas se oxidan a quinonas, principalmente por la acción de la enzima polifenol oxidasa, y se unen a otros compuestos fenólicos, aminas o péptidos formando pigmentos amarillos-marrones. Esta polimerización resulta en moléculas de alto peso molecular conocidas como taninos o taninos condensados

(proantocianidinas) menos digeribles que las formas monoméricas. En conjunto la concentración de (+)-catequinas y (-)-epicatequinas se reduce en un 10-70%. Paralelamente las antocianinas son hidrolizadas mediante la enzima glucosidasa y los productos resultantes, conocidos como antocianidinas, polimerizan formando proantocianidinas. Tras 4 días de fermentación la concentración de antocianinas se reduce un 94% aproximadamente y, si el proceso se prolonga, las proantocianidinas se degradan a compuestos aromáticos de menor peso molecular. Al finalizar el proceso, la concentración total de polifenoles solubles de la semilla se ve reducida en un 10-50%. Durante el secado, la actividad enzimática de la polifenol oxidasa disminuye a tan solo un 2% residual, pero se inicia la oxidación no enzimática (12). Se estima que con los procesos de fermentación y secado se puede llegar a reducir la cantidad total de (+)-catequinas en un 90%.

La pérdida de (+)-catequinas y (-)-epicatequinas continua durante el tostado, debido a las altas temperaturas y el tiempo prolongado del proceso, la molienda de las semillas y en el conchado de la pasta de cacao (47). La alcalinización que se aplica en ocasiones aumenta la polimerización de los flavonoides y, por tanto, disminuye la cantidad de monómeros libres. Sin embargo, las pérdidas de flavonoides producidas a lo largo del proceso conllevan una reducción en la astringencia y amargura del cacao que se busca intencionadamente en la industria alimentaria ya que favorece el sabor y aceptación del cacao (12).

Metilxantinas

Las metilxantinas son alcaloides con una base púrica producidos como metabolitos secundarios de las plantas. La cafeína es la más abundante en el café (*Coffea sp.*), la teofilina en el té (*Camelia sinensis*) y la teobromina en el cacao (*Theobroma cacao*). Aunque la teobromina es la mayoritaria en el cacao, también se hallan, en menor proporción, cafeína y teofilina. De hecho, sus concentraciones varían de nuevo según el genotipo, región de cultivo y procesado de las semillas (**Fig. 3**) (48). Se considera que la teobromina representa entre un 0,8 y un 2% del peso seco del grano o alrededor de un 4% en la manteca de cacao; mientras que la cafeína es un 0,2% aproximadamente. Las metilxantinas no sufren transformación durante el proceso de fermentación, sin embargo, se ha visto una migración al exterior y difusión con pérdidas de hasta

un 30%. Al igual que con los polifenoles, la pérdida de metilxantinas reduce la astringencia y amargor del cacao (49).

1.4 Efectos de los compuestos bioactivos del cacao sobre la salud

El cacao contiene compuestos bioactivos como los polifenoles, las metilxantinas y sus derivados, y la fibra. Sus efectos sobre la salud vienen condicionados por su biodisponibilidad (48,50).

Los flavonoides presentes en el cacao en forma de monómeros, dímeros y trímeros pueden ser absorbidos en el intestino delgado (yeyuno), donde sufren reacciones de metilación y glucuronización. Posteriormente, son transportados al hígado donde pueden de nuevo ser metilados, glucuronizados o sulfatados y ser devueltos a la circulación sanguínea, para finalmente excretarse por vía renal (orina) o hepática (bilis). Los flavonoides más polimerizados como las procianidinas llegan intactos hasta el colon donde pueden ser metabolizados por la microbiota intestinal, dando lugar a compuestos más activos. Los flavonoides que no pueden ser absorbidos en el tracto gastrointestinal se eliminan en las heces. La biodisponibilidad también se ve influenciada por la propia matriz del alimento y por la interacción con otros alimentos consumidos en la misma comida (51,52).

Las metilxantinas, en cambio, se absorben fácilmente en el tracto gastrointestinal y se distribuyen por todo el organismo. Se metabolizan en el hígado y son sometidas a un reciclaje continuo hasta ser eliminadas en orina (48,53).

La estructura química de los flavanoles le confiere al cacao la propiedad de neutralizar radicales libres, actuar como quelantes de metales neutralizando o reduciendo su poder oxidante (54). Pero más allá de aumentar el sistema de defensa antioxidante, el cacao también puede ejercer su efecto mediante otros mecanismos celulares (51).

Numerosos estudios clínicos han asociado el consumo de cacao con la reducción del riesgo cardiometabólico, debido a los efectos del cacao en la disminución de la agregación plaquetaria, la regulación de la presión arterial, la mejora en el perfil lipídico (incrementa el colesterol HDL y

disminuye el LDL) y el incremento de la sensibilidad a la insulina. Estos efectos se deben principalmente a la reducción de la oxidación de lípidos, el aumento de óxido nítrico (NO) y la modulación de mediadores de la inflamación (51,53,55).

Estudios clínicos y epidemiológicos han atribuido efectos positivos del consumo de cacao sobre la función cognitiva como la atención, la memoria y la velocidad de procesamiento. Los mecanismos de acción se relacionan con la capacidad del cacao de mejorar el riego sanguíneo y la perfusión cerebral, y a la interacción de los flavonoides con las vías de señalización que fomentan la función neuronal y la conectividad cerebral (48,56).

La fibra es otro de los compuestos bioactivos presentes en el cacao. Estudios clínicos han demostrado la capacidad de la fibra de cacao para aumentar la motilidad intestinal, reduciendo el tiempo de tránsito en el colon y mejorando la consistencia de las heces, lo que disminuye el tiempo de permanencia de toxinas en el colon y en consecuencia reduce el riesgo de cáncer colorrectal (57). También se ha comprobado su capacidad para modificar la microbiota colónica favoreciendo la proliferación de ciertas cepas beneficiosas (56).

Además, estudios preclínicos e *in vitro* evidencian efectos inmunomoduladores del cacao.

1.4.1 Efectos del cacao sobre el sistema inmunitario

La influencia que ejerce una dieta rica en cacao sobre la funcionalidad del sistema inmunitario ha sido objeto de estudio del grupo de investigación de Autoinmunidad, Inmunonutrición y Tolerancia durante los últimos 20 años. A partir de los resultados obtenidos, se demuestra que el cacao tiene propiedades inmunomoduladoras tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* (58–62).

Numerosos estudios *in vitro* han demostrado que el cacao es capaz de inhibir la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (63), mostrando efectos protectores en células neuronales (64,65) y β -pancreáticas sometidas a estrés oxidativo (66–69). Asimismo, el cacao es capaz de modular moléculas inflamatorias, como TNF- α , MCP-1 y NO secretadas por macrófagos (65,70). Formas monoméricas de flavonoides del cacao, como la epicatequina, son capaces de inhibir la producción de IL-6 e IL-8 (71) e incrementar la de IL-4 (72), mientras que el cacao y/o sus

flavonoides poliméricos aumentan la producción de TNF- α , IL-1 e IL-6 (73,74) y reducen la transcripción de IL-2 en células sanguíneas estimuladas (75). También se ha observado la reducción de la activación del factor de transcripción NF- κ B por flavonoides mono- y diméricos del cacao en una línea celular linfoide (76). Debido a la implicación de NF- κ B en la regulación de la expresión genética de mediadores inflamatorios, su inhibición es uno de los mecanismos por los que se considera que el cacao reduce la secreción de citocinas proinflamatorias.

Los estudios preclínicos se han focalizado en evaluar la composición leucocitaria, la concentración de anticuerpos y las citocinas secretadas en animales alimentados con dietas ricas en cacao. Así, el consumo de dietas al 10% de cacao durante al menos 3-4 semanas disminuyó la formación de ROS (77) y la secreción de TNF- α en macrófagos peritoneales, así como la concentración sérica de MPC-1 en ratas (77). La producción de IFN- γ por parte de linfocitos de ganglios linfáticos mesentéricos de rata también se redujo tras el consumo de una dieta rica en cacao durante 3 semanas (78), sin embargo, no se observaron variaciones en la producción de IFN- γ por parte de los linfocitos de bazo (79). La reducción de la activación de NF- κ B también se demostró en ratas alimentadas con una dieta al 10% de cacao durante 10 semanas (80). Por otro lado, se detectó una reducción en la secreción de IL-4 en los linfocitos activados de ganglios linfáticos de animales que consumieron una dieta rica en cacao durante 3 semanas y en linfocitos del bazo en intervenciones nutricionales de 3 y 9 semanas, indicando una posible reducción en la activación de linfocitos Th2 (79,81).

La composición de los linfocitos y su función también se han visto modificadas por dietas ricas en cacao, con diferentes efectos según el órgano estudiado, el periodo de consumo de la dieta y su concentración en cacao. En el timo, el cacao ha demostrado promover la maduración de linfocitos TCR $\alpha\beta$ aumentando el porcentaje de células CD4⁺CD8⁻ (82). En el bazo, el consumo de una dieta al 10% de cacao durante 8 días incrementó la proporción de células Th, disminuyó la de linfocitos Tc y no afectó a la proporción de células B (83), sin embargo, la misma dieta durante 3 semanas redujo la proporción de células Th y aumentó la de células B (79). En el compartimento intestinal, la proporción de linfocitos Th disminuyó en ganglios linfáticos mesentéricos y placas de Peyer tras intervenciones nutricionales de 3 a 4 semanas con dietas ricas en cacao (81,83–85). En cuanto a la funcionalidad, el consumo de dietas con un 10% de cacao durante al menos 3 semanas en ratas de 3 semanas de edad también modificó la

concentración de inmunoglobulinas (Ig) a nivel sistémico, reduciendo la concentración sérica de anticuerpos IgM, IgG e IgA (271, 286). No obstante, la influencia de la intervención nutricional resultó menor en animales que iniciaron la dieta con más edad (6 semanas). El análisis en detalle de los isotipos de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c) reveló una modulación diferente de sus concentraciones según el porcentaje de cacao, la edad de inicio y el tiempo de consumo de la dieta: una dieta al 10% de cacao durante 3 semanas en ratas de 6 semanas de edad disminuyó la concentración de IgG2a sérica sin influir en el resto de los isotipos, mientras que la dieta al 5% de cacao en las mismas condiciones disminuyó la concentración de IgG2a y aumentó la de IgG2c (61). Al iniciar una dieta al 10% de cacao a las 4 semanas de edad y extender su consumo durante 7 semanas se obtuvo una reducción de la concentración de IgG2b sin afectar al resto de los isotipos (86). A nivel intestinal los efectos de la intervención nutricional con cacao son consistentes, mostrando una reducción del contenido de IgA mucosal tras consumir dietas al 5-10% de cacao durante al menos 3 semanas (61,81,84,86,87).

Se ha establecido la influencia de la teobromina en los efectos inmunorreguladores del cacao a nivel sistémico e intestinal (83). Así, una dieta enriquecida al 0,25% de teobromina mostró resultados similares a los obtenidos con una dieta al 10% de cacao, la cual aporta la misma cantidad de teobromina: incremento en la proporción de linfocitos Th y disminución de la de linfocitos Tc en bazo y reducción de la producción de anticuerpos IgM, IgG e IgA sistémicos e IgA intestinal.

Más recientemente, Ruiz-Iglesias *et al.* (78,88) ha demostrado el efecto inmunomodulador de una dieta al 10% de cacao en ratas sometidas a un ejercicio intenso agudo. La intervención nutricional durante 4 semanas atenuó el incremento de la proporción de células Th y el descenso de linfocitos Tc inducido por el ejercicio en los ganglios linfáticos mesentéricos, a más de reducir la producción de ROS en macrófagos peritoneales. La dieta, sin embargo, no influyó en el descenso de inmunoglobulinas IgG provocado por el ejercicio.

En cuanto a los ensayos clínicos que abordan los efectos del cacao en el sistema inmunitario, hasta la fecha se han focalizado principalmente en su acción antiinflamatoria. El consumo regular de chocolate negro se ha asociado a una reducción de la proteína C-reactiva en plasma, molécula utilizada habitualmente como marcador de inflamación (89). Resultados similares se

han descrito en un estudio en adultos obesos que recibieron una bebida de cacao durante 5 días, mostrando una reducción de proteína C-reactiva e IL-6 (90). Además, una única dosis de cacao en polvo (40 g) mostró inhibir la activación de NF- κ B en individuos sanos a las 6 h de su consumo (91). En cambio, en otro estudio no se encontraron efectos en la proteína C-reactiva ni en la concentración de las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 tras el consumo de chocolate negro (40 g) o cacao en polvo (41 g) durante 6 semanas (92).

1.4.2 Efectos del cacao sobre la respuesta alérgica

La capacidad inmunomoduladora del cacao permitió establecer la hipótesis de que el cacao podía ejercer un efecto positivo en trastornos mediados por el sistema inmunitario, como en los casos de hipersensibilidad. Por ello, se llevaron a cabo diversos estudios preclínicos con el objetivo de evaluar el efecto de dietas ricas en cacao en animales alérgicos.

Abril-Gil *et al.* (93) ha demostrado que el consumo de una dieta con un 10% de cacao durante 4 semanas era capaz de atenuar el incremento de la concentración sérica de los anticuerpos específicos IgG1, IgG2a e IgE (inmunoglobulinas asociadas a la respuesta Th2) en ratas Brown Norway sensibilizadas a ovoalbúmina (OVA) por vía intraperitoneal. El cultivo de linfocitos de ganglios linfáticos mesentéricos de estos animales mostró una reducción en la secreción de TNF- α e IL-10, mientras que incremento la de IL-4. Un estudio similar con ratas Wistar alimentadas durante 9 semanas con dietas al 4% o al 10% de cacao, también mostró una reducción en la producción de anticuerpos anti-OVA asociados a la respuesta inmunológica Th2 (IgG1, IgG2a e IgG2c) (94). Además, la dieta al 10% de cacao aumentó la producción de IgG2b, relacionada con una respuesta Th1. Sin embargo, el protocolo de sensibilización aplicado en este estudio no logró inducir la síntesis de IgE y no se pudo evaluar el efecto de la dieta rica en cacao sobre este anticuerpo. En cuanto a la secreción de citocinas IL-4 por parte de linfocitos cultivados y activados, no se modificó cuando estos procedían de ganglios linfáticos mesentéricos, sin embargo, la secreción disminuyó en los linfocitos procedentes del bazo de animales alimentados con la dieta al 4% de cacao (94). Por su parte, Camps-Bossacoma *et al.* (84,95) demostró resultados similares en ratas Lewis sensibilizadas mediante la administración oral de OVA. Las ratas que recibieron una dieta al 10% de cacao durante 4 semanas tuvieron un

incremento menor de los anticuerpos específicos IgG1, IgG2b e IgM en suero. La dieta también provocó el descenso de IgA sérica e intestinal total de forma independiente a la sensibilización.

También se ha evaluado el efecto de la ingesta de una dieta al 10% de cacao en ratas a las que se les indujo una alergia alimentaria a OVA mediante sensibilización intraperitoneal y posterior administración oral del alérgeno (96). El resultado fue una atenuación del incremento de las concentraciones séricas de IgG1, IgG2a e IgE específicas. La dieta rica en cacao también logró reducir el contenido de proteasa II en suero, liberada por la degranulación de mastocitos. En paralelo, el estudio analizó el efecto de una dieta rica en flavonoides de cacao no fermentado a la misma concentración de polifenoles que la dieta al 10% de cacao. Esta dieta también mostró una reducción en la concentración de anticuerpos específicos pero el efecto fue más débil. Ambas dietas paliaron el incremento de IL-5 e IL-13 en linfocitos de ganglios linfáticos mesentéricos, sin embargo, tan solo la dieta rica en cacao evitó el incremento de IL-2 e IL-4 en linfocitos de bazo.

2. Asma alérgica

El asma bronquial es una enfermedad respiratoria crónica, no-comunicable y muy heterogénea caracterizada por la inflamación de las vías respiratorias que transcurre con hiperreactividad bronquial y una obstrucción reversible al paso del aire. Entre los síntomas y signos se encuentran tos, respiración entrecortada, estornudos, opresión en el pecho y sibilancias. La sintomatología es variable en cuanto a intensidad y duración, dependiendo de los factores desencadenantes, y puede resolverse de forma espontánea o requerir de medicación (97).

2.1 Epidemiología

El asma afecta a unos 358 millones de personas en todo el mundo, con una prevalencia que va del 1 al 22% de la población según el país, y se prevé que la cifra ascienda a 400 millones para 2025. Actualmente ocupa la decimosexta posición en el ranking mundial de años vividos con discapacidad, la vigésimo octava en carga de enfermedad y se le otorgan unas 490.500 muertes anuales. Contribuye notablemente al número de casos de emergencia y hospitalización en centros de salud y causa numerosas ausencias escolares y bajas laborales. Además, el asma presenta diversas comorbilidades, entre las más frecuentes se encuentra rinosinusitis, reflujo gastroesofágico, apnea obstructiva del sueño y trastornos psicológicos. En consecuencia, el asma ejerce un impacto importante en la salud y la calidad de vida de los individuos afectados y consume un número elevado de recursos del sistema sanitario (97–99).

La prevalencia del asma difiere considerablemente entre países, aunque debido a la dificultad de definir y evaluar sus síntomas es difícil hacer comparaciones. El asma bronquial representa la enfermedad crónica más común en la etapa infantil. Se estima que, a nivel mundial, el 11,7% de los niños y niñas de 6-7 años y el 14,1% entre los adolescentes de 13-14 años sufren de asma, de los cuales un ~80% de los casos serían de fenotipo alérgico (98).

La mortalidad relacionada con el asma es mayor en países en vías de desarrollo, sin embargo, la prevalencia es más elevada en los países desarrollados (100). En estos países con alta prevalencia, como Europa occidental, se ha observado una reducción de los síntomas en niños

en los últimos años, mientras que se han incrementado en regiones donde la prevalencia solía ser baja, como África, América Latina, Europa oriental y Asia, y la tendencia sigue al alza (101). Las zonas que en los últimos años han pasado de ambiente rural a ambiente urbano, con mayor índice demográfico, tráfico de vehículos y áreas industriales, son las que fundamentalmente contribuyen a este aumento. Los últimos datos recogidos muestran una prevalencia de asma infantil superior en Latinoamérica, con un 17,4% de afectación en menores de 6 a 7 años, que en países de Europa occidental como España, con un 9,6% (101).

Perú, se encuentra entre los países con mayor prevalencia de asma en el mundo. Un estudio epidemiológico a nivel mundial, “The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)” (101), declara que, en Lima en el periodo de 2000-2003, la prevalencia era del 9,8% en adolescentes de 13-14 años, y estudios posteriores han mostrado una prevalencia del 16,7% entre 6-18 años, con mayor prevalencia en varones (102). A pesar de que la enfermedad suele precisar tratamiento farmacológico a largo plazo o de por vida, casi un 30% de los individuos con sintomatología asmática no asiste a consulta médica por trastornos respiratorios, y menos de la mitad han usado un dispositivo de inhalación para tratar los síntomas (102).

2.2 Etiopatogenia del asma alérgica

2.2.1 Endotipos y fenotipos de asma

Los factores causales del asma no están del todo claros. La predisposición genética junto con factores ambientales, como la exposición a alérgenos, contaminantes o infecciones entre otros serían los principales responsables.

Durante décadas se ha considerado que el asma se manifestaba en forma de dos fenotipos¹ principales, asma atópica o “extrínseca”, que normalmente se iniciaba durante la niñez o adolescencia, y asma no atópica o “intrínseca”, que se desarrollaba en edades más avanzadas. Posteriormente se han definido fenotipos adicionales en función de la gravedad, los

¹ *Propiedades observables de un organismo producidas por la interacción del genotipo y los factores ambientales.*

desencadenantes de los síntomas, la edad de inicio o el grado de obstrucción al flujo del aire. No obstante, este método no permitía distinguir claramente cada fenotipo porque muchos de ellos se solapaban. Actualmente se utiliza metodología de biología de sistemas que mitiga los sesgos mediante algoritmos que integran el efecto de múltiples componentes para describir y predecir los fenotipos y los mecanismos moleculares subyacentes (endotipos) del asma. El consenso actual establece dos endotipos principales, Th2 alto y no-Th2 alto, que incluyen diversos fenotipos. Algunos de los más comunes son los siguientes (100,103,104):

I. Asma Th2 alto

Se caracteriza por el desarrollo de una inflamación eosinofílica mediada por linfocitos Th2 (inflamación tipo 2). Incluye, a su vez:

- **Asma alérgica de inicio temprano:** Antiguamente referida como asma atópica. Se desarrolla principalmente durante la niñez, aunque también puede aparecer durante la adolescencia o edad adulta. Representa aproximadamente el ~70% de los fenotipos asmáticos (105). Se distingue por presentar IgE totales y específicas elevadas en suero y esputo, y habitualmente muestra resultados positivos en test cutáneos de alérgenos (100).
- **Asma eosinofílica de inicio tardío:** Suele iniciarse en edad adulta. Con un mecanismo molecular no muy claro se caracteriza por presentar IL-5 elevada y eosinofilia en suero y esputo, y en ocasiones neutrofilia. Suele ser refractaria a corticosteroides (103).

II. Asma no-Th2 alto o Th2 bajo

Denominada históricamente como asma no atópica, comprende una serie de fenotipos en los que no predomina una inflamación subyacente de tipo 2. Suele presentar una inflamación neutrofílica mediada por linfocitos Th1 y/o Th17 (104).

- **Asma asociada a obesidad:** no está muy claro si la obesidad es la causa del asma o se desarrolla como morbilidad asociada. Afecta mayoritariamente a mujeres adultas y suelen presentar resistencia al tratamiento con corticosteroides (104).
- **Asma asociada a fumar:** El mecanismo subyacente no está claro, pero se considera que incluiría modificaciones epigenéticas por estrés oxidativo que activarían neutrófilos y macrófagos (100).
- **Asma de inicio muy tardío:** se desarrolla principalmente a partir de los 50 años y su mecanismo tampoco está claro, aunque una de las características distintivas serían la pérdida de funcionalidad pulmonar propia del envejecimiento debido a la reducción de elasticidad del tejido (104).

2.2.2 Asma alérgica y sistema inmunitario

El sistema inmunitario incluye células, tejidos y productos derivados que llevan a cabo la defensa del organismo contra agentes que reconoce como extraños (antígenos) (106). Los antígenos que desencadenan una reacción inmunitaria específica de tipo alérgica, también denominada reacción de hipersensibilidad inmediata o de tipo I, se conocen como **alérgenos**. Normalmente son antígenos ambientales no microbianos producidos por animales o plantas, sustancias químicas o fármacos que causan la activación de linfocitos Th2 y la producción de anticuerpos IgE (105). Algunos de los alérgenos más comunes causantes de asma son polen, ácaros del polvo doméstico, epidermis de mascotas, contaminantes químicos del aire y alimentos (107) .

Las principales células patogénicas que participan en el desarrollo y transcurso del asma alérgica se resumen a continuación (98,105,106):

I. Células dendríticas (DC):

Células presentadoras de antígenos (APC) que inician la respuesta inmunitaria innata y la transita a una respuesta adaptativa. Captan antígenos, como los alérgenos, procedentes de la

superficie del epitelio de las mucosas y los conducen a los ganglios linfáticos, donde los presentan a los linfocitos T vírgenes e inducen la diferenciación de células T *helper* 2 (Th2) y la producción de sus citocinas típicas como IL-4, IL-5 e IL-13.

II. Mastocitos:

Participan en la respuesta inflamatoria en respuesta a infecciones por helmintos y en reacciones alérgicas. Se encuentran en número elevado en la piel y en el epitelio de mucosas. Se caracterizan por expresar, en su membrana celular, receptores de IgE de alta afinidad (FcεRI). La unión de la IgE ligada a FcεRIC y al antígeno causa la desgranulación de mastocitos, liberando el contenido de sus gránulos citoplasmáticos cargados de mediadores inflamatorios como histamina y proteasas, y sintetizando leucotrienos y prostaglandinas con efecto broncoconstrictor.

III. Eosinófilos:

Se encuentran en sangre y tejidos, sobre todo en los recubrimientos mucosos como las vías respiratorias. Su activación a través receptores de membrana para IgA, IgG e IL-5, entre otros, libera el contenido de sus gránulos con un amplio abanico de enzimas proteolíticas, ROS, leucotrienos y proteínas que dañan las paredes celulares de los parásitos y las células epiteliales de la vía respiratoria. En general, el paciente asmático suele presentar eosinofilia en las vías respiratorias.

IV. Macrófaos (MΦ):

Se encuentran en los tejidos tanto de forma residente, actuando como centinelas, como reclutados puntualmente en la zona de inflamación. Actúan como células fagocíticas, APC y promotoras de la reparación de tejido dañado.

Son células con una gran plasticidad y polaridad, capaces de cambiar de fenotipo según las señales y estímulos que reciben del ambiente (**Tabla 3**). El número de macrófaos aumenta en

el tracto respiratorio del paciente asmático, especialmente en casos graves. Su presencia se relaciona con la persistencia del asma.

Tabla 3 | Fenotipos de macrófagos según el estímulo necesario para su activación, las citocinas que secretan y sus principales actividades biológicas (108–110)

Estímulo	Fenotipo MΦ	Citocinas producidas	Funciones
LPS, TNF- α , IFN- γ , GM-CSF	M1	TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23	Respuesta Th1 Inflamación tipo 1 (antimicrobiana)
IL-4, IL-13, GM-CSF	M2a	IL-10, TGF- β	Respuesta Th2 Inflamación tipo 2 Inflamación alérgica
IL-1 β , IL-6, Ligandos de TLR	M2b	TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10	Respuesta Th2 Remodelación de tejido Fibrosis
IL-10, TGF- β , PG, glucocorticoides	M2c	IL-10, TGF- β ,	Remodelación de tejido Fibrosis Anti-inflamación
Ligandos de TLR, ligando de receptores de adenosina	M2d	IL-10	Angiogénesis

GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos; IFN, interferón; IL, interleucina; LPS, lipopolisacárido; TGF, *transforming growth factor*; TLR, *toll-like receptor*; TNF, factor de necrosis tumoral.

V. Neutrófilos:

Son los leucocitos más abundantes en sangre y son fundamentales en las reacciones inflamatorias. Su función principal es la fagocitosis. Contiene gránulos citoplasmáticos con enzimas que expulsan para eliminar patógenos extracelulares y que pueden dañar células de tejido sano.

VI. Linfocitos:

Los linfocitos T y B son las células principales del sistema inmunitario adaptativo. Su función consiste en reconocer antígenos, desencadenar una respuesta inmunitaria específica contra éstos y desarrollar memoria inmunológica específica para iniciar una respuesta más rápida y eficaz en caso de una segunda exposición. En general, el paciente asmático suele presentar linfocitosis en las vías respiratorias.

Los **linfocitos T** proceden de precursores de la médula ósea que migran al timo donde acaban de madurar. En su primera etapa en el timo, los precursores no expresan receptores de célula T (TCR) ni los correceptores CD4 y CD8. Tras una serie de interacciones celulares y selecciones positivas y negativas, los linfocitos maduros expresan TCR CD4+ (Th vírgenes o Th0) o TCR CD8+ (células T citotóxicas o Tc), y abandonan el timo hacia la circulación y los ganglios linfáticos. Los **linfocitos Th** vírgenes se activan cuando interactúan con su antígeno específico presentado por una APC junto con complejo de histocompatibilidad mayor de clase II (MHC-II). El complejo MHC-II/antígeno activa al linfocito Th0 y estimula su diferenciación a células Th efectoras (106). A diferencia de los **linfocitos Tc**, que destruyen la célula infectada mediante la liberación del contenido de gránulos citoplasmáticos, las células Th no destruyen los patógenos por sí solas, sino que secretan un abanico de mediadores que dirigen la respuesta inmunitaria celular activando linfocitos B y otros leucocitos, como los neutrófilos y eosinófilos, que se encargarán de su eliminación.

Dependiendo de los mediadores liberados, los linfocitos Th0 se diferenciarán a (105):

- **Linfocito Th1:** se forman en presencia de citocinas como la IL-12. Los linfocitos Th1 secretan IFN- γ que estimula la activación del M Φ y potencia la destrucción de antígenos mediante la producción de NO y ROS. La activación de M Φ por parte de los linfocitos Th1, se conoce como activación clásica del macrófago y da lugar a macrófagos M1, los cuales liberan quimiocinas reclutadoras de leucocitos proinflamatorios (**Tabla 3**). La activación de Th1 es uno de los mecanismos moleculares subyacentes en el asma no-Th2, pero también se encuentra en menor medida en el asma alérgica.

- **Linfocito Th2:** se forman en presencia de la citocina IL-4, liberada por mastocitos y por las propias células Th2. La diferenciación a Th2 también se produce por la secreción de IL-25 e IL-33 por parte de las células epiteliales. La principal función de esta subpoblación es estimular a los linfocitos B a secretar IgE y activar mastocitos y eosinófilos, principalmente a través de la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13. La liberación de IL-5 estimula específicamente la formación y activación de eosinófilos, mientras que IL-13 incrementa la secreción mucosa por parte de las células caliciformes de las vías respiratorias y digestivas. Tanto IL-4 como IL-13 inducen la secreción de IgE, el reclutamiento de leucocitos, especialmente eosinófilos y la inhibición de M1 (98,105). El MΦ activado mediante este mecanismo se denomina macrófago M2 y pueden tener diversos subtipos (**Tabla 3**). La activación linfocítica Th2 es la predominante en el asma alérgica. Los motivos por los que se activa esta vía no están claros, pero como se ha comentado, la predisposición genética y factores ambientales tendrían un papel importante.
- **Linfocito T regulador (Treg):** su función principal es limitar y suprimir la respuesta inmunitaria, principalmente mediante la secreción de citocinas inmunomoduladoras como la IL-10 y el *transforming growth factor beta* (TGF-β). Participa en el desarrollo de la tolerancia a ciertos antígenos, como partículas del ambiente y alimentos, y en la resolución de la inflamación (106).

Los **linfocitos B** proceden de células madre hematopoyéticas de la médula ósea y su maduración se produce en el mismo tejido. Su función principal es producir inmunoglobulinas contra antígenos específicos. Cuando linfocitos B vírgenes reconocen al antígeno mediante su receptor (BCR), se activan y diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos. Los linfocitos Th activados por el mismo antígeno son necesarios en la proliferación y diferenciación de los linfocitos B. Los anticuerpos formados pueden ser (105,106).

- **IgM:** primer anticuerpo liberado en respuesta a la activación del linfocito. Opsoniza al antígeno para facilitar su destrucción.

- **IgG**: la más abundante en circulación. Facilita la neutralización de toxinas, virus y bacterias mediante la opsonización.
- **IgA**: característica de los tejidos mucosos, protege la superficie impidiendo la entrada de toxinas, virus y bacterias a través del epitelio.
- **IgE**: se forma en la respuesta frente helmintos y los alérgenos. Su síntesis está favorecida por IL-4 e IL-13 secretadas por el linfocito Th2.

2.2.3 Inmunopatogénesis del asma alérgica

El proceso inflamatorio del asma alérgica se resume en la Fig. 4

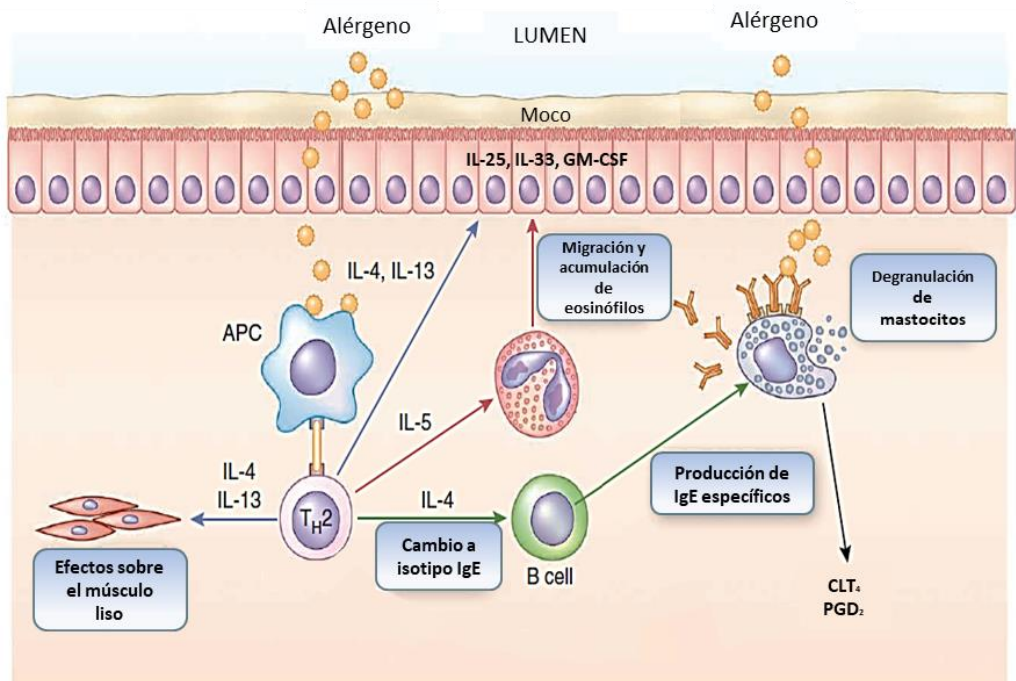


Fig. 4 | Resumen de los procesos involucrados en el asma alérgica. IL, interleucina; Ig, inmunoglobulina; GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; CLT₄, leucotrienos cisteínicos C₄; PGD₂, prostaglandina D₂; APC, célula presentadora de antígenos (adaptada de (100)).

En el asma, la respuesta alérgica se inicia cuando una partícula ambiental, generalmente inocua, entra en contacto por primera vez con el tracto respiratorio del individuo. Las CD captan los alérgenos procedentes de la superficie del epitelio y los conducen a los ganglios linfáticos, donde los presentan a los linfocitos T vírgenes. En condiciones normales el proceso induciría la activación de células Treg que liberarían citocinas inmunomoduladoras; sin embargo, en el individuo atópico los linfocitos se activan y diferencian a células efectoras Th2. Parte de estas células migran a la región folicular donde interaccionan con los linfocitos B y estimulan la secreción de IgE mediante la liberación de IL-4, IL-5 e IL-13. La IgE secretada pasa a sangre y se une a los receptores FcεRI de mastocitos y basófilos. En este momento, el individuo está sensibilizado al alérgeno. Parte de los linfocitos Th2 se trasladan a la mucosa de las vías respiratorias atraídas por quimiocinas e inducirán una respuesta inflamatoria tipo 2 protagonizada por eosinófilos (97,98,105).

En una segunda exposición al alérgeno, este se une a la IgE que se encuentra en la superficie de mastocitos y basófilos y causa su activación y desgranulación. Los gránulos liberan histamina, y al mismo tiempo se forma LTC₄ y PGD₂. Estos mediadores provocan una rápida vasodilatación, aumento de permeabilidad, lo que origina edema, y broncoconstricción impidiendo el paso de aire. La acción de la histamina dura poco tiempo, pero LTC₄ y PGD₂ provocan una broncoconstricción prolongada. Esta fase se conoce como respuesta inmediata por la rápida aparición de los síntomas característicos del asma tras el contacto con el alérgeno y puede durar de 5-90 min. Después de la respuesta inmediata se produce una reacción tardía, que se desarrolla durante 3-12 h y deriva de la infiltración y activación de leucocitos de la zona (105,111).

Además, mastocitos y células Th2 de la mucosa secretan citocinas alérgicas que reclutan más linfocitos Th2 y mastocitos. En especial, la secreción de IL-5 produce la maduración, reclutamiento, activación y prolongación de la supervivencia de eosinófilos. La activación de eosinófilos libera enzimas proteolíticas, ROS y más LTC₄, incrementando la broncoconstricción. Al mismo tiempo, la presencia de IL-13 en el epitelio incrementa la producción de moco por parte de las células caliciformes (107,111,112).

Los principales mediadores inflamatorios que participan en el desarrollo y transcurso del asma alérgica se resumen en la **Tabla 4**:

Tabla 4 | Mediadores inflamatorios principales en el asma (98,105,106)

Citocinas	Dirigen la respuesta inflamatoria y determinan la severidad del asma. Entre las más relevantes se encuentran IL-4, IL-5 e IL-13.
Quimiocinas	Mediadores clave en el reclutamiento de las células inflamatorias hacia las vías respiratorias. Son producidas por células epiteliales. Las más destacadas son CCL11 o eotaxina-1, y CCL17 y CCL22 para el reclutamiento de eosinófilos y células Th2, respectivamente.
Leucotrienos cisteínicos C ₄ (LTC ₄)	Mediadores lipídicos proinflamatorios derivados del ácido araquidónico y liberados principalmente por mastocitos, eosinófilos, basófilos y macrófagos alveolares. Provocan broncoconstricción prolongada, secreción de moco y aumento de la permeabilidad vascular. Su inhibición se asocia a una mejora de la función pulmonar y de los síntomas de asma.
Prostaglandina D ₂ (PGD ₂)	Mediador lipídico broncoconstrictor derivado del ácido araquidónico y liberado principalmente por los mastocitos. Participa en el reclutamiento de células Th2 en las vías respiratorias.
Histamina	Amina vasoactiva liberada por los mastocitos tras su activación. Se une a receptores celulares de histamina, provoca broncoconstricción y vasodilatación.
Óxido nítrico (NO)	Vasodilatador producido a través de la enzima sintasa inducible del óxido nítrico en las células epiteliales.

Las células epiteliales de las vías respiratorias liberan mediadores en respuesta al alérgeno y a los productos de desgranulación de mastocitos y eosinófilos. Entre estos, liberan IL-25, IL-33 y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), que desencadenan el reclutamiento y diferenciación de linfocitos a Th2, mastocitos y eosinófilos en la zona contribuyendo a amplificar, prolongar y cronificar la inflamación (104,105). La presencia de

IL-13, IL-33 y GM-CSF induce la polarización de los macrófagos residentes a M2 que junto con los eosinófilos sintetizan factores profibróticos, como el TGF- β , que estimulan a fibroblastos a producir colágeno y fibronectina para reparar el tejido dañado. En lesiones y procesos inflamatorios agudos o transitorios se repara la estructura de la vía respiratoria dañada, sin embargo, la inflamación persistente que se da en un individuo asmático induce una remodelación crónica que se refleja en pérdida de células epiteliales, hiperplasia de las células caliciformes, hiperplasia e hipertrofia del músculo liso, engrosamiento de la membrana basal, fibrosis subepitelial y aumento de la densidad vascular. El resultado es una reducción permanente del lumen debido al engrosamiento del tejido y al exceso de mucosidad, y la pérdida progresiva de la función pulmonar (113–115).

El individuo asmático puede pasar temporadas largas sin sufrir ataques de asma o sufrir episodios recurrentes de distinta intensidad. En los casos más extremos, se puede producir anafilaxis; los mediadores inflamatorios pueden constreñir las vías respiratorias hasta producir la asfixia y provocar un edema generalizado con caída de la presión arterial y posible colapso cardiovascular, que puede llevar al shock y en el peor de los casos, a la muerte (105). Para minimizar la recurrencia e intensidad de las exacerbaciones actualmente se dispone un amplio abanico de fármacos.

2.3 Tratamiento del asma

El objetivo del tratamiento es conseguir mantener bajo control el asma mediante la contención de la inflamación en las vías respiratorias con la mínima medicación y dosis posible. A menudo se requieren periodos prolongados de tratamiento farmacológico que en muchas ocasiones acaba siendo de por vida. La aparición de efectos secundarios es frecuente (116).

La farmacoterapia se base en 3 grupos de tratamientos: de rescate, de control a largo plazo y complementarios (116).

I. Rescate o Alivio rápido:

Se utilizan como tratamientos de emergencia en casos de ataques de asma con el fin de aliviar los síntomas a corto plazo.

- **Agonistas β_2 de acción corta (SABAs):** actúan como ligandos de los receptores adrenérgicos, con afinidad para los receptores β_2 , tipo predominante en los vasos bronquiales. La activación de receptores β_2 -adrenérgicos impide la contracción del musculo liso de las vías respiratorias. Los SABAs suelen administrarse por vía inhalatoria para disminuir los efectos secundarios, su efecto se inicia en menos de 5 min y dura entre 3 y 6 h. El efecto adverso más común es la taquicardia, debido a su efecto sobre los receptores β del corazón (117). El uso excesivo de SABAs (frecuente entre los pacientes con asma) puede desencadenar hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) tanto a estímulos específicos (alérgenos) como inespecíficos (ejercicio), que paradójicamente podría desencadenar el efecto contrario al deseado. Además, se ha observado un aumento de la respuesta asmática tardía por alérgenos (117,118).
- **Anticolinérgicos de acción corta (SAMAs):** estos broncodilatadores se utilizan principalmente en casos de enfisema y bronquitis, pero también se pueden emplear en asma. Actúan como antagonistas no-selectivos de los receptores muscarínicos M1, M2 y M3 de las vías respiratorias, impidiendo la unión de la acetilcolina y causando la contracción del musculo liso y la secreción mucosa. Su vida media es de unos 15 min y suele utilizarse juntamente con los SABAs o sustituyéndolos cuando no son bien tolerados (119,120).

II. Control a largo plazo:

Estos fármacos suelen tomarse a diario durante largos periodos de tiempo y son el eje fundamental del tratamiento del asma. Su finalidad es reducir la inflamación de las vías respiratorias (antiinflamatorios bronquiales). Disminuyen la limitación del paso de aire, controlan los síntomas y minimizan las exacerbaciones. En este grupo se incluyen:

- **Corticosteroides inhalados (ICS):** es la terapia de primera línea por su efectividad contra la inflamación producida por linfocitos Th2 modulando la producción de citocinas. Su actividad es de amplio espectro y no específica. Aunque se consideran seguros, a largo plazo puede conllevar efectos secundarios tanto a nivel sistémico como locales. El potencial efecto adverso más importante es la insuficiencia adrenal, caracterizada por la incapacidad de producir cantidades adecuadas de cortisol. Los síntomas son variables y van desde fatiga, dolor de cabeza y dolor abdominal, a hipotensión, hipoglucemia, debilidad generalizada, disminución de la conciencia e incluso el coma. La supresión del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal puede darse en pacientes sometidos a altas dosis de ICS o con dosis medias en tratamientos prolongados. Se han asociado altas dosis de ICS a una disminución de densidad mineral ósea en adultos, provocando osteoporosis y por lo tanto a un aumento del riesgo de fracturas. También se ha visto una posible reducción del crecimiento en niños repercutiendo en su altura, efecto que podría ser o no transitorio. Los ICS pueden causar hiperglucemia debido al incremento de la gluconeogénesis y la reducción de la sensibilidad a la insulina. Se ha asociado el tratamiento a dosis elevadas con un incremento del riesgo a sufrir diabetes y a un empeoramiento del control glucémico en pacientes diabéticos. El tratamiento prolongado en niños también ha mostrado un aumento de glucosa sérica con casos de hiperglucemia transitoria. También se ha observado un incremento del riesgo de sufrir complicaciones oculares, como cataratas, hipertensión ocular y glaucoma en pacientes de edad avanzada en tratamientos con dosis medias y altas durante largos periodos. Los efectos secundarios locales se consideran de menor importancia, pero pueden afectar la calidad de vida del individuo y disminuir la adherencia al tratamiento. Los más comunes suelen ser candidiasis orofaríngea, disfonía, faringitis y tos. El lubricante y propulsor del inhalador también puede tener efectos no deseados, como irritación faríngea, inmunodepresión oral o incremento de la glucosa salival (116,121,122).
- **Agonistas β_2 de acción prolongada (LABAs):** El uso de LABAs en combinación con los ICS mejora la función pulmonar de forma más efectiva que la monoterapia de ICS (116). A diferencia de los SABAs, su efecto se retrasa hasta los 15 min tras su administración y se prolonga durante al menos 12 h. Sin embargo, mientras que la terapia dual se considera segura, la monoterapia prolongada con LABAs no disminuye la exacerbación

y se asocia con un incremento del riesgo de hospitalización, intubación y mortalidad por ataques graves de asma. Además, su uso durante largos periodos y su acción duradera puede desensibilizar los receptores β_2 y atenuar sus efectos bronco-protectores (117,118).

- **Anticolinérgicos de acción larga (LAMAs):** Incluye al tiotropio, fármaco de apoyo en el manejo del asma en pacientes mayores de 6 años en los que la medicación con dosis medias-altas de ICS/LABAs no es suficiente para controlar las exacerbaciones. En estos casos, la adición de tiotropio mejora la función pulmonar y el control del asma. A diferencia del ipratropio (SAMA), tiene una mayor afinidad por los receptores M1 y M3 y su vida media se prolonga hasta las 27 h. Los efectos adversos más comunes son la sequedad bucal, disuria y estreñimiento (119,120,123).
- **Antagonistas de receptores de leucotrienos (LTRA):** Inhiben la broncoconstricción y reactividad de las vías respiratorias. Entre los efectos secundarios que producen se encuentran dolor de cabeza, eczema, laringitis, faringitis e infecciones víricas e infecciosas del tracto respiratorio superior (124).
- **Cromonas:** presentan acción antiinflamatoria ya que evitan la desgranulación y liberación de mediadores por parte de mastocitos. Por ello evitan la reducción del lumen de las vías respiratorias (124). Aunque se consideran seguros, su eficiencia es baja y provocan que el inhalador se tenga que lavar concienzudamente a diario para que no se obstruya (97).

III. Complementario:

Se recurre a estos tratamientos en casos de asma grave y fuera de control aun cuando la medicación a largo plazo está optimizada. El tratamiento puede incluir anti-IgE, teofilina y antihistamínicos entre otros.

- **Anti-IgE:** Se administran vía intramuscular en casos diagnosticados de asma alérgica. Se unen específicamente a la IgE y disminuyen su presencia en circulación y con ello su unión a mastocitos y basófilos. Sus efectos adversos más comunes incluyen dolor en el lugar de la inyección, enrojecimiento, urticaria y erupción. No se ha estudiado en profundidad sus efectos a largo plazo en niños (116).

- **Teofilina:** Se administra por vía oral y atenúa la producción y liberación de mediadores proinflamatorios como los leucotrienos. Es menos efectiva que otros broncodilatadores, dispone de una ventana terapéutica estrecha que requiere monitoreo continuo de niveles en suero, interfiere con otros medicamentos y sus efectos adversos son numerosos. Entre ellos se incluye la excitación del sistema nervioso central con dolor de cabeza, insomnio e irritabilidad, convulsiones, diarrea, vómitos, diuresis, temblores, taquicardia e infarto agudo de miocardio, entre otros. En consecuencia, la teofilina no suele usarse como tratamiento de control a largo plazo (124,125).

- **Antihistamínicos:** Actúan como antagonistas no competitivos de los receptores de la histamina H₁ en el músculo liso de las vías respiratorias, reduciendo la vasodilatación, los estornudos y la picazón. Los antihistamínicos de primera generación o clásicos tienen un efecto sedante y anticolinérgico. Los de segunda generación en cambio presentan mayor afinidad por el receptor H₁ periférico y son menos lipofílicos, reduciendo así los efectos adversos.

OBJETIVOS

El asma es una de las enfermedades más comunes de las vías respiratorias caracterizada por inflamación crónica y se desencadena, en muchos casos, por la inhalación de alérgenos. Afecta a personas de todas las edades y suele requerir de terapia multifarmacológica a largo plazo, incluso de por vida, con un impacto importante en la calidad de vida del paciente. Por ello, resulta interesante el establecimiento de dietas que, de forma coadyuvante al tratamiento, puedan contribuir a prevenir o paliar los efectos del asma alérgica mejorando así su calidad de vida. El cacao, producto del árbol *Theobroma cacao* que crece en climas tropicales, constituye un alimento rico en compuestos bioactivos como polifenoles y metilxantinas, cuya cantidad y calidad depende del origen y de las condiciones de crecimiento. Perú es uno de los países productores de cacao más importantes y destaca por una gran riqueza de variedades autóctonas. Durante los últimos años, el grupo de investigación de Autoimmunitat, Immunonutrició i Tolerància ha demostrado el efecto inmunomodulador del cacao convencional y sus compuestos bioactivos tanto en animales sanos como en modelos animales de inflamación y alergia.

Partiendo de esta hipótesis, el **objetivo principal** de la tesis ha sido establecer el efecto antiasmático de diferentes variedades de cacao nativas del Perú procedentes de distintas regiones del país.

Para conseguir el objetivo principal, se han desarrollado los siguientes **objetivos específicos**:

1. **Desarrollar un modelo de asma alérgica en ratas Brown Norway que permita la inducción y cuantificación objetiva de una respuesta anafiláctica.**

Los resultados de este objetivo forman parte de la siguiente publicación:

- *Development and Characterization of an Allergic Asthma Rat Model for Interventional Studies*. International Journal of Molecular Sciences 2020, volume 21 (11), no 3841 (**Artículo 1**).

2. Caracterizar el efecto antioxidante, antiinflamatorio e inmunomodulador *in vitro* de cuatro variedades de cacao nativas de Perú sobre células del sistema inmunitario.

Los resultados de este objetivo forman parte de la siguiente publicación:

- *Attenuating Effect of Peruvian Cocoa Populations on the Acute Asthmatic Response in Brown Norway Rats*. Nutrients. 2020, volume 12 (8), no 2301 (Artículo 2).

3. Establecer el efecto protector de dos dietas enriquecidas con un 10% de cacao nativo peruano en el modelo de asma alérgica en rata.

Los resultados de este objetivo forman parte de las siguientes publicaciones:

- *Attenuating Effect of Peruvian Cocoa Populations on the Acute Asthmatic Response in Brown Norway Rats*. Nutrients. 2020, volume 12 (8), no 2301 (Artículo 2).
- *Influence of Consumption of Two Peruvian Cocoa Populations on Mucosal and Systemic Immune Response in an Allergic Asthma Rat Model*. Nutrients 2022, volume 14 (3), no 410 (Artículo 3).

RESULTADOS

Artículo 1

“Development and Characterization of an Allergic Asthma Rat Model for Interventional Studies”

Marta Pérez, Francisco J. Pérez-Cano, Maria J. Rodríguez-Lagunas, Trinitat Cambras, Santiago Pastor-Soplin, Iván Best, Margarida Castell and Malén Massot-Cladera

International Journal of Molecular Sciences
2020, volume 21 (11), nº 3841

Revista de acceso abierto

Índice de impacto (2020): 5.924

Categoría: Biochemistry & molecular biology, Q1 (67/295)

Los resultados del presente artículo han sido presentados en el congreso:

- XIII Congrés de la Societat Catalana d'Immunologia, Barcelona, noviembre 2019. **Animal model of allergic asthma for therapeutic studies**. Marta Pérez; Francisco J. Pérez-Cano; Santiago Pastor-Soplin; Margarida Castell; Ivan Best; Malen Massot-Cladera.

Resumen ARTÍCULO 1

Objetivo

Disponer de un modelo animal de asma alérgica puede ser de utilidad para el estudio de terapias específicas y de coadyuvantes que puedan reducir su semiología. El objetivo de este trabajo, que incluye el primer objetivo de la tesis, fue desarrollar un modelo de asma alérgica en rata que permitiera la inducción y cuantificación objetiva del shock anafiláctico.

Metodología

Se utilizaron ratas hembra Brown Norway que se sensibilizaron intraperitonealmente con una suspensión de ovoalbúmina (OVA), hidróxido de aluminio y toxina de *Bordetella pertussis*. Una semana más tarde se administró una dosis de refuerzo de OVA en hidróxido de aluminio. Se dispuso de un grupo de animales no tratados. Para inducir el choque anafiláctico, a día 28, todas las ratas recibieron una administración intranasal de una solución de OVA en solución salina. Se evaluó la respuesta anafiláctica mediante cambios en la actividad motora y la temperatura corporal. También se determinó la concentración de leucotrienos en el fluido de lavado broncoalveolar (BALF) y la concentración de inmunoglobulina E (IgE) total y específica en muestras de suero y BALF a las 24 h del choque anafiláctico.

Resultados

La inducción de choque anafiláctico provocó una disminución de la movilidad y la temperatura corporal de los animales asmáticos que se prolongó al menos 20 h. Asimismo, los animales asmáticos desarrollaron anticuerpos IgE anti-OVA tanto en BALF como en suero.

Conclusiones

Se ha desarrollado un modelo efectivo y relativamente rápido de asma alérgica en ratas hembra Brown Norway que permite la cuantificación de la respuesta anafiláctica.



Article

Development and Characterization of an Allergic Asthma Rat Model for Interventional Studies

Marta Pérez ^{1,2}, Francisco J. Pérez-Cano ^{1,2}, Maria J. Rodríguez-Lagunas ^{1,2},
Trinitat Cambras ¹, Santiago Pastor-Soplin ³, Iván Best ^{3,4}, Margarida Castell ^{1,2,*}
and Malén Massot-Cladera ^{1,2}

¹ Secció de Fisiologia, Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain; mperiz@ub.edu (M.P.); franciscoperez@ub.edu (F.J.P.-C.); mjrodriguez@ub.edu (M.J.R.-L.); cambras@ub.edu (T.C.); malen.massot@ub.edu (M.M.-C.)

² Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), UB, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

³ Programa Cacao, Ingeniería Agroforestal, Facultad de Ciencias Ambientales, Universidad Científica del Sur, 15842 Lima, Peru; spastor@ucientifica.edu.pe (S.P.-S.); ibest@usil.edu.pe (I.B.)

⁴ Unidad de Investigación en Nutrición, Salud, Alimentos Funcionales y Nutraceuticos, Universidad San Ignacio de Loyola, 15024 Lima, Peru

* Correspondence: margaridacastell@ub.edu; Tel.: +34-93-4024505

Received: 9 April 2020; Accepted: 14 May 2020; Published: 28 May 2020



Abstract: Allergic asthma is one of the most common chronic diseases of the airways, however it still remains underdiagnosed and hence undertreated. Therefore, an allergic asthma rat model would be useful to be applied in future therapeutic strategy studies. The aim of the present study was to develop an objective model of allergic asthma in atopic rats that allows the induction and quantification of anaphylactic shock with quantitative variables. Female Brown Norway rats were intraperitoneally sensitized with ovalbumin (OVA), alum and *Bordetella pertussis* toxin and boosted a week later with OVA in alum. At day 28, all rats received an intranasal challenge with OVA. Anaphylactic response was accurately assessed by changes in motor activity and body temperature. Leukotriene concentration was determined in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and total and IgE anti-OVA antibodies were quantified in blood and BALF samples. The asthmatic animals' motility and body temperature were reduced after the shock for at least 20 h. The asthmatic animals developed anti-OVA IgE antibodies both in BALF and in serum. These results show an effective and relatively rapid model of allergic asthma in female Brown Norway rats that allows the quantification of the anaphylactic response.

Keywords: body temperature; bronchoalveolar lavage fluid; Brown Norway rats; IgE; intranasal challenge; leukotriene; motor activity; ovalbumin

1. Introduction

Allergic asthma is a chronic inflammatory disorder of the airways, caused by an immunological-mediated hypersensitivity reaction [1]. A range of underlying mechanisms causes airway inflammation that involves variable airflow limitation and respiratory symptoms. Wheezing, shortness of breath, chest tightness and cough are the most characteristic asthma features [2]. The condition usually starts in childhood, although it can also develop in adulthood, and affects people of all ages. There is currently no cure, but treatment can help control the symptoms [1]. Although type 2-driven inflammation is key in allergic asthma, the pathophysiology is complex and involves several pathogenic pathways that allow the definition of disease endotypes [3]. Asthma is one of the most common chronic,

non-communicable diseases, and affects around 270 million people worldwide [4]. Nevertheless, asthma still remains underdiagnosed and hence undertreated, producing quality of life and lifestyle disruptions and creating a burden on families, societies and countries [5].

Animal models of asthma have been developed in mice and rats [6–12], as they share many features of human allergic asthma [13]. Transgenic technology has been applied in mouse models which allowed the identification of particular genes involved in the pathology of asthma [14]. Nevertheless, the main symptoms of asthma, such as airway hyperresponsiveness and inflammation, can be more easily reproduced in rats than in mice [10]. In addition, rats are easier to handle and larger than mice which permit the collection of higher amounts of samples. For these reasons, rat models of asthma are increasing in importance [7]. However, rat strains such as Wistar, Sprague Dawley, Fisher and Lewis do not always develop an allergic response with IgE production [7,15]. Despite this fact, asthma models in Wistar and Sprague Dawley rats have been reported [12,16]. In contrast, the Brown Norway rat is an atopic strain prone to produce IgE responses after allergen sensitization [17–19]; hence, it is a suitable strain for studying allergic asthma. Although a variety of allergens have been used for allergic sensitization, ovalbumin (OVA) is one of the most commonly used [7,11,12,20]. Several types of models have been developed varying the OVA-sensitization protocol in terms of the route of administration, the adjuvant, the number of sensitizations and the number of challenges carried out [11,12]. The aim of the current study was to develop an objective model of allergic asthma in Brown Norway rats that allows the induction and quantification of an anaphylactic shock with quantitative variables. This model could be applied in future studies of therapeutic strategies aimed at preventing or decreasing allergic asthma symptoms. To carry out our investigation, two experimental procedures were designed. Firstly, a preliminary design sought to address whether *Bordetella pertussis* toxin (Bpt) was required for allergy induction and whether the conditions tested were sufficient to induce an anaphylactic response by intranasal (i.n.) route. After this, a definitive study was carried out, focused on establishing objective variables to quantify the anaphylactic response.

2. Results

2.1. Preliminary Study

2.1.1. Serum Anti-OVA IgE Antibodies

The first experiments were carried out in order to establish whether Bpt was needed to induce an IgE-mediated allergy in the animals. Two groups of rats were studied, one with the presence of Bpt in the first sensitization and one group without (Figure 1a). At day 27 from the first sensitization, all rats developed anti-OVA antibodies, some of them belonging to the IgE isotype (Figure 2a,b). Considering the mean of basal values plus two standard deviations as the negative cut-off, 100% of the animals developed anti-OVA antibodies and anti-OVA IgE. The group immunized with Bpt presented the highest total anti-OVA antibody levels ($p < 0.0001$ vs. basal levels and those from the non-Bpt immunized group) with an increase in anti-OVA IgE antibody production ($p < 0.01$ vs. basal levels).

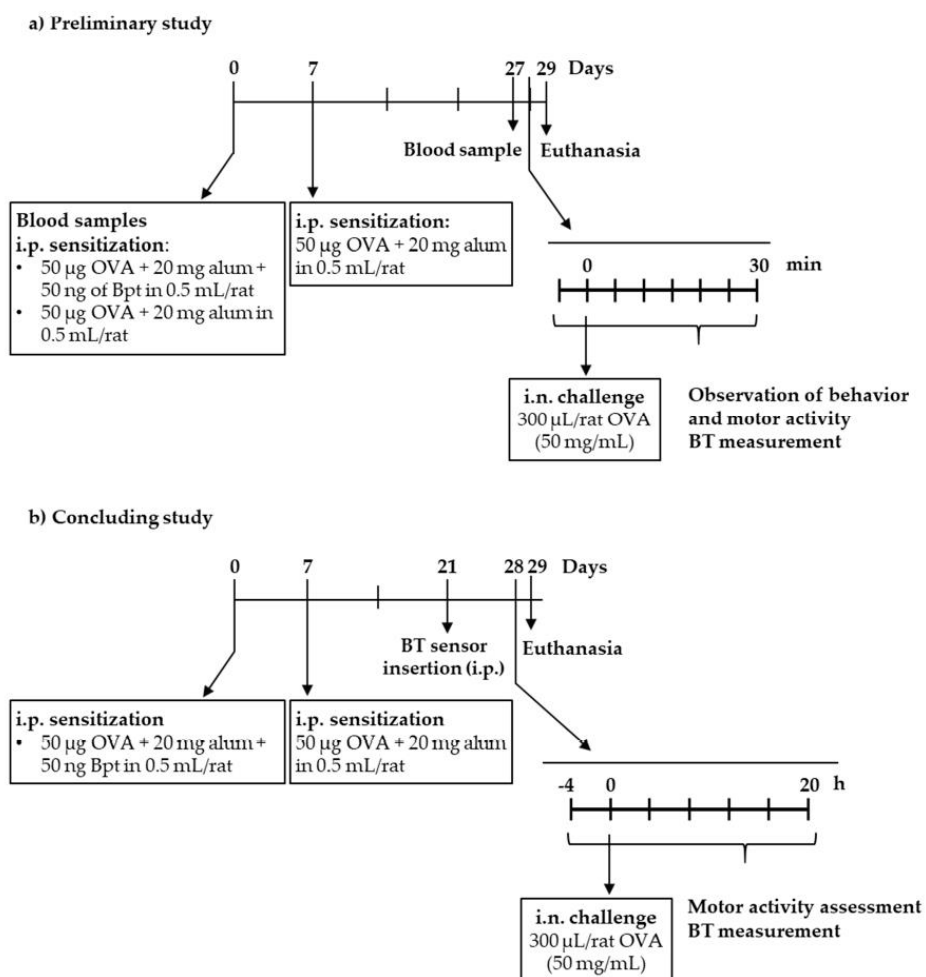


Figure 1. Experimental designs followed in the (a) preliminary study and (b) the definitive study. Bpt: *Bordetella pertussis* toxin; BT: body temperature; i.n.: intranasal; i.p.: intraperitoneal; OVA: ovalbumin.

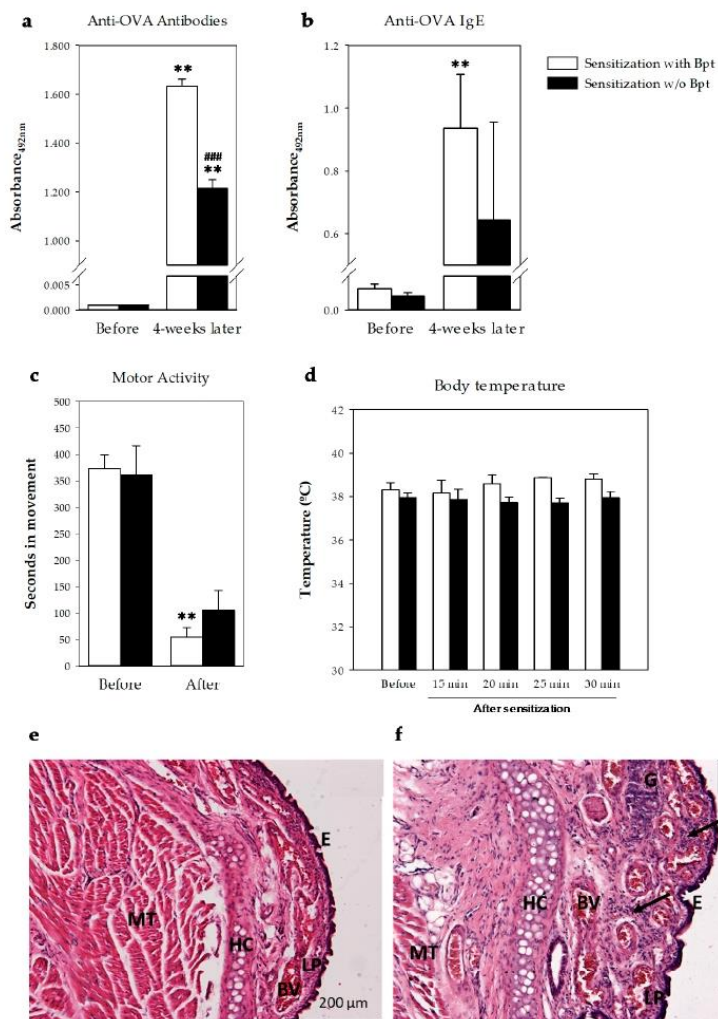


Figure 2. Effect of sensitization with (white bars) or without (w/o, black bars) Bpt on (a) serum total anti-OVA antibodies and (b) serum anti-OVA IgE before and 4 weeks after sensitization. Changes on (c) motor activity and (d) body temperature before and after the challenge with i.n. OVA (50 mg/mL) in sensitized rats with (white bars) or without (black bars) Bpt. Results are expressed as mean \pm standard error ($N = 4$) of absorbance units. Significant differences: ** $p < 0.01$ vs. basal values; ### $p < 0.001$ vs. sensitization with Bpt. Changes in respiratory airway 24 h after the i.n. challenge (f) in comparison with non-challenged animals (e). Representative histological images of respiratory mucosa of nasal sections stained with hematoxylin and eosin, 100 \times , scale bar = 200 μ m. E, epithelium; LP, lamina propria; BV, blood vessels; HC, hyaline cartilage; MT, muscle tissue; G, gland. Arrow indicates leukocyte infiltrate.

2.1.2. Intranasal-Induced Shock Quantification

At day 29, the rats, sensitized or not with Bpt, were challenged by i.n. administration of either 5 or 50 mg/mL OVA. Motor activity was assessed in a blinded manner by quantifying the time each animal spent moving in a video recorded during the first 10 min after the challenge and comparing the results with its own basal movements (i.e., before the challenge) during the same period of time (Figure 2c). Although both types of sensitizations affected the rats' movements after the i.n. challenge, the decrease

was only significant in the Bpt-sensitized animals with respect to basal conditions. Moreover, the behavior observation revealed the appearance of wheezing only in the Bpt-sensitized animals that had been challenged with the highest dose of OVA.

Body temperature was also measured before and every 5 min from 15 min to 30 min after the i.n. challenge (Figure 2d). No significant changes were observed during the studied period.

2.1.3. Respiratory Airway Histology

Nasal respiratory mucosa of animals sensitized with Bpt and challenged with i.n. OVA exhibited mucosal thickening in the nasal subepithelial, with strong leukocytic cell infiltration in the lamina propria compared to unchallenged animals (Figure 2e,f). Moreover, submucosal gland hypertrophy was also observed in challenged animals (Figure 2f).

The results of the preliminary study allowed us to conclude that the Brown Norway rats immunized with Bpt became more sensitized than those that did not receive it and that 4 weeks from the first sensitization was enough to induce an anaphylactic shock by i.n. route. This shock induced behavioral changes which, to be objectively quantified, required better approaches such as those applied in the second and definitive study.

2.2. Definitive Study

In the second design, rats sensitized with OVA together with Bpt and boosted one week later were challenged by i.n. route with OVA on day 28 (Figure 1b). Concurrently, a group of healthy rats was also challenged.

2.2.1. Motor Activity

Motor activity was measured at 1 h intervals from 4 h before the challenge until 20 h after. Before challenging, basal motor activity did not differ between healthy and sensitized rats. The number of movements recorded for 4 h was 175.22 ± 33.32 vs. 127.89 ± 27.44 (mean \pm standard error for nine animals) in the healthy group and asthmatic group, respectively. However, the i.n. challenge with OVA decreased the movements of asthmatic rats as observed in the 20 h period studied after shock induction (Figure 3a). Moreover, the number of movements during darkness in asthmatic rats did not show the characteristic increase in motor activity present in healthy rats. The differences among the groups' movements in the same period of time was also observed when the total number of movements was calculated ($p = 0.008$) (Figure 3b).

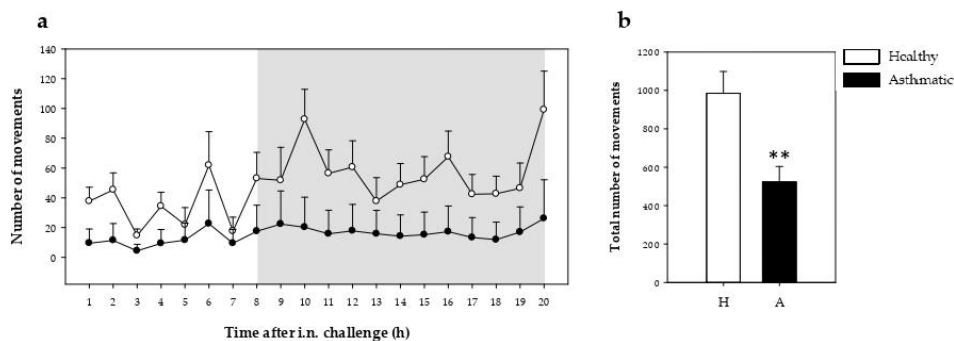


Figure 3. Motor activity during 20 h after the i.n. challenge. **(a)** Motor activity assessed every hour (the shadow period corresponds to darkness) in healthy (H, white symbol) and asthmatic (A, black symbol) rats. Statistical differences not included. **(b)** Total number of movements in healthy (H, white bars) and asthmatic (A, black bars) 20 h after the challenge. Results are expressed as mean \pm standard error ($N = 9$). Significant differences: ** $p < 0.01$ vs. healthy animals.

2.2.2. Temperature

Body temperature was measured by means of a data logger during 20 h after the challenge in healthy and asthmatic groups. There were no differences in body temperature between healthy and sensitized rats in the 4 h period before the challenge ($37.80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.10\text{ }^{\circ}\text{C}$ vs. $37.64\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.05\text{ }^{\circ}\text{C}$; mean \pm standard error for nine animals in healthy and sensitized groups, respectively). The i.n. challenge with OVA induced a reduction in body temperature in both healthy and asthmatic rats in the first 3 h post-challenge (Figure 4a). The body temperature of healthy rats decreased by $1.9\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ (mean \pm standard error) whereas asthmatic rats displayed a reduction of $3.2\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.7\text{ }^{\circ}\text{C}$. In addition, the asthmatic group showed lower body temperature than healthy rats for the 20 h period studied as observed in the time course (Figure 4a) as well as in the area under the curve (AUC) ($p = 0.001$; Figure 4b).

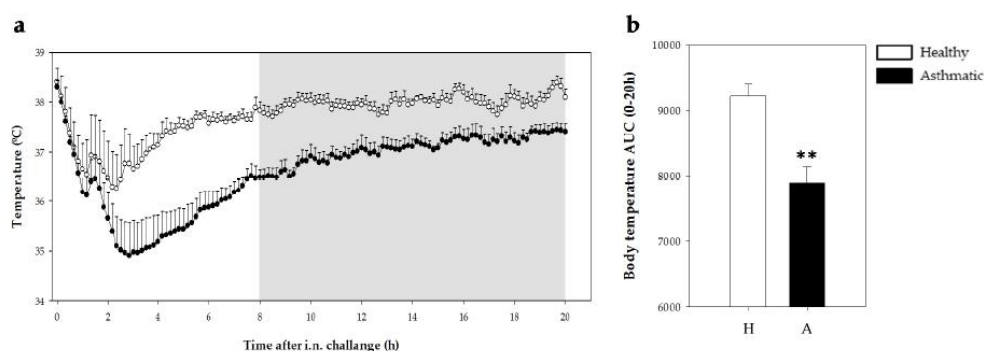


Figure 4. Body temperature 20 h after the i.n. challenge. (a) Body temperature assessed every 10 min (grey period corresponds to the dark period) in healthy (H, white bars) and asthmatic (A, black bars) rats. Statistical differences not included. (b) Area under the curve (AUC) of body temperature changes (from $34\text{ }^{\circ}\text{C}$) in the same period. Results are expressed as mean \pm standard error ($N = 9$). Significant differences: ** $p < 0.01$ vs. healthy animals.

2.2.3. Serum Anti-OVA Antibodies.

Specific anti-OVA antibodies belonging to IgE and IgG isotypes were quantified in serum samples collected the day after the i.n. challenge (Figure 5). In comparison to healthy rats, asthmatic animals showed significant levels of specific antibodies belonging to IgE, IgG1 and IgG2a isotypes (Figure 5a–c), which were associated with a Th2 response [17,21,22], as well as those belonging to IgG2b and IgG2c isotypes related to Th1 response (Figure 5d,e, $p < 0.0007$). Considering the values of the healthy rats plus two standard deviations as the negative cut-off, the proportion of asthmatic rats that developed anti-OVA antibodies was 100%, 100%, 100%, 89% and 78% for IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG2c isotypes, respectively. Taking into account the serum dilution used in each assay, those antibodies belonging to IgG1 and IgG2a (Th2-associated) were more abundant than those belonging to the isotypes associated with a Th1 response (Figure 5a–c).

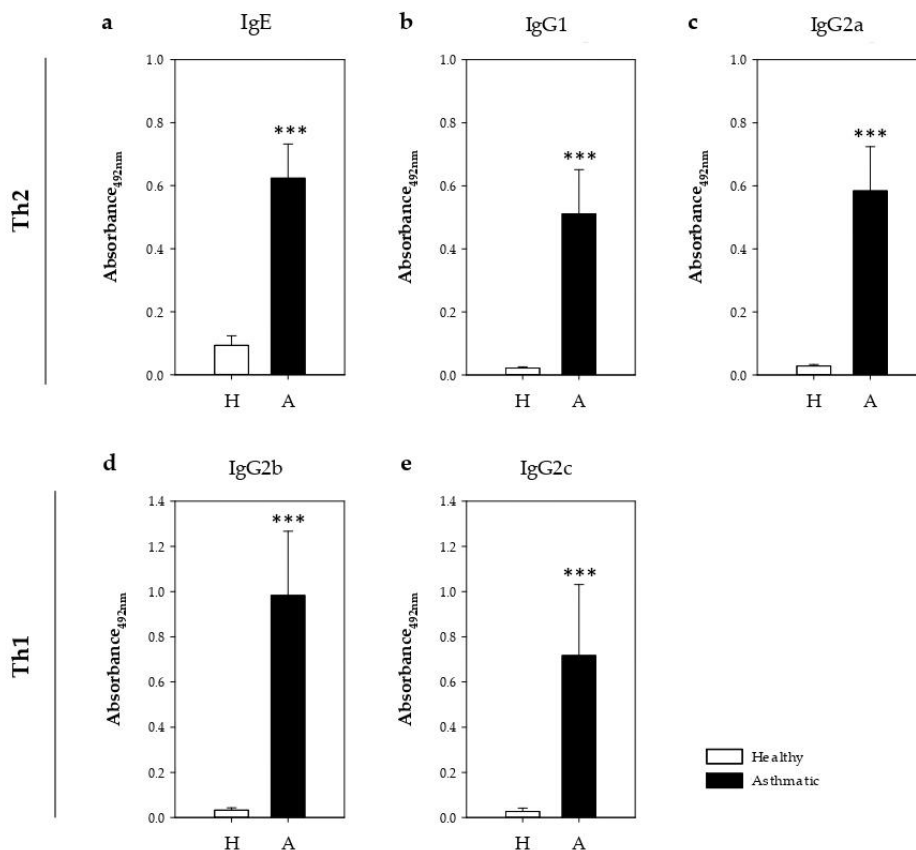


Figure 5. Concentration of serum OVA-specific antibodies 24 h post-challenge. (a) IgE, (b) IgG1, (c) IgG2a, (d) IgG2b and (e) IgG2c in healthy (H, white bars) and asthmatic (A, black bars) rats. Results are expressed as mean \pm standard error ($N = 9$). Significant differences: *** $p < 0.001$ vs. healthy animals.

2.2.4. IgE Antibodies and Leukotrienes in Bronchoalveolar Lavage Fluid

Anti-OVA IgE specific antibodies were also quantified in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) samples obtained 24 h after the i.n. challenge (Figure 6). Asthmatic rats showed higher levels than healthy rats (Figure 6a, $p < 0.0002$). Considering the values of the healthy rats plus two standard deviations as the negative cut-off, 100% of asthmatic rats had anti-OVA IgE antibodies in BALF samples.

On the other hand, total IgE and cysteinyl leukotriene (CysLT) concentrations were quantified on BALF samples. IgE concentration tended to increase in the asthmatic animals (Figure 6b). Similarly, the CysLT concentration tended to increase in asthmatic rats' BALF collected one day after the i.n. challenge (Figure 6c).

The correlation between BALF CysLT values and specific and total BALF IgE concentrations from the asthmatic animals was also studied. Anti-OVA IgE levels did not correlate with CysLT values. However, a significant positive correlation was found when considering the content of CysLT and total IgE in BALF samples ($r = 0.833$, $p = 0.010$).

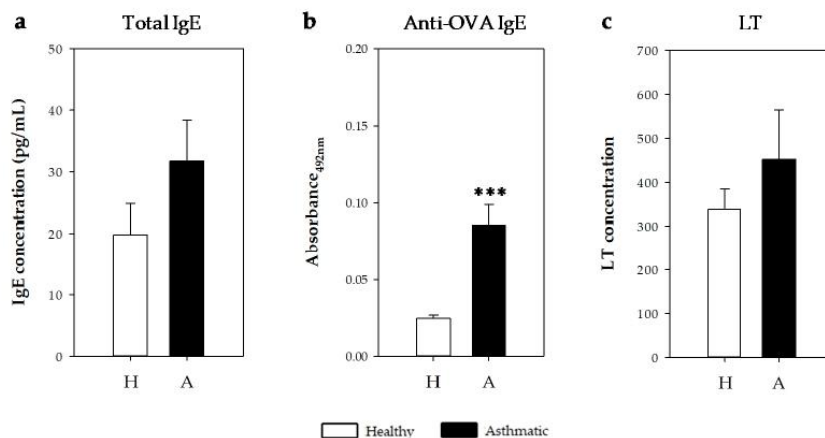


Figure 6. (a) Total and (b) anti-OVA IgE concentrations and (c) CysLT content in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) samples obtained 24 h after the i.n. challenge in healthy (H, white bars) and asthmatic rats (A, black bars). Results are expressed as mean \pm standard error ($N = 9$). Significant differences: *** $p < 0.001$ vs. healthy animals.

2.2.5. Cytokine and Leukocytes in Bronchoalveolar Lavage Fluid

The concentration of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), interleukin (IL) 1 α , interferon (IFN) γ , IL-4, IL-13 and IL-10 were quantified in BALF samples obtained 24 h after the i.n. challenge (Figure 7a). MCP-1 and IL-1 α are inflammatory cytokines, IFN- γ is associated with Th1 responses, and IL-4, IL-13 and IL-10 are associated with Th2 responses [23]. Although MCP-1 was the most abundant, IL-1 α increased in the BALF of asthmatic animals ($p < 0.05$, Figure 7a). No changes were observed in IFN- γ and IL-4 concentrations. Nevertheless, BALF from asthmatic rats showed lower IL-13 levels and higher IL-10 concentrations than healthy rats ($p < 0.05$, Figure 7a).

On the other hand, leukocytes, lymphocytes, monocytes and granulocytes were also enumerated in BALF samples (Figure 7b). The number of leukocytes tended to increase in asthmatic rats without reaching statistical significance due to high variability among animals. Although the three types of cells tended to increase, granulocytes seemed to be mainly responsible for such increases.

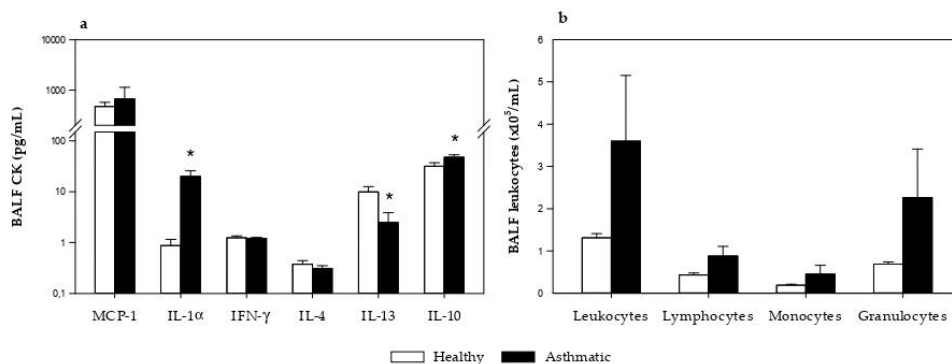


Figure 7. (a) Cytokine concentration and (b) leukocyte content in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) samples obtained 24 h after the i.n. challenge in healthy rats (H, white bars) and asthmatic rats (A, black bars). Results are expressed as mean \pm standard error ($N = 9$). Significant differences: * $p < 0.05$ vs. healthy animals.

3. Discussion

Studies in experimental models can contribute to understanding allergic asthma pathophysiology as well as to participating in the screening of new drugs and other therapeutic or preventive approaches. Different animal models of asthma have been available for many years. Specifically, rats have demonstrated similar features of airway allergy and allergic asthma to those exhibited by humans [7]. Here we introduce a rat model of allergic asthma that is easy to induce, in which anaphylactic shock can be objectively quantified by changes in motor activity and body temperature, among others.

In line with previous animal studies in asthma [18] and systemic and food allergy [17,19,24,25], we have used the Brown Norway rat strain because it is naturally atopic and, as in systemic and food allergy models, it is able to produce an IgE immune response to certain antigens. Moreover, female rats were chosen because at least in the case of Lewis rats, they show an exacerbated immune response [15].

In the preliminary design, it was demonstrated that Brown Norway rats need sensitization with *B. pertussis* toxin to produce a higher IgE response able to induce anaphylactic shock when an allergen is given by intranasal route, mimicking an asthmatic attack. Furthermore, this anaphylactic response was accompanied by changes in the nasal architecture the day after, as revealed by histological studies. In other studies in rat asthma models, authors applied *B. pertussis*, inactivated or not, together with intraperitoneal (i.p.) sensitization [26,27] or by an alternative route such as the foot pad [28]. Nevertheless, other studies did not apply an adjuvant [12,29,30]. However, in the present asthma model, sensitization with two i.p. administrations of OVA together with an i.n. challenge with a high dose of allergen was enough to produce anaphylactic shock. Therefore, it contrasts with other studies that required three or more i.p. administrations of OVA [29,31,32] and instillation of OVA nebulized by aerosol for several continuous or alternate days [27,33]. In addition, this first design evidenced the necessity of using approaches to objectively evaluate shock-associated symptoms.

The relationship between changes in rodent behavior and the immune response was well established years ago [34] and again recently [35]. Rodents with rhinitis show behavioral changes, such as anxiety-like behavior and reduced social interactions [36]. Moreover, anaphylaxis in mice induces scratching and rubbing around the nose and head, puffiness around the eyes and mouth, piloerection, increased respiratory rate, wheezing and decreased motor activity [37]. The evaluation of these symptoms requires the observation of each animal and this can be subject to personal interpretation. To quantify behavior changes, objective approaches should be used. In this sense, in previous studies focused on food allergy, the quantification of the decrease in motor activity after the induction of an oral challenge was objectively evaluated by activity meters [17,38]. The present study revealed that the i.n. challenge in sensitized rats could be evaluated by this approach, showing a decrease in the motor activity that remained at least until the day after the challenge.

Similarly, an anaphylactic response induced a decrease in body temperature, which must be a consequence of the systemic vasodilation produced by mast cell mediators [39]. Previous studies where animals were challenged orally, demonstrated a decrease of about 3 °C that remained for at least 2 h [17]. Herein, the body temperature achieved its minimum value 3 h after the challenge and, interestingly, it remained low even 20 h after shock induction. It is worth highlighting the use of a sensitive method to measure the temperature, such as the loggers placed in the peritoneal region of each animal one week before the challenge. Such an approach has been previously used to study the effect of the circadian rhythms in rats [40]. Although there are many studies in which rat asthma models are applied for the screening of drugs or other therapeutic approaches, anaphylactic shock has not been quantified *in vivo* [33,41].

Major variables quantified in animal models include IgE, cytokines, histopathological features and some functional tests [11,26,27,29–31]. In this sense, the i.p. sensitization by OVA and one booster 7 days later induced the synthesis of specific IgE and IgG antibodies in sera. Previous studies quantified specific IgE in asthmatic rats [27], however specific IgG is often not included. Our results show that asthmatic rats produced higher amounts of anti-OVA antibodies belonging to IgG1 and IgG2a classes than those belonging to IgG2b and IgG2c isotypes. These results meet the criteria established

by Knippels et al. which stated that a good animal model should produce a significant amount of IgE- and/or other Th2-related antibodies [25]. It has been demonstrated that IgG1 and IgG2a are isotypes related to Th2 response in rats [17,21,22]. Therefore, this model will be closer to the type 2 asthma endotype, including the most common phenotypes, which involves Th2 cells, IgE-producing B cells, group 2 innate lymphoid cells, IL-4-producing natural killer (NK) cells, NK-T cells, basophils, eosinophils, mast cells and their major cytokines [42]. In fact, when analyzing the leukocytes present in the BALF, a tendency to increase the content of granulocytes that would include eosinophils was observed. Further experiments focused on this particular leukocyte should be carried out. On the other hand, the BALF cytokine profile revealed that the inflammatory cytokines such as IL-1 α increased, whereas typical Th2-related cytokines such as IL-4 and IL-13 did not increase. These results need to be confirmed and completed by determinations not just 24 h after the shock and, for example, with cytokine gene expression in the lung.

In addition, total and specific IgE concentrations were measured in BALF. Although anti-OVA IgE antibodies were found in all OVA-sensitized rats, the quantification of total IgE did not reveal a significant increase. It could be due, at least in part, to the high variability between rats in the same group. Similarly, when quantifying the CysLT concentration in BALF, values did not achieve statistical significance. CysLT are early mediators of asthma in rats [7] that can be secreted by eosinophils and CysLT may be involved in the accumulation of eosinophils in the airways of asthmatics [42]. We found a positive correlation between CysLT and total IgE in the BALF, meaning that the higher the LT concentration in rats, the higher the total BALF IgE content. Such mediators are important in the pathophysiology of asthma [42]. Further studies should be carried out to better characterize the cells, i.e., eosinophils and mast cells, and the mechanisms involved in our asthma model.

4. Materials and Methods

4.1. Animals and Ethical Issues

Four-week-old female Brown Norway rats were obtained from Envigo (Huntingdon, UK) and housed in polycarbonate cages containing bedding of large fibrous particles (Souralit 1035, Bobadab S.L., Santo Domingo de la Calzada, Spain) with two or three rats per cage under controlled conditions of temperature and humidity in a 12:12 h light/dark cycle. The animals had unrestricted access to OVA-free food (American Institute of Nutrition 93M formulation, AIN-93M, Envigo Teklad Diets, Madison, WI, USA) and water and remained in one week of quarantine before experiments began.

With regard to sample size estimation, the Appraising Project Office's Program from the Universidad Miguel Hernández de Elche (Alicante, Spain) was used to calculate the minimum number of animals providing statistically significant differences among groups, assuming no dropout rate and type I error of 0.05 (two-sided).

The animal procedures were in accordance with the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals and approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the University of Barcelona and the Catalonia Government (CEEA/UB ref. 414/16 and DAAM 9351, respectively), in full compliance with national legislation following the EU-Directive 2010/63/EU for the protection of animals used for scientific purposes.

4.2. Experimental Designs

A preliminary experimental design was carried out in order to study whether *B. pertussis* toxin (Bpt) was required for allergy induction and if the conditions tested were sufficient to induce an anaphylactic response by intranasal (i.n.) route (Figure 1a). For this, on day 0, rats were sensitized by an i.p. injection of a suspension (500 μ L) containing 50 μ g ovalbumin (OVA, grade V, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), 20 mg alum (Imject®, Pierce, IL, USA) with or without 50 ng Bpt (Sigma-Aldrich). At day 7, a booster was given to rats by i.p. injection of 500 μ L of a suspension containing 50 μ g OVA in 20 mg alum. At day 27, blood was collected from the saphenous vein to test the specific IgE production.

As all rats synthesized anti-OVA IgE, an i.n. challenge with 300 μ L (drop by drop in two charges of an automatic pipette of 200 μ L in the immobilized animal) of either 5 or 50 mg/mL OVA was carried out at day 29. Anaphylactic shock was then assessed by changes in rat behavior, motor activity and body temperature. One day later, animals were euthanized and nose tissue was collected.

After considering the results of the preliminary study, a definitive design was carried out and the anaphylactic shock was quantified by unbiased measurements and for a longer period (Figure 1b). In this second round of experiments, rats were sensitized with 50 μ g OVA, 20 mg alum and 50 ng Bpt (i.p.) and boosted a week later with 50 μ g OVA in 20 mg alum (i.p.). A parallel group of non-sensitized rats (age and sex matched) was included. At day 28, all rats received an i.n challenge with 300 μ L of 50 mg/mL OVA. Anaphylactic response was accurately assessed by changes in motor activity and body temperature. Blood and BALF samples were obtained 24 h later.

4.3. Motor Activity Assessment

In the preliminary study, changes in motor activity were assessed by observation in a blinded manner of a video recorded from each animal (isolated in a cage) before and immediately after the i.n. challenge for 10 minutes.

In the definitive study, the movements of each animal were quantified by an activity meter as previously performed [38]. Briefly, the animals were placed in an isolated room and housed in small cages individually. Motor activity was recorded using activity-meters consisting of two perpendicular infrared beams. Every time the animal crossed one beam a count was detected. Number of movements was recorded every hour from 4 h before the i.n. challenge (basal) until 20 h after shock induction.

4.4. Temperature Measurement

In the first design, body temperature was measured prior to the i.n. challenge, every 5 min for 15–30 min after the challenge by a rectal probe (Oakton Acorn Temp J-K-T Thermocouple Thermometer WD-35627-00, Physitemp Instruments, Oakton, Vernon Hills, IL, USA). As the results obtained with this thermometer did not have enough sensitivity to quantify the decrease in body temperature induced by the shock, in the second round of experiments body temperature was recorded by data loggers (Thermochron[®], iButton type DS1921H-FS with a resolution of 0.125 °C). For this, one week before the i.n. challenge, a logger was intraperitoneally implanted into each rat under isoflurane (Isoflo[®]) anesthesia (4%–5% in the induction and 1%–2% in the maintenance, with an oxygen flow of 0.5–1.0 L/min). Animals were then isolated in individual cages. Meloxicam (1 mg/kg BW, subcutaneous route) was administered immediately after the intervention and 24 h later. Body temperature was recorded every 10 minutes from 4 h before the challenge until 20 h later. Body temperature in the period after challenge was summarized as the AUC considering changes above 34 °C.

4.5. Blood Collection

In the first experiments, blood samples were collected from the saphenous vein before immunization to be used as non-sensitized reference samples. Blood collection was repeated 4 weeks later before the i.n. challenge.

In the definitive design, one day after the i.n. challenge rats were anaesthetized with ketamine/xylazine (90 and 10 mg/kg, respectively; Merial laboratories S.A., Barcelona, Spain; Bayer A.G., Leverkusen, Germany). Blood was collected by heart puncture and serum was kept at –20°C until anti-OVA antibody quantification.

4.6. BALF Collection

After exsanguination, the trachea was exposed by surgically opening the neck region with minimum incisions possible. Five mL of chilled phosphate buffered saline (PBS) was instilled into the lung using a 10 mL syringe fitter with a 16G catheter. The PBS was allowed to stay in the lungs for 30 s, while the thoracic area was gently massaged and BALF was retrieved and instilled again with the help

of a syringe. This was repeated three times. The procedure was done again to a final volume of 10 mL PBS. The BALF was centrifuged at $538\times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and the supernatant was collected and stored either at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ or $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for further analysis.

4.7. IgE and Anti-OVA Antibodies Quantification

IgE concentration in BALF samples was quantified by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using anti-rat IgE antibody as the capture reagent and biotin-conjugated anti-rat IgE antibody as the detection reagent [17,24]. Undiluted BALF samples were added, while IgE standard was added in a concentration range of 0.15–20 ng/mL.

Specific IgE antibody isotype in serum and BALF samples were quantified using an antibody-capture ELISA as previously performed [17,24]. Results are shown as absorbance units obtained from all samples analyzed in the same ELISA plate. Serum samples were diluted 1/10, whereas BALF samples were processed undiluted.

The serum concentration of anti-OVA total immunoglobulin concentrations as well as IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG2c isotypes were assessed by ELISA as previously described [17,24]. Results are shown as absorbance units obtained from all samples analyzed in the same ELISA plate. For serum anti-OVA IgG1 and IgG2a quantification, samples were diluted at 1/400,000 and for serum IgG2b and IgGc, samples were diluted 1/1,600 and 1/400, respectively.

4.8. Histological Study

Noses were excised and set overnight in 4% buffered formaldehyde at room temperature. Then, fixed nose tissues were dehydrated, embedded in paraffin and cut into $6\text{ }\mu\text{m}$ -thick sections using a microtome (RM2135, Leica, Wetzlar, Germany). Subsequently, the sections were stained with hematoxylin-eosin and mounted on glass slides. The observation of the nasal architecture was performed using a bright-field microscope (Olympus BX41, Olympus Corporation, Shinjuku, Tokyo, Japan) and an Olympus XC50 camera (Olympus, Tokyo, Japan) at $100\times$.

4.9. Quantification of Cysteinyl Leukotriene (CysLT)

The concentration of CysLT in BALF was quantified using a cysteinyl leukotriene ELISA kit (Enzo Life Sciences Inc., New York, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. Extraction of LTs was first carried out by sample acidification (with 2 M HCl) to pH 3.5 and concentration through a C18 reverse-phase column following the manufacturer's instructions.

4.10. Quantification of Cytokines

The concentration of MCP-1, IL-1 α , IFN- γ , IL-4, IL-13 and IL-10 was quantified in BALF samples using a ProcartaPlex[®] multiplex immunoassay (eBioscience). The concentration of each cytokine was obtained by MAGPIX[®] analyzer (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) at the Cytometry Service of the Scientific and Technological Centers of the University of Barcelona (CCiT-UB). Assay sensitivity was as follows: 15 pg/mL for MCP-1, 10 pg/mL for IL-1 α , 0.62 pg/mL for IL-4, 3 pg/mL for IL-13 and 6.01 pg/mL for IL-10.

4.11. Leukocytes in BALF

An aliquot of BALF samples was concentrated by centrifugation and was then analyzed with an automated hematology analyzer (Spincell, MonLab Laboratories, Barcelona, Spain) calibrated for rat leukocytes. Total leukocytes, lymphocytes, monocytes and granulocytes were quantified and expressed as cells/mL BALF after considering the conditions of sample concentration.

4.12. Statistical Analysis

The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS v22.0, IBM, Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. Data were tested for homogeneity of variance and normality distribution by the Levene's and Shapiro–Wilk tests, respectively. Non-parametric Mann–Whitney U and Friedman tests were used in order to assess significance for independent and related samples, respectively.

To explore the functional correlation between the antibody and CysLT production, body temperature and motor activity changes, Spearman's correlation analyses were performed considering values from the asthmatic group.

5. Conclusions

In conclusion, by means of a combination of two i.p. immunizations (the first one with *B. pertussis* toxin), we have established an easy and effective rat model of allergic asthma in female Brown Norway rats that induces the synthesis of specific Th2-related antibodies, especially IgE, and therefore an anaphylactic response after i.n. challenge. Moreover, the anaphylactic shock can be unbiasedly quantified by changes in motor activity and body temperature, which remained for at least 20 h after the i.n. challenge. Apart from the anaphylactic response, further experiments should be carried out to establish other functional consequences such as vascular and lung responses, as well as the mechanisms involved in such models. Further experiments should also assess cells and mediators involved, such as eosinophils and mast cells and their products. This model, which could potentially be widely applied to other aeroallergens and always administered with alum and *B. pertussis* toxin, could be useful for studying both therapeutic and dietetic interventions in order to prevent or treat this prevalent disease.

Author Contributions: Conceptualization, F.J.P.-C., S.P.-S., I.B., M.C. and M.M.-C.; methodology, M.P., M.J.R.-L., T.C. and M.M.-C.; formal analysis, M.P., M.C. and M.M.-C.; writing—original draft preparation, M.C. and M.M.-C.; writing—review and editing, M.P., F.J.P.-C. and M.J.R.-L.; supervision, M.C. and M.M.-C.; funding acquisition, S.P.-S. and I.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Fund for Scientific, Technology and Technological Innovation Development (FONDECYT) of the National Council of Science, Technology and Technological Innovation (CONCYTEC), Contract 137-2017-FONDECYT.

Acknowledgments: The authors would like to thank Nerea Moreno, Andrea Barranco and Anna Cutrina for their technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

AUC	Area under the curve
BALF	Bronchoalveolar lavage fluid
Bpt	<i>Bordetella pertussis</i> toxin
CysLT	Cysteinyl leukotriene
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
IL	Interleukin
i.n.	Intranasal
IFN	Interferon
i.p.	Intraperitoneal
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
OVA	Ovalbumin
Th	T helper

References

1. World Health Organization. *Prevention of Allergy and Allergic Asthma*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2003. Available online: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/68361> (accessed on 3 March 2020).

2. Papi, A.; Brightling, C.; Pedersen, S.E.; Reddel, H.K. Asthma. *Lancet* **2018**, *391*, 783–800. [[CrossRef](#)]
3. Agache, I. Severe asthma phenotypes and endotypes. *Semin. Immunol.* **2019**, *46*, 101301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. James, S.L.; Abate, D.; Abate, K.H.; Abay, S.M.; Abbafati, C.; Abbasi, N.; Abbastabar, H.; Abd-Allah, F.; Abdela, J.; Abdelalim, A.; et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* **2018**, *392*, 1789–1858. [[CrossRef](#)]
5. Rehman, A.; Amin, F.; Sadeeqa, S. Prevalence of asthma and its management: A review. *J. Pak. Med. Assoc.* **2018**, *68*, 1823–1827. [[PubMed](#)]
6. Shin, Y.S.; Takeda, K.; Gelfand, E.W. Understanding asthma using animal models. *Allergy Asthma Immunol. Res.* **2009**, *1*, 10–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Kucharewicz, I.; Bodzenta-Iukaszyk, A.; Bucko, W. Experimental asthma in rats. *Pharmacol. Rep.* **2008**, *60*, 783–788.
8. Rosenberg, H.F.; Druey, K.M. Modeling asthma: Pitfalls, promises, and the road ahead. *J. Leukoc. Biol.* **2018**, *104*, 41–48. [[CrossRef](#)]
9. Russjan, E.; Kaczyńska, K. Murine models of hapten-induced asthma. *Toxicology* **2018**, *410*, 41–48. [[CrossRef](#)]
10. Zosky, G.R.; Sly, P.D. Animal models of asthma. *Clin. Exp. Allergy* **2007**, *37*, 973–988. [[CrossRef](#)]
11. Aun, M.V.; Bonamichi-Santos, R.; Arantes-Costa, F.M.; Kalil, J.; Giavina-Bianchi, P. Animal models of asthma: Utility and limitations. *J. Asthma Allergy* **2017**, *10*, 293–301. [[CrossRef](#)]
12. Kianmehr, M.; Ghorani, V.; Boskabady, M.H. Animal model of asthma, various methods and measured parameters, a methodological review. *Iran. J. Allergy Asthma Immunol.* **2016**, *15*, 445–465.
13. Pauluhn, J.; Mohr, U. Experimental approaches to evaluate respiratory allergy in animal models. *Exp. Toxicol. Pathol.* **2005**, *56*, 203–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Elias, J.A.; Lee, C.G.; Zheng, T.; Ma, B.; Homer, R.J.; Zhu, Z. New insights into the pathogenesis of asthma. *J. Clin. Investig.* **2003**, *111*, 291–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Camps-Bossacoma, M.; Abril-Gil, M.; Franch, A.; Perez-Cano, F.; Castell, M. Induction of an oral sensitization model in rats. *Clin. Immunol. Endocr. Metab. Drugs* **2015**, *1*, 89–101. [[CrossRef](#)]
16. Li, Y.; Chen, L.; Guo, F.; Cao, Y.; Hu, W.; Shi, Y.; Lin, X.; Hou, J.; Li, L.; Ding, X.; et al. Biochemical and biophysical research communications effects of epigallocatechin-3-gallate on the HMGB1/RAGE pathway in PM 2.5-exposed asthmatic rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *513*, 898–903. [[CrossRef](#)]
17. Abril-Gil, M.; Garcia-Just, A.; Pérez-Cano, F.J.; Franch, À.; Castell, M. Development and characterization of an effective food allergy model in Brown Norway rats. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0125314. [[CrossRef](#)]
18. Zainal, Z.; Rahim, A.A.; Khaza'ai, H.; Chang, S.K. Effects of palm oil tocotrienol-rich fraction (TRF) and carotenes in ovalbumin (OVA)-challenged asthmatic brown Norway rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1764. [[CrossRef](#)]
19. Knippels, L.M.J.; Penninks, A.H.; van Meeteren, M.; Houben, G.F. Humoral and cellular immune responses in different rat strains on oral exposure to ovalbumin. *Food Chem. Toxicol.* **1999**, *37*, 881–888. [[CrossRef](#)]
20. Smole, U.; Schabussova, I.; Pickl, W.F.; Wiedermann, U. Murine models for mucosal tolerance in allergy. *Semin. Immunol.* **2017**, *30*, 12–27. [[CrossRef](#)]
21. 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. [[CrossRef](#)]
22. Lindholm Bøgh, K.; Barkholt, V.; Bernhard Madsen, C. The sensitising capacity of intact β -lactoglobulin is reduced by Co-administration with digested β -lactoglobulin. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2013**, *161*, 21–36. [[CrossRef](#)]
23. Curtis, J.L. Cell-mediated adaptive immune defense of the lungs. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2005**, *2*, 412–416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Abril-Gil, M.; Massot-Cladera, M.; Pérez-Cano, F.J.; 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Knippels, L.M.J.; Penninks, A.H. Recent advances using rodent models for predicting human allergenicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *207*, 157–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Chen, Z.; Liu, N.; Xiao, J.; Wang, Y.H.; Dong, R. The amygdala via the paraventricular nucleus regulates asthma attack in rats. *CNS Neurosci. Ther.* **2020**, 1–11. [[CrossRef](#)]
27. Guan, Y.; Shen, H.; Shen, J.; Jia, Y.; Dong, X.; Jin, Y.; Xie, Q. Anti-allergic activities of 5,7-dimethoxy-3,4'-dihydroxyflavone via inhalation in rat allergic models. *Eur. J. Pharmacol.* **2019**, *848*, 55–61. [[CrossRef](#)]

28. Kucharewicz, I.; Kasacka, I.; Pawlak, D.; Tankiewicz-Kwedlo, A.; Mroczko, B.; Buczko, W.; Bodzenta-Lukaszyk, A. The concentration of kynurenine in rat model of asthma. *Folia Histochem. Cytobiol.* **2008**, *46*, 199–203. [[CrossRef](#)]
29. Chattopadhyay, P.; Pathak, M.P.; Patowary, P.; Chakrabarti, S.; Goyary, D.; Karmakar, S.; Dwivedi, S.K. Synthesized atropine nanoparticles ameliorate airway hyperreactivity and remodeling in a murine model of chronic asthma. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**, *56*, 101507. [[CrossRef](#)]
30. Kaveh, M.; Eftekhari, N.; Boskabady, M.H. The effect of alpha linolenic acid on tracheal responsiveness, lung inflammation and immune markers in sensitized rats. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **2019**, *22*, 255–261.
31. Hanna, D.A.; Khalaf, M.M.; Abo-Saif, A.A. Polydatin protects against ovalbumin-induced bronchial asthma in rats; involvement of urocortin and surfactant-D expression. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2019**, *41*, 403–412. [[CrossRef](#)]
32. Thakur, V.R.; Khuman, V.; Beladiya, J.V.; Chaudagar, K.K.; Mehta, A.A. An experimental model of asthma in rats using ovalbumin and lipopolysaccharide allergens. *Heliyon* **2019**, *5*, e02864. [[CrossRef](#)]
33. Zemouri, H.; Sekiou, O.; Ammar, S.; El Feki, A.; Bouaziz, M.; Messarah, M.; Boumendjel, A. Urtica dioica attenuates ovalbumin-induced inflammation and lipid peroxidation of lung tissues in rat asthma model. *Pharm. Biol.* **2017**, *55*, 1561–1568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Vljaković, S.; Dugandžija-Novaković, S.; Milanović, S.; Janković, B.D. Brain self-stimulation and immunity: Effect on humoral and cell-mediated immune responses. *Int. J. Neurosci.* **1993**, *69*, 235–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Michael, K.C.; Bonneau, R.H.; Bourne, R.A.; Godbolt, L.D.; Caruso, M.J.; Hohmann, C.; Cavigelli, S.A. Divergent immune responses in behaviorally-inhibited vs. non-inhibited male rats. *Physiol. Behav.* **2020**, *213*, 112693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Tonelli, L.H.; Katz, M.; Kovacsics, C.E.; Gould, T.D.; Joppy, B.; Hoshino, A.; Hoffman, G.; Komarow, H.; Postolache, T.T. Allergic rhinitis induces anxiety-like behavior and altered social interaction in rodents. *Brain Behav. Immun.* **2009**, *23*, 784–793. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Li, X.M.; Serebrisky, D.; Lee, S.Y.; Huang, C.K.; Bardina, L.; Schofield, B.H.; Stanley, J.S.; Burks, A.W.; Bannon, G.A.; Sampson, H.A. 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*, 150–158. [[CrossRef](#)]
38. Abril-Gil, M.; Garcia-Just, A.; Cambras, T.; Pérez-Cano, F.J.; Castellote, C.; Franch, À.; Castell, M. Motor activity as an unbiased variable to assess anaphylaxis in allergic rats. *Exp. Biol. Med.* **2015**, *240*, 1373–1377. [[CrossRef](#)]
39. Giménez-Rivera, V.; Metz, M.; Siebenhaar, F. Mast cell-mediated reactions in vivo. In *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*; Gibbs, B., Falcone, F., Eds.; Humana Press: New York, NY, USA, 2014; Volume 1192, pp. 239–247.
40. 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*, 835–840. [[CrossRef](#)]
41. Moura, C.T.M.; Bezerra, F.C.; De Moraes, I.M.I.; Magalhães, P.J.C.; Capaz, F.R. Increased responsiveness to 5-hydroxytryptamine after antigenic challenge is inhibited by nifedipine and niflumic acid in rat trachea in vitro. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2005**, *32*, 1119–1123. [[CrossRef](#)]
42. Boonpiyathad, T.; Celebi Sözen, Z.; Satitsuksona, P.; Akdis, C.A. Immunological mechanisms in asthma. *Semin. Immunol.* **2019**, *46*, 101333. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Artículo 2

“Attenuating Effect of Peruvian Cocoa Populations on the Acute Asthmatic Response in Brown Norway Rats”

Marta Pérez, Francisco J. Pérez-Cano, Trinitat Cambras, Àngels Franch, Iván Best, Santiago Pastor-Soplin, Margarida Castell and Malén Massot-Cladera

Nutrients
2020, volume 12 (8), nº 2301

Revista de acceso abierto
Índice de impacto (2020): 5.719
Categoría: Nutrition & Dietetics, Q1 (17/88)

Los resultados del presente artículo han sido presentados en el congreso:

- Nutrients 2019 - Nutritional Advances in the Prevention and Management of Chronic Disease, Barcelona, September 2019. **In vitro immunomodulatory properties of different Peruvian cocoa populations on rat spleen lymphocytes.** Marta Pérez, Mariano Nicola-Llorente, Malen Massot-Cladera, Santiago Pastor-Soplin, Margarida Castell, Ivan Best, Francisco J. Pérez-Cano.

Resumen ARTÍCULO 2

Objetivo

El cacao contiene componentes bioactivos que varían según factores genéticos y ambientales. El presente estudio, que desarrolla el segundo y parte del tercer objetivo de la tesis, tuvo como fin caracterizar las propiedades antialérgicas de cuatro variedades de cacao autóctonas de Perú (“Blanco de Piura” o BPC, “Amazonas de Perú” o APC, “Criollo de Montaña” o CMC, “Chuncho” o CCC) y compararlas con las de un cacao común (OC). Para ello, se llevó a cabo un estudio *in vitro* y un estudio *in vivo*.

Metodología

En el estudio *in vitro* se determinó el efecto antioxidante y antiinflamatorio de los extractos de los cacaos en macrófagos peritoneales mediante su capacidad de reducir la producción de especies reactivas de oxígeno y el fenotipo anti o proinflamatorio predominante tras su estimulación con lipopolisacárido. Asimismo, la funcionalidad de linfocitos obtenidos del bazo cultivados con los extractos de cacao se evaluó mediante la cuantificación de la secreción de TNF α y de IgG. En base a su contenido de polifenoles, actividad antioxidante y efectos *in vitro*, se seleccionaron las variedades APC y CMC para incluirlos en el estudio *in vivo*.

Para el estudio *in vivo* se utilizaron ratas Brown Norway a las que se indujo el modelo de asma alérgica desarrollado en el Artículo 1. Los animales se sometieron a dietas enriquecidas con un 10% de pasta de cacao APC o CMC durante 5 semanas, empezando 1 semana antes de la inducción del modelo de asma. Se evaluó la respuesta anafiláctica mediante cambios en la temperatura corporal, la actividad motora y el peso corporal. También se cuantificó la concentración de inmunoglobulina E (IgE) específica, proteasa de mastocitos y leucotrienos en suero y/o fluido de lavado broncoalveolar.

Resultados

Las variedades de CMC y OC mostraron una protección parcial frente a la respuesta anafiláctica, reflejado en la atenuación del descenso de la temperatura y la temprana recuperación, la menor síntesis de IgE y liberación de proteasa de mastocitos.

Conclusiones

El cacao peruano CMC presenta un efecto protector sobre la respuesta anafiláctica de un modelo de asma alérgica en ratas.

Article

Attenuating Effect of Peruvian Cocoa Populations on the Acute Asthmatic Response in Brown Norway Rats

Marta Pérez ^{1,2}, Francisco J. Pérez-Cano ^{1,2}, Trinitat Cambras ¹, Àngels Franch ^{1,2}, Ivan Best ^{3,4}, Santiago Pastor-Soplin ³, Margarida Castell ^{1,2} and Malén Massot-Cladera ^{1,2,*}

¹ Secció de Fisiologia, Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain; mperiz@ub.edu (M.P.); franciscoperez@ub.edu (F.J.P.-C.); cambras@ub.edu (T.C.); angelsfranch@ub.edu (À.F.); margaridacastell@ub.edu (M.C.)

² Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), UB, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

³ Programa Cacao, Ingeniería Agroforestal, Facultad de Ciencias Ambientales, Universidad Científica del Sur, Lima 15842, Peru; ibest@usil.edu.pe (I.B.); spastor@ucientifica.edu.pe (S.P.-S.)

⁴ Unidad de Investigación en Nutrición, Salud, Alimentos Funcionales y Nutracéuticos, Universidad San Ignacio de Loyola, Lima 15024, Peru

* Correspondence: malen.massot@ub.edu

Received: 15 June 2020; Accepted: 24 July 2020; Published: 31 July 2020



Abstract: Cocoa contains bioactive components, which vary according to genetic and environmental factors. The present study aimed to ascertain the anti-allergic properties of native Peruvian cocoa populations (“Blanco de Piura” or BPC, “Amazonas Peru” or APC, “Criollo de Montaña” or CMC, “Chuncho” or CCC, and an ordinary cocoa or OC). To do so, after an initial in vitro approach, an in vivo study focused on the induction of an anaphylactic response associated with allergic asthma in Brown Norway rats was carried out. Based on their polyphenol content, antioxidant activity and in vitro effects, the APC and CMC were selected to be included in the in vivo study. Cocoa diets were tested in a model of allergic asthma in which anaphylactic response was assessed by changes in body temperature, motor activity and body weight. The concentration of specific immunoglobulin E (IgE), mast cell protease and leukotrienes was also quantified in serum and/or bronchoalveolar lavage fluid. CMC and OC populations exhibited a protective effect on the allergic asthma rat model as evidenced by means of a partial protection against anaphylactic response and, above all, in the synthesis of IgE and the release of mast cell protease.

Keywords: anaphylaxis; asthma; IgE; leukotriene; mast cell protease; methylxanthines; motor activity; polyphenols; temperature; *Theobroma cacao*

1. Introduction

Allergic asthma is a complex inflammatory disorder characterized by chronic airway inflammation and immune-mediated hypersensitivity reaction [1]. Asthmatic patients often present airflow limitation and suffer from variable respiratory symptoms such as wheezing, shortness of breath, chest tightness and cough [2]. Histologically, the airway of an asthmatic patient is characterized by eosinophils infiltration, degranulated mast cells together with alteration of epithelial cell tight junctions and hyperplasia of goblet cells [3,4]. Although allergic asthma often starts in childhood, its prevalence is also high in adults, and affects around 270 million people worldwide [5]. Peru is one of the countries with the highest prevalence of asthma in Latin America [6,7], where 19.6% of adolescents

(13–14 years old) suffer from asthma. However, this disease is underdiagnosed and the prevalence of physician-diagnosed asthma in Peru has been reported to be 33.1% [6].

Asthma therapy includes pharmacological interventions as well as treatment of associated comorbidities and modifiable lifestyle risk factors (e.g., avoidance of tobacco and weight loss). The pharmacological treatment consists of short-acting β_2 -agonists and inhaled corticosteroids, although adherence is often poor. In addition, emerging biological therapies, such as monoclonal antibodies targeting several cytokines, show promising results [2]. Nevertheless, non-pharmacological strategies can reveal some benefits in reducing symptoms and corticosteroid use. In this context, it has been proposed that diet could represent a good complement to controlling allergic asthma disease.

Flavonoids, chemically belonging to the polyphenol class, are a large family of secondary products of plants that contribute to the blue, scarlet and orange colors of their leaves, flowers and fruits. They are found in seeds, nuts, grains and spices and in some derived beverages such as wine, tea, cocoa and beer [8]. Due to their chemical polyphenolic structure, flavonoids have demonstrated antioxidant properties. This is why, in the past few years, flavonoids have emerged as potential therapeutic/coadjuvant agents in several conditions, such as in cardiovascular diseases, in chronic inflammation, in cancer and also in allergies and asthma [8–11].

The cocoa bean and its derivatives (e.g., cocoa powder, chocolate, etc.) have bioactive compounds and, among them, flavonoids [9]. In particular, cocoa contains (+)-catechin and (–)-epicatechin as monomers and procyanidins (from 2 to 10 monomeric units) as polymers [9]. These flavonoids together with other bioactive compounds, such as theobromine and fiber, confer on cocoa immunomodulatory properties both in vitro and in vivo [12–17]. In particular, cocoa consumption has previously shown anti-allergic properties in a model of systemic disease [18,19] and oral sensitization [20]. In addition, a protective effect on allergy has also been suggested when considering cocoa consumption in young people [21].

Effects of cocoa intake will vary depending on the amount of flavonoids and other bioactive compounds present in the product. Polyphenolic content of cocoa products varies greatly due to genetic factors, such as the variety or clone their beans come from [22,23]. However, genetics only partially determines the biochemical profile. The phenolic content of cocoa products also varies greatly due to environmental factors such as soil, water, cultivation latitude, management and post-harvest handling of the product (fermentation and drying). Thus, the result is a wide range of regional cocoa populations with singular qualities and quantities of these bioactive compounds [24–26].

Based on the above-mentioned, we hypothesized that the cocoa tree (*Theobroma cacao* L.) cultivated under a tropical climate, as in the North of Peru and South of Ecuador, which are considered as being the center of the origin and genetic diversity of cocoa [27,28], may include populations with different biological effects, such as those on the immune system reported so far. Thus, the present study aimed to ascertain the anti-allergic properties of Peruvian cocoa populations, firstly using an in vitro approach to select the most active populations and secondly using an in vivo study focused on the induction of an anaphylactic response associated with allergic asthma in Brown Norway rats.

2. Materials and Methods

2.1. Cocoa Population Characterization

Pastes made with beans from four Peruvian cocoa populations were used: “Blanco de Piura” (BPC) from the Piura region (latitude/longitude $-5.270248, -79.964108$), “Amazonas Peru” (APC) from the Amazonas region ($-5.737422, -78.431114$), “Criollo de Montaña” (CMC) from the Junín region ($-11.335774, -74.533181$), and “Chuncho” (CCC) from the Cusco region ($-12.510664, -73.834577$). As reference cocoa, CCN-51 ordinary cocoa paste from the same area as the CCC was included. With the exception of the CCN-51, these are the populations of Peruvian cocoa considered to be fine or flavor cocoa (Article 39, ICA, 2010) [29], and due to their morpho-agronomic and sensory properties, they are best known and characterized for their use in making high quality artisan chocolates [30,31]. The cocoa

a Gallios™ Cytometer (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) in the Flow Cytometry Unit of the Scientific and Technological Centers of the UB (CCiTUB) and analyzed with FlowJo v.10 software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA). Results are expressed as percentages of positive cells in the macrophage population previously selected according to their forward-scatter (FSC) and side-scatter (SSC) characteristics.

2.3.4. IgG and Tumor Necrosis Factor (TNF)- α Quantification by ELISA

TNF- α were quantified in the 24 h supernatants by stimulated splenocytes using Opt-EIA-set (BD Biosciences), as in previous studies [46]. IgG were quantified in 96 h supernatants by nonstimulated splenocytes with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) following the manufacturer's instructions (BD Biosciences), as previously described [46]. In both cases, absorbance was measured in a microplate photometer (LabSystems Multiskan) and analyzed using ASCENT version 2.6 software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). TNF- α and IgG results are shown as percentage with respect to the control condition (without cocoa), which was considered as 100%.

2.4. *In vivo* Study

According to their polyphenol content, antioxidant activity and their *in vitro* effect on macrophages and splenocytes, two populations of Peruvian cocoa were selected: "Amazonas Peru" cocoa (APC) and "Criollo de Montaña" cocoa (CMC). The *in vivo* effects of these two populations were then established in a model of allergy in rats. The ordinary cocoa (OC) was also included to be considered as a reference cocoa.

2.4.1. Diets and Animal Groups

Four diets were elaborated: a standard diet based on the AIN-93M diet (Envigo) and three diets in which 90% of powdered AIN-93M was mixed with 10% of cocoa paste (OC, APC or CMC) previously pulverized. The mixture was pelletized and subsequently dried in a 40 °C oven for 36 h. Once dried, the pelleted diet was vacuum-packed to prevent oxidation and contamination and stored at 4 °C until used.

The animals were randomized into five experimental groups ($N = 9$ animals/group): the healthy reference group (REF) and asthmatic group (A) were both fed with the standard diet, and the three asthmatic groups received the OC, APC and CMC diets, respectively (CC, APC and CMC groups). The animals had free access to the experimental diet and water. The body weight and food and water intake were monitored every 2–3 days throughout the study. The Appraising Project Office's program from the Universidad Miguel Hernández de Elche (Alicante, Spain) was used to calculate the minimum number of animals providing statistically significant differences among groups, assuming that there is no dropout rate and type I error of 0.05 (two-sided). In addition, the sample size was adjusted following the University Ethical Committee guidelines and to apply the three Rs rule for experimenting in animals.

2.4.2. Sensitization and Induction of an Anaphylactic Response

At 1 week after the beginning of the experimental diet, asthma was induced using ovalbumin (OVA) as allergen, as previously described [47]. Briefly, on day 0, rats were firstly sensitized via intraperitoneal (i.p.) with 500 μ L of a suspension containing 50 μ g of OVA (grade V, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), 20 mg of alum (Imject®; Pierce, IL, USA) and 50 ng of *Bordetella pertussis* toxin (Sigma-Aldrich) and boosted a week later with 50 μ g of OVA in 20 mg of alum (i.p.). A parallel group of non-sensitized rats (age and sex matched) was included.

At day 28, between 10 a.m. and 1 p.m., all rats received an intranasal (i.n) challenge with 300 μ L of an OVA solution (50 mg/mL). Anaphylactic response was accurately assessed by changes in motor activity, body temperature, body weight and plasma protease concentration. Anti-OVA IgE was quantified in blood and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) samples obtained 24 h later.

samples were obtained under prior informed consent (PIC), in agreement and signed with farmers, and in accordance with the Nagoya Protocol spirit of sharing the benefits arising from the utilization of genetic resources [32,33]. BPC comes from a coastal area, facing the Pacific Sea. It develops in a dry and warm environment, but under irrigation and neutral loamy soils. The other cocoa populations are found on the eastern side of the Andes, in the Amazon, and they develop in rain fed on acidic and clay loam soils. The cocoa pastes were made at the place of origin, based on a common protocol. Biochemical analysis, which was performed in triplicate, began with 100% pure cocoa paste.

2.1.1. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity

The extraction of bioactive compounds from the different cocoa samples was carried out using the methodology proposed by Pedan et al. [34], with minor modifications. The cocoa paste was heated in a water bath until it reached a liquid state. To remove lipids, 20 mL of each sample was placed in a 250 mL flask and 80 mL of n-hexane was added (5 min at 20 °C) and then centrifuged (2880× g, 5 min). The defatting procedure was repeated five times, until the n-hexane extract remained colorless. After drying, 5 g of cocoa powder with an average particle size of less than 100 µm was extracted three times with 15 mL of acetone/water (50/50) (8 min at 50 °C) and then centrifuged (2880× g, 5 min). The supernatants obtained in each extraction step were mixed and used to measure the total levels of phenols and flavonoids using the Folin-Ciocalteu method [35] and the aluminum chloride colorimetric method [36], respectively.

In vitro antioxidant capacity was evaluated using the α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay [37] and the ferric-reducing/antioxidant power (FRAP) assay [38].

2.1.2. Methylxanthine Quantification

High-performance liquid chromatography (HPLC) determination of theobromine, theophylline, and caffeine was performed according to Srdjenovic et al. [39] with minor modifications. Firstly, an extract was prepared (2.5 g of cocoa powder with 10 mL of water) and then incubated in an ultrasonic bath (30 min at 60 °C). After centrifuging (4000× g, 10 min, 20 °C), 10 mL of the supernatants was purified using solid phase separation (SPE) with a Supelclean LC-18 SPE cartridge (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Samples were run on a Chromaster 600 HPLC with a diode array detector (Hitachi, Tokyo, Japan), an autosampler and a C8 reverse-phase column (5 µm particle size, i.d. 4.6 × 150 mm). The mobile phase consisted of water-tetrahydrofuran (0.1% in water, pH 8)—acetonitrile (90:10, v/v); the run time was 8 min with a flow rate of 0.8 mL/min. Detection was performed at 273 nm using a photodiode array detector.

2.2. Animals

Four-week-old female Brown Norway rats were obtained from Envigo (Huntingdon, UK) and housed (3 rats per cage) in the animal facilities at the Faculty of Pharmacy and Food Science (University of Barcelona) in polycarbonate cages containing bedding of large fibrous particles (Souralit 1035, Bobadab S.L., Santo Domingo de la Calzada, Spain) under controlled conditions of temperature and humidity in a 12:12 h light/dark cycle. The animals remained in quarantine for 1 week before experiments began.

All experimental procedures were conducted in accordance with the institutional guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the University of Barcelona and the Catalonia Government (CEEA/UB ref. 414/16 and DAAM 9351, respectively), in full compliance with national legislation following the EU-Directive 2010/63/EU for the protection of animals used for scientific purposes.

2.3. *In vitro* Study

2.3.1. Peritoneal Macrophages and Lymphocytes Culture

Peritoneal macrophages and spleen mononuclear cells were obtained from six healthy rats under anesthesia with ketamine (90 mg/kg) (Merial Laboratories S.A, Barcelona, Spain) and xylazine (10 mg/kg) (Bayer A.G, Leverkusen, Germany).

Peritoneal macrophages were collected as previously described [40]. Briefly, after the injection of 40 mL of ice-cold sterile phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) into the peritoneal cavity, a 1 min massage was performed, and cell suspension was aspirated and centrifuged ($538\times g$, 10 min, 4 °C). After removing possible erythrocytes by osmotic lysis (ammonium chloride), cells were resuspended with cold Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium without phenol red (Merck, Madrid, Spain), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 IU/mL streptomycin-penicillin, 2 mM L-glutamine and 0.05 mM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Macrophage counts were assessed using a SpinCell hematology analyzer (MonLab Laboratories, Barcelona, Spain), properly calibrated for these cells, and were plated (10^6 cells/mL) at 37 °C overnight. After removing non-attached cells, macrophages were incubated with 10 µg/mL of each of the five cocoa extracts in dimethyl sulfoxide (DMSO) for 2 h. Afterwards, cells were stimulated with 100 ng/mL lipopolysaccharide (LPS) for 6 h. Stimulated macrophages with no cocoa addition were used as control. Cell viability was measured through determination of lactate dehydrogenase (LDH) enzyme released to the medium. Macrophages were also used to establish M1/M2 polarization.

Spleen mononuclear cells were isolated from rat spleens as previously described [41,42]. Firstly, spleen cell suspensions were obtained by passing the tissue through a cell strainer (40 µm, BD Biosciences, Heidelberg, Germany), and then erythrocytes were eliminated by osmotic lysis. A Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used for cell counting and the assessment of viability. Splenocytes (10^6 cells/well) were immediately incubated in the presence of 10 µg/mL of each of the five cocoa extracts in DMSO for 2 h. Afterwards, splenocytes were stimulated with 100 ng/mL LPS or remained nonstimulated for 24 h, and then, supernatants from both conditions were collected for TNF-α determination. In parallel, nonstimulated splenocytes were cultured for 96 h, whose supernatants were used to quantify the IgG. Both assays were performed in quadruplicate.

2.3.2. Radical Oxygen Species (ROS) Production

ROS production was quantified in isolated macrophages as previously described [42]. In brief, macrophages were plated (10^5 cells/well) and allowed to attach overnight. Then, they were washed with warm 1% FBS-supplemented RPMI medium without phenol red. Macrophages were incubated with 20 µM of reduced 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) probe (Invitrogen, Paisley, UK) for 30 min at 37 °C. Macrophage-derived ROS oxidized H₂DCF-DA to a fluorescent compound (20,70-dichlorofluorescein, DCF), which was quantified using the fluorimeter Modulus® Microplate Multimode Reader (excitation 538 nm, emission 485 nm, Turner BioSystems, CA, USA). ROS results are expressed as the time course from 0 to 130 min and also as the area under the curve (AUC) of this period of time.

2.3.3. M1 and M2 Characterization

After cocoa incubation and LPS stimulation, the M1 and M2 phenotype of macrophages were established by the exclusive expression of the molecules CD86 and CD206, respectively [43,44]. For M1 phenotype, an anti-rat CD86 conjugated to phycoerythrin (Biolegend, San Diego, CA, USA) was applied as in previous studies. For M2 phenotype, a primary rabbit polyclonal antibody (Ab) to mannose receptor (CD206) (Abcam plc, Cambridge, UK) was used, followed by blocking nonspecific signals, and a secondary Ab conjugated to Alexa-Fluor-647 (Abcam plc), as in previous studies [45]. A negative control using isotype-matched Ab was included for each sample. Data were acquired with

2.4.3. Body Temperature Monitoring

In order to monitor the body temperature, data loggers (Thermochron[®], iButton type DS1921H-FS with a resolution of 0.125 °C) were used. For this, 1 week before the i.n. challenge, a logger was intraperitoneally implanted in each rat under isoflurane (Isoflo[®], ECUPHAR, Barcelona, Spain) anesthesia (4–5% in the induction, 1–2% in the maintenance with an oxygen flow of 0.5–1.0 L/min). Meloxicam (1 mg/kg body weight, subcutaneous route) was administered subcutaneously immediately after the intervention and 24 h later. Animals were then housed in individual cages in an isolated room (see motor activity assessment section). Body temperature was recorded every minute from the night before the challenge (starting at 2 a.m.) until the day after the challenge, when the sensor was removed. The results of body temperature are expressed as the time course of the mean values during the registered period, the mean value every 2 h from 2 h before the challenge to 18 h after the i.n. challenge and as the AUC between 900 and 400 min after the challenge considering changes above 34 °C.

2.4.4. Motor Activity Assessment

The movement of animals housed in individual cages and placed in an isolated room were quantified using an activity meter, as previously performed [47,48]. The activity meters consisted of two infrared beams that crossed perpendicularly 7 cm above the floor of the cage. Every time the animal crossed one beam a count was detected. Number of movements was recorded every minute from 2 days before the i.n. challenge until 18 h after. To summarize the effects of anaphylactic response on motor activity, the total number of movements in the active period of the rats (darkness period from 8 p.m to 8 a.m) was considered, with the exception of the last 2 h in order to avoid the variations in motor activity in anticipation of light due to the normal circadian rhythm. The movements in the dark period before and after the i.n. challenge were also compared.

2.4.5. Sample Collection

One hour after the i.n. challenge, blood samples from the saphenous vein were obtained to quantify plasma mast cell protease.

Twenty-four hours after the i.n. challenge, the rats were anesthetized with ketamine (90 mg/kg) (Merial Laboratories S.A) and xylazine (10 mg/kg) (Bayer A.G). Urine samples obtained by direct puncture of the bladder were kept at –80 °C until quantification of the polyphenol concentration. Blood samples were collected by heart puncture and kept at –20 °C until anti-IgE determination.

2.4.6. Quantification of Plasma Rat Mast Cell Protease II

Plasma samples obtained 1 h after the i.n. challenge were used to quantify rat mast cell protease II (RMCP II) concentration using a commercial ELISA kit (Bionova, Madrid, Spain) following the manufacturer's instructions. Results are shown as absorbance units obtained from all samples analyzed in the same ELISA plate compared to that produced by asthmatic rats, which are considered as 100%.

2.4.7. Antibody Quantification

Anti-OVA specific IgE antibody isotype in serum and BALF samples were quantified using an antibody-capture ELISA, as previously performed [18,41]. A pool of positive sera was used as standard in each plate. Serum samples were diluted 1/10, whereas BALF samples were processed undiluted. Results are shown as mean percentage compared to the asthmatic group, which are considered as 100%.

IgE concentration in BALF samples was quantified using a sandwich ELISA, as previously described [47]. Results are shown as mean percentage compared to the asthmatic group, which are considered as 100%.

2.4.8. Quantification of Cysteinyl Leukotriene (CysLT)

The concentration of CysLT in BALF was quantified using an Cysteinyl Leukotriene ELISA kit (Enzo Life Sciences Inc., New York, NY, SUA) following manufacturer's instructions, with a prior extraction of leukotrienes as previously described [47]. Results are shown as the percentage from that produced by asthmatic rats, which are considered as 100%.

2.4.9. Urine Polyphenols

Total phenolic content in urine samples was determined according to Folin–Ciocalteu's method adapted to a microplate. Briefly, 250 μ L of Folin–Ciocalteu's reagent (Sigma-Aldrich) and 1.25 mL of 20% Na_2CO_3 solution were added to 500 μ L of diluted urine. After 2 h at room temperature, the absorbance was measured at 765 nm. A standard curve prepared with gallic acid (Sigma-Aldrich) was used.

2.5. Statistical Analysis

The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS v22.0, IBM, Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. Data were tested for homogeneity of variance and normality distribution using the Levene's and Shapiro–Wilk tests, respectively. When data was homogeneous and had a normal behavior, a conventional two-way ANOVA test followed by the post hoc Bonferroni and paired t-test were used in order to assess significance for independent and related samples, respectively. Otherwise, the nonparametric Kruskal–Wallis test followed by the post hoc Mann–Whitney U test were performed. Significant differences were established when $p < 0.05$ for the paired t-test, whereas for multiple comparisons, the p value was adjusted following Bonferroni correction [49].

To explore the functional correlation between the antibody levels, CysLT concentration, RMCPII production, body temperature and motor activity changes, Spearman' correlation analyses were performed in all samples grouped together.

3. Results

3.1. Cocoa Peruvian Populations Characterization

The content of total phenolics, total flavonoids, theobromine and caffeine differed between the five cocoa samples considered (Table 1). The population with the highest content in phenolics and flavonoids was CMC, followed by APC, and CCC in the third place ($p < 0.005$ CMC, APC and CCC vs. OC; $p < 0.005$ APC vs. CMC; $p < 0.005$ CCC vs. BPC). The OC and BPC cocoa pastes contained the lowest levels of both phenolic and flavonoid content. With regard to methylxanthine content (Table 1), the CMC cocoa paste exhibited the highest amounts of theobromine and caffeine ($p < 0.00001$) followed by the CCC population.

With regard to the antioxidant capacity (Table 1), the APC cocoa paste was the one with the highest capacity, followed by the CMC and CCC populations ($p < 0.01$), whereas the BPC had the lowest antioxidant capacity.

Table 1. Content of total polyphenols and flavonoids, methylxanthines and antioxidant capacity in the cocoa populations considered in the study. APC: “Amazonas Peru” cocoa; BPC: “Blanco de Piura” cocoa; CCC: “Chuncho” cocoa; CMC: “Criollo de Montaña” cocoa; OC: ordinary cocoa. Results are represented as mean \pm standard error of the mean from three independent experiments. Values not sharing letters denote significant differences between populations ($p < 0.01$) while values sharing the same letter did not differ.

	OC	BPC	APC	CMC	CCC
Total phenolics (mg gallic acid equivalents/g)	24.11 \pm 1.15 ^{ab}	21.07 \pm 0.98 ^a	28.69 \pm 0.80 ^c	30.44 \pm 0.56 ^d	25.30 \pm 0.38 ^b
Total flavonoids (mg catechin equivalents/g)	34.82 \pm 1.01 ^a	36.59 \pm 0.98 ^a	50.35 \pm 0.95 ^b	56.62 \pm 1.12 ^c	45.60 \pm 1.26 ^d
Theobromine (mg/100 g)	560.75 \pm 0.45 ^a	491.39 \pm 0.93 ^b	564.71 \pm 0.37 ^a	604.19 \pm 0.28 ^d	573.36 \pm 0.30 ^c
Theophylline (mg/100 g)	1.41 \pm 0.00 ^a	1.37 \pm 0.00 ^b	1.40 \pm 0.00 ^c	1.39 \pm 0.00 ^d	1.54 \pm 0.00 ^e
Caffeine (mg/100 g)	236.35 \pm 0.06 ^a	280.74 \pm 0.56 ^b	275.10 \pm 0.11 ^c	360.53 \pm 0.27 ^d	324.55 \pm 0.15 ^e
FRAP activity ($\mu\text{mol Fe}^{2+}$ /g)	275.29 \pm 12.28 ^{ab}	261.39 \pm 14.15 ^a	344.31 \pm 11.80 ^c	309.55 \pm 6.7 ^b	308.32 \pm 4.79 ^b
DPPH activity ($\mu\text{g TEAC/g}$)	25.36 \pm 0.24 ^{ab}	19.62 \pm 0.38 ^c	29.77 \pm 0.70 ^a	25.38 \pm 0.94 ^{bd}	24.39 \pm 0.07 ^d

3.2. In Vitro Effects of Cocoa Peruvian Populations

An approach to study the immunomodulatory effects of each cocoa population in vitro on spleen lymphocytes and peritoneal macrophages was carried out (Figure 1).

3.2.1. Effects on Spleen Cells

The viability of rat spleen mononuclear cells was not affected by the cocoa addition, which was around 90% in all cases. In these conditions, CMC and CCC cocoa populations were able to prevent the secretion of TNF- α after LPS stimulation ($p < 0.01$) (Figure 1a). Moreover, all cocoa populations lowered spontaneous IgG production compared to the control ($p < 0.01$) (Figure 1b).

3.2.2. Effects on Macrophages

Cell viability of rat macrophages did not decrease after cocoa addition but the ROS production was significantly reduced in cells incubated with both APC and CMC populations throughout the studied period, as observed in the time course (Figure 1c) as well as in the AUC ($p < 0.01$ vs. OC and CCC samples) (Figure 1d). In addition, when analyzing the proportion of M1 (pro-inflammatory) and M2 (anti-inflammatory) macrophages after LPS stimulation, it was observed that three of the samples tested (BPC, APC and CMC) decreased the proportions of M1 cells compared to the stimulated cells with no cocoa (Figure 1e). Moreover, the BPC population was able to significantly increase the proportion of M2 macrophages ($p < 0.01$) (Figure 1e). Overall, although all cocoa samples tended to lower the M1/M2 ratio, only the decrease caused by the BPC and CMC cocoas reached statistical significance ($p < 0.01$) (Figure 1f).

Based on their polyphenol content, antioxidant activity and their in vitro effects on macrophages and splenocytes, the APC and CMC Peruvian cocoa populations were selected to be included in the in vivo study. The OC cocoa was also included to be used as a reference cocoa.

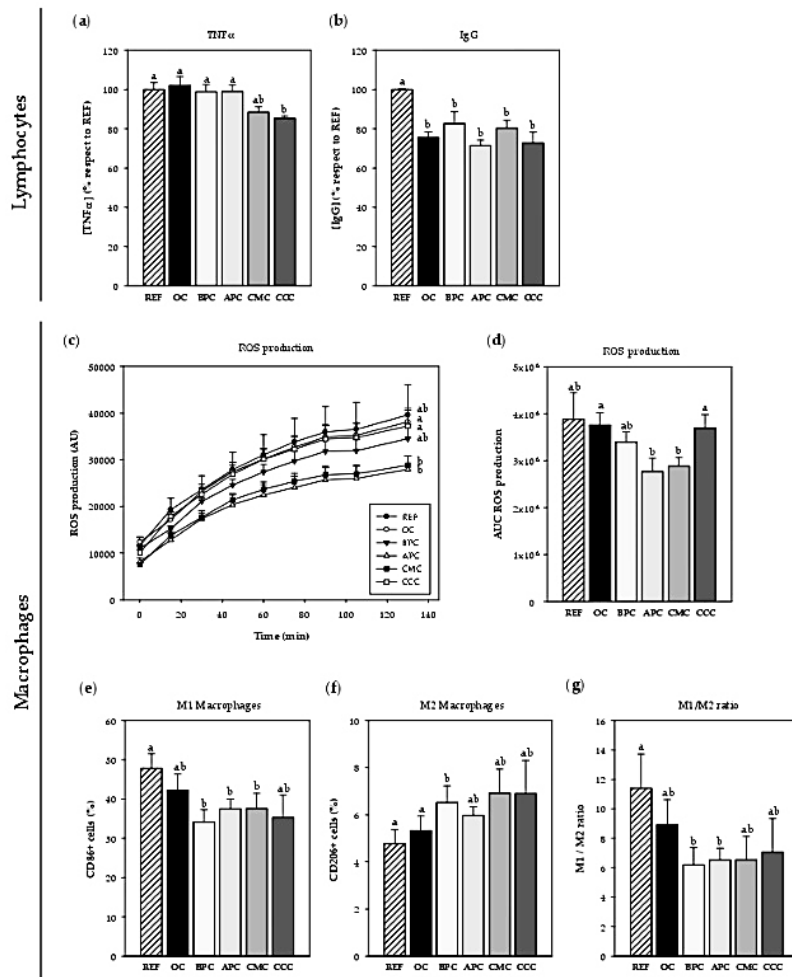


Figure 1. In vitro immunomodulatory effects of the five Peruvian cocoa samples. Effects of cocoa samples on TNF- α (a) and spontaneous IgG (b) production by splenocytes. Effects of cocoa samples on macrophages: oxygen reactive species (ROS) production (c) over time and as area under the curve (AUC) (d), and phenotype characterization: M1 (e), M2 (f) and M1/M2 ratio (g). REF: cells with no cocoa; OC: ordinary Peruvian cocoa; BPC: “Blanco de Piura”; APC: “Amazonas Peru” cocoa; CMC: “Criollo de Montaña” cocoa; CCC: “Chuncho” del Cusco. Results are represented as mean \pm standard error of the mean ($N = 6$). Values not sharing letters denote significant differences between cocoa samples ($p < 0.01$), while values sharing the same letter did not differ.

3.3. In Vivo Effects of Cocoa Peruvian Populations

3.3.1. Body Weight and Food and Water Intake

At the beginning of the diets, 1 week before asthma induction, animals from all groups had a similar body weight (Table 2). Although the asthmatic animals’ body weight was not significantly modified by either asthma induction or cocoa diets, it tended to be lower than that in the reference animals after the booster and it tended to be even lower with cocoa diets. These changes in body weight were not due to changes in either food or water consumption, which did not vary between diets and groups (Supplementary Tables S1 and S2).

Table 2. Body weight for all experimental groups throughout the study. REF: healthy reference group fed standard diet; A: asthmatic group fed standard diet; OC: asthmatic group fed 10% ordinary Peruvian cocoa; APC: asthmatic group fed 10% “Amazonas Peru” cocoa; CMC: asthmatic group fed 10% “Criollo de Montaña” cocoa. Results are represented as mean \pm standard error of the mean ($N = 9$).

Time (days)	REF	A	OC	APC	CMC
−7	57.01 \pm 5.04	57.52 \pm 3.32	56.43 \pm 3.59	56.46 \pm 3.54	56.97 \pm 2.63
−3	67.38 \pm 5.37	68.60 \pm 3.57	65.37 \pm 3.86	64.84 \pm 3.80	64.03 \pm 2.90
0 ^a	75.96 \pm 5.37	76.97 \pm 3.55	72.44 \pm 3.79	72.66 \pm 4.03	71.91 \pm 2.79
4	85.07 \pm 4.80	84.76 \pm 3.10	79.31 \pm 3.65	79.21 \pm 3.80	78.47 \pm 2.59
7 ^b	91.57 \pm 4.66	91.33 \pm 3.57	82.73 \pm 3.50	85.10 \pm 3.94	84.48 \pm 2.72
11	98.29 \pm 5.52	93.70 \pm 3.76	88.29 \pm 3.34	89.31 \pm 3.99	89.43 \pm 2.67
14	104.03 \pm 4.66	99.94 \pm 3.74	94.59 \pm 4.16	94.96 \pm 4.28	94.07 \pm 2.82
18	109.49 \pm 4.88	105.90 \pm 3.62	97.99 \pm 4.68	97.98 \pm 4.15	99.27 \pm 2.92
21	115.80 \pm 4.86	112.00 \pm 3.72	104.26 \pm 4.58	104.24 \pm 4.49	105.77 \pm 2.89
25	118.29 \pm 5.58	115.68 \pm 3.62	107.66 \pm 4.93	108.10 \pm 4.39	107.65 \pm 2.52
28	123.73 \pm 5.16	118.09 \pm 2.46	109.46 \pm 4.52	111.95 \pm 4.03	112.97 \pm 2.71

^a day of sensitization; ^b day of booster.

3.3.2. Content of Polyphenols in Urine

Total polyphenol concentration was quantified in urine samples at the end of the study to verify the polyphenol absorption. As expected, urine samples from rats fed the cocoa diets showed higher values than those obtained from the reference and asthmatic rats fed the standard diet (Figure 2). Moreover, the highest polyphenol content was found in CMC- and APC-fed animals' urine samples, which was the population with the highest flavonoid content (Table 1).

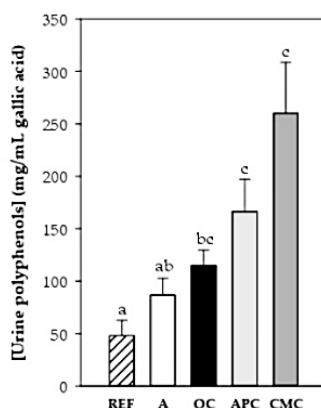


Figure 2. Polyphenol content (expressed as $\mu\text{g/mL}$ gallic acid) in urine samples at the end of the study. REF: healthy reference group fed standard diet; A: asthmatic group fed standard diet OC: asthmatic animals fed with ordinary cocoa-enriched diet; APC: asthmatic animals fed with “Amazonas Peru” cocoa-enriched diet; CMC: asthmatic animals fed with “Criollo de Montaña” cocoa-enriched diet. Results are represented as mean \pm standard error of the mean ($N = 9$). Values not sharing letters denote significant differences between groups ($p < 0.01$), while values sharing the same letter did not differ.

3.3.3. Changes in Body Temperature After i.n. Challenge

The body temperature (BT) was registered for each rat from 2 a.m. on the day of the i.n. challenge to 10 a.m. the day after (Figure 3). The mean value profile of BT registered every minute for this period with respect to the hour of the day (independently of the moment of challenge) is shown in Figure 3a, in which the darkness period is represented in gray. Also indicated is the period in which

rats received the i.n. challenge and blood was collected. Table 3 summarizes the results of BT adjusted to the moment each rat was challenged and until 18 h after the i.n. challenge.

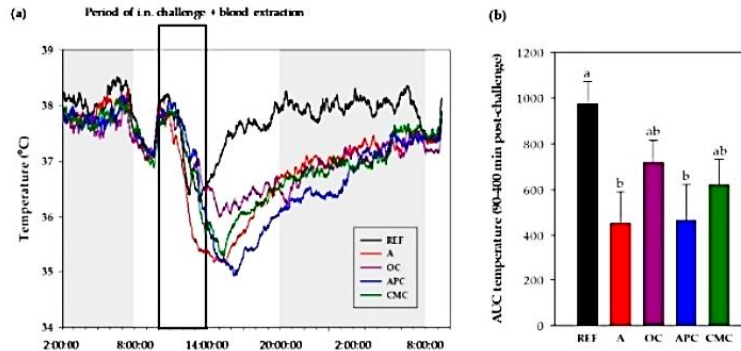


Figure 3. Changes in body temperature. Profile of body temperature from 2 a.m. before intranasal (i.n.) challenge and until 10 a.m. the day after. Statistical differences not shown (a). Area under the curve (AUC) of body temperature (from 34 °C) in the period comprised between 90 and 400 min after the i.n. challenge (b). REF: healthy animals fed standard diet; A: asthmatic animals fed standard diet; OC: asthmatic animals fed with ordinary cocoa-enriched diet; APC: asthmatic animals fed with “Amazonas Peru” cocoa-enriched diet; CMC: asthmatic animals fed with “Criollo de Montaña” cocoa-enriched diet. Results are shown as mean (a) or as mean plus standard error of the mean (b) (N = 9). Values not sharing letters denote significant differences between groups in (b) (*p* < 0.01), while values sharing the same letter did not differ.

Table 3. Temperature means at 2 h intervals from 2 h before until 18 h after the intranasal challenge. REF: healthy animals fed standard diet; A: asthmatic animals fed standard diet; OC: asthmatic animals fed with ordinary cocoa-enriched diet; APC: asthmatic animals fed with “Amazonas Peru” cocoa-enriched diet; CMC: asthmatic animals fed with “Criollo de Montaña” cocoa-enriched diet. Results are represented as mean ± standard error of the mean (N = 9).

Time (h)	REF	A	OC	APC	CMC
−2 to 0	37.7 ± 0.11	37.6 ± 0.10	37.8 ± 0.18	37.9 ± 0.18	37.7 ± 0.13
0 to 2	37.1 ± 0.61	36.7 ± 0.29 *	37.1 ± 0.19	36.1 ± 0.44 *	36.2 ± 0.33 *
2 to 4	36.7 ± 0.51 * ^a	35.1 ± 0.58 * ^b	36.2 ± 0.24 * ^a	35.3 ± 0.68 * ^a	35.8 ± 0.32 * ^a
4 to 6	37.5 ± 0.14 * ^a	35.5 ± 0.41 * ^b	36.2 ± 0.37 * ^b	35.6 ± 0.44 * ^b	36.1 ± 0.43 * ^b
6 to 8	37.7 ± 0.11 ^a	36.2 ± 0.23 * ^b	36.5 ± 0.44 * ^b	36.1 ± 0.28 * ^b	36.3 ± 0.39 * ^b
8 to 10	37.9 ± 0.11 ^a	36.6 ± 0.17 * ^b	36.4 ± 0.58 ^b	36.4 ± 0.36 * ^b	36.7 ± 0.37 * ^b
10 to 12	38.0 ± 0.09 ^a	36.9 ± 0.18 * ^b	36.9 ± 0.50 ^a	36.5 ± 0.40 * ^b	36.8 ± 0.39 ^b
12 to 14	37.9 ± 0.12 ^a	37.1 ± 0.18 * ^b	37.0 ± 0.52 ^a	36.8 ± 0.30 * ^b	36.9 ± 0.38 ^b
14 to 16	38.1 ± 0.09 ^a	37.2 ± 0.12 * ^b	37.1 ± 0.60 ^a	37.2 ± 0.25 * ^b	37.0 ± 0.40 ^b
16 to 18	38.0 ± 0.14 ^a	37.3 ± 0.18 * ^b	37.2 ± 0.64 ^a	37.4 ± 0.24 ^a	37.4 ± 0.27 ^a

* represents statistical differences vs. their own basal values before challenge (−2 to 0) (*p* < 0.05). Values not sharing letters denote significant differences between groups during the same period of time (*p* < 0.01) while values sharing the same letter did not differ.

The i.n. challenge resulted in a reduced BT (Figure 3a and Table 3). However, the profile through the day shows that the REF group was able to recover the BT during the afternoon-evening and remained more or less constant the following night (Figure 3a). On the contrary, the asthmatic rats showed a slower BT recovery than the REF group and achieved the REF animals’ BT at about 8 a.m. the day after the challenge.

Before challenging, the basal BT (mean value for 2 h before challenge) did not differ between groups (Table 3). After the i.n. challenge, all animals reduced their BT and reached the lowest values 2–4 h later. The REF group showed about 1 °C of BT reduction with respect to their own basal BT

($p < 0.05$), in the period between 2 and 6 h after the challenge. The asthmatic group fed a standard diet underwent a decrease of more than 2 °C of BT, which was already detected during the first 2 h after the i.n. challenge. Their BT remained significantly lower during all the period considered when comparing it either to their basal BT ($p < 0.05$) or to the REF animals' BT at the same time interval ($p < 0.01$).

The OC-fed asthmatic rats showed a BT reduction of about 1.5 °C during the interval of 2–8 h after the i.n. challenge. Their BT was significantly lower compared to their basal BT ($p < 0.05$) and to that in the REF group during the 4–10 h period of time after the challenge ($p < 0.05$). The APC-fed asthmatic rats also showed a reduction in BT (of about 2.5 °C) with respect to their basal values in the period comprised between 0 and 16 h after the challenge ($p < 0.01$) and with respect to the REF animals' BT in the period comprised between 4 and 16 h ($p < 0.01$). In the APC-fed group, the BT mean profile was the lowest (Figure 3a). Finally, the CMC-fed asthmatic rats also showed a decrease in BT (of about 2 °C) from immediately after the challenge until 10 h after, when it was compared to their basal values ($p < 0.05$), and during the period from 4 to 16 h after the challenge when compared to the REF animals' BT ($p < 0.05$).

The effects of diets on BT in the first hours after handling have been considered as AUC (Figure 3b). It can be observed that the BT was the lowest in the asthmatic rats fed either a standard diet or APC diet ($p < 0.01$)

3.3.4. Changes in Motor Activity After i.n. Challenge

The motor activity (MA) of each rat was registered from the day before the i.n. challenge to 18 h after. To summarize the results and avoid the period in which animals were handled, the MA in the dark period (activity period for rats) during the night before the i.n. challenge was compared to the MA during the night after the challenge (Figure 4). The challenge significantly decreased the MA in all the asthmatic groups compared to the REF group ($p < 0.05$). In particular, it resulted in a decrease of MA by about 60% in the asthmatic animals fed the standard diet with respect to their own basal MA ($p = 0.001$). However, the cocoa samples-fed asthmatic rats exhibited a lower reduction (of about 40–50%) in the MA in comparison to their MA before the challenge ($p < 0.05$). The MA of cocoa-fed animals did not differ from that of the asthmatic rats fed a standard diet.

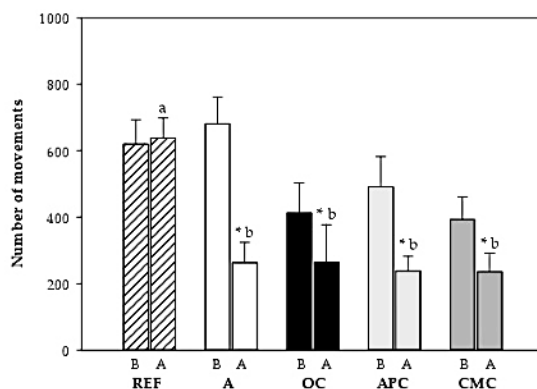


Figure 4. Number of movements during the active period (10 h of darkness) before (B) and after (A) intranasal challenge. REF: healthy animals fed standard diet; A: asthmatic animals fed standard diet; OC: asthmatic animals fed with ordinary cocoa-enriched diet; APC: asthmatic animals fed with “Amazonas Peru” cocoa-enriched diet; CMC: asthmatic animals fed with “Criollo de Montaña” cocoa-enriched diet. Results are shown as mean \pm standard error ($N = 9$). * represents statistical differences from individual values before challenge (paired t-test) ($p < 0.05$). Values not sharing letters denote significant differences between groups ($p < 0.01$) while values sharing the same letter did

3.3.5. Changes in Body Weight After i.n. Challenge

One day after the i.n. challenge, all groups showed a significant decrease in body weight with respect to the body weight before the challenge (Figure 5). The asthmatic animals fed a standard diet decreased body weight by about 6%, whereas it decreased by up to 4% in cocoa-fed animals. Only the decrease in A group was significantly higher than that in the REF group ($p < 0.001$).

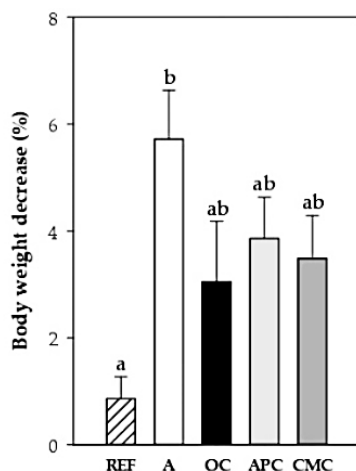


Figure 5. Body weight decrease (%) 24 h after the intranasal challenge with respect to the body weight before the challenge. REF: healthy reference group fed standard diet; A: asthmatic group fed standard diet; OC: asthmatic animals fed with ordinary cocoa-enriched diet; APC: asthmatic animals fed with “Amazonas Peru” cocoa-enriched diet; CMC: asthmatic animals fed with “Criollo de Montaña” cocoa-enriched diet. Results are represented as mean \pm standard error of the mean ($N = 9$). Values not sharing letters denote significant differences between groups ($p < 0.01$), while values sharing the same letter did not differ.

3.3.6. Rat Mast Cell Protease II (RMCPII)

RMCPII concentration was determined in plasma samples collected 1 h after the i.n. challenge from all experimental groups. The asthmatic group (A group) showed higher RMCPII concentration than that in the REF animals (Figure 6) ($p < 0.01$). Both the APC and CMC diets tended to prevent such increase whereas the OC diet was able to maintain the RMCPII values similar to those found in the REF group.

3.3.7. IgE Antibodies

Specific anti-OVA IgE Ab concentration was quantified in serum and BALF samples obtained the day after the i.n. challenge. There were significant levels of specific IgE in the serum of asthmatic animals fed a standard diet ($p < 0.05$ vs. REF group) (Figure 7a). However, both OC and CMC diets were able to partially prevent such an increase, this reduction being significant only in the OC group, whose anti-OVA IgE levels were 50% lower than those in the A group ($p = 0.021$). In the BALF samples, both the OC and CMC groups showed a reduction of about 50% in the anti-OVA IgE levels in comparison to those observed in the asthmatic group ($p < 0.05$, Figure 7b). No significant changes were observed in the APC group in any of the sample types.

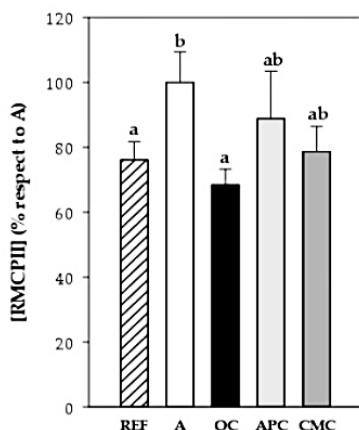


Figure 6. Rat mast cell protease II (RMCPII) in plasma obtained 1 h after the intranasal challenge. REF: healthy animals fed standard diet; A: asthmatic animals fed standard diet; OC: asthmatic animals fed with ordinary cocoa-enriched diet; APC: asthmatic animals fed with “Amazonas Peru” cocoa-enriched diet; CMC: asthmatic animals fed with “Criollo de Montaña” cocoa-enriched diet. Results are shown as mean \pm standard error ($N = 9$). Results are expressed as mean \pm standard error ($N = 9$) of absorbance units. Values not sharing letters denote significant differences between groups ($p < 0.01$), while values sharing the same letter did not differ.

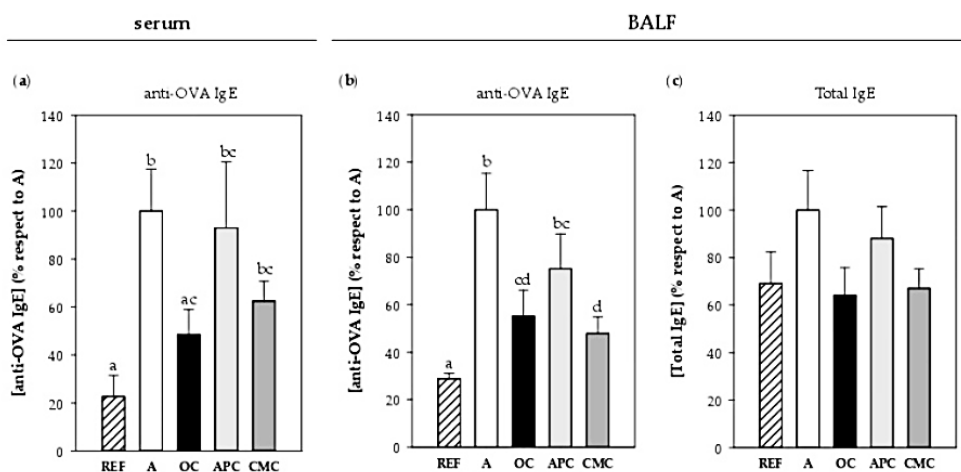


Figure 7. Anti-OVA IgE concentration in serum (a) and BALF (b) and total IgE content in BALF (c) obtained 24 h after the intranasal challenge. REF: healthy animals fed standard diet; A: asthmatic animals fed standard diet; OC: asthmatic animals fed with ordinary cocoa-enriched diet; APC: asthmatic animals fed with “Amazonas Peru” cocoa-enriched diet; CMC: asthmatic animals fed with “Criollo de Montaña” cocoa-enriched diet. Results are shown as mean \pm standard error ($N = 9$). Values not sharing letters denote significant differences between groups ($p < 0.01$), while values sharing the same letter did not differ.

Total IgE content was also quantified in BALF, but in this case, although a similar profile to specific IgE was observed, no statistically significant differences were detected (Figure 7c).

There was a correlation between specific IgE levels in serum and BALF samples and the RMCPII content in plasma quantified in samples from 1 h after i.n. challenge ($r = 0.370$ $p = 0.029$ and $r = 0.440$

$p = 0.008$, respectively). However, no correlations were found between IgE levels and changes in MA and BT (data not shown).

3.3.8. Leukotrienes

Cys-LT concentration was determined in BALF samples collected 24 h after the i.n. challenge from all experimental groups. The asthmatic animals showed the highest values, but they did not reach statistical significance (Figure 8). This tendency to increase was partially reverted by all three diets containing cocoa samples.

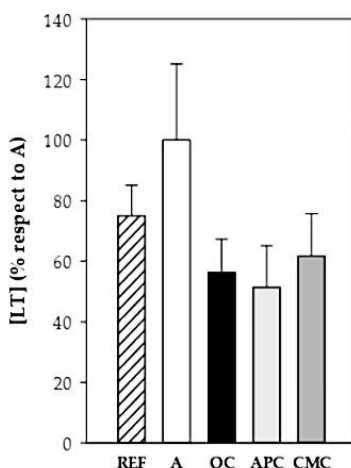


Figure 8. CysLT content in BALF samples obtained 24 h after the intranasal challenge. REF: healthy animals fed standard diet; A: asthmatic animals fed standard diet; OC: asthmatic animals fed with ordinary cocoa-enriched diet; APC: asthmatic animals fed with “Amazonas Peru” cocoa-enriched diet; CMC: asthmatic animals fed with “Criollo de Montaña” cocoa-enriched diet. Results are shown as mean \pm standard error ($N = 9$).

No correlations were found between Cys-LT and RMCPII, IgE levels and changes in MA and BT.

4. Discussion

In the current study, the preventive potential of several Peruvian cocoa samples for allergic asthma has been approached. Cocoa has been considered beneficial for several chronic diseases [50–53], and it has been reported that such positive effects are mainly due to the composition of its bioactive compounds [54]. The content of such bioactive compounds in cocoa is largely dependent not only on the agricultural and postharvest practices and processing, but also on the cultivar and origins of cocoa [22,23]. In this sense, herein we have tested different Peruvian cocoa samples cultivated in various regions of the country, which could impact differently on human health due to their different bioactive compound contents. Therefore, the biochemical characterization along with the *in vitro* properties of four native Peruvian populations—all high quality cocoa used for making artisan chocolates—have been analyzed. At the same time, their properties were compared to an ordinary Peruvian cocoa but from an Ecuadorean clone [55]. It has been observed that the content of polyphenols, flavonoids and methylxanthines was distinct between the populations tested, thus confirming that environmental and genetic factors significantly influence their content, as previously reported [23]. The “Criollo de Montaña” (CMC) population was the richest in flavonoid (and polyphenol) concentration, as well as in methylxanthines content. This population grows in the Junín region (Satipo city) at 480 m.a.s.l. where the climate is predominantly hot and humid with a fluctuating temperature of between 18 and 35 °C. The second population with a higher content in flavonoids/polyphenols was the “Amazonas Peru”

(APC) cocoa, which also exhibited the highest antioxidant activity, followed by the CMC population. The antioxidant properties of both the APC and CMC populations were also observed in the *in vitro* ROS production by macrophages, which was significantly decreased by these populations. Therefore, the higher the content of polyphenols these populations have, the stronger the antioxidant effects they exert, as would be expected.

The CCC (“Chuncho”) population exerted *in vitro* inhibitory effects on the inflammatory mediators’ secretion, such as TNF- α , by LPS-stimulated splenocytes, in agreement with previous *in vitro* studies using a conventional cocoa and particular cocoa flavonoids [13]. The anti-inflammatory properties of cocoa samples were also evidenced when analyzing the phenotype of *in vitro* LPS-stimulated macrophages. In this sense, the results obtained show that the native populations from BPC (“Blanco de Piura”) and APC had the potential to downregulate pro-inflammatory macrophage proportion while upregulating those from anti-inflammatory cells. Similar effects have been reported in the THP1 cell line cultured with a cocoa phenolic extract, which was able to induce a phenotypic switch in polarized macrophages in favor of the anti-inflammatory one [56].

On the other hand, all native populations tested in the present study, and also the ordinary cocoa, were able to downregulate the *in vitro* ability to produce immunoglobulins. This effect is in line with *in vivo* studies reporting a reduction of not only plasma IgG concentration, but also IgM and IgA in cocoa-fed animals [57,58]. This downregulation of immunoglobulin secretion seems to be due to an inhibitory B cell differentiation caused by the decrease in Th2 cytokines [59]. Overall, given that allergy is a Th2-associated response, these results encouraged us to evaluate the effects of cocoa in the present allergic asthma rat model.

As previously mentioned, based on their polyphenol content, their antioxidant activity and their *in vitro* effects, two cocoa populations (“Amazonas Peru” and “Criollo de Montaña”) were selected to be used *in vivo* in an allergic asthma model. In fact, previous studies have demonstrated the antiallergic properties of cocoa in preclinical studies, in models of systemic disease [18,19] and oral sensitization [20], and in observational studies considering cocoa consumption habits in young people with allergy [21].

Herein, body temperature and motor activity variables have been used to assess the anaphylactic response after *i.n.* challenge as previously set up [47] and also as used earlier in a model of oral allergy [19,48]. In addition, the decrease in body weight was also considered as a variable to assess anaphylaxis. Our results evidenced that the anaphylactic response was accompanied by a reduction in motor activity, which was not modified by any cocoa diet, although this decrease in cocoa-fed animals was relatively lower. Previous studies had reported a reduction in motor activity in animals fed with cocoa and receiving an oral challenge [19]. Nevertheless, when changes in body temperature were considered, some differences appeared. The asthmatic group fed a standard diet showed a significant decrease in body temperature that appeared earlier than the other groups and was more long-lasting, while the OC- and CMC-fed asthmatic animals maintained their body temperature similar to that found in the REF group for a longer time. This partial prevention in body temperature decrease by OC and CMC cocoa samples does not match with the vasodilator properties reported for cocoa [52] and the effects observed on a food allergy model [19]. On the other hand, the protective effects of cocoa samples were also observed in the decrease in body weight after *i.n.* challenge. Furthermore, the increase in plasma RMCPII released by activated mucosal mast cells [60] was partially prevented by both OC and CMC cocoas. In summary, the CMC population appears to be the native Peruvian population with the most potential to prevent anaphylactic response after *i.n.* challenge, and this ability is shared and even higher with the OC clone.

Diets containing Peruvian cocoa samples were able to differently influence the synthesis of specific IgE antibodies. Again, the CMC cocoa paste was the most effective native population at decreasing both the serum and bronchoalveolar lavage fluid IgE concentration, but its effects did not differ from the non-native OC cocoa. The protective effect of cocoa on IgE synthesis found here has already been described in other allergy models [8,18], and it confirms the immunomodulatory effects of a 10% cocoa

diet in preclinical studies. Similarly, the anti-asthmatic effect of some extracts rich in flavonoids has also been demonstrated in an asthmatic animal model [61,62] and also in a limited number of clinical trials [63]. In agreement with these effects, the consumption of polyphenol-containing apple extracts was associated with an alleviation of some allergic symptoms, such as runny nose and nasal congestion in subjects suffering from allergic rhinitis [64].

Leukotrienes are other inflammatory molecules released when allergen binds to the mast cell-coupled IgE in allergy, which are primarily responsible for the bronchoconstriction during asthma attacks [60]. In our model, its concentration tended to increase in the asthmatic animals fed a standard diet, but all cocoa diets tended to prevent it and showed similar content as the reference group. All three cocoa samples tested in the present study contain theophylline, a methylxanthine naturally present in small amounts (1.40 mg/100 g) in cocoa beans that came out as a clinical treatment for asthma and other respiratory diseases once its bronchodilator effects had been identified [65]. In fact, it has been found that theophylline can act as suppressant of leukotriene production [66].

From the results obtained in *in vivo* experiments, it can be hypothesized that the main mechanism by which cocoa diets can exert a protective effect against allergic asthma response is by attenuating the synthesis of Th2-related antibodies. In particular, the cocoa diets have shown their anti-allergic potential mainly reducing the anti-OVA IgE levels. Therefore, the lower the IgE production is, the lower the amount of this antibody which can bind to mast cells in the airway. Consequently, when a new allergen contact is produced, the allergen may bind to only a little mast cell-bound IgE. For this reason, the release of mediators such as proteases and leukotrienes in the bronchoalveolar compartment is low and a weak anaphylactic response can be observed. The mechanisms produced by the effective cocoa populations must be addressed in further studies.

Polyphenol content in urine was also determined for approaching flavonoid absorption. The animals fed the CMC diet, which was elaborated with the native Peruvian population that exerted the most protective effects, had the highest polyphenol concentration in urine. Nevertheless, the OC diet also showed a protective response against anaphylactic response and showed the lowest urine polyphenol concentration. Therefore, it is not just the flavonoid content that seems to be important in playing a protective role in this model, but it may also be the type of flavonoids (for example monomers or polymeric forms) present in each population. Anyway, as CMC has the most immunomodulatory properties of the Peruvian “fine aroma” cocoa populations evaluated in this study, further experiments focused on particular cocoa flavonoids or other cocoa bioactive compounds in this population must shed light on this issue.

The cocoa used as raw material for chocolate is a source of differences in terms of its sensorial quality, as can be observed between ordinary cocoa and fine aroma cocoa. Ordinary cocoa has the most widespread use in the industry, being used for common chocolates, while fine aroma cocoa is used for fine or artisan chocolates. The result of this study shows that the origin of the cocoa populations from which the chocolate pastes are obtained determines differences that are expressed at the biochemical level and in their bioactivity. Chocolate pastes, made with cocoa taken from different populations in the same country (Peru), are biochemically differentiable and have different bioactivity, as demonstrated in the present study.

5. Conclusions

Overall, it has been shown that particular populations of Peruvian cocoa exhibit a protective effect on a rat model of acute allergic asthma response. This effect can be observed by means of a partial protection against anaphylactic response and, above all, in the synthesis of IgE and the release of mast cell protease. These results show that the origin of cocoa is relevant and should be taken into account and declared in these types of studies, and probably also when it comes to be used in the making of dark chocolate or as nutraceuticals.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6643/12/8/2301/s1>, Table S1: Food intake for all experimental groups throughout the study. Table S2: Water consumption for all experimental groups throughout the study.

Author Contributions: Conceptualization, F.J.P.-C., I.B., S.P.-S., M.C. and M.M.-C.; methodology, M.P., T.C., À.F. and M.M.-C.; formal analysis, M.P., F.J.P.-C., T.C., M.C. and M.M.-C.; writing—original draft preparation, F.J.P.-C., M.C. and M.M.-C.; writing—review and editing, M.P., T.C., À.F., I.B., S.P.-S.; supervision, M.C. and M.M.-C.; funding acquisition, F.J.P.-C., I.B., S.P.-S. and M.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Fund for Scientific, Technology and Technological Innovation Development (FONDECYT) of the National Council of Science, Technology and Technological Innovation (CONCYTEC), Contract 137-2017-FONDECYT, and Universidad Científica del Sur. Open access fees were supported by the Universidad Científica del Sur (Lima, Peru).

Acknowledgments: The authors would like to thank Mariona Camps and Mariano Nicola Llorente for their technical assistance in the in vitro studies and Nerea Moreno, Andrea Barranco and Anna Cutrina for their technical assistance in the in vivo studies.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. World Health Organization. *Prevention of Allergy and Allergic Asthma*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2003.
2. Papi, A.; Brightling, C.; Pedersen, S.E.; Reddel, H.K. Asthma. *Lancet* **2018**, *391*, 783–800. [CrossRef]
3. Mishra, V.; Banga, J.; Silveyra, P. Oxidative stress and cellular pathways of asthma and inflammation: Therapeutic strategies and pharmacological targets HHS Public Access. *Pharmacol. Ther.* **2018**, *181*, 169–182. [CrossRef] [PubMed]
4. Curtis, J.L. Cell-mediated Adaptive Immune Defense of the Lungs. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2005**, *2*, 412–416. [CrossRef] [PubMed]
5. James, S.L.; Abate, D.; Abate, K.H.; Abay, S.M.; Abbafati, C.; Abbasi, N.; Abbastabar, H.; Abd-Allah, F.; Abdela, J.; Abdelalim, A.; et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* **2018**, *392*, 1789–1858. [CrossRef]
6. Solé, D.; Aranda, C.S.; Wandalsen, G.F. Asthma: Epidemiology of disease control in Latin America—Short review. *Asthma Res. Pract.* **2017**, *3*, 4–9. [CrossRef]
7. Mallol, J.; Solé, D.; Baeza-Bacab, M.; Aguirre-Camposano, V.; Soto-Quiros, M.; Baena-Cagnani, C. Regional variation in asthma symptom prevalence in Latin American children. *J. Asthma* **2010**, *47*, 644–650. [CrossRef]
8. Castell, M.; Pérez-Cano, F.J.; Abril-Gil, M.; Franch, À. Flavonoids on Allergy. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 973–987. [CrossRef]
9. Shahidi, F.; Ambigaipalan, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects. *J. Funct. Foods* **2015**, 1–78. [CrossRef]
10. Joskova, M.; Sadlonova, V.; Nosalova, G.; Novakova, E.; Franova, S. Polyphenols and their components in experimental allergic asthma. In *Respiratory Regulation—The Molecular Approach*; Pokorski, M., Ed.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2013; pp. 91–98.
11. Ayala-Mata, F.; Barrera-Mendoza, C.C.; Cortés-Rojo, C.; Montoya-Pérez, R.d.C.; García-Pérez, M.E.; Rodríguez-Orozco, A.R. Antioxidants in asthma: Polyphenols. *Med. Interna Mex.* **2019**, *35*, 223–234.
12. 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*, 859–866. [CrossRef]
13. Ramiro, E.; Franch, A.; Castellote, C.; Pérez-Cano, F.; Permanyer, J.; Izquierdo-Pulido, M.; Castell, M. Flavonoids from Theobroma cacao down-regulate inflammatory mediators. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8506–8511. [CrossRef]
14. Ramiro-Puig, E.; Castell, M. Cocoa: Antioxidant and immunomodulator. *Br. J. Nutr.* **2009**, *101*, 931–940.

15. Castell, M.; Franch, A.; Castellote, C. Effect of a diet rich in cocoa flavonoids on experimental acute inflammation. In *Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources*; Keller, R.B., Ed.; Nova Science Publishers Inc.: New York, NY, USA, 2009; Volume 6, pp. 213–229. ISBN 9781607416227.
16. Massot-Cladera, M.; Franch, À.; Pérez-Cano, F.J.; Castell, M. Cocoa and cocoa fibre differentially modulate IgA and IgM production at mucosal sites. *Br. J. Nutr.* **2016**, *115*, 1539–1546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Camps-Bossacoma, M.; Massot-Cladera, M.; Abril-Gil, M.; Franch, A.; Pérez-Cano, F.J.; Castell, M. Cocoa Diet and Antibody Immune Response in Preclinical Studies. *Front. Nutr.* **2017**, *4*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Abril-Gil, M.; Massot-Cladera, M.; Pérez-Cano, F.J.; 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Abril-Gil, M.; Pérez-Cano, F.J.; Franch, À.; Castell, M. Effect of a cocoa-enriched diet on immune response and anaphylaxis in a food allergy model in Brown Norway rats. *J. Nutr. Biochem.* **2016**, *27*, 317–326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Camps-Bossacoma, M.; Abril-Gil, M.; Saldaña-Ruiz, S.; Franch, À.; Pérez-Cano, F.J.; Castell, M. Cocoa diet prevents antibody synthesis and modifies lymph node composition and functionality in a rat oral sensitization model. *Nutrients* **2016**, *8*, 242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Rodríguez-Lagunas, M.J.; Vicente, F.; Pereira, P.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J. Relationship between cocoa intake and healthy status: A pilot study in university students. *Molecules* **2019**, *24*, 812. [[CrossRef](#)]
22. Febrianto, N.A.; Zhu, F. Diversity in Composition of Bioactive Compounds among 26 Cocoa Genotypes. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 9501–9509. [[CrossRef](#)]
23. Oracz, J.; Zyzelewicz, D.; Nebesny, E. The Content of Polyphenolic Compounds in Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.), Depending on Variety, Growing Region, and Processing Operations: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2015**, *55*, 1176–1192. [[CrossRef](#)]
24. Bertoldi, D.; Barbero, A.; Camin, F.; Caligiani, A.; Larcher, R. Multielemental fingerprinting and geographic traceability of *Theobroma cacao* beans and cocoa products. *Food Control* **2016**, *65*, 46–53. [[CrossRef](#)]
25. Caligiani, A.; Marseglia, A.; Prandi, B.; Palla, G.; Sforza, S. Influence of fermentation level and geographical origin on cocoa bean oligopeptide pattern. *Food Chem.* **2016**, *211*, 431–439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. D'Souza, R.N.; Grimbs, S.; Behrends, B.; Bernaert, H.; Ullrich, M.S.; Kuhnert, N. Origin-based polyphenolic fingerprinting of *Theobroma cacao* in unfermented and fermented beans. *Food Res. Int.* **2017**, *99*, 550–559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Thomas, E.; van Zonneveld, M.; Loo, J.; Hodgkin, T.; Galluzzi, G.; van Etten, J. Present Spatial Diversity Patterns of *Theobroma cacao* L. in the Neotropics Reflect Genetic Differentiation in Pleistocene Refugia Followed by Human-Influenced Dispersal. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e47676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Zarrillo, S.; Gaikwad, N.; Lanaud, C.; Powis, T.; Viot, C.; Lesur, I.; Fouet, O.; Argout, X.; Guichoux, E.; Salin, F.; et al. The use and domestication of *Theobroma cacao* during the mid-Holocene in the upper Amazon. *Nat. Ecol. Evol.* **2018**, *2*, 1879–1888. [[CrossRef](#)]
29. United Nations Conference on Trade and Development. *International Cocoa Agreement*; United Nations: Geneva, Switzerland, 2010; ISBN 9780857091253.
30. Eskes, A.B.; Rodríguez, C.A.C.; Cruz Condori, D.; Seguíne, E.; García Carrion, L.F.; Lachenaud, P. Large genetic diversity for fine-flavor traits unveiled in cacao (*Theobroma cacao* L.) with special attention to the native Chunco variety in Cusco, Peru. *Agrotropica (Itabuna)* **2018**, *30*, 157–174. [[CrossRef](#)]
31. García Carrión, L.F. *Catálogo de Cultivares de cacao del Perú*; Ministerio de Agricultura y Riego, Dirección General de Competitividad Agraria: Lima, Peru, 2010.
32. Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica. *Protocolo de Nagoya Sobre Acceso a los Recursos Genéticos y Participación Justa y Equitativa en los Beneficios que se Deriven de su Utilización al Convenio Sobre la Diversidad Biológica*; Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica: Montreal, QC, Canada, 2011; ISBN 92-9225-310-7.
33. Laird, S.; Wynberg, R.; Rourke, M.; Humphries, F.; Muller, M.R.; Lawson, C. Rethink the expansion of access and benefit sharing. *Science* **2020**, *367*, 1200–1202. [[CrossRef](#)]
34. Pedan, V.; Fischer, N.; Rohn, S. An online NP-HPLC-DPPH method for the determination of the antioxidant activity of condensed polyphenols in cocoa. *Food Res. Int.* **2016**, *89*, 890–900. [[CrossRef](#)]
35. Shetty, K.; Curtis, O.F.; Levin, R.E.; Witkowsky, R.; Ang, W. Prevention of Vitrification Associated with in vitro Shoot Culture of Oregano. (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* spp. *J. Plant Physiol.* **1995**, *147*, 447–451.

36. Xu, G.; Ye, X.; Chen, J.; Liu, D. Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 330–335. [[CrossRef](#)]
37. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30. [[CrossRef](#)]
38. Marinova, D.; Ribarova, F.; Atanassova, M. Total Phenolics and Total Flavonoids in Bulgarian Fruits and Vegetables. *J. Univ. Chem. Technol. Metall.* **2005**, *40*, 255–260.
39. Srdjenovic, B.; Djordjevic-Milic, V.; Grujic, N.; Injac, R.; Lepojevic, Z. Simultaneous HPLC determination of caffeine, theobromine, and theophylline in food, drinks, and herbal products. *J. Chromatogr. Sci.* **2008**, *46*, 144–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Ramos-Romero, S.; Pérez-Cano, F.J.; Ramiro-Puig, E.; Franch, A.; Castell, M. Cocoa intake attenuates oxidative stress associated with rat adjuvant arthritis. *Pharmacol. Res.* **2012**, *66*, 207–212. [[CrossRef](#)]
41. Abril-Gil, M.; Garcia-Just, A.; Pérez-Cano, F.J.; Franch, À.; Castell, M. Development and characterization of an effective food allergy model in Brown Norway rats. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0125314. [[CrossRef](#)]
42. Estruel-Amades, S.; Massot-Cladera, M.; Garcia-Cerdà, P.; Pérez-Cano, F.J.; Franch, À.; Castell, M.; Camps-Bossacoma, M. Protective effect of hesperidin on the oxidative stress induced by an exhausting exercise in intensively trained rats. *Nutrients* **2019**, *11*, 783. [[CrossRef](#)]
43. Wu, L.; Magaz, A.; Maughan, E.; Oliver, N.; Darbyshire, A.; Loizidou, M.; Emberton, M.; Birchall, M.; Song, W. Cellular responses to thermoresponsive stiffness memory elastomer nanohybrid scaffolds by 3D-TIPS. *Acta Biomater.* **2019**, *85*, 157–171. [[CrossRef](#)]
44. Yu, T.; Gao, M.; Yang, P.; Liu, D.; Wang, D.; Song, F.; Zhang, X.; Liu, Y. Insulin promotes macrophage phenotype transition through PI3K/Akt and PPAR- γ signaling during diabetic wound healing. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 4217–4231. [[CrossRef](#)]
45. Rodríguez-Palmero, M.; Franch, À.; Castell, M.; Pelegrí, C.; Pérez-Cano, F.J.; Kleinschnitz, C.; Stoll, G.; Hünig, T.; Castellote, C. Effective treatment of adjuvant arthritis with a stimulatory CD28-specific monoclonal antibody. *J. Rheumatol.* **2006**, *33*, 110–118.
46. Ramiro-Puig, E.; Pérez-Cano, F.J.; Ramírez-Santana, C.; Castellote, C.; Izquierdo-Pulido, M.; Permanyer, J.; Franch, A.; Castell, M. Spleen lymphocyte function modulated by a cocoa-enriched diet. *Clin. Exp. Immunol.* **2007**, *149*, 535–542. [[CrossRef](#)]
47. Pérez, M.; Pérez-cano, F.J.; Rodríguez-lagunas, M.J.; Cambras, T. Development and characterization of an allergic asthma rat model for interventional studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3841. [[CrossRef](#)]
48. Abril-Gil, M.; Garcia-Just, A.; Cambras, T.; Pérez-Cano, F.J.; Castellote, C.; Franch, À.; Castell, M. Motor activity as an unbiased variable to assess anaphylaxis in allergic rats. *Exp. Biol. Med.* **2015**, *240*, 1373–1377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Jafari, M.; Ansari-Pour, N. Why, when and how to adjust your P values? *Cell J.* **2019**, *20*, 604–607.
50. Ellam, S.; Williamson, G. Cocoa and Human Health. *Annu. Rev. Nutr.* **2013**, *33*, 105–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Ferri, C.; Desideri, G.; Ferri, L.; Proietti, I.; Di Agostino, S.; Martella, L.; Mai, F.; Di Giosia, P.; Grassi, D. Cocoa, Blood Pressure, and Cardiovascular Health. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 9901–9909. [[CrossRef](#)]
52. Desch, S.; Schmidt, J.; Kobler, D.; Sonnabend, M.; Eitel, I.; Sareban, M.; Rahimi, K.; Schuler, G.; Thiele, H. Effect of Cocoa Products on blood pressure: Systematic review and meta-analysis. *Am. J. Hypertens.* **2010**, *23*, 97–103. [[CrossRef](#)]
53. Seem, S.A.; Yuan, Y.V.; Tou, J.C. Chocolate and chocolate constituents influence bone health and osteoporosis risk. *Nutrition* **2019**, *65*, 74–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Andújar, I.; Recio, M.C.; Giner, R.M.; Ríos, J.L. Cocoa polyphenols and their potential benefits for human health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2012**, *2012*, 1–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Pallares Pallares, A.; Estupiñán A, M.R.; Perea Villamil, J.A.; López Giraldo, L.J. Impacto de la fermentación y secado sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante del clon de cacao CCN-51. *Rev. ION Bucaramanga* **2016**, *29*, 7–21.
56. Dugo, L.; Belluomo, M.G.; Fanali, C.; Russo, M.; Cacciola, F.; Maccarrone, M.; Sardanelli, A.M. Effect of Cocoa Polyphenolic Extract on Macrophage Polarization from Proinflammatory M1 to Anti-Inflammatory M2 State. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 1–11. [[CrossRef](#)]

57. Ramiro-Puig, E.; Pérez-Cano, F.J.; Ramos-Romero, S.; Pérez-Berezo, T.; Castellote, C.; Permanyer, J.; Franch, À.; Izquierdo-Pulido, M.; Castell, M. Intestinal immune system of young rats influenced by cocoa-enriched diet. *J. Nutr. Biochem.* **2008**, *19*, 555–565. [CrossRef] [PubMed]
58. Massot-Cladera, M.; Abril-Gil, M.; Torres, S.; Franch, A.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J. Impact of cocoa polyphenol extracts on the immune system and microbiota in two strains of young rats. *Br. J. Nutr.* **2014**, *112*, 1944–1954. [CrossRef] [PubMed]
59. Pérez-Berezo, T.; Ramiro-Puig, E.; Pérez-Cano, F.J.; Castellote, C.; Permanyer, J.; Franch, A.; Castell, M. Influence of a cocoa-enriched diet on specific immune response in ovalbumin-sensitized rats. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 389–397. [CrossRef]
60. Gibson, S.; Mackeller, A.; Newlands, G.F.J.; Miller, H.R.P. 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. [PubMed]
61. Das, M.; Ram, A.; Ghosh, B. Luteolin alleviates bronchoconstriction and airway hyperreactivity in ovalbumin sensitized mice. *Inflamm. Res.* **2003**, *52*, 101–106.
62. Choi, J.R.; Lee, C.M.; Jung, I.D.; Lee, J.S.; Jeong, Y.I.; Chang, J.H.; Park, H.J.; Choi, I.W.; Kim, J.S.; Shin, Y.K.; et al. Apigenin protects ovalbumin-induced asthma through the regulation of GATA-3 gene. *Int. Immunopharmacol.* **2009**, *9*, 918–924. [CrossRef]
63. Tanaka, T.; Takahashi, R. Flavonoids and asthma. *Nutrients* **2013**, *5*, 2128–2143. [CrossRef]
64. 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.
65. Cooling, D.S. Theophylline toxicity. *J. Emerg. Med.* **1993**, *11*, 415–425. [CrossRef]
66. Kraft, M.; Torvik, J.A.; Trudeau, J.B.; Wenzel, S.E.; Martin, R.J. Theophylline: Potential antiinflammatory effects in nocturnal asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1996**, *97*, 1242–1246. [CrossRef]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Artículo 3

“Influence of Consumption of Two Peruvian Cocoa Populations on Mucosal and Systemic Immune Response in an Allergic Asthma Rat Model”

Marta Pérez, Maria J. Rodríguez-Lagunas, Francisco J. Pérez-Cano, Iván Best, Santiago Pastor-Soplin, Margarida Castell and Malén Massot-Cladera

Nutrients
2022, volume 14 (3), nº 410

Revista de acceso abierto
Índice de impacto (2021): 6.706
Categoría: Nutrition & Dietetics, Q1 (15/90)

Los resultados del presente artículo han sido presentados en el congreso:

- XII ISIN Conference on Immunonutrition, Barcelona, July 2021. **Influence of the consumption of Peruvian cocoa populations on a rat model of allergic asthma.** Marta Pérez, Malén Massot-Cladera, Santiago Pastor-Soplin, Margarida Castell, Ivan Best, Francisco J. Pérez-Cano.

Resumen ARTÍCULO 3

Objetivo

El Artículo 2 permitió establecer el papel protector de determinadas variedades de cacao autóctono del Perú en la respuesta anafiláctica de un modelo de asma en rata. El objetivo de este artículo, que se incluye en el tercer objetivo de la tesis, fue establecer el efecto de dietas ricas en variedades de cacao nativas del Perú (“Amazonas de Perú” o APC, y “Criollo de Montaña” o CMC) sobre la función inmunológica del compartimiento bronquial y a nivel sistémico y mucosal en el modelo de asma alérgica en rata establecido en el Artículo 1. Los resultados se compararon con los obtenidos tras la ingesta de un cacao ordinario (OC).

Metodología

Para ello, se analizaron las células del fluido de lavado broncoalveolar (BALF) y su contenido en IgA, así como la respuesta de anticuerpos alérgeno-específicos en suero, entre otras variables, de las ratas Bron Norway del Artículo 2 a las que se indujo el modelo de asma alérgica y se aplicó la intervención nutricional con dietas enriquecidas al 10% en pasta de cacao nativo peruano.

Resultados

Las dietas enriquecidas con las tres variedades de cacao evitaron el aumento de concentración de IgG1 sérica específica (isotipo asociado a una respuesta inmunitaria Th2). Asimismo, las tres dietas de cacao evitaron el aumento de granulocitos, sobre todo eosinófilos, presente en el BALF tras la inducción del choque anafiláctico. Además, tanto la dieta OC como la CMC pudieron prevenir la infiltración de leucocitos tanto en la tráquea como en la cavidad nasal y disminuyeron la cantidad de IgA total en las muestras fecales y BALF.

Conclusiones

En general, los resultados destacan el potencial de diferentes variedades de cacao en la prevención del asma alérgica.

Article

Influence of Consumption of Two Peruvian Cocoa Populations on Mucosal and Systemic Immune Response in an Allergic Asthma Rat Model

Marta Pérez ^{1,2}, María J. Rodríguez-Lagunas ^{1,2}, Francisco J. Pérez-Cano ^{1,2}, Ivan Best ^{3,4,*}, Santiago Pastor-Soplín ³, Margarida Castell ^{1,2,5,*} and Malén Massot-Cladera ^{1,2}

- ¹ Secció de Fisiologia, Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l’Alimentació, Universitat de Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain; marta.perizto@gmail.com (M.P.); mjrodriguez@ub.edu (M.J.R.-L.); franciscoperez@ub.edu (F.J.P.-C.); malen.massot@ub.edu (M.M.-C.)
- ² Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), UB, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain
- ³ Programa Cacao, Ingeniería Agroforestal, Facultad de Ciencias Ambientales, Universidad Científica del Sur, Lima 15842, Peru; spastor@cientifica.edu.pe
- ⁴ Unidad de Investigación en Nutrición, Salud, Alimentos Funcionales y Nutracéuticos, Universidad San Ignacio de Loyola, Lima 15024, Peru
- ⁵ Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain
- * Correspondence: ibest@usil.edu.pe (I.B.); margaridacastell@ub.edu (M.C.); Tel.: +34-93-402-4505 (M.C.)



Citation: Pérez, M.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Pérez-Cano, F.J.; Best, I.; Pastor-Soplín, S.; Castell, M.; Massot-Cladera, M. Influence of Consumption of Two Peruvian Cocoa Populations on Mucosal and Systemic Immune Response in an Allergic Asthma Rat Model. *Nutrients* **2022**, *14*, 410. <https://doi.org/10.3390/nu14030410>

Rodríguez-Lagunas, M.J.; Pérez-Cano, F.J.; Best, I.; Pastor-Soplín, S.; Castell, M.; Massot-Cladera, M. Influence of Consumption of Two Peruvian Cocoa Populations on Mucosal and Systemic Immune Response in an Allergic Asthma Rat Model. *Nutrients* **2022**, *14*, 410. <https://doi.org/10.3390/nu14030410>

Academic Editor: Henry J. Thompson

Received: 23 December 2021

Accepted: 13 January 2022

Published: 18 January 2022

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Different cocoa populations have demonstrated a protective role in a rat model of allergic asthma by attenuating the immunoglobulin (Ig) E synthesis and partially protecting against anaphylactic response. The aim of this study was to ascertain the effect of diets containing two native Peruvian cocoa populations (“Amazonas Peru” or APC, and “Criollo de Montaña” or CMC) and an ordinary cocoa (OC) on the bronchial compartment and the systemic and mucosal immune system in the same rat model of allergic asthma. Among other variables, cells and IgA content in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and serum anti-allergen antibody response were analyzed. The three cocoa populations prevented the increase of the serum specific IgG1 (T helper 2 isotype). The three cocoa diets decreased asthma-induced granulocyte increase in the BALF, which was mainly due to the reduction in the proportion of eosinophils. Moreover, both the OC and CMC diets were able to prevent the leukocyte infiltration caused by asthma induction in both the trachea and nasal cavity and decreased the IgA in both fecal and BALF samples. Overall, these results highlight the potential of different cocoa populations in the prevention of allergic asthma.

Keywords: asthma; bronchoalveolar lavage fluid; eosinophil; methylxanthines; polyphenols; *Theobroma cacao*

1. Introduction

Cocoa, derived from the beans of the *Theobroma cacao* L. tree, has been consumed by indigenous civilizations in Mesoamerica since 460 B.C. [1,2]. The religious rituals and medical uses of cocoa beverages by the Olmecs were adopted by the Mayas and Mexicas, expanding the trees’ cultivation and their uses and customs [3]. Despite the domestication of the cocoa tree in the Mexican region and its extensive uses, it is native to the Amazon basin, likely in the north-eastern area of Peru [4] and southeast Ecuador, where cocoa use was evidenced by three kinds of archaeological studies, i.e., cocoa starch grains, absorbed theobromine residues and ancient DNA, dating from approximately 5300 years ago recovered from Santa Ana-La Florida [5]. Geographically separated cultivars adapted to the local conditions and human selection and distribution of cocoa beans over the years have driven the development of multiple geographic and genetic populations of

Theobroma cacao L. [6]. According to Thomas et al. [4], the locations with the highest richness of species from the genus *Theobroma* are in the Upper Amazon regions of north-eastern Peru, which contain not only high levels of genetic diversity but also the highest number of different genetic clusters. The knowledge of the biologic properties of such cocoa populations could be useful to farmers and producers in order to increase the added value of cocoa grain and its derivatives, especially artisan chocolates, nutraceutical derivatives and cosmetic supplies. Additionally, knowing the cocoa distribution can be helpful in securing a valuable resource using strategies such as an in situ germplasm bank (in farm), ex situ collections or in the course of creating so-called protected areas.

The bioactive compounds of cocoa include fiber (both soluble fiber, such as pectic substances, and insoluble fiber, such as Klason lignin) [7], polyphenolic compounds (mainly flavonoids, such as epicatechin, catechin and procyanidins) and methylxanthines (such as theobromine, caffeine and theophylline) [8–10]. Cocoa paste from different Peruvian regions has shown different content of phenolics, flavonoids and methylxanthines, and this fact contributes to different biological properties both in vitro and in vivo [11]. By means of the antioxidant capacity or other properties of these compounds, they exert cardioprotective effects by reducing pro-inflammatory mediators such as leukotrienes (LT), interleukin (IL-) 1 β and tumor necrosis factor (TNF) α , thus improving endothelial function, decreasing platelet aggregation and improving cardiovascular health [2,12–16]. In addition, cocoa and cocoa-derived foods have been suggested to possess the potential to counteract cognitive decline and sustain cognitive abilities in patients at risk [17].

Besides the influence on cardiovascular and nervous systems, we have demonstrated the anti-inflammatory and immunomodulatory properties of cocoa-enriched diets [10,18,19]. In this regard, a flavonoid-enriched cocoa extract was able to decrease, in vitro, the secretion of inflammatory mediators such as TNF- α , monocyte chemoattractant protein-1 and nitric oxide (NO) by macrophages [20]. In addition, the anti-inflammatory effect of cocoa has been evidenced in rat models of acute and chronic inflammation [21,22]. Concerning the acquired immune system, a 10% cocoa-enriched diet in rats was able to downregulate serum specific IgM, IgG1, IgG2a and IgG2c antibodies after an immunization [23], which suggests a regulatory effect of a cocoa diet in T helper (Th) 2-immune responses. Moreover, cocoa intake in rats resulted in an increase in the proportion of spleen B lymphocytes [24] and in that of natural killer (NK) cells and T $\gamma\delta$ lymphocytes in mesenteric lymph nodes [25,26], which may be responsible for the attenuating the synthesis of antibodies [27,28]. Moreover, a decrease in IL-4 release was found in activated lymph node cells and splenocytes from rats fed cocoa [23–25]. Taking together the fact that IL-4 promotes IgE synthesis [29], which is reduced in rats fed cocoa, and the attenuation of serum antibodies induced by this diet, cocoa feeding may be beneficial in reducing some allergies. In fact, in several rat models, it has been demonstrated that a diet containing 10% cocoa reduced the levels of specific antibodies related to Th2 immune response, including serum specific IgE [30,31]. In agreement with these findings, an observational study in young people revealed that the percentage of allergic people was lower in those consuming moderate or high amounts of cocoa than in people with low cocoa intake [32].

In the context of allergic diseases, asthma is a heterogeneous condition induced by sensitization to environmental allergens, characterized by respiratory symptoms with air-flow limitation associated with airway inflammation and airway remodeling [33]. Allergic asthma results from sensitization to an allergen and a Th2-mediated response involving, among others, Th2 cells, basophils, eosinophils, mast cells and their major cytokines [34]. The activation and differentiation of allergen-specific Th2 cells induces the IgE synthesis against the allergen. This antibody binds to receptors on mast cells, which will be activated by subsequent exposures to the allergen, inducing mast cell degranulation, thus releasing histamine and proteases and producing the synthesis of prostanoids and LT [35]. Later, eosinophils will be recruited into the lungs, where a persistent airway inflammation occurs due to the subsequent exposures to the allergen [34]. Eosinophils contribute to the develop-

ment of bronchial asthma via the release of mediators, such as LT, which will maintain the eosinophilic inflammation [36].

We have recently demonstrated that a native Peruvian cocoa population (CMC) exerted a protective effect on a rat model of allergic asthma due to an attenuating effect on IgE synthesis and the release of mast cell protease and a partial protection against anaphylactic response [11]. Nevertheless, it remained to be known what happened in both the mucosal and the systemic immune systems. In consequence, the aim of this study was to ascertain the effect of two diets containing two different native Peruvian cocoa populations on the bronchial immune system and the systemic compartment in the same rat model of allergic asthma.

2. Materials and Methods

2.1. Diets

Two native Peruvian cocoa pastes of different origins were used: “Amazonas Peru” cocoa paste (APC) from the Amazonas Region (latitude/longitude -5.737422 , -78.431114), and “Criollo de Montaña” cocoa paste (CMC) from the Junín Region (-11.335774 , -74.533181). In addition, CCN-51 ordinary cocoa paste (OC) obtained from the Cusco Region (-12.510664 , -73.834577) was used as control. The different content of polyphenols, flavonoids, methylxanthines and the antioxidant capacity of these three cocoa populations have already been reported [11]. From these cocoa pastes, three diets were made by mixing 90% of powdered AIN-93M (Envigo, Huntingdon, UK) with 10% of cocoa paste previously pulverized. The mixture was pelletized, dried (40 °C for 36 h), vacuum-packed and stored at 4 °C until used. A standard diet based on the AIN-93M diet (Envigo) was used as reference. The composition of the diets is detailed in Table 1.

Table 1. Composition of the experimental diets.

	APC Diet	CMC Diet	OC Diet	REF Diet
Casein (g/kg)	126	126	126	140
L-Cystine (g/kg)	1.62	1.62	1.62	1.8
Corn Starch (g/kg)	419.12	419.12	419.12	466
Maltodextrin (g/kg)	139.5	139.5	139.5	155
Sucrose (g/kg)	90	90	90	100
Soybean oil (g/kg)	36	36	36	40
Cellulose (g/kg)	45	45	45	50
Mineral mix (g/kg)	31.5	31.5	31.5	35.0
Vitamin mix (g/kg)	9	9	9	10
Choline bitartrate (g/kg)	2.25	2.25	2.25	2.50
TBHQ (antioxidant) (g/kg)	0.007	0.007	0.007	0.008
Cocoa paste (g/kg):	100	100	100	-
Total phenolics (g gallic acid equivalents/kg)	2.87	3.04	2.41	-
Total flavonoids (g gallic acid equivalents/kg)	5.04	5.66	3.48	-
Total methylxanthines (g/kg)	0.841	0.966	0.799	-

APC diet: “Amazonas Peru” cocoa-enriched diet; CMC diet: “Criollo de Montaña” cocoa-enriched diet; OC diet: ordinary cocoa-enriched diet; REF diet: AIN-93M diet. TBHQ: *ter-butyl hydroquinone*.

2.2. Animals and Allergic Asthma Induction

Female Brown Norway rats (4-week-old) were obtained from Envigo and were kept in the animal facilities at the Faculty of Pharmacy and Food Science (University of Barcelona (UB), Barcelona, Spain) in polycarbonate cages containing bedding of large fibrous particles under controlled conditions of temperature and humidity in a 12/12 h light/dark cycle. Procedures carried out in these animals were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the University of Barcelona (CEEA/UB ref. 414/16) and the Catalonia Government (DAAM 9351), following the EU-Directive 2010/63/EU for the protection of animals used for scientific purposes.

The animals were randomized to achieve the same body weight mean into five experimental groups (9 animals/group). Throughout all the experimental procedure, two of the groups were fed with the reference diet and three groups received the three cocoa diets. Food and water were provided *ad libitum*. One week after the beginning of the

dietetic intervention, allergic asthma was induced in one group fed the reference diet and the three groups fed cocoa diets. The procedure of asthma induction with ovalbumin (OVA) has already been reported [11,37]. Briefly, rats were intraperitoneally (i.p.) sensitized with 50 µg OVA (grade V, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), 2.5 mg aluminum hydroxide (alum; Imject[®]; Pierce, IL, USA) and 50 ng *Bordetella pertussis* toxin (Sigma-Aldrich). One week later, they received a booster (i.p.) with 50 µg OVA and 2.5 mg alum. After 3 weeks, all the animals were challenged with 300 µL of OVA solution (50 mg/mL) via intranasal (i.n.) instillation. Twenty-four hours after the challenge, the rats were anesthetized with ketamine (90 mg/kg) (Meril Laboratories S.A, Barcelona, Spain) and xylazine (10 mg/kg) (Bayer A.G, Leverkusen, Germany).

Blood samples were collected from the heart in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-anticoagulated tubes and in non-anticoagulated tubes. The EDTA blood sample was used to determine total and differential leukocyte counts using an automated hematology analyzer (SpinCell 3, MonLab Laboratories, Barcelona, Spain). Non-anticoagulated blood was centrifuged, and the serum was kept at −20 °C until anti-OVA antibodies determination using the ELISA technique. Fecal samples were also collected and kept at −20 °C before obtaining the fecal homogenates by mixing fecal samples with phosphate buffered saline (PBS) (50 mg/mL), homogenizing them with a tissue homogenizer (Pellet Pestle Cordless Motor, Kimble, Meiningen, Germany) and finally centrifuging (300 × g, 5 min, 4 °C). Fecal supernatants were used to quantify mucosal IgA.

2.3. Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) Collection and Cellular Assessment

BALF collection was carried out as reported previously [37]. Briefly, 5 mL of chilled PBS was instilled through the trachea into the lungs and kept there for 30 s; then, BALF was retrieved. This was repeated three times with the same PBS and done again with an additional 5 mL PBS. The whole volume of the collected BALF (about 10 mL) was centrifuged at 538 × g at 4 °C, and supernatants were distributed in aliquots and stored at −80 °C or −20 °C until cytokine and IgA quantification, respectively. Cell pellets were resuspended in 100 µL of PBS and used to establish the proportion of leukocytes using a hematology analyzer and by flow cytometry.

BALF suspension (20 µL) were used to establish leukocytes counts and the relative proportion of lymphocytes, monocytes and granulocytes using an automated hematology analyzer (MonLab Laboratories). In addition, the remaining BALF cells were also phenotyped via immunofluorescence staining and flow cytometry analysis to establish the proportions of B and T lymphocytes, dendritic cells, eosinophils and alveolar macrophages. The immunofluorescence staining procedure was carried out as in previous studies [38]. The antibodies used were specific to rat CD45, TCRαβ, CD45RA, CD11b and CD170 (BD Biosciences, Madrid, Spain) and were conjugated either to phycoerythrin, peridinin-chlorophyll a-protein, allophycocyanin or brilliant violet 421. Briefly, fresh BALF cells were incubated with fluorochrome-conjugated antibodies at saturating concentrations (20 min, 4 °C, in darkness). After washing the excess of antibodies, cells were fixed with 0.5% p-formaldehyde and stored at 4 °C protected from light until analysis (Gallios™ Cytometer, Beckman Coulter, Miami, FL, USA) in the Flow Cytometry Unit of the Scientific and Technological Centers of the University of Barcelona (CCiT-UB). Data were analyzed with Flowjo v10 software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA). BALF CD45⁺ leukocytes were gated and then the proportion of T cells (TCRαβ⁺ CD45RA[−]), B cells (TCRαβ[−] CD45RA⁺), dendritic cells (CD170[−] CD11b⁺), eosinophils (CD170⁺ CD11b⁺) and alveolar macrophages (CD170⁺ CD11b[−]) was assessed.

2.4. BALF Cytokine Determination

The BALF concentration of IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17α, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon gamma (IFN-γ), monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 and TNF-α was assessed using ProcartaPlex[®] Multiplex Immunoassay following

the manufacturer's instructions (Affymetrix, eBioscience, San Diego, CA, USA). The concentration of each cytokine was obtained using a MAGPIX[®] analyzer (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) in the Flow Cytometry Unit of the CCIT-UB. The limits of detection were: 10 pg/mL for IL-1 α , 13 pg/mL for IL-1 β , 1.82 pg/mL for IL-2, 0.62 pg/mL for IL-4, 1.42 pg/mL for IL-5, 2.19 pg/mL for IL-6, 6.01 pg/mL for IL-10, 4.22 pg/mL for IL-12p70, 3 pg/mL for IL-13, 2.09 pg/mL for IL-17 α , 4.91 pg/mL for G-CSF, 4.81 pg/mL for GM-CSF, 3.34 pg/mL for IFN- γ , 15 pg/mL for MCP-1 and 2.88 pg/mL for TNF- α .

2.5. BALF and Fecal IgA Content Quantification

BALF and fecal homogenate supernatants were used to assess the mucosal IgA concentration using a rat IgA ELISA Quantification Set (A110-102) following the manufacturer's instructions (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) as carried out in previous studies [39]. All samples were tested in duplicates. Absorbance was measured using a microplate photometer (Labsystems Multiskan, Helsinki, Finland) and data were interpolated using ASCENT version 2.6 software (Thermo Fisher Scientific, S.L.U, Barcelona, Spain) into standard curves. Results were expressed as fold change considering the mean value of the asthmatic group as 100%.

2.6. Serum Specific Anti-OVA Antibodies Quantification

The concentration of anti-OVA antibodies belonging to IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, and IgM in serum was quantified using an indirect ELISA as previously described [40]. All samples were tested in duplicates. For the quantification of specific IgG1 and IgG2a antibodies, serum was diluted 1/400,000; in the quantification of IgG2b and IgG2c, antibodies serum was diluted 1/1600. To quantify anti-OVA IgM, samples were diluted 1/800. Results were expressed as fold change considering the mean value of the asthmatic group as 100%.

2.7. Histopathological Examination

For the histological analysis, the upper part of the trachea and the nasal cavity were excised from anesthetized rats. The tissues were fixed in 4% buffered formaldehyde at room temperature for 24 h. Then, tissues were rinsed in PBS and dehydrated in graded ethanol (70%, 90% and 100%), and after permeation in xylene the samples were finally embedded in paraffin (Merck, Madrid, Spain). All samples were cut into 5 μ m sections, stained with hematoxylin and eosin or periodic acid-Schiff (PAS) and photographed under a light microscope (Olympus BX41 and Olympus XC50 camera at 100 \times).

2.8. Statistical Analysis

The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS v27.0, IBM, Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. Data were tested for homogeneity of variance and normality distribution using the Levene and Shapiro-Wilk tests, respectively. When data were homogeneous and had a normal behavior a conventional two-way ANOVA test followed by Bonferroni post hoc was performed. Otherwise, the nonparametric Kruskal-Wallis test was applied, followed by a post hoc analysis with the Mann-Whitney U test. Results were expressed as the mean \pm SEM and significant differences were considered when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of Allergic Asthma and Cocoa Diets on Body Weight

Before the intervention, the rat body weight ranged between 44 and 60 g, and at the end of the study the body weight had increased by about 95–130% (Figure 1). There was no significant difference in body weight gain due to either the asthma induction or nutritional interventions. Nevertheless, a tendency to a lower body weight gain was observed in all asthmatic animals compared to the healthy ones.

asthma induction resulted in a reduction of blood lymphocyte proportion and an increase in granulocyte percentage. Diets containing cocoa did not prevent these changes. With regard to monocytes, there was no significant change due to asthma induction, but the monocyte percentage in animals fed OC and APC was lower than that found in healthy animals (Table 2).

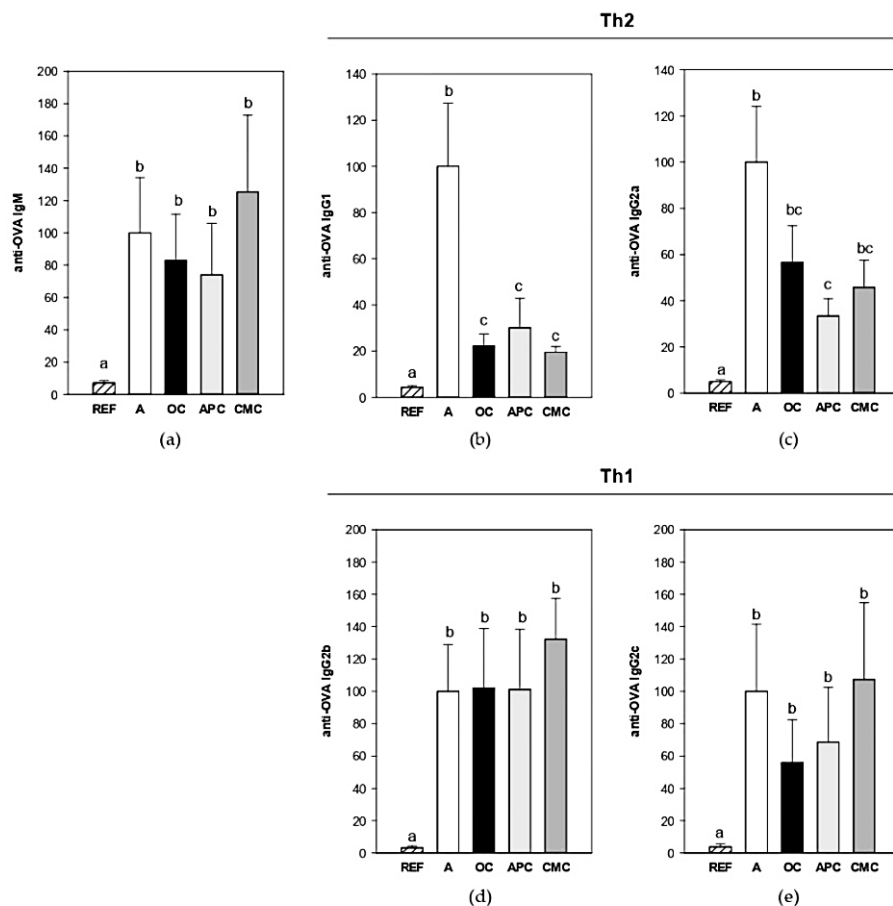


Figure 2. Relative concentration of anti-OVA IgM (a), Th2-related (IgG1 and IgG2a) (b,c) and Th1-related (IgG2b and IgG2c) (d,e) antibodies in serum obtained 24 h after the intranasal challenge. All experimental group results were referred to group A levels, which were considered as 100%. REF: healthy animals fed standard diet; A: asthmatic animals fed standard diet; OC: asthmatic animals fed with ordinary cocoa-enriched diet; APC: asthmatic animals fed with “Amazonas Peru” cocoa-enriched diet; CMC: asthmatic animals fed with “Criollo de Montaña” cocoa-enriched diet. Results are shown as mean \pm standard error (N = 9). Values not sharing letters denote significant differences between groups ($p < 0.05$), while values sharing the same letter do not differ.

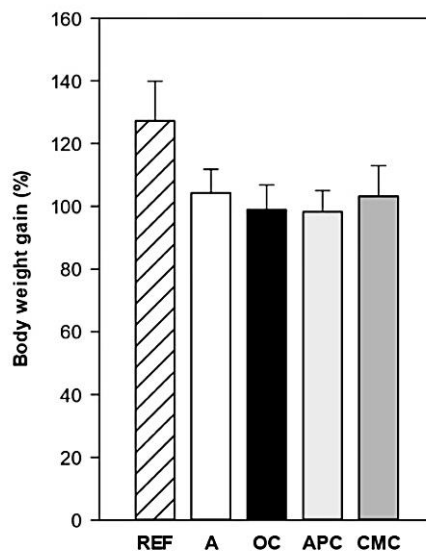


Figure 1. Body weight gain compared to that at the beginning of the nutritional intervention. REF: healthy animals fed standard diet; A: asthmatic animals fed standard diet; OC: asthmatic animals fed ordinary cocoa-enriched diet; APC: asthmatic animals fed “Amazonas Peru” cocoa-enriched diet; CMC: asthmatic animals fed “Criollo de Montaña” cocoa-enriched diet. Results are shown as mean \pm standard error (N = 9).

3.2. Influence of Allergic Asthma and Cocoa Diets on Serum Specific Antibodies

The allergic asthma model induced the synthesis of anti-OVA antibodies belonging to IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG2c isotypes (Figure 2) ($p < 0.003$, A group vs. REF group in all antibodies). The Th2-related antibodies (IgG1 and IgG2a isotypes) were the ones detected in the highest relative concentration because a higher dilution was needed for quantifying them (1/400,000 in both cases).

The diets containing cocoa did not prevent the synthesis of either serum anti-OVA IgM, IgG2b and IgG2c antibodies. However, with regard to Th2-related antibodies, the three cocoa-enriched diets prevented the increase of anti-OVA IgG1 antibodies ($p < 0.02$, groups OC, APC and CMC vs. group A) by about 70–80%. Moreover, the APC cocoa diet prevented the increase in anti-OVA IgG2a by more than 60% ($p = 0.019$, group APC vs. group A), whereas both the OC and CMC diets showed a tendency to reduce its levels.

3.3. Effects of Allergic Asthma and Cocoa Diets on IgA Concentration in Mucosal Compartments

The concentration of IgA at two mucosal compartments, i.e., the lung and the intestine, was determined by quantifying it in the BALF and fecal homogenates, respectively (Figure 3). The levels of mucosal IgA in both compartments did not differ between reference animals and asthmatic animals, however, the cocoa intake modified them. In particular, the OC and CMC diets were able to decrease the IgA levels in both mucosal compartments compared to REF and A groups ($p < 0.02$).

3.4. Influence of Allergic Asthma and Cocoa Diets on Blood Leukocyte Counts

Total and differential blood leukocyte counts were established at the end of the study, i.e., 24 h after the i.n. challenge (Table 2). The values of total blood leukocyte counts did not differ between groups; however, when considering the differential leukocytes,

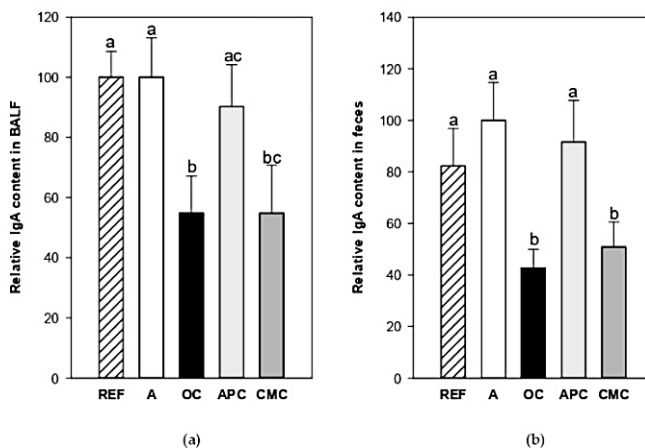


Figure 3. Relative IgA content in the bronchoalveolar lavage fluid (a) and feces (b) in samples obtained 24 h after the intranasal challenge. All experimental group results were referred to group A levels which were considered as 100%. REF: healthy animals fed standard diet; A: asthmatic animals fed standard diet; OC: asthmatic animals fed with ordinary cocoa-enriched diet; APC: asthmatic animals fed with “Amazonas Peru” cocoa-enriched diet; CMC: asthmatic animals fed with “Criollo de Montaña” cocoa-enriched diet. Results are shown as mean \pm standard error (N = 9). Values not sharing letters denote significant differences between groups ($p < 0.05$), while values sharing the same letter did not differ.

Table 2. Total and differential leukocyte counts in blood samples obtained 24 h after the intranasal challenge.

	REF Group	A Group	OC Group	APC Group	CMC Group
Total leukocyte counts ($\times 10^9/L$)	11.22 \pm 0.86	10.23 \pm 1.69	10.76 \pm 1.40	9.92 \pm 1.08	10.08 \pm 1.38
Lymphocyte (%)	70.79 \pm 2.08 ^a	64.03 \pm 1.56 ^b	63.07 \pm 8.70 ^b	64.26 \pm 7.72 ^b	59.03 \pm 3.93 ^b
Monocyte (%)	6.36 \pm 0.15 ^a	6.24 \pm 0.21 ^{ab}	5.96 \pm 0.08 ^b	5.84 \pm 0.70 ^b	5.91 \pm 0.23 ^{ab}
Granulocyte (%)	22.86 \pm 2.07 ^a	29.72 \pm 1.72 ^b	31.01 \pm 4.68 ^b	29.90 \pm 3.85 ^b	35.06 \pm 3.98 ^b

REF: healthy animals fed standard diet; A: asthmatic animals fed standard diet; OC: asthmatic animals fed with ordinary cocoa-enriched diet; APC: asthmatic animals fed with “Amazonas Peru” cocoa-enriched diet; CMC: asthmatic animals fed with “Criollo de Montaña” cocoa-enriched diet. Results are shown as mean \pm standard error (N = 9). Values not sharing letters denote significant differences between groups ($p < 0.05$), while values sharing the same letter did not differ.

3.5. Effects of Allergic Asthma and Cocoa Diets on BALF Leukocytes

Total leukocyte counts as well as lymphocyte, monocyte and granulocyte counts were quantified in BALF samples using an automated hematology analyzer and further by flow cytometry (Table 3 and Figure 4).

Table 3. Total and differential leukocyte counts in bronchoalveolar samples obtained 24 h after the intranasal challenge.

	REF Group	A Group	OC Group	APC Group	CMC Group
Total leukocyte counts ($\times 10^8/L$)	1.31 \pm 0.10 ^a	2.07 \pm 0.31 ^b	1.60 \pm 0.15 ^{ab}	2.47 \pm 0.42 ^b	2.42 \pm 0.36 ^b
Lymphocyte (%)	32.65 \pm 2.43	32.43 \pm 2.98	35.06 \pm 3.85	46.35 \pm 6.47	42.11 \pm 4.58
Monocyte (%)	14.63 \pm 0.77	12.39 \pm 0.58	12.81 \pm 0.56	12.32 \pm 0.93	12.75 \pm 1.43
Granulocyte (%)	52.72 \pm 2.85	55.17 \pm 2.88	52.13 \pm 3.97	41.33 \pm 6.60	45.13 \pm 4.77

REF: healthy animals fed standard diet; A: asthmatic animals fed standard diet; OC: asthmatic animals fed with ordinary cocoa-enriched diet; APC: asthmatic animals fed with “Amazonas Peru” cocoa-enriched diet; CMC: asthmatic animals fed with “Criollo de Montaña” cocoa-enriched diet. Results are shown as mean \pm standard error (N = 9). Values not sharing letters denote significant differences between groups ($p < 0.05$), while values sharing the same letter did not differ.

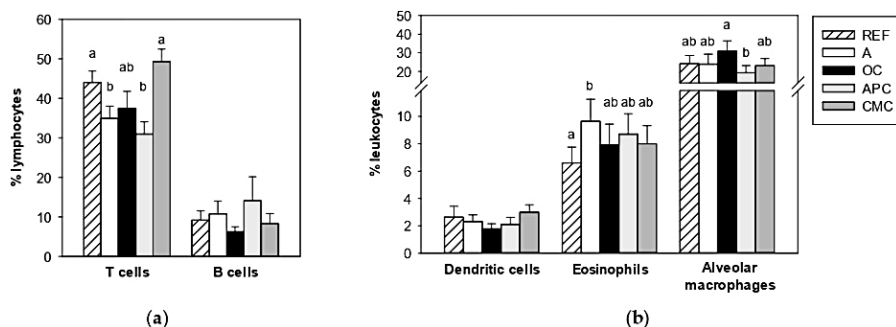


Figure 4. Proportion of lymphocyte subsets (a) and dendritic cells, eosinophils and alveolar macrophages (b) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) samples obtained 24 h after the intranasal challenge. REF: healthy animals fed standard diet; A: asthmatic animals fed standard diet; OC: asthmatic animals fed with ordinary cocoa-enriched diet; APC: asthmatic animals fed with “Amazonas Peru” cocoa-enriched diet; CMC: asthmatic animals fed with “Criollo de Montaña” cocoa-enriched diet. Results are shown as mean \pm standard error (N = 9). Values not sharing letters denote significant differences between groups ($p < 0.05$), while values sharing the same letter did not differ.

The counts of leukocytes recovered from BALF in asthmatic animals fed a standard diet were higher than those observed in REF animals ($p = 0.047$ group A vs. group REF). Such an increase was prevented by the OC diet but not by the APC and CMC diets (Table 3). The increase in leukocyte counts in asthmatic animals fed a standard diet as well as APC and CMC diets was due to higher counts of lymphocytes, monocytes and granulocytes because no changes in the proportion of such cells were observed in these groups (Table 3).

BALF lymphocyte subsets were established using flow cytometry (Figure 4a). The proportion of T cells was significantly reduced due to the asthma induction ($p < 0.05$ group A vs. group REF). This decrease was also observed in the APC-fed asthmatic animals ($p < 0.02$ group APC vs. group REF) but it was not in asthmatic animals fed other cocoa diets. The proportion of B cells was not modified by either allergic asthma induction or cocoa diets (Figure 4b).

The BALF proportion of dendritic cells, eosinophils and alveolar macrophages was also determined using flow cytometry (Figure 4b). Asthma induction did not modify the proportion of dendritic cells and alveolar macrophages, whereas that of eosinophils increased in asthmatic animals fed a standard diet ($p < 0.05$ group A vs. group REF). This increase was partially prevented by all three cocoa experimental diets (Figure 4b).

3.6. Effects of Allergic Asthma and Cocoa Diets on BALF Cytokines

Of the cytokines determined in BALF samples, only MCP-1, IL-10 and IL-13 achieved detectable levels. The BALF concentration of MCP-1 was not significantly modified by asthma induction or cocoa diets (Figure 5). Nevertheless, the BALF concentration of IL-10 increased in the asthmatic group ($p < 0.05$ vs. REF group) and also in OC- and APC-fed animals. Nevertheless, the CMC diet was able to prevent this increase ($p < 0.05$ CMC group vs. A, OC and APC groups). In contrast, the BALF concentration of IL-13 decreased in asthmatic animals fed the standard diet and also in those fed with the OC diet ($p < 0.05$ REF group vs. A and OC groups). This decrease was prevented by the CMC diet and partly by the APC diet.

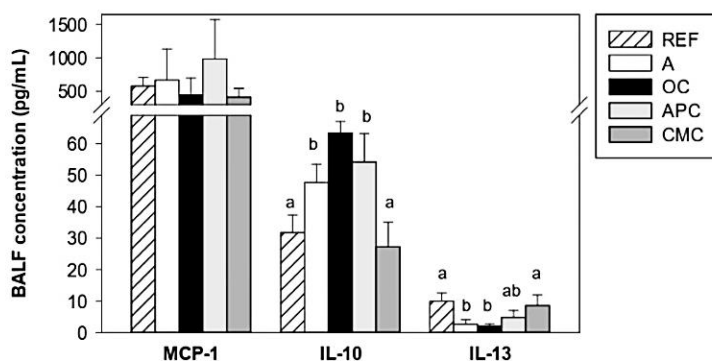


Figure 5. Cytokine concentration in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) samples obtained 24 h after the intranasal challenge. REF: healthy animals fed standard diet; A: asthmatic animals fed standard diet; OC: asthmatic animals fed with ordinary cocoa-enriched diet; APC: asthmatic animals fed with “Amazonas Peru” cocoa-enriched diet; CMC: asthmatic animals fed with “Criollo de Montaña” cocoa-enriched diet. Results are shown as mean \pm standard error (N = 9). Values not sharing letters denote significant differences between groups ($p < 0.05$), while values sharing the same letter did not differ.

3.7. Effects of Allergic Asthma and Cocoa Diets on Nasal Tissue and Trachea

The nasal cavity of asthma animals presented high leukocyte infiltrate, as it can be observed in hematoxylin and eosin stained sections (Figure 6a). The OC- and APC-fed animals showed a pattern more similar to REF animals. However, in the CMC group, even though there was some amelioration compared to the A animals, an increased presence of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) was observed.

Trachea of REF animals displayed a pseudostratified ciliated epithelium, submucosal glands that add moisture to the air and aid in trapping contaminants, and hyaline cartilage (Figure 6b). The trachea of asthmatic animals presented leukocyte infiltrate with eosinophils and other PMNs. The OC- and CMC-fed animals showed a pattern more similar to REF animals. However, in the APC-fed ones, even showing some amelioration with respect to the A group, an increased presence of PMNs was observed.

With regard to PAS staining, which stains mucus bright pink, asthmatic animals had more presence of mucus in the nasal cavity (Figure 6c) and in the trachea (Figure 6d) compared to REF animals. APC-fed animals seemed to revert this increase followed by the OC and CMC animals.

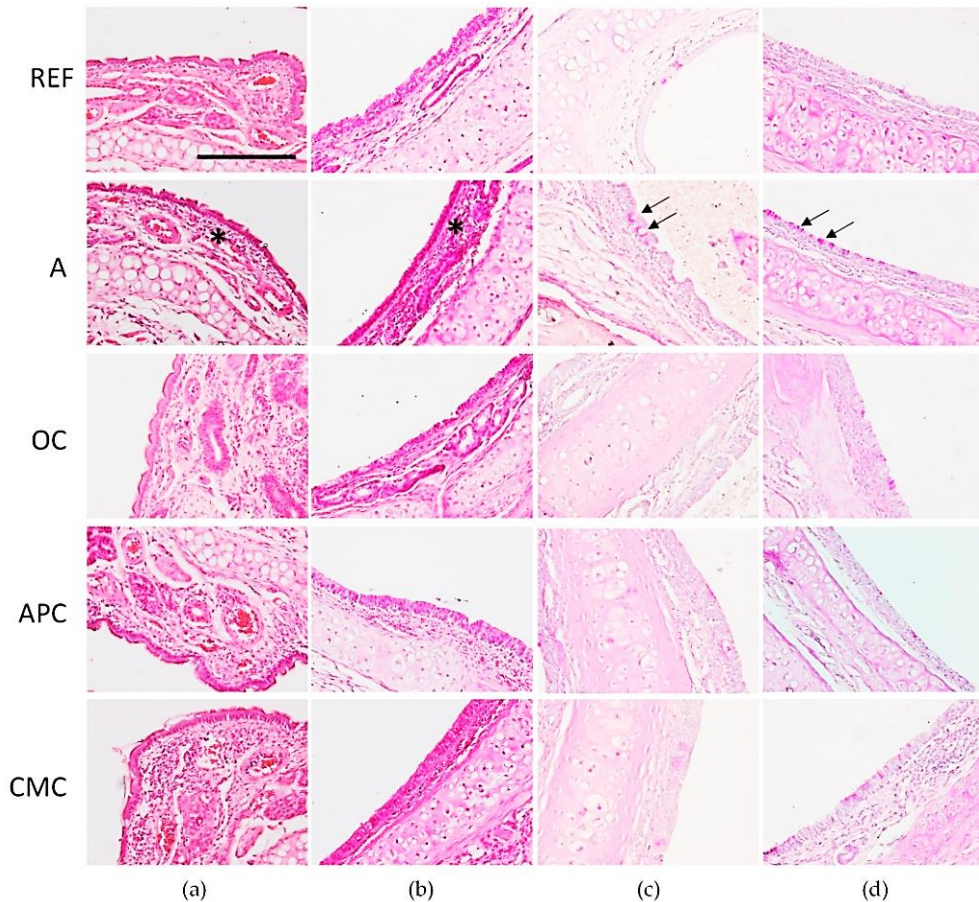


Figure 6. Hematoxylin and eosin staining (a,b) and PAS staining (c,d) of nasal tissue (a,c) and trachea (b,d) obtained 24 h after the intranasal challenge. REF: healthy animals fed standard diet; A: asthmatic animals fed standard diet; OC: asthmatic animals fed with ordinary cocoa-enriched diet; APC: asthmatic animals fed with “Amazonas Peru” cocoa-enriched diet; CMC: asthmatic animals fed with “Criollo de Montaña” cocoa-enriched diet. Scale bar = 100 μ m. Asterisk indicates leukocyte infiltrate and arrow indicates presence of mucus.

4. Discussion

In a previous study we demonstrated the partial protective effect of native Peruvian cocoa populations on the anaphylactic response induced in a rat model of allergic asthma [11]. The aim of the current study was to go in depth into the systemic and mucosal immune responses of these animals.

Firstly, focusing on the systemic immune response, and in particular on the blood compartment, asthma induction produced changes in the proportions of blood leukocytes, decreasing the percentage of lymphocytes and increasing that of granulocytes, which included neutrophils, eosinophils and basophils. These alterations were not prevented

by any cocoa diet. On the other hand, the asthma induction brought on the synthesis of specific antibodies belonging to IgM, IgG1, IgG2a, IgGb and IgG2c isotypes, which can be associated with either rat Th1 or Th2 immune responses [23]. Cocoa diets differentially affected the synthesis of these antibodies. While no significant changes were found in anti-OVA IgM and Th1-related IgG isotypes (i.e., IgG2b and IgG2c), the three cocoa diets attenuated anti-OVA IgG1 and IgG2a levels, associated with a Th2 immune response, although the effect on IgG2a only achieved statistical significance after APC diet intake. These results are in line with those obtained in the previous study in which we observed that serum anti-OVA IgE antibodies decreased in OC- and CMC-fed animals, whereas the APC diet did not significantly decrease IgE levels [11]. The distinct results obtained with the various cocoas could be attributed to a differential profile of bioactive compounds in the three cocoa populations, which differed in the amount of flavonoids and methylxanthines (CMC > APC > OC in both cases). Overall, the current results are in agreement with previous studies reporting the modulating effect of conventional cocoa on specific Th2-related antibodies in rat models of allergy [26,30,41]. With regard to the mechanisms involved in any cocoa intake regarding allergic response, they could include both the first phases of the acquired immune response, such as antigen presentation, and the cytokines secreted by effector T cells, as has been suggested [18].

Focusing on mucosal immunity, results regarding cell infiltration in the respiratory tissue and bronchoalveolar exudates show that asthma induction caused a higher presence of leukocytes, mainly granulocytes, as observed in nasal and tracheal sections and also in the BALF counts. In addition, flow cytometry analysis indicated a higher proportion of eosinophils and a lower proportion of T lymphocytes. These results agree with those reported by Thakur et al. [42] who found increased numbers of leukocytes, neutrophils, eosinophils, lymphocytes and monocytes in BALF 24 h after the challenge, in a similar model of rat asthma. Today, eosinophils are considered to play important roles in the development of asthma [36]. These cells can accumulate in respiratory airways after adhesion to vascular endothelial cells by means of $\alpha 4$ integrin/vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, which is upregulated by Th2 cytokines such as IL-4 and IL-13 [36]. In the lungs, eosinophils release a number of mediators, such as major basic protein (MBP), radical oxygen species (ROS), cytokines and leukotrienes [36]. Moreover, eosinophils promote airway edema, prompting both the recruitment and function of Th2 cells as well as mast cells. Therefore, the control of lung eosinophils could be a good strategy for controlling asthma. We found that cocoa diets decreased the granulocyte counts and particularly those of eosinophils in the BALF and also in airway tissues. The results regarding the decrease in eosinophil lung infiltration agree with those reported in rodent asthma models orally treated with natural extracts rich in flavonoids [43–45], or particular flavonoids [46,47]. All these results suggest that cocoa flavonoid content could be responsible for the protection against eosinophil infiltration. In addition, the effect on controlling eosinophils could be partially responsible for the protection of the anaphylactic response quantified by a decrease in body temperature and body weight, as well as by plasma mast cell protease II and BALF leukotrienes in these animals, as previously reported [11]. Furthermore, future experiments should analyze in depth the role of eosinophils in this asthma model and the cocoa effect by quantifying more specific eosinophil mediators.

When considering cytokine levels in the BALF, from the wide panel we applied, only the inflammatory MCP-1, the regulatory IL-10 and the Th2-related IL-13 were detected. In asthmatic animals fed standard diet, IL-10 increased while IL-13 decreased. The results of the cytokine contents do not agree with the higher levels of IL-4, IL-5 and IL-13 reported in other asthma models [46,48,49]. We did not detect IL-4 and IL-5, and there were surprisingly low concentrations of IL-13. The problem could be due to the use of the high volume of PBS instilled to obtain the BALF. We used a total of 10 mL per rat when others used 0.5–1 mL per mouse [46,49]. Further studies should consider the instillation of lower volumes of washing buffer to better detect cytokines in the BALF or even the application of more sensitive methods to better define the cytokine profile in healthy and asthmatic rats. In

spite of the low levels obtained, it is worth highlighting the results obtained with the CMC diet, which was able to prevent the changes induced by asthma induction.

Finally, considering mucosal immunity, we also analyzed the total IgA content in two mucosal compartments: the BALF and the intestine (fecal samples). It has been suggested that IgA is a protective antibody because there is an inverse relationship between mucosal IgA levels and the incidence of allergic airway disease [50]. In our study, no changes in BALF IgA content in asthmatic animals were found. These results agree with data reported in a mouse model of allergic asthma also induced with OVA [51], however, they do not concur with another study in mice with allergic asthma induced using a fungal biopesticide showing an IgA increase [52]. Although the BALF IgA content was not influenced by allergy asthma induction in our model, the OC and CMC diets—but not the APC diet—decreased it. The results of cocoa diets on the BALF IgA levels match those of fecal IgA content and agree with previous studies using diets with 10% conventional cocoa, which induced lower IgA values in salivary glands [39] and in the intestine [18,25,26,39,53,54]. The reason why the APC diet did not affect mucosal IgA remains unknown, and it cannot be attributed to the total amount of flavonoids and methylxanthines because it contains levels ranging between those of the CMC and OC populations [11]. Nevertheless, the difference between the effects of cocoa could derive from a particular flavonoid profile, which depends on the origin of the cocoa. The content of flavonoids and methylxanthines is higher in the CMC population, from the Junin region (Satipo city) in Peru, with a hot and humid climate, than in the APC population, coming from the Amazonas region [11]. Previous studies have appointed epicatechin as being partially responsible for the effect of cocoa diet on fecal IgA levels due to an inverse correlation between fecal IgA concentration and the quantity of epicatechin derivatives in urine [55] without showing a dose-response relationship [56,57]. However, more recently, cocoa theobromine has been considered the main compound responsible for decreasing intestinal IgA [55,58]. Therefore, differences between APC and CMC populations could be due to the content of both theobromine and flavonoids. However, as the OC diet caused a similar effect to that of CMC and its content in these compounds was lower [11], this suggests that other factors must also have an influence. In fact, these results together with other differential values obtained for the three cocoa populations prompt us to establish, in further studies, the exact chemical profile of each cocoa paste and to correlate them with the preventive effect found here.

5. Conclusions

The results regarding anti-allergen IgG antibodies and the changes in the cellularity observed in the bronchoalveolar lavage fluid and in the airway pathway tissues highlight the potential of different populations of Peruvian cocoa in the prevention of allergic asthma. This could be important in countries with a high prevalence of asthma, such as Peru, where localities with a high genetic diversity of the *Theobroma cacao* L. trees are found.

Author Contributions: Conceptualization, F.J.P.-C., I.B., S.P.-S., M.C. and M.M.-C.; methodology, M.P., M.J.R.-L. and M.M.-C.; formal analysis, M.P., M.J.R.-L., M.C. and M.M.-C.; writing—original draft preparation, M.J.R.-L., F.J.P.-C., M.C. and M.M.-C.; writing—review and editing, I.B., S.P.-S.; supervision, M.C. and M.M.-C.; funding acquisition, F.J.P.-C., I.B., S.P.-S. and M.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Fund for Scientific, Technology and Technological Innovation Development (FONDECYT) of the National Council of Science, Technology and Technological Innovation (CONCYTEC), Contract 137-2017-FONDECYT, and Universidad Científica del Sur.

Institutional Review Board Statement: Procedures carried out in these animals were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the University of Barcelona (CEEA/UB ref. 414/16) and the Catalonia Government (DAAM 9351), following the EU-Directive 2010/63/EU for the protection of animals used for scientific purposes.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to thank Nerea Moreno, Andrea Barranco and Anna Cutrina for their technical assistance. The authors also would like to thank Jaume Comas, head of the Flow Cytometry Unit, for his advice.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Seligson, F.H.; Krummel, D.A.; Apgar, J.L. Patterns of chocolate consumption. *Am. J. Clin. Nutr.* **1994**, *60*, 1060S–1064S. [CrossRef]
- 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. [CrossRef] [PubMed]
- Dillinger, T.L.; Barriga, P.; Escárcega, S.; Jimenez, M.; Salazar Lowe, D.; Grivetti, L.E. Food of the Gods: Cure for Humanity? A Cultural History of the Medicinal and Ritual Use of Chocolate. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2057S–2072S. [CrossRef] [PubMed]
- Thomas, E.; van Zonneveld, M.; Loo, J.; Hodgkin, T.; Galluzzi, G.; van Etten, J. Present spatial diversity patterns of *Theobroma cacao* L. in the neotropics reflect genetic differentiation in Pleistocene refugia followed by human-influenced dispersal. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e47676. [CrossRef] [PubMed]
- Zarrillo, S.; Gaikwad, N.; Lanaud, C.; Powis, T.; Viot, C.; Lesur, I.; Fouet, O.; Argout, X.; Guichoux, E.; Salin, F.; et al. The use and domestication of *Theobroma cacao* during the mid-Holocene in the upper Amazon. *Nat. Ecol. Evol.* **2018**, *2*, 1879–1888. [CrossRef]
- Motamayor, J.C.; Lachenaud, P.; da Silva e Mota, J.W.; Loor, R.; Kuhn, D.N.; Brown, J.S.; Schnell, R.J. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3311. [CrossRef]
- Lecumberri, E.; Mateos, R.; Izquierdo-Pulido, M.; Rupérez, P.; Goya, L.; Bravo, L. Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food Chem.* **2007**, *104*, 948–954. [CrossRef]
- Shively, C.A.; Tarka, S.M.J. Methylxanthine composition and consumption patterns of cocoa and chocolate products. *Prog. Clin. Biol Res.* **1984**, *158*, 149–178.
- Calzavara-Pinton, P.; Calzavara-Pinton, I.; Arisi, M.; Rossi, M.T.; Scapagnini, G.; Davinelli, S.; Venturini, M. Cutaneous Photoprotective Activity of a Short-term Ingestion of High-Flavanol Cocoa: A Nutritional Intervention Study. *Photochem. Photobiol.* **2019**, *95*, 1029–1034. [CrossRef] [PubMed]
- Ramiro-Puig, E.; Castell, M. Cocoa: Antioxidant and immunomodulator. *Br. J. Nutr.* **2009**, *101*, 931–940. [CrossRef]
- Pérez, M.; Pérez-Cano, F.J.; Cambras, T.; Franch, A.; Best, I.; Pastor-Soplin, S.; Castell, M.; Massot-Cladera, M. Attenuating effect of Peruvian cocoa populations on the acute asthmatic response in Brown Norway rats. *Nutrients* **2020**, *12*, 2301. [CrossRef]
- Andujar, I.; Recio, M.C.; Giner, R.M.; Rios, J.L. Cocoa polyphenols and their potential benefits for human health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2012**, *2012*, 906252. [CrossRef]
- Vlachojannis, J.; Erne, P.; Zimmermann, B.; Chrubasik-Hausmann, S. The Impact of Cocoa Flavanols on Cardiovascular Health. *Phyther. Res.* **2016**, *30*, 1641–1657. [CrossRef] [PubMed]
- Ludovici, V.; Barthelmes, J.; Nägele, M.P.; Enseleit, F.; Ferri, C.; Flammer, A.J.; Ruschitzka, F.; Sudano, I. Cocoa, Blood Pressure, and Vascular Function. *Front. Nutr.* **2017**, *4*, 36. [CrossRef]
- Martins, T.F.; Palomino, O.M.; Alvarez-Cilleros, D.; Martín, M.A.; Ramos, S.; Goya, L. Cocoa Flavanols Protect Human Endothelial Cells from Oxidative Stress. *Plant. Foods Hum. Nutr.* **2020**, *75*, 161–168. [CrossRef]
- Selmi, C.; Mao, T.K.; Keen, C.L.; Schmitz, H.H.; Eric Gershwin, M. The anti-inflammatory properties of cocoa flavanols. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2006**, *47*, S163–S176. [CrossRef] [PubMed]
- Socci, V.; Tempesta, D.; Desideri, G.; De Gennaro, L.; Ferrara, M. Enhancing Human Cognition with Cocoa Flavonoids. *Front. Nutr.* **2017**, *4*, 19. [CrossRef] [PubMed]
- Camps-Bossacoma, M.; Massot-Cladera, M.; Abril-Gil, M.; Franch, A.; Pérez-Cano, F.J.; Castell, M. Cocoa Diet and Antibody Immune Response in Preclinical Studies. *Front. Nutr.* **2017**, *4*, 28. [CrossRef]
- Camps-Bossacoma, M.; Massot-Cladera, M.; Pérez-Cano, F.J.; Castell, M. Influence of a Cocoa-Enriched Diet on the Intestinal Immune System and Microbiota. In *Dietary Interventions in Gastrointestinal Diseases: Foods, Nutrients, and Dietary Supplements*; Watson, R.R., Preedy, V.R., Eds.; Academic Press (Elsevier Inc.): London, UK, 2019; pp. 213–225, ISBN 9780128144695.
- Ramiro, E.; Franch, A.; Castellote, C.; Pérez-Cano, F.; Permanyer, J.; Izquierdo-Pulido, M.; Castell, M. Flavanoids from *Theobroma cacao* down-regulate inflammatory mediators. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8506–8511. [CrossRef]
- Castell, M.; Franch, A.; Ramos-Romero, S.; Ramiro-Puig, E.; Pérez-Cano, F.J.; Castellote, C. Effect of a diet rich in cocoa flavonoids on experimental acute inflammation. In *Flavonoids: Biosynthesis, Biological effects and Dietary Sources*; Keller, R.B., Ed.; Nova Science Publishers, Inc.: Hauppauge, NY, USA, 2009; Volume 6, pp. 213–229, ISBN 9781607416227.
- Ramos-Romero, S.; Pérez-Cano, F.J.; Castellote, C.; Castell, M.; Franch, A. Effect of cocoa-enriched diets on lymphocytes involved in adjuvant arthritis in rats. *Br. J. Nutr.* **2012**, *107*, 378–387. [CrossRef]
- Pérez-Berezo, T.; Ramiro-Puig, E.; Pérez-Cano, F.J.; Castellote, C.; Permanyer, J.; Franch, A.; Castell, M. Influence of a cocoa-enriched diet on specific immune response in ovalbumin-sensitized rats. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 389–397. [CrossRef]
- Ramiro-Puig, E.; Pérez-Cano, F.J.; Ramírez-Santana, C.; Castellote, C.; Izquierdo-Pulido, M.; Permanyer, J.; Franch, A.; Castell, M. Spleen lymphocyte function modulated by a cocoa-enriched diet. *Clin. Exp. Immunol.* **2007**, *149*, 535–542. [CrossRef]

25. Ramiro-Puig, E.; Pérez-Cano, F.J.; Ramos-Romero, S.; Pérez-Berezo, T.; Castellote, C.; Permanyer, J.; Franch, À.; Izquierdo-Pulido, M.; Castell, M. Intestinal immune system of young rats influenced by cocoa-enriched diet. *J. Nutr. Biochem.* **2008**, *19*, 555–565. [CrossRef] [PubMed]
26. Camps-Bossacoma, M.; Abril-Gil, M.; Saldaña-Ruiz, S.; Franch, À.; Pérez-Cano, F.J.; Castell, M. Cocoa diet prevents antibody synthesis and modifies lymph node composition and functionality in a rat oral sensitization model. *Nutrients* **2016**, *8*, 242. [CrossRef] [PubMed]
27. Huang, Y.; Getahun, A.; Heiser, R.A.; Detanico, T.O.; Aviszus, K.; Kirchenbaum, G.A.; Casper, T.L.; Huang, C.; Aydintug, M.K.; Carding, S.R.; et al. $\gamma\delta$ T Cells Shape Preimmune Peripheral B Cell Populations. *J. Immunol.* **2016**, *196*, 217–231. [CrossRef]
28. Deniz, G.; Erten, G.; Küküksezer, U.C.; Kocacik, D.; Karagiannidis, C.; Aktas, E.; Akdis, C.A.; Akdis, M. Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 850–857. [CrossRef]
29. Steinke, J.W.; Borish, L. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: Its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir. Res.* **2001**, *2*, 66–70. [CrossRef] [PubMed]
30. Abril-Gil, M.; Pérez-Cano, F.J.; Franch, À.; Castell, M. Effect of a cocoa-enriched diet on immune response and anaphylaxis in a food allergy model in Brown Norway rats. *J. Nutr. Biochem.* **2016**, *27*, 317–326. [CrossRef]
31. Kang, H.; Lee, C.H.; Kim, J.-E.R.E.; Kwon, J.Y.; Son, M.-J.J.; Kim, J.-E.R.E.; Lee, K.W. *Theobroma cacao* extract attenuates the development of *Dermatophagoides farinae*-induced atopic dermatitis-like symptoms in NC/Nga mice. *Food Chem.* **2017**, *216*, 19–26. [CrossRef] [PubMed]
32. Rodríguez-Lagunas, M.J.; Vicente, F.; Pereira, P.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J. Relationship between cocoa intake and healthy status: A pilot study in university students. *Molecules* **2019**, *24*, 812. [CrossRef] [PubMed]
33. Papi, A.; Brightling, C.; Pedersen, S.E.; Reddel, H.K. Asthma. *Lancet* **2018**, *391*, 783–800. [CrossRef]
34. Boonpiyathad, T.; Celebi Sözenler, Z.; Satitsuksonoa, P.; Akdis, C.A. Immunological mechanisms in asthma. *Semin. Immunol.* **2019**, *46*, 101333. [CrossRef] [PubMed]
35. Nauta, A.J.; Engels, F.; Knippels, L.M.; Garssen, J.; Nijkamp, F.P.; Redegeld, F.A. Mechanisms of allergy and asthma. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *585*, 354–360. [CrossRef]
36. Nakagome, K.; Nagata, M. Involvement and Possible Role of Eosinophils in Asthma Exacerbation. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2220. [CrossRef] [PubMed]
37. Pérez, M.; Pérez-Cano, F.J.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Cambras, T.; Pastor-Soplin, S.; Best, I.; Castell, M.; Massot-Cladera, M. Development and characterization of an allergic asthma rat model for interventional studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3841. [CrossRef]
38. Estruel-Amades, S.; Ruiz-Iglesias, P.; Pérez, M.; Franch, À.; Pérez-Cano, F.J.; Camps-Bossacoma, M.; Castell, M. Changes in Lymphocyte Composition and Functionality After Intensive Training and Exhausting Exercise in Rats. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 1491. [CrossRef]
39. Massot-Cladera, M.; Franch, À.; Pérez-Cano, F.J.; Castell, M. Cocoa and cocoa fibre differentially modulate IgA and IgM production at mucosal sites. *Br. J. Nutr.* **2016**, *115*, 1539–1546. [CrossRef]
40. Abril-Gil, M.; Garcia-Just, A.; Pérez-Cano, F.J.; Franch, À.; Castell, M. Development and characterization of an effective food allergy model in Brown Norway rats. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0125314. [CrossRef]
41. Abril-Gil, M.; Massot-Cladera, M.; Pérez-Cano, F.J.; 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. [CrossRef]
42. Thakur, V.R.; Khuman, V.; Beladiya, J.V.; Chaudagar, K.K.; Mehta, A.A. An experimental model of asthma in rats using ovalbumin and lipopolysaccharide allergens. *Heliyon* **2019**, *5*, e02864. [CrossRef]
43. Bui, T.T.; Piao, C.H.; Song, C.H.; Lee, C.H.; Shin, H.S.; Chai, O.H. Baicalein, wogonin, and *Scutellaria baicalensis* ethanol extract alleviate ovalbumin-induced allergic airway inflammation and mast cell-mediated anaphylactic shock by regulation of Th1/Th2 imbalance and histamine release. *Anat. Cell Biol.* **2017**, *50*, 124–134. [CrossRef] [PubMed]
44. Zemouri, H.; Sekiou, O.; Ammar, S.; El Feki, A.; Bouaziz, M.; Messarah, M.; Boumendjel, A. *Urtica dioica* attenuates ovalbumin-induced inflammation and lipid peroxidation of lung tissues in rat asthma model. *Pharm. Biol.* **2017**, *55*, 1561–1568. [CrossRef] [PubMed]
45. Rosa, S.I.G.; Rios-Santos, F.; Balogun, S.O.; de Almeida, D.A.T.; Damazo, A.S.; da Cruz, T.C.D.; Pavan, E.; Barbosa, R.d.S.; Alvim, T.d.C.; Soares, I.M.; et al. Hydroethanolic extract from *Echinodorus scaber* Rataj leaves inhibits inflammation in ovalbumin-induced allergic asthma. *J. Ethnopharmacol.* **2017**, *203*, 191–199. [CrossRef] [PubMed]
46. Xu, B.; Huang, S.; Wang, C.; Zhang, H.; Fang, S.; Zhang, Y. Anti-inflammatory effects of dihydromyricetin in a mouse model of asthma. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *15*, 3674–3680. [CrossRef]
47. Dogan, M.F.; Parlar, A.; Cam, S.A.; Tosun, E.M.; Uysal, F.; Arslan, S.O. Glabridin attenuates airway inflammation and hyperresponsiveness in a mice model of ovalbumin-induced asthma. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **2020**, *63*, 101936. [CrossRef]
48. Yuan, W.Y.; Li, L.Q.; Chen, Y.Y.; Zhou, Y.J.; Bao, K.F.; Zheng, J.; Hua, Y.Q.; Jiang, G.R.; Hong, M. Frontline Science: Two flavonoid compounds attenuate allergic asthma by regulating epithelial barrier via G protein-coupled estrogen receptor: Probing a possible target for allergic inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **2020**, *108*, 59–71. [CrossRef]
49. Roy, S.; Manna, K.; Jha, T.; Saha, K.D. Chrysin-loaded PLGA attenuates OVA-induced allergic asthma by modulating TLR/NF- κ B/NLRP3 axis. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2020**, *30*, 102292. [CrossRef]
50. Gloudemans, A.K.; Lambrecht, B.N.; Smits, H.H. Potential of immunoglobulin A to prevent allergic asthma. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, *2013*, 542091. [CrossRef]

51. Kumar, R.K.; Temelkovski, J.; McNeil, H.P.; Hunter, N. Airway inflammation in a murine model of chronic asthma: Evidence for a local humoral immune response. *Clin. Exp. Allergy* **2000**, *30*, 1486–1492. [[CrossRef](#)]
52. Ward, M.D.W.; Chung, Y.J.; Haykal-Coates, N.; Copeland, L.B. Differential allergy responses to *Metarhizium anisopliae* fungal component extracts in BALB/c mice Allergy-like responses to fungal components. *J. Immunotoxicol.* **2009**, *6*, 62–73. [[CrossRef](#)]
53. Pérez-Berezo, T.; Franch, A.; Ramos-Romero, S.; Castellote, C.; Pérez-Cano, F.J.; Castell, M. Cocoa-enriched diets modulate intestinal and systemic humoral immune response in young adult rats. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55*, S56–S66. [[CrossRef](#)]
54. Pérez-Berezo, T.; Franch, A.; Castellote, C.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J. Mechanisms involved in down-regulation of intestinal IgA in rats by high cocoa intake. *J. Nutr. Biochem.* **2012**, *23*, 838–844. [[CrossRef](#)]
55. Massot-Cladera, M.; Mayneris-Perxachs, J.; Costabile, A.; Swann, J.R.; Franch, À.; Pérez-Cano, F.J.; Castell, M. Association between urinary metabolic profile and the intestinal effects of cocoa in rats. *Br. J. Nutr.* **2017**, *117*, 623–634. [[CrossRef](#)]
56. Massot-Cladera, M.; Franch, A.; Castellote, C.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J. Cocoa flavonoid-enriched diet modulates systemic and intestinal immunoglobulin synthesis in adult Lewis rats. *Nutrients* **2013**, *5*, 3272–3286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Massot-Cladera, M.; Abril-Gil, M.; Torres, S.; Franch, A.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J. Impact of cocoa polyphenol extracts on the immune system and microbiota in two strains of young rats. *Br. J. Nutr.* **2014**, *112*, 1944–1954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Camps-Bossacoma, M.; Pérez-Cano, F.J.; Franch, À.; Castell, M. Theobromine is responsible for the effects of cocoa on the antibody immune status of rats. *J. Nutr.* **2018**, *148*, 464–471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

DISCUSIÓN

El asma alérgica representa un problema de salud pública a nivel mundial con una prevalencia que está en aumento, especialmente entre la población infantil que vive en grandes ciudades. El tratamiento de la enfermedad se basa en contener la inflamación y reducir la sintomatología mediante múltiples fármacos de uso prolongado que suelen conllevar la aparición de efectos secundarios (97,101,102). Por este motivo, es muy interesante desde el punto de vista sanitario, establecer estrategias nutricionales que puedan paliar el asma alérgica y reducir la dependencia a fármacos.

El uso de alimentos o ciertos nutrientes con el fin de mejorar la salud es una práctica tradicional que ha resurgido en las últimas décadas a través de la intervención con alimentos funcionales y nutracéuticos. Entre estos alimentos ricos en compuestos bioactivos se encuentra el cacao, fuente importante de vitaminas, minerales, fibra, polifenoles y metilxantinas, a los que se le han atribuido numerosos efectos beneficiosos para la salud (30,56,126). Durante más de 10 años, el grupo de investigación de Autoinmunidad, Inmunonutrición y Tolerancia de la facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación ha investigado la influencia de extractos de cacao y sus principales compuestos bioactivos sobre la respuesta inmunitaria, tanto en condiciones de salud como en modelos experimentales de inflamación y alergia (78,83,84,88,93,96). Sin embargo, el contenido de estos compuestos bioactivos varía según las condiciones de crecimiento, lo que provoca que uno de los países principales productores de cacao, como es Perú, disponga de múltiples variedades en función de la región del país en la que se haya cultivado.

Por ello el **objetivo principal** de la presente tesis consistió en establecer el efecto antiasmático de diferentes variedades de cacao nativas del Perú procedentes de distintas regiones del país. Para conseguir este objetivo principal se han desarrollado tres objetivos secundarios.

El primer objetivo secundario de la tesis consistió en desarrollar un modelo de asma alérgica en ratas Brown Norway que permitiera la inducción de una reacción anafiláctica.

Los modelos animales de hipersensibilidad inmediata suelen utilizar adyuvantes que potencian no solo la respuesta inmunitaria, sino también la respuesta en anticuerpos IgE que provocarán la desgranulación de mastocitos (94,127). Se han desarrollado múltiples modelos de asma en ratas y ratones aplicando distintos alérgenos, método de sensibilización y provocación. Sin

embargo, los principales síntomas del asma se reproducen mejor en rata que en ratón (128). Asimismo, las ratas de la cepa Brown Norway presentan una mayor capacidad de generar IgE tras la sensibilización (129,130). Por otro lado, la albúmina de huevo (ovoalbúmina u OVA) es uno de los alérgenos más usados (131–139) y ya se había utilizado de forma intraperitoneal junto con hidróxido de aluminio (alum) y toxina de *Bordetella pertussis* y posteriormente administrada por vía oral en un modelo de alergia alimentaria inducido en ratas de la misma cepa (93,140). La incorporación de la toxina de *Bordetella pertussis* potencia la síntesis de interleucina (IL) 4 (141) y la activación de linfocitos B (142,143), mientras que el alum adsorbe el alérgeno y permite una liberación prolongada, aumenta la respuesta inmunitaria provocada por la sensibilización e induce la respuesta inmunitaria polarizada hacia linfocitos Th2 y, por ello, el desarrollo de IgE (144,145).

Dentro del primer objetivo secundario de la tesis, una primera parte se dirigió a establecer la necesidad o no de incorporar la toxina de *Bordetella pertussis* para la obtención del modelo de asma alérgica (**Artículo 1**).

Para ello se dispuso de ratas Brown Norway que se sensibilizaron mediante la administración intraperitoneal de una suspensión de OVA en alum con o sin toxina de *Bordetella pertussis*. A los 7 días se administró, a los animales de ambas condiciones, una dosis de refuerzo de OVA y alum. Tres semanas más tarde se obtuvieron muestras de sangre, y se pudo observar la formación de anticuerpos anti-OVA y particularmente de tipo IgE en las dos condiciones, sin embargo, la síntesis fue superior al incorporar la toxina de *Bordetella pertussis* (**Artículo 1**). Por lo tanto, se pudo obtener un modelo de sensibilización y formación de IgE con solo dos administraciones de alérgeno, lo que constituye una ventaja respecto a otros modelos que utilizan tres o más administraciones (146–148)

Asimismo, en estos animales sensibilizados se provocó un shock anafiláctico mediante la administración intranasal de una solución de OVA y se determinó su comportamiento (registro de video durante 10 min y análisis posterior) y temperatura corporal (sonda rectal entre los 15 y 30 min posteriores a la inducción del shock anafiláctico), variables relacionadas con la respuesta anafiláctica (96,140,149,150). Se valoraron dos dosis de OVA para inducir la provocación y los resultados mostraron que los animales sensibilizados con toxina de *Bordetella*

pertussis que recibieron por vía intranasal la dosis alta de OVA tuvieron una mayor respuesta, disminuyendo sus movimientos y desarrollando sibilancias tras la provocación. Sin embargo, no se detectaron cambios significativos en la temperatura corporal (**Artículo 1**). Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta primera parte del primer objetivo permiten confirmar la puesta a punto de un modelo de asma alérgica, mediante las condiciones adecuadas para la sensibilización con OVA, alum y toxina de *Bordetella pertussis*, así como para la inducción de una respuesta anafiláctica por vía intranasal (**Artículo 1**). Este modelo se caracterizó posteriormente en la segunda parte del primer objetivo de la tesis.

Para la caracterización del modelo y, sobre todo, para la evaluación del shock anafiláctico se empleó, entre otras variables, la cuantificación objetiva de la actividad motora. Para ello se utilizaron actímetros especiales para roedores, ampliamente utilizados por investigadores de la Sección de Fisiología (151,152) y que ya se habían aplicado en la cuantificación de un shock anafiláctico en rata (140,153). Mediante los actímetros se registró el número de movimientos por hora, desde 4 h antes de la provocación hasta 20 h después. Los resultados demuestran la inactividad de los animales asmáticos incluso durante las horas de oscuridad (máxima actividad de las ratas) (**Artículo 1**). Por otra parte, para la caracterización del modelo, también se cuantificó la temperatura corporal mediante sensores implantados intraperitonealmente a los animales. Los sensores son similares a los utilizados para la determinación de la temperatura corporal humana mediante una pulsera y son capaces de registrar y grabar gran número de datos durante el tiempo programado. Este tipo de sensor, utilizado también por investigadores de la Sección de Fisiología (154–156), permitieron observar que la disminución de la temperatura corporal llega al máximo a las tres horas de la inducción del shock anafiláctico, a partir de entonces incrementa paulatinamente, pero aún se mantienen por debajo de la temperatura habitual a las 20 h tras la provocación (**Artículo 1**). La reducción en la temperatura es característica de un shock anafiláctico por la vasodilatación generalizada provocada por los mediadores liberados, principalmente la histamina secretada por los mastocitos y el óxido nítrico liberado por las células epiteliales (157,158). De hecho, la desgranulación de los mastocitos se demuestra por la determinación de la proteasa mastocitaria tipo II (típica de mucosas) (159), que fue superior en plasma después de 1 h de la provocación intranasal (**Artículo 2**). La proteasa mastocitaria, al igual que la histamina, se libera a los pocos minutos del contacto con el alérgeno y se utiliza habitualmente como biomarcador de la activación de los

mastocitos y de la anafilaxis. El enlace cruzado del alérgeno con la IgE específica unida a la membrana del mastocito provoca su desgranulación y la liberación de mediadores como histamina y proteasas, y la formación de mediadores derivados del ácido araquidónico, entre ellos los leucotrienos. En conjunto, los mediadores liberados provocan la sintomatología alérgica (98).

Además de la actividad motora y la temperatura corporal, el desarrollo del shock anafiláctico se evidenció por una disminución de peso corporal en las 24 h siguientes a la provocación (**Artículo 2**). Globalmente, el peso corporal de los animales inmunizados fue similar al de los animales de referencia (**Artículo 2**), pero, durante las 24 h siguientes a la inducción de la anafilaxis hubo una disminución de peso de casi un 6% (**Artículo 2**). Esta disminución se puede relacionar con la inactividad presentada durante el periodo nocturno de los animales asmáticos lo que puede haber dado lugar a una baja o nula ingesta de comida.

Para la caracterización del modelo, también se cuantificaron los anticuerpos alérgeno-específicos en sangre y fluido de líquido broncoalveolar (BALF) a las 24 h de la provocación. En sangre, todos los isotipos de IgG anti-OVA aumentaron en los animales asmáticos (**Artículo 1**), tanto los relacionados con una repuesta inmunitaria asociada a linfocitos Th2 (IgG1 e IgG2a) como a Th1 (IgG2b e IgG2c) (140,160,161). Además, se produce la síntesis de IgE específica, detectada tanto en sangre como en BALF, tal como se detecta a las 24 h de la provocación (**Artículo 1**). La reacción respiratoria también se evidencia en el BALF con un cierto aumento de leucotrienos cisteínicos (**Artículo 1**), mediadores bronco-constrictores liberados por mastocitos y eosinófilos en la reacción asmática. La falta de una elevación significativa de leucotrienos podría ser debida al momento de obtención de la muestra (24 h post-provocación). El análisis de muestras obtenidas más cercanas a la provocación intranasal quizá permitiría detectar un aumento de leucotrienos más patente y significativo.

Por otra parte, en muestras de BALF de los animales asmáticos se ha determinado la presencia de infiltrado celular (**Artículo 3**) y la concentración de citocinas (**Artículo 1**). En cuanto a las células presentes en el BALF, se ha observado un aumento significativo del número de leucocitos que es debido a cambios en el recuento de linfocitos, monocitos y granulocitos. En particular, la inducción del asma alérgica disminuye la proporción de linfocitos T e incrementa la de

eosinófilos (**Artículo 3**). Este aumento de eosinófilos puede asociarse a la liberación de leucotrienos, que inducen su reclutamiento, diferenciación y supervivencia y promueven su acumulación en la vía respiratoria, mientras que los eosinófilos también son responsables de la liberación de leucotrienos (162,163). En relación con los monocitos, se observó que la proporción de macrófagos alveolares en BALF no se modifica significativamente en animales asmáticos. Cabe remarcar la dificultad de identificar y fenotipar estas células por citometría de flujo debido a la existencia de poca variedad de marcadores para rata y a la auto-fluorescencia inherente que presentan los macrófagos (**Artículo 3**).

El análisis de citocinas en el BALF reveló un aumento de IL-1 α (**Artículo 1**) e IL-10 (**Artículos 1 y 3**), mientras que disminuyó la concentración de IL-13 (**Artículos 1 y 3**). La IL-1 α es una citocina inflamatoria secretada por macrófagos y células epiteliales respiratorias como señal de alarma en respuesta a la exposición a alérgenos y daño tisular (164–166). La liberación de IL-1 α provoca, de forma autocrina, la expresión de su receptor celular y aumenta la secreción de IL-33, la cual promueve una respuesta inflamatoria tipo 2 con reclutamiento y activación de leucocitos en la vía respiratoria (164,165,167,168). Por ello, los valores elevados de IL-1 α podrían relacionarse con la acumulación de leucocitos en el BALF y en muestras tisulares respiratorias (**Artículo 3**). La IL-10 es una citocina antiinflamatoria secretada por linfocitos, células dendríticas, mastocitos, monocitos y macrófagos que presenta funciones reguladoras claves en la fisiopatología del asma (169,170). En condiciones normales, los macrófagos alveolares, residentes en la superficie del epitelio alveolar, son una de las principales células productoras de IL-10 en la mucosa respiratoria donde contribuyen a mantener la homeóstasis (169,170). Numerosos estudios clínicos y pre-clínicos han asociado el déficit endógeno de IL-10 al aumento de la hiperreactividad bronquial y, en general, a una mayor gravedad de la enfermedad (114,171–173). Sin embargo, se ha descrito que durante una reacción asmática se incrementa la presencia de macrófagos M2 en las vías respiratorias por reclutamiento de monocitos circulantes (169). A diferencia de la función homeostática de los macrófagos alveolares residentes, estos nuevos macrófagos, que también secretan IL-10, tienen como objetivo combatir al agente nocivo mediante la promoción de una inflamación eosinofílica y contribuir a la reparación del tejido dañado (169). La infiltración de estos macrófagos podría explicar el aumento de IL-10 en BALF del presente estudio (**Artículos 1 y 3**). Asimismo, se ha sugerido que un aumento de IL-10 podría potenciar la inflamación eosinofílica en la reacción asmática (174,175). Por otra parte, aunque

se esperaba encontrar un incremento en la concentración de citocinas típicas de una respuesta Th2 como IL-4, IL-5 e IL-13, la concentración de IL-4 e IL-5 fue prácticamente indetectable en BALF y, inexplicablemente, se observó una reducción de la concentración de IL-13 (**Artículos 1 y 3**).

En resumen, con los resultados obtenidos del primer objetivo de esta tesis, se puede afirmar que se ha desarrollado un modelo de alergia respiratoria capaz de dar lugar a una reacción anafiláctica con síntesis de IgE e IgG y liberación de mediadores de mastocitos, variaciones de comportamiento animal (actividad motora) y temperatura corporal.

El **segundo objetivo secundario de la tesis se centró en establecer *in vitro* el efecto antioxidante, antiinflamatorio e inmunomodulador de cuatro variedades de cacao nativas de Perú sobre células del sistema inmunitario**. Las variedades de cacao estudiadas fueron “Blanco de Piura”, “Amazonas Perú”, “Criollo de Montaña” y “Chuncho del Cusco”, que corresponden a clones obtenidos en diferentes regiones del país. El cacao objeto de estudio de cada una de estas variedades se obtuvo a partir de una selección y evaluación de frutos y semillas de un mínimo de 15 árboles por variedad en la misma fase de la cosecha 2018. Las variedades de cacao estudiadas se consideran como cacao fino o de aroma (176). A partir de las semillas cosechadas, se obtuvo la pasta de cacao en base al protocolo local que es la que se ha estudiado en este trabajo (177).

La determinación bioquímica de las cuatro variedades autóctonas de cacao peruano ha identificado a la población Blanco de Piura, procedente de la región costera de Piura, al noroeste de Perú, como la población con menor concentración de polifenoles, metilxantinas y capacidad antioxidante. El cacao Amazonas de Perú, de la región Amazónica al nordeste del país, mostró altos niveles de polifenoles, una concentración moderada de metilxantinas y la capacidad antioxidante más elevada. Sin embargo, el cacao Criollo de Montaña, de la región céntrica de Junín, resultó ser la variedad con mayor contenido de polifenoles y metilxantinas. El cacao Chuncho de la región de Cusco, más al sur del país, mostró menos cantidad de polifenoles, niveles intermedios de metilxantinas y menor capacidad antioxidante que los dos cacaos anteriores (**Artículo 2**). Como cacao de referencia se utilizó el clon CCN-51, un cacao ordinario de origen ecuatoriano ampliamente cultivado para la industria chocolatera por su alto

rendimiento y resistencia a plagas, pero de sabor amargo y alta astringencia. En este caso, el cultivo procedía de la región de Cusco y mostró una concentración en polifenoles y actividad antioxidante similares a los del cacao Chunchu, procedente de la misma región, aunque con menor cantidad de metilxantinas (**Artículo 2**).

En primer lugar, se analizó el efecto antiinflamatorio de las variedades de cacao *in vitro*, utilizando un cultivo de macrófagos peritoneales cultivados en presencia de extracto de cacao y estimulados posteriormente con lipopolisacárido (LPS) bacteriano. Después de 6 h de estimulación se estudió el perfil de macrófagos proinflamatorios M1 y antiinflamatorios M2 mediante técnicas de citometría de flujo. Las cuatro variedades peruanas de cacao autóctono, sobre todo Blanco de Piura y Amazonas de Perú, favorecieron el fenotipo de macrófagos M2 (**Artículo 2**). Asimismo, se observó que las variedades Amazonas Perú y Criollo de Montaña eran capaces de reducir la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) de los macrófagos cultivados (**Artículo 2**). Estos resultados coinciden con los llevados a cabo por Dugo *et al.* (178) y Ramiro *et al.* (70) con extractos de polifenoles de cacao, lo que sugiere que los polifenoles podrían ser los responsables del efecto observado. De hecho, las variedades Amazonas Perú y Criollo de Montaña corresponden a las pastas de cacao con el mayor contenido de polifenoles y mayor actividad antioxidante.

El estudio *in vitro* se completó mediante el análisis de la influencia de las diferentes variedades de cacao sobre la funcionalidad de linfocitos esplénicos. Para ello, una parte de los linfocitos tratados con los extractos de cacao fue estimulada con LPS (24 h) y se cuantificó la secreción de TNF α en el sobrenadante. Otra parte de estos linfocitos tratados con cacao se incubó durante 4 días y se analizó la concentración de IgG secretada.

Todos los extractos de cacao mostraron un efecto modulador sobre los linfocitos, reduciendo la secreción de IgG. Sin embargo, la respuesta inhibitoria sobre la producción de la citocina inflamatoria TNF α solo fue significativa para la variedad “Chunchu de Cusco”. El efecto atenuante del cacao sobre la producción de anticuerpos y de citocinas proinflamatorias coincide con estudios publicados utilizando también técnicas *in vitro* (65,70–75).

Los resultados obtenidos *in vitro* sobre macrófagos y linfocitos, así como la caracterización bioquímica de las diferentes variedades de cacao permitieron seleccionar las variedades Amazonas Perú y Criollo de Montaña para los estudios *in vivo* posteriores (**Artículos 1 y 3**).

El tercer objetivo de la tesis consistió en establecer el efecto protector de dos dietas enriquecidas con un 10% de cacao nativo peruano en el modelo de asma alérgica en rata.

Para ello, ratas Brown Norway fueron distribuidas en cuatro grupos que fueron alimentados con diferentes dietas: una dieta estándar o una dieta estándar a la que se le añadió un 10% de pasta de cacao Amazonas Perú, Criollo de Montaña o cacao ordinario. Se comprobó la absorción de los polifenoles mediante su determinación en orina y se observó que los animales que recibieron las variedades autóctonas del Perú presentaban mayores concentraciones de polifenoles.

Después de una semana de intervención nutricional se inició la sensibilización y, a las 4 semanas, se provocó la respuesta anafiláctica por vía respiratoria. Se evaluó el impacto de la dieta sobre la respuesta asmática aguda (**Artículo 2**) y a nivel sistémico y mucosal (**Artículo 3**).

Se ha evaluado la respuesta anafiláctica mediante los cambios en la temperatura corporal, la actividad motora y el peso corporal durante las horas siguientes a la provocación (**Artículo 2**). Los resultados muestran que las dietas enriquecidas en cacao nativo peruano no protegen de la disminución de la actividad motora inducida por la provocación por vía intranasal. Aun así, la provocación causó una disminución de la actividad motora de más del 60% en aquellos animales asmáticos alimentados con dieta estándar, mientras que en aquellos animales asmáticos alimentados con Amazonas Perú, Criollo de Montaña o cacao ordinario se vio disminuida en un 50, 40 y 35%, respectivamente.

En cuanto a la **temperatura corporal**, el shock anafiláctico causó una disminución de la temperatura a las pocas horas de la inducción en todos los animales, siendo mayor, precoz y de recuperación tardía en los animales asmáticos alimentados con la dieta referencia. Además, los resultados mostraron que la variedad nativa de Criollo de Montaña, la pasta de cacao con mayor contenido en compuestos fenólicos, flavonoides y teobromina; pero no la de Amazonas Perú, es capaz de evitar parcialmente dicha disminución.

Respecto a la IgA mucosal, y coincidiendo con resultados obtenidos en estudios anteriores ((84,87,96,179–184), el consumo de las dietas elaboradas con la pasta de Criollo de Montaña o con cacao ordinario disminuyó la concentración de IgA en los compartimentos intestinal (heces) y pulmonar (BALF) (**Artículo 3**). En este sentido, estudios previos de intervención nutricional con una dieta enriquecida con un 10% de cacao evidenciaron una menor expresión génica de moléculas relacionadas con la síntesis de IgA en el compartimento intestinal como IL-6 (86) y TGF- β 1 (asociadas con la diferenciación de células B productoras de IgA) (85,185,186), la quimiocina CCL-28, el receptor de quimiocina CCR-9 y los receptores nucleares de ácido retinoico RAR α y RAR β (relacionadas con la migración intestinal de linfocitos B) (61,85,86,187). Sin embargo, no todas las variedades ejercen el mismo efecto modulador si no que depende de su composición. Camps-Bossacoma *et al.* (83) evidenció que la teobromina a una dosis de 0,25% es el compuesto bioactivo presente en el cacao convencional responsable de dicha disminución. No obstante, estos cambios en la concentración de IgA mucosal no se observaron en los animales alimentador con la variedad Amazonas Perú a pesar de presentar un contenido de teobromina similar al del cacao convencional.

El contenido en flavonoides en las diferentes variedades de cacao analizadas podría también ser responsable de estos efectos. Sin embargo, de nuevo la dieta con cacao ordinario mostró un efecto mayor aun teniendo un menor contenido en flavonoide que la variedad Amazonas de Perú. Cabe pensar, entonces en el perfil de composición de estos flavonoides. En este aspecto, estudios recientes han demostrado que la administración oral de ciertos polifenoles, como la quercetina, la luteolina y también las antocianinas, incrementan la concentración de IgA intestinal en modelos animales (188–190). Por lo tanto, la composición particular de los flavonoides del cacao Amazonas de Perú, donde podría encontrarse una mayor proporción de antocianinas, compensaría el efecto reductor de otros compuestos del cacao sobre la IgA mucosal.

La intervención nutricional con cacao afectó la respuesta asmática inducida en los animales, siendo capaz de paliar la síntesis de anticuerpos IgE específicos. El cacao ordinario redujo la concentración de IgE anti-OVA tanto sistémica como respiratoria mientras que las poblaciones autóctonas peruanas mostraron un efecto menor: la dieta con Criollo de Montaña disminuyó la concentración de IgE en lavado broncoalveolar, con una tendencia en suero, mientras que la

dieta con Amazonas Perú solo mostró un cierto efecto a nivel respiratorio (**Artículo 2**). Resultados similares se observaron en la degranulación mastocitaria, tal como se observa con la tendencia a disminuir la concentración de proteasa mastocitaria II en plasma tras la respuesta anafiláctica (**Artículo 2**). Las poblaciones nativas peruanas Amazonas Perú y Criollo de Montaña tuvieron un efecto protector menor al del cacao ordinario, que pudo evitar por completo el incremento de la proteasa 1 h después de la provocación. Una menor activación mastocitaria también conllevará una menor formación de mediadores proinflamatorios como los leucotrienos, lo que explicaría el efecto protector de las variedades de cacao sobre estos mediadores (**Artículo 2**). La protección del cacao frente a la degranulación de los mastocitos podría deberse a una menor producción de IgE específicas, lo que reduciría el número de mastocitos con IgE anti-OVA adheridos a su superficie, menos complejo IgE-alérgeno y por tanto menos número e intensidad de activación de los mastocitos reduciendo la presencia de mediadores inflamatorios (entre ellos los CysLT y vasodilatadores como histamina). Estos resultados concuerdan con los de la temperatura corporal, donde el cacao ordinario y el Criollo de Montaña previnieron parcialmente el descenso y propiciaron una recuperación más temprana (**Artículo 2**).

A demás de la IgE, la inducción del asma aumentó la concentración de un amplio abanico de **anticuerpos** específicos a nivel sistémico, tanto los relacionados con una respuesta inmunitaria Th1 (IgG2 y IgG2c) como Th2 (IgG1 y IgG2a) e IgM. Las tres dietas ricas en pasta de cacao atenúan el incremento de IgG1, sin embargo, el efecto sobre la IgG2a fue dispar: las 3 dietas redujeron la concentración de anticuerpo, pero tan solo resultó significativo con la dieta rica en cacao Amazonas Perú. El efecto sobre la respuesta Th1 no fue significativo con ninguna dieta. Tal como se ha mencionado, se ha sugerido que la teobromina del cacao sea la responsable de este efecto (83), sin embargo, la dieta con Amazonas Perú mostró igual o mayor eficacia que las dietas con Criollo de Montaña y cacao ordinario (con mayor y menor concentración de teobromina, respectivamente), resultados contrarios a los obtenidos sobre la IgA mucosal (**Artículo 3**). La fibra de cacao y ciertos flavonoides vegetales también han mostrado influir en la respuesta humoral (182,191,192). Los estudios anteriores del grupo pusieron de manifiesto la influencia de varios factores que influyen en la acción del cacao sobre los anticuerpos, como la edad y la cepa del animal, el inicio y la duración de la intervención nutricional y el isotipo. Los resultados

de la presente tesis añaden el perfil de flavonoides del cacao como nueva variante a tener en cuenta.

El estudio de la **composición leucocitaria** en las vías respiratorias indicó una atenuación del incremento de leucocitos en los animales asmáticos alimentados con la dieta rica en cacao ordinario. Numerosos estudios han demostrado la función moduladora del cacao en la composición linfocitaria, con resultados variantes dependiendo del tejido analizado y de los factores mencionados anteriormente. Además, todas las dietas ricas en cacao tendieron a reducir la subida de la proporción de eosinófilos, células características del fenotipo asmático Th2-alto donde se incluye el de tipo alérgico (**Artículo 3**).

La acumulación de eosinófilos en la vía respiratoria incrementa el daño tisular y la broncoconstricción por la liberación de mediadores como leucotrienos, especies reactivas de oxígeno, proteasas y citocinas que a su vez promueven el reclutamiento de más leucocitos a la zona, entre ellos los mastocitos. Como consecuencia se incrementa la respuesta Th2, la aparición de edema y los típicos síntomas alérgicos de una respuesta asmática tardía. Una menor degranulación de mastocitos con una reducción de la secreción de leucotrienos debido a la disminución de IgE podría explicar parcialmente la atenuación de los eosinófilos en la vía respiratoria, aunque la reducción de eosinófilos *per se* también contribuiría a la reducción de leucotrienos. Por otro lado, un compuesto bioactivo del cacao, la teofilina, ha demostrado tener efectos clínicos en cuanto a la reducción de leucotrienos y podría contribuir a los efectos observados.

Las limitaciones técnicas encontradas en el análisis de citocinas no han permitido realizar una evaluación global del efecto de los cacaos sobre este aspecto clave de la respuesta alérgica. A pesar de ello, se pudo detectar una normalización de las citocinas IL-10 e IL-13 en aquellos animales asmáticos que consumieron una dieta CMC, mostrando valores similares a los de animales sanos. Estudios preclínicos han descrito la acción de la teobromina como sustancia reguladora de citocinas Th2 mediante la inhibición de la enzima nuclear PARP-1 en diversas células, entre ellas los macrófagos (principales productores de IL-10 en la mucosa pulmonar). Los flavonoides también han demostrado influir en la secreción de citocinas, con resultados distintos según la citocina y la estructura del flavonoide (74,75,193).

Como resumen general, hay que destacar el potencial beneficioso del cacao sobre el asma alérgica al paliar la respuesta inmunitaria Th2, especialmente la síntesis de anticuerpos específicos IgE en la fase de sensibilización y la degranulación de mastocitos durante la respuesta anafiláctica. Los efectos no se pueden atribuir a un solo compuesto bioactivo, debiendo influir tanto el contenido en teobromina como la concentración y perfil de flavonoides de cada cacao, que varía según su origen. Para esclarecer las diferencias de influencia de cada uno de ellos sería interesante conocer la concentración de proantocinidinas, epicatequinas catequinas, antocianinas, polifenoles no-flavonoides (como el ácido hidroxibenzoico) y otros polifenoles minoritarios.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten extraer las siguientes conclusiones:

- La combinación de una sensibilización intraperitoneal con ovoalbúmina, hidróxido de aluminio y toxina *Bordetella pertussis*, con un refuerzo sin toxina a los siete días, y la administración intranasal de una dosis alta de ovoalbúmina constituye un modelo de asma alérgica en ratas Brown Norway. El modelo se caracteriza por una síntesis elevada de anticuerpos anti-ovoalbúmina en suero (IgE, IgG1 e IgG2a) y lavado broncoalveolar (IgE).
- La administración intranasal de ovoalbúmina tras la sensibilización causa una reacción anafiláctica que es cuantificable mediante la reducción de la actividad motora, la temperatura, el peso corporal y el aumento de la proteasa mastocitaria II.
- El modelo del asma alérgica modifica la composición leucocitaria sistemática y pulmonar, incrementando el número de leucocitos y la proporción de eosinófilos, y provoca cambios estructurales en la mucosa de las fosas nasales y de la tráquea con acumulación de leucocitos y de mucosidad.
- Los cacaos nativos de Perú Blanco de Piura, Amazonas Perú, Criollo de Montaña y, Chunco del Cusco, así como el cacao ordinario, presentan distintas concentraciones de compuestos bioactivos (polifenoles, flavonoides y metilxantinas) debido a variaciones genéticas y/o ambientales.
- La población Criollo de Montaña contiene concentraciones superiores de polifenoles, flavonoides y metilxantinas, seguido de la población Amazonas Perú y muestran mayor capacidad antioxidante *in vitro*.
- La ingesta de una dieta al 10% de pasta de cacao Amazonas Perú, Criollo de Montaña o cacao ordinario, iniciada 1 semana antes de la sensibilización, mitiga la producción de anticuerpos sistémicos específicos relacionados con la respuesta Th2 (IgE, IgG1 e IgG2a) y la liberación de proteasa mastocitaria II, indicador de la degranulación de los

mastocitos. Además, el cacao Criollo de Montaña reduce la producción de IgE en la vía respiratoria.

- o Las dietas con 10% en cacao Criollo de Montaña y cacao ordinario, pero no la dieta con Amazonas Perú, reducen la síntesis de IgA mucosal en intestino y pulmón.

BIBLIOGRAFÍA

1. Powis TG, Cyphers A, Gaikwad NW, Grivetti L, Cheong K. Cacao use and the San Lorenzo Olmec. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 24;108(21):8595–600.
2. Dillinger TL, Barriga P, Escárcega S, Jimenez M, Lowe DS, Grivetti LE. Food of the gods: cure for humanity? A cultural history of the medicinal and ritual use of chocolate. *J Nutr*. 2000;130(8S Suppl).
3. Coe, S., Coe, M., Huxtable R. *The true history of chocolate*. 1996.
4. Cuatrecasas J. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *Systematic Plant Studies*. 1964;379–614.
5. Somarriba E, Beer J. Productivity of *Theobroma cacao* agroforestry systems with timber or legume service shade trees. *Agroforestry Systems* 2010 81:2. 2010;81(2):447–55.
6. Dostert N, Roque J, Cano A, La Torre MI, Weigend M, Luebert F tr. *Hoja botánica: Cacao. Theobroma cacao L*. 2012;
7. Lindorf R, Lindorf I, Lindorf H. Desarrollo y anatomía del fruto y la semilla de *Theobroma cacao L* on JSTOR. *Acta Botánica Venezuéllica*, vol 6, no 1/4, Fundación Instituto Botánico de Venezuela (FIBV). 1971;261–95.
8. Rangel-Fajardo MaA, Zavaleta-Mancera HA, Córdova-Téllez L, López-Andrade AP, Delgado-Alvarado A, Vidales-Fernández I, et al. Anatomía e histoquímica de la semilla del cacao (*Theobroma cacao L*.) criollo mexicano. *Revista fitotecnia mexicana*. 2012;35(3):189–97.
9. Campos-Vega R, Nieto-Figueroa KH, Oomah BD. Cocoa (*Theobroma cacao L*.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. *Trends Food Sci Technol*. 2018 Nov 1;81:172–84.

10. Hall H, Li Y, Comerford N, Arévalo E, Luis G, Cernades Z, et al. Cover crops alter phosphorus soil fractions and organic matter accumulation in a Peruvian cacao agroforestry system. *Number 3 Agroforest Syst.* 2010;80:447–55.
11. Cornejo OE, Yee MC, Dominguez V, Andrews M, Sockell A, Strandberg E, et al. Population genomic analyses of the chocolate tree, *Theobroma cacao* L., provide insights into its domestication process. *Commun Biol.* 2018;1(1).
12. Oracz J, Zyzelewicz D, Nebesny E. The content of polyphenolic compounds in cocoa beans (*Theobroma cacao* L.), depending on variety, growing region, and processing operations: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2015 Jul 29;55(9):1176–92.
13. Thomas E, Van Zonneveld M, Loo J, Hodgkin T, Galluzzi G, Van Etten J. Present spatial diversity patterns of *Theobroma cacao* L. in the neotropics reflect genetic differentiation in pleistocene refugia followed by human-influenced dispersal. *PLoS One.* 2012;7(10).
14. Zarrillo S, Gaikwad N, Lanaud C, Powis T, Viot C, Lesur I, et al. The use and domestication of *Theobroma cacao* during the mid-Holocene in the upper Amazon. *Nat Ecol Evol.* 2018 Dec 1;2(12):1879–88.
15. Macmanus Chinenye N, Ogunlowo AS, Olukunle OJ. COCOA BEAN (*Theobroma cacao* L.) DRYING KINETICS. *Chil J Agric Res.* 70(4):633–9.
16. Jespersen L, Nielsen DS, Hønholt S, Jakobsen M. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Res.* 2005;5(4–5):441–53.
17. Schwan RF, Wheals AE. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2004;44(4):205–21.
18. Camu N, De Winter T, Verbrugghe K, Cleenwerck I, Vandamme P, Takrama JS, et al. Dynamics and Biodiversity of Populations of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria

- Involved in Spontaneous Heap Fermentation of Cocoa Beans in Ghana. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Mar;73(6):1809.
19. Nielsen DS, Teniola OD, Ban-Koffi L, Owusu M, Andersson TS, Holzapfel WH. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *Int J Food Microbiol.* 2007 Mar 10;114(2):168–86.
 20. Lima LJR, Almeida MH, Nout MJR, Zwietering MH. *Theobroma cacao* L., “The food of the Gods”: quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2011;51(8):731–61.
 21. Ho VTT, Zhao J, Fleet G. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *Int J Food Microbiol.* 2014 Mar 17;174:72–87.
 22. De Vuyst L, Weckx S. The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *J Appl Microbiol.* 2016 Jul 1;121(1):5–17.
 23. Díaz-Muñoz C, Van de Voorde D, Comasio A, Verce M, Hernandez CE, Weckx S, et al. Curing of Cocoa Beans: Fine-Scale Monitoring of the Starter Cultures Applied and Metabolomics of the Fermentation and Drying Steps. *Front Microbiol.* 2021 Jan 11;11:3446.
 24. Soares TF, Oliveira MBPP. Cocoa By-Products: Characterization of Bioactive Compounds and Beneficial Health Effects. *Molecules* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2022 Sep 19];27(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35268725/>
 25. Rojas M, Hommes A, Heeres HJ, Chejne F. Physicochemical Phenomena in the Roasting of Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food Engineering Reviews* 2021. 2022;1:3.
 26. Rojas M, Hommes A, Heeres HJ, Chejne F. Physicochemical Phenomena in the Roasting of Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food Engineering Reviews* 2021. 2022 Jan 13;1:1–25.

27. Meursing E. Cocoa Manual The De Zaan[®] Cocoa Manual, 40th Anniversary Edition, , ADM Cocoa International, Switzerland, 2009. BAKING & CEREALS BEVERAGES DAIRY SNACK FOODS COCOA CANDY & The De Zaan[®].
28. Zyzelewicz D, Krysiak W, Budryn G, Oracz J, Nebesny E. Tocopherols in cocoa butter obtained from cocoa bean roasted in different forms and under various process parameters. *Food Research International*. 2014 Sep 1;63:390–9.
29. Buscato MHM, Grimaldi R, Kieckbusch TG. Cocoa butter symmetrical monounsaturated triacylglycerols: separation by solvent fractionation and application as crystallization modifier. *J Food Sci Technol*. 2017 Sep 1;54(10):3260.
30. Montagna MT, Diella G, Triggiano F, Caponio GR, De Giglio O, Caggiano G, et al. Chocolate, “Food of the Gods”: History, Science, and Human Health. *Int J Environ Res Public Health*. 2019 Dec 2;16(24).
31. Naik B, Kumar V. Cocoa Butter and Its Alternatives: A Reveiw. *Journal of Bioresource Engineering and Technology | Year-2014 |*. 2014;1:7–17.
32. Calleja CA, Hurtado C, Daschner Á, Fernández Escámez P, Manuel C, Abuín FC, et al. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre Ingestas Nutricionales de Referencia para la población española Miembros del Comité Científico Colaboradores externos Ramón Estruch Riba.
33. Lecumberri E, Mateos R, Izquierdo-Pulido M, Rupérez P, Goya L, Bravo L. Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food Chem*. 2007 Jan 1;104(3):948–54.
34. Dhingra D, Michael M, Rajput H, Patil RT. Dietary fibre in foods: a review. *J Food Sci Technol*. 2012;49(3):255–66.

35. Redgwell R, Trovato V, Merinat S, Curti D, Hediger S, Manez A. Dietary fibre in cocoa shell: characterisation of component polysaccharides. *Food Chem.* 2003 May 1;81(1):103–12.
36. Okiyama DCG, Navarro SLB, Rodrigues CEC. Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. *Trends Food Sci Technol.* 2017 May 1;63:103–12.
37. Rawel HM, Huscek G, Sagu ST, Homann T. Cocoa Bean Proteins-Characterization, Changes and Modifications due to Ripening and Post-Harvest Processing. *Nutrients.* 2019 Feb 1;11(2).
38. Reglamento (UE) n° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor.
39. De Clercq N. Changing the functionality of cocoa butter. 2011.
40. Lipp M, Simoneau C, Ulberth F, Anklam E, Crews C, Brereton P, et al. Composition of Genuine Cocoa Butter and Cocoa Butter Equivalents. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2001 Aug 1;14(4):399–408.
41. Kühn J, Schröter A, Hartmann BM, Stangl GI. Cocoa and chocolate are sources of vitamin D2. *Food Chem.* 2018 Dec 15;269:318–20.
42. Marles RJ. Mineral nutrient composition of vegetables, fruits and grains: The context of reports of apparent historical declines. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2017 Mar 1;56:93–103.
43. Cuevas A, Saavedra N, Salazar LA, Abdalla DSP. Modulation of immune function by polyphenols: possible contribution of epigenetic factors. *Nutrients.* 2013 Jun 28;5(7):2314–32.
44. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* 2010;2(12):1231–46.

45. Aron PM, Kennedy JA. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Mol Nutr Food Res*. 2008 Jan 1;52(1):79–104.
46. Rodriguez-Campos J, Escalona-Buendía HB, Orozco-Avila I, Lugo-Cervantes E, Jaramillo-Flores ME. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International*. 2011 Jan 1;44(1):250–8.
47. Schinella G, Mosca S, Cienfuegos-Jovellanos E, Pasamar MÁ, Muguerza B, Ramón D, et al. Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. *Food Research International*. 2010 Jul 1;43(6):1614–23.
48. Franco R, Oñatibia-Astibia A, Martínez-Pinilla E. Health Benefits of Methylxanthines in Cacao and Chocolate. *Nutrients*. 2013;5:4159–73.
49. Peláez PP, Bardón I, Camasca P. Methylxanthine and catechin content of fresh and fermented cocoa beans, dried cocoa beans, and cocoa liquor. *Scientia Agropecuaria*. 2016 Dec 31;7(4):355–65.
50. Rodriguez-Mateos A, Cifuentes-Gomez T, Gonzalez-Salvador I, Ottaviani JI, Schroeter H, Kelm M, et al. Influence of age on the absorption, metabolism, and excretion of cocoa flavanols in healthy subjects. *Mol Nutr Food Res*. 2015 Aug 1;59(8):1504–12.
51. Keen CL, Holt RR, Oteiza PI, Fraga CG, Schmitz HH. Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr*. 2005 Jan 1;81(1):298S-303S.
52. Rimbach G, Melchin M, Moehring J, Wagner AE. Polyphenols from Cocoa and Vascular Health—A Critical Review. *Int J Mol Sci*. 2009 Oct;10(10):4290.
53. Sarriá B, Gomez-Juaristi M, López SM, Cordero JG, Bravo L, Raquel Mateos Briz M. Cocoa colonic phenolic metabolites are related to HDL-cholesterol raising effects and methylxanthine metabolites and insoluble dietary fibre to anti-inflammatory and hypoglycemic effects in humans. *PeerJ*. 2020;8.

54. Luo Y, Jian Y, Liu Y, Jiang S, Muhammad D, Wang W. Flavanols from Nature: A Phytochemistry and Biological Activity Review. Vol. 27, *Molecules*. MDPI; 2022.
55. Hooper L, Kay C, Abdelhamid A, Kroon PA, Cohn JS, Rimm EB, et al. Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Am J Clin Nutr*. 2012 Mar 1;95(3):740–51.
56. Martín MÁ, Ramos S. Impact of cocoa flavanols on human health. *Food and Chemical Toxicology*. 2021 May 1;151:112121.
57. Caponio GR, Lorusso MP, Sorrenti GT, Marcotrigiano V, Difonzo G, de Angelis E, et al. Chemical characterization, gastrointestinal motility and sensory evaluation of dark chocolate: A nutraceutical boosting consumers' health. *Nutrients*. 2020 Apr 1;12(4).
58. Goya L, Martín MÁ, Sarriá B, Ramos S, Mateos R, Bravo L. Effect of Cocoa and Its Flavonoids on Biomarkers of Inflammation: Studies of Cell Culture, Animals and Humans. *Nutrients*. 2016 Apr 9;8(4).
59. Pérez-Cano FJ, Massot-Cladera M, Franch À, Castellote C, Castell M. The effects of cocoa on the immune system. *Front Pharmacol*. 2013;4 JUN(June):1–12.
60. Ramiro-Puig E, Castell M. Cocoa: Antioxidant and immunomodulator. Vol. 101, *British Journal of Nutrition*. *Br J Nutr*; 2009. p. 931–40.
61. 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 May;55(SUPPL. 1).
62. Camps-Bossacoma M, Massot-Cladera M, Abril-Gil M, Franch A, Pérez-Cano FJ, Castell M. Cocoa Diet and Antibody Immune Response in Preclinical Studies. *Front Nutr*. 2017;4(June):1–14.

63. Martins TF, Palomino OM, Álvarez-Cilleros D, Martín MA, Ramos S, Goya L. Cocoa Flavonols Protect Human Endothelial Cells from Oxidative Stress. *Plant Foods Hum Nutr.* 2020 Jun 1;75(2):161–8.
64. Ramiro-Puig E, Casadesús G, Lee HG, Zhu X, McShea A, Perry G, et al. Neuroprotective effect of cocoa flavonoids on in vitro oxidative stress. *Eur J Nutr.* 2009 Feb;48(1):54–61.
65. Carballeda Sangiao N, Chamorro S, de Pascual-Teresa S, Goya L. Aqueous Extract of Cocoa Phenolic Compounds Protects Differentiated Neuroblastoma SH-SY5Y Cells from Oxidative Stress. *Biomolecules.* 2021 Sep 1;11(9).
66. 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 Mar;58(3):447–56.
67. Martín MA, Ramos S, Mateos R, Serrano ABG, Izquierdo-Pulido M, Bravo L, et al. Protection of human HepG2 cells against oxidative stress by cocoa phenolic extract. *J Agric Food Chem.* 2008 Sep 10;56(17):7765–72.
68. 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 Mar;21(3):196–205.
69. Cordero-Herrera I, Martín MA, Goya L, Ramos S. Cocoa flavonoids protect hepatic cells against high-glucose-induced oxidative stress: Relevance of MAPKs. *Mol Nutr Food Res.* 2015 Apr 1;59(4):597–609.
70. Ramiro E, Franch À, Castellote C, Pérez-Cano F, Permanyer J, Izquierdo-Pulido M, et al. Flavonoids from *Theobroma cacao* down-regulate inflammatory mediators. *J Agric Food Chem.* 2005 Nov 2;53(22):8506–11.
71. 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-kappaB nuclear

- translocation in whole blood stimulated system. *Neuro Endocrinol Lett.* 2009 Mar;30(1):131–8.
72. 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 Jun;93(6):859–66.
73. 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(1):17–22.
74. Kenny TP, Keen CL, Schmitz HH, Gershwin ME. Immune effects of cocoa procyanidin oligomers on peripheral blood mononuclear cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 2007 Feb;232(2):293–300.
75. Mao T, van de Water J, Keen CL, Schmitz HH, Gershwin ME. Cocoa Procyanidins and Human Cytokine Transcription and Secretion. *J Nutr.* 2000 Aug 1;130(8):2093S-2099S.
76. 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(1):167–9.
77. 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 Feb 28;107(4):523–32.
78. Ruiz-Iglesias P, Massot-Cladera M, Rodríguez-Lagunas MJ, Franch À, Camps-Bossacoma M, Castell M, et al. A Cocoa Diet Can Partially Attenuate the Alterations in Microbiota and Mucosal Immunity Induced by a Single Session of Intensive Exercise in Rats. *Front Nutr.* 2022 Apr 11;9.

79. 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 Sep;149(3):535–42.
80. Álvarez-Cilleros D, López-Oliva ME, Ramos S, Martín MÁ. Preventive effect of cocoa flavanols against glucotoxicity-induced vascular inflammation in the arteria of diabetic rats and on the inflammatory process in TNF- α -stimulated endothelial cells. *Food Chem Toxicol*. 2020 Dec 1;146.
81. 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. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2008 Aug;19(8):555–65.
82. 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 Aug 8;55(16):6431–8.
83. Camps-Bossacoma M, Pérez-Cano FJ, Franch À, Castell M. Theobromine is responsible for the effects of cocoa on the antibody immune status of rats. *Journal of Nutrition*. 2018 Mar 1;148(3):464–71.
84. Camps-Bossacoma M, Abril-Gil M, Saldaña-Ruiz S, Franch À, Pérez-Cano FJ, Castell M. Cocoa diet prevents antibody synthesis and modifies lymph node composition and functionality in a rat oral sensitization model. *Nutrients*. 2016 Apr 23;8(4).
85. Camps-Bossacoma M, Pérez-Cano FJ, Franch À, Untersmayr E, Castell M. Effect of a cocoa diet on the small intestine and gut-associated lymphoid tissue composition in an oral sensitization model in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2017;42:182–93.
86. Pérez-Berezo T, Franch A, Castellote C, Castell M, Pérez-Cano FJ. Mechanisms involved in down-regulation of intestinal IgA in rats by high cocoa intake. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012 Jul 1;23(7):838–44.

87. Massot-Cladera M, Abril-Gil M, Torres S, Ngels Franch A', 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(12):1944–54.
88. Ruiz-Iglesias P, Massot-Cladera M, Rodríguez-Lagunas MJ, Franch À, Camps-Bossacoma M, Pérez-Cano FJ, et al. Protective Effect of a Cocoa-Enriched Diet on Oxidative Stress Induced by Intensive Acute Exercise in Rats. *Antioxidants (Basel).* 2022 Apr 1;11(4).
89. 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(10):1939–45.
90. Stote KS, Clevidence BA, Novotny JA, Henderson T, Radecki S V., Baer DJ. Effect of cocoa and green tea on biomarkers of glucose regulation, oxidative stress, inflammation and hemostasis in obese adults at risk for insulin resistance. *Eur J Clin Nutr.* 2012 Oct;66(10):1153–9.
91. Vázquez-Agell M, Urpi-Sarda M, Sacanella E, Camino-López S, Chiva-Blanch G, Llorente-Cortés V, et al. Cocoa consumption reduces NF-κB activation in peripheral blood mononuclear cells in humans. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013 Mar;23(3):257–63.
92. 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 Dec 1;132(12):3663–7.
93. 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 Jun;65(6):603–8.
94. 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 Mar;53(3):389–97.

95. Camps-Bossacoma M, Abril-Gil M, Franch A, Pérez-Cano F CM. Induction of An Oral Sensitization Model in Rats. *Clinical Immunology, Endocrine & Metabolic Drugs*. 2014;1(2):89–101.
96. Abril-Gil M, Pérez-Cano FJ, Franch À, Castell M. Effect of a cocoa-enriched diet on immune response and anaphylaxis in a food allergy model in Brown Norway rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2016 Jan 1;27:317–26.
97. Global Initiative for Asthma. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*, 2021. Available from: www.ginasthma.org.
98. Global Initiative for Asthma. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention Appendix*, 2020. Available from: www.ginasthma.org.
99. Dharmage SC, Perret JL, Custovic A. Epidemiology of asthma in children and adults. *Front Pediatr*. 2019;7(JUN):1–15.
100. Wenzel SE. Asthma phenotypes: The evolution from clinical to molecular approaches. Vol. 18, *Nature Medicine*. *Nat Med*; 2012. p. 716–25.
101. Mallol J, Crane J, Von Mutius E, Odhiambo J, Keil U, Stewart A. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three: A global synthesis. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2013;41(2):73–85.
102. Martin M, Sauer T, Alarcon JA, Vinales J, Walter EC, Ton TG, et al. Prevalence and impact of asthma among school-aged students in Lima, Peru. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2017 Nov 1;21(11).
103. Agache I, Akdis CA. Endotypes of allergic diseases and asthma: An important step in building blocks for the future of precision medicine. *Allergology International*. 2016 Jul 1;65(3):243–52.

104. Kuruvilla ME, Lee FEH, Lee GB. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2019;56(2):219–33.
105. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman SP. *Inmunología celular y molecular*. 10ª edición. Elsevier España SLU, editor. 2022.
106. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*. 2018;14(s2):1–10.
107. Holgate ST, Wenzel S, Postma DS, Weiss ST, Renz H, Sly PD. Asthma. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1(1).
108. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018 Sep 1;233(9):6425–40.
109. Saradna A, Do DC, Kumar S, Fu QL, Gao P. Macrophage polarization and allergic asthma. Vol. 191, *Translational Research*. Mosby Inc.; 2018. p. 1–14.
110. Jiang Z, Zhu L. Update on the role of alternatively activated macrophages in asthma. *J Asthma Allergy*. 2016;9:101–7.
111. Caminati M, Pham D le, Bagnasco D, Canonica GW. Type 2 immunity in asthma. 2018;1–10.
112. Nagata M, Nakagome K, Soma T. Mechanisms of eosinophilic inflammation. *Asia Pac Allergy*. 2020;10(2).
113. Fehrenbach H, Wagner C, Wegmann M. Airway remodeling in asthma: what really matters. *Cell Tissue Res*. 2017;367(3):551–69.

114. Samitas K, Delimpoura V, Zervas E, Gaga M. Anti-IgE treatment, airway inflammation and remodelling in severe allergic asthma: Current knowledge and future perspectives. *European Respiratory Review*. 2015;24(138):594–601.
115. Frey A, Lunding LP, Ehlers JC, Weckmann M, Zissler UM, Wegmann M. More Than Just a Barrier: The Immune Functions of the Airway Epithelium in Asthma Pathogenesis. *Front Immunol*. 2020 Apr 28;11:761.
116. Kaur S, Singh V. Asthma and Medicines – Long-Term Side-Effects, Monitoring and Dose Titration. *Indian J Pediatr*. 2018 Sep 1;85(9):748–56.
117. Chester N, Mottram DR. Beta 2 Agonists. *Drugs in Sport, Seventh Edition*. 2021 May 28;173–87.
118. Sears MR. Adverse effects of beta-agonists. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110(6 Suppl):S322–8.
119. Gosens R, Gross N. The mode of action of anticholinergics in asthma. *European Respiratory Journal*. 2018;52(4).
120. Buhl R, Hamelmann E. Future perspectives of anticholinergics for the treatment of asthma in adults and children. *Ther Clin Risk Manag*. 2019;15:473–85.
121. Allen DB. Inhaled Corticosteroids and Endocrine Effects in Childhood. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2020;49(4):651–65.
122. Heffler E, Nascimento Girardi Madeira L, Ferrando M, Puggioni F, Racca F, Malvezzi L, et al. Clinical Commentary Review Inhaled Corticosteroids Safety and Adverse Effects in Patients with Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2018;6:776–81.
123. Lommatzsch M, Buhl R, Korn S. The Treatment of Mild and Moderate Asthma in Adults. *Dtsch Arztebl Int*. 2020 Jun 19;117(25):434.

124. Sharma S, Hashmi MF, Chakraborty RK. Asthma Medications. StatPearls. 2022;
125. Gong LL, Du L Da, Du GH. Theophylline. In: Natural Small Molecule Drugs from Plants. Springer Singapore; 2018. p. 469–78.
126. Rusconi M, Conti A. Theobroma cacao L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. Vol. 61, Pharmacological Research. 2010. p. 5–13.
127. 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. Vol. 167, Toxicology. 2001.
128. Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma. Vol. 37, Clinical and Experimental Allergy. 2007. p. 973–88.
129. Untersmayr E, Jensen-Jarolim E. Mechanisms of type I food allergy. Vol. 112, Pharmacology and Therapeutics. 2006. p. 787–98.
130. Pilegaard K, Madsen C. An oral Brown Norway rat model for food allergy: Comparison of age, sex, dosing volume, and allergen preparation. Toxicology. 2004 Mar 15;196(3):247–57.
131. Wu YQ, Zhou CH, Tao J, Li SN. Antagonistic effects of nobiletin, a polymethoxyflavonoid, on eosinophilic airway inflammation of asthmatic rats and relevant mechanisms. Life Sci. 2006 May 1;78(23):2689–96.
132. Branchett WJ, Walker SA, Lloyd CM. Experimental mouse models of asthma and analysis of CD4 T cells. Methods in Molecular Biology. 2021;2285:329–48.
133. Rosa MPG, Jose MMF. Petiveria alliacea Suppresses Airway Inflammation and Allergen-Specific Th2 Responses in Ovalbumin-Sensitized Murine Model of Asthma. Chin J Integr Med. 2018 Dec 1;24(12):912–9.

134. Lu X, Xu C, Yang R, Zhang G. Ganoderic Acid A Alleviates OVA-Induced Asthma in Mice. Inflammation. 2021 Oct 1;44(5):1908–15.
135. Azman S, Sekar M, Wahidin S, Gan SH, Vaijanathappa J, Bonam SR, et al. Embelin Alleviates Severe Airway Inflammation in OVA-LPS-Induced Rat Model of Allergic Asthma. *J Asthma Allergy*. 2021;14:1511–25.
136. Upur H, Abdureyim S, Amat N, Umar A, Berke B, Moore N. Anti-inflammatory, immunomodulatory, and heme oxygenase-1 inhibitory activities of Ravan Napas, a formulation of Uighur traditional medicine, in a rat model of allergic asthma. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2011;2011.
137. Bai D, Sun T, Lu F, Shen Y, Zhang Y, Zhang B, et al. Eupatilin Suppresses OVA-Induced Asthma by Inhibiting NF- κ B and MAPK and Activating Nrf2 Signaling Pathways in Mice. *Int J Mol Sci*. 2022 Feb 1;23(3).
138. Zhang HY, Xie QM, Zhao CC, Sha JF, Ruan Y, Wu HM. CPG oligodeoxynucleotides attenuate ova-induced allergic airway inflammation via suppressing jnk-mediated endoplasmic reticulum stress. *J Asthma Allergy*. 2021;14:1399–410.
139. Wang J, Gao S, Zhang J, Li C, Li H, Lin J. Interleukin-22 attenuates allergic airway inflammation in ovalbumin-induced asthma mouse model. *BMC Pulm Med*. 2021 Dec 1;21(1).
140. Abril-Gil M, Garcia-Just A, Pérez-Cano FJ, Franch Á, Castell M. Development and characterization of an effective food allergy model in Brown Norway rats. *PLoS One*. 2015 Apr 29;10(4).
141. Mu HH, Sewell WA. Regulation of DTH and IgE responses by IL-4 and IFN- γ in immunized mice given pertussis toxin. Vol. 83, *Immunology*. 1994.
142. Ryan M, Mccarthy L, Rappuoli R, Mahon BP, Mills KHG. Pertussis toxin potentiates T h 1 and T h 2 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. Vol. 10, *International Immunology*. 1998.
143. Dong W, Selgrade MJ, Gilmour MI. Systemic administration of *Bordetella pertussis* enhances pulmonary sensitization to house dust mite in juvenile rats. *Toxicological Sciences*. 2003 Mar 1;72(1):113–21.
144. Eisenbarth SC. Use and limitations of alum-based models of allergy. *Clinical & Experimental Allergy*. 2008 Oct 1;38(10):1572–5.
145. Gupta RK. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. Vol. 32, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1998.
146. Hanna, D.A.; Khalaf, M.M.; Abo-Saif, A.A. Polydatin protects against ovalbumin-induced bronchial asthma in rats; involvement of urocortin and surfactant-D expression. *Immunopharmacol. Immunotoxicol*. 2019, 41, 403–412.
147. Chattopadhyay P, Pathak MP, Patowary P, Chakrabarti S, Goyary D, Karmakar S, et al. Synthesized atropine nanoparticles ameliorate airway hyperreactivity and remodeling in a murine model of chronic asthma. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2020 Apr 1;56.
148. Thakur VR, Khuman V, Beladiya J v., Chaudagar KK, Mehta AA. An experimental model of asthma in rats using ovalbumin and lipopolysaccharide allergens. *Heliyon*. 2019 Nov 1;5(11).
149. 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. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2000;106(1 1):150–8.
150. Vinje NE, Larsen S, Løvik M. A mouse model of lupin allergy. *Clinical and Experimental Allergy*. 2009 Aug;39(8):1255–66.

151. 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 Feb 1;105(3):835–40.
152. 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. *Behavioural Brain Research.* 2013 Sep 1;252:347–55.
153. Abril-Gil M, Garcia-Just A, Cambras T, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Franch À, et al. Motor activity as an unbiased variable to assess anaphylaxis in allergic rats. *Exp Biol Med.* 2015 Oct 1;240(10):1373–7.
154. Cambras T, Romero O, Díez-Noguera A, Lecube A, Sampol G. Circadian patterns of patients with type 2 diabetes and obstructive sleep apnea. *J Clin Med.* 2021 Jan 2;10(2):1–11.
155. Zerón-Rugerio, M.F., Díez-Noguera, A., Izquierdo-Pulido, M., Cambras, T. Adiposity and body mass index of young women are associated with altered 24-hour profile of wrist temperature and sleep quality (2020) *Chronobiology International*, 37 (11), pp. 1580-1590.
156. Barnadas Solé, C., Zerón Rugerio, M.F., Foncillas Corvinos, J., Díez-Noguera, A., Cambras, T., Izquierdo-Pulido, M. Sleeve gastrectomy in patients with severe obesity restores circadian rhythms and their relationship with sleep pattern (2021) *Chronobiology International*, 38 (4), pp. 565-575.
157. Nguyen SMT, Rupprecht CP, Haque A, Pattanaik D, Yusin J, Krishnaswamy G. Mechanisms Governing Anaphylaxis: Inflammatory Cells, Mediators, Endothelial Gap Junctions and Beyond. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 1;22(15).
158. Yatera K, Mukae H. Possible pathogenic roles of nitric oxide in asthma. *Respir Investig.* 2019 Jul 1;57(4):295–7.

159. Fu Z, Thorpe M, Hellman L. rMCP-2, the major rat mucosal mast cell protease, an analysis of its extended cleavage specificity and its potential role in regulating intestinal permeability by the cleavage of cell adhesion and junction proteins. *PLoS One*. 2015 Jun 26;10(6).
160. 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 Jan;10(1):67–74.
161. Lindholm Bøgh K, Barkholt V, Bernhard Madsen C. The sensitising capacity of intact β -lactoglobulin is reduced by Co-administration with digested β -lactoglobulin. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;161(1):21–36.
162. Thompson-Souza GA, Gropillo I, Neves JS. Cysteinyl leukotrienes in eosinophil biology: Functional roles and therapeutic perspectives in eosinophilic disorders. *Front Med (Lausanne)*. 2017;4(JUL):106.
163. Miyata J, Fukunaga K, Kawashima Y, Ohara O, Arita M. Cysteinyl leukotriene metabolism of human eosinophils in allergic disease. *Allergology International*. 2020 Jan 1;69(1):28–34.
164. Saikumar Jayalatha AK, Hesse L, Ketelaar ME, Koppelman GH, Nawijn MC. The central role of IL-33/IL-1RL1 pathway in asthma: From pathogenesis to intervention. *Pharmacol Ther*. 2021 Sep 1;225:107847.
165. Xu H, Shu H, Zhu J, Song J. Inhibition of TLR4 inhibits allergic responses in murine allergic rhinitis by regulating the NF- κ B pathway. *Exp Ther Med [Internet]*. 2019 May 29 [cited 2022 Jul 10];18(1):761.
166. Nakae S, Komiyama Y, Yokoyama H, Nambu A, Umeda M, Iwase M, et al. IL-1 is required for allergen-specific Th2 cell activation and the development of airway hypersensitivity response. *Int Immunol*. 2003 Apr 1;15(4):483–90.

-
167. Willart MAM, Deswarte K, Pouliot P, Braun H, Beyaert R, Lambrecht BN, et al. Interleukin-1 α controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33. *J Exp Med*. 2012 Jul 7;209(8):1505.
 168. Lambrecht BN, Hammad H. Allergens and the airway epithelium response: Gateway to allergic sensitization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2014;134(3):499–507.
 169. Draijer C, Peters-Golden M. Alveolar Macrophages in Allergic Asthma: the Forgotten Cell Awakes. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2017;17(2).
 170. Chung F. Anti-inflammatory cytokines in asthma and allergy: Interleukin-10, interleukin-12, interferon- γ . *Mediators Inflamm*. 2001;10(2):51–9.
 171. Tournoy KG, Kips JC, Pauwels RA. Endogenous interleukin-10 suppresses allergen-induced airway inflammation and nonspecific airway responsiveness. *Clin Exp Allergy*. 2000;30(6):775–83.
 172. Urry Z, Xystrakis E, Hawrylowicz CM. Interleukin-10-Secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Current Allergy and Asthma Reports* 2006 6:5. 2006 Sep;6(5):363–71.
 173. Ogawa Y, Duru EA, Ameredes BT. Role of IL-10 in the Resolution of Airway Inflammation. *Curr Mol Med*. 2008 Aug 3;8(5):437.
 174. Yang X, Wang S, Fan Y, Han X. IL-10 deficiency prevents IL-5 overproduction and eosinophilic inflammation in a murine model of asthma-like reaction.
 175. Coomes SM, Kannan Y, Pelly VS, Entwistle LJ, Guidi R, Perez-Lloret J, et al. CD4⁺ Th2 cells are directly regulated by IL-10 during allergic airway inflammation. *Mucosal Immunology* 2017 10:1. 2016 May 11;10(1):150–61.
 176. GUZMÁN BAUTISTA JH. Producción de cacao “Theobroma cacao L.” fino o de aroma peruano: Agronegocio sostenible. *Alpha Centauri*. 2020 Sep 18;1(1):49–55.

177. Characterization of native cocoa populations and their importance as quality seeds for Family Farming Systems in Peru. Pastor-Soplín, Santiago; Mendoza, Luis; Pérez-Cano, Francisco; Castell, Margarida; Best, Ivan 4th World Congress on Agroforestry, Montpellier, France, 2019.
178. Dugo L, Belluomo MG, Fanali C, Russo M, Cacciola F, MacCarrone M, et al. Effect of Cocoa Polyphenolic Extract on Macrophage Polarization from Proinflammatory M1 to Anti-Inflammatory M2 State. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017.
179. Massot-Cladera M, Pérez-Berezo T, Franch A, Castell M, Pérez-Cano FJ. Cocoa modulatory effect on rat faecal microbiota and colonic crosstalk. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2012. p. 105–12.
180. 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(8):3272–86.
181. Massot-Cladera M, Costabile A, Childs CE, Yaqoob P, Franch À, Castell M, et al. Prebiotic effects of cocoa fibre on rats. *J Funct Foods*. 2015 Dec 1;19:341–52.
182. Massot-Cladera M, Franch À, Pérez-Cano FJ, Castell M. Cocoa and cocoa fibre differentially modulate IgA and IgM production at mucosal sites. *British Journal of Nutrition*. 2016 May 14;115(9):1539–46.
183. Massot-Cladera M, Mayneris-Perxachs J, Costabile A, Swann JR, Franch À, Pérez-Cano FJ, et al. Association between urinary metabolic profile and the intestinal effects of cocoa in rats. *British Journal of Nutrition*. 2017 Mar 14;117(5):623–34.
184. Camps-Bossacoma M, Pérez-Cano FJ, Franch À, Castell M. Gut Microbiota in a Rat Oral Sensitization Model: Effect of a Cocoa-Enriched Diet. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017.

185. Ramsay AJ, Husband AJ, Ramshaw IA, Bao S, Matthaei KI, Koehler G, et al. The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. *Science*. 1994 Apr 22;264(5158):561–3.
186. Le NPK, do Nascimento AF, Schneberger D, Quach CC, Zhang X, Aulakh GK, et al. Deficiency of leukocyte-specific protein 1 (LSP1) alleviates asthmatic inflammation in a mouse model. *Respir Res*. 2022;23(1):1–16.
187. Seo GY, Jang YS, Kim J, Choe J, Han HJ, Lee JM, et al. Retinoic acid acts as a selective human IgA switch factor. *Hum Immunol*. 2014;75(8):923–9.
188. Fujiki T, Shinozaki R, Udono M, Katakura Y. Identification and Functional Evaluation of Polyphenols That Induce Regulatory T Cells. *Nutrients*. 2022 Jul 13;14(14):2862.
189. Murugan SK, Bethapudi B, Raghunandhakumar S, Purusothaman D, Nithyanantham M, Mundkinajeddu D, et al. A flavonoid rich standardized extract of *Glycyrrhiza glabra* protects intestinal epithelial barrier function and regulates the tight-junction proteins expression. *BMC Complement Med Ther*. 2022 Dec 1;22(1).
190. Liu X, Wang L, Zhuang H, Yang Z, Jiang G, Liu Z. Promoting intestinal IgA production in mice by oral administration with anthocyanins. *Front Immunol*. 2022 Jul 27;13.
191. 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 Aug;46(5):257–63.
192. Kogiso M, Sakai T, Mitsuya K, Komatsu T, Yamamoto S. Genistein suppresses antigen-specific immune responses through competition with 17 β -estradiol for estrogen receptors in ovalbumin-immunized BALB/c mice. *Nutrition*. 2006 Jul;22(7–8):802–9.
193. Mao TK, Powell J, van de Water J, Keen CL, Schmitz HH, Hammerstone JF, et al. The effect of cocoa procyanidins on the transcription and secretion of interleukin 1p in peripheral blood mononuclear cells. Vol. 66, *Life Sciences*.

