



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE CIENCIAS**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAGÍSTER EN BIOLOGÍA POR PEDECIBA BIOLOGÍA

ORIENTACIÓN: BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

# ESTUDIO DE LOS COMPONENTES Y PROPIEDADES INMUNOLÓGICAS DE LA LECHE DE MADRES CELÍACAS

LIC. EMILIA VILLAMIL PEDETTI

TUTORA: DRA. ANA HERNÁNDEZ

MONTEVIDEO, URUGUAY

JUNIO, 2019

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Resumen .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. El sistema inmune en la mucosa intestinal .....</b>	<b>7</b>
1.1.1. La barrera intestinal.....	7
1.1.2. Mecanismos de tolerancia oral .....	13
1.1.3. Particularidades inmunológicas del intestino neonatal .....	16
1.2.3. El Circuito bronco-entero-mamario.....	22
1.2.4. La Lactancia y protección contra enfermedades con componente inmunológico .....	25
<b>1.3. La enfermedad celíaca .....</b>	<b>25</b>
1.3.1. Generalidades.....	25
1.3.2. La gliadina y la barrera intestinal .....	28
<b>2. Hipótesis y objetivos .....</b>	<b>35</b>
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1 Muestras de estudio .....</b>	<b>38</b>
3.1.1. Recolección de muestras.....	38
3.1.2. Procesamiento y conservación de las muestras .....	39
<b>3.2. Análisis de macronutrientes: grasa, lactosa y proteínas .....</b>	<b>40</b>
<b>3.3. Determinación de componentes con actividad inmunológica.....</b>	<b>41</b>
3.3.1 Determinación de la actividad lisozima.....	41
3.3.2. Análisis de anticuerpos totales presentes en la leche .....	41
3.3.3. ELISA para valorar anticuerpos específicos.....	43
<b>3.4. Determinación de gliadina soluble en leche.....</b>	<b>46</b>
3.4.1. Determinación de GLD o pGLD por ELISA competitivo diseñado en el laboratorio ....	46
3.4.2. Determinación de GLD por método comercial .....	51
3.5.1. Determinación de complejos inmunes específicos contra gliadina de isotipo IgA .....	51
3.5.2. Determinación de citoquinas, quimioquinas, receptores solubles y otros factores .....	52
<b>3.6. Ensayos con modelos celulares in vitro para evaluar efectos biológicos de la FA de la leche .....</b>	<b>53</b>
3.6.1. Metodología general de los ensayos in vitro para HT-29 y HT-29-GFP .....	55
3.6.2. Evaluación de la expresión de HLA-DR inducida por IFN- $\gamma$ y pGLD .....	56
3.6.3. Producción de IL-8 y TNF- $\alpha$ por células HT-29.....	57
3.6.4. Activación de la vía inflamatoria NF- $\kappa$ B en las células HT-29-GFP.....	57
<b>3.7. Tratamiento estadístico .....</b>	<b>58</b>
Análisis univariable.....	58
Análisis con variables múltiples.....	58
<b>4. Resultados .....</b>	<b>60</b>
<b>4.1 Características del grupo de estudio .....</b>	<b>60</b>

<b>4.2. Caracterización de macronutrientes en leche materna.....</b>	<b>62</b>
<b>4.3. Análisis de componentes inmunológicos.....</b>	<b>65</b>
4.3.1 Anticuerpos totales .....	65
4.3.2. Anticuerpos específicos .....	66
4.3.3. Actividad lisozima.....	72
4.3.4. Anticuerpos específicos de la Enfermedad celíaca.....	72
<b>4.4 Determinación de gliadina soluble y formando complejos inmunes .....</b>	<b>74</b>
4.4.1. Detección de GLD soluble en leche.....	74
<b>4.5 Componentes reguladores de la respuesta inmune y de la función barrera epitelial.</b>	<b>79</b>
<b>4.6 Estudios con modelos celulares <i>in vitro</i> para evaluar efectos biológicos de la FA de la leche .....</b>	<b>90</b>
<b>4.6.1. Ensayos con la línea celular HT-29-GFP: efectos sobre la vía NF-<math>\kappa</math>B .....</b>	<b>90</b>
Estandarización de las condiciones experimentales.....	90
<b>4.6.2. Estudio de efectos moduladores de la FA de la leche sobre los efectos inducidos por TNF-<math>\alpha</math>.....</b>	<b>95</b>
4.6.3 Efectos de la leche sobre la estimulación con péptidos de gliadina. ....	97
4.6.4. Efectos de la leche sobre la coestimulación con péptidos de gliadina y citoquinas inflamatorias .....	99
<b>4.7. Ensayos con la línea celular HT-29 .....</b>	<b>102</b>
4.7.1. Efectos de la FA de la leche sobre la expresión de HLA-DR .....	102
<b>5. Discusión .....</b>	<b>104</b>
<b>5.1. Aspectos generales sobre el grupo de estudio .....</b>	<b>104</b>
<b>5.2. Composición.....</b>	<b>104</b>
5.2.1. Macronutrientes .....	104
5.2.2. Anticuerpos totales .....	107
5.2.3. Anticuerpos específicos .....	110
5.2.4. Anticuerpos específicos de la EC .....	113
5.2.5 Gliadina y complejos inmunes de gliadina .....	114
<b>5.3. Componentes inmunoreguladores y de acción sobre la función barrera epitelial...</b>	<b>118</b>
<b>5.4. En relación a la funcionalidad de la glándula mamaria .....</b>	<b>118</b>
<b>5.5. En relación a la barrera epitelial y la función inmunológica del intestino del lactante .....</b>	<b>121</b>
<b>5.6. En relación a factores con efectos moduladores de la inflamación intestinal .....</b>	<b>123</b>
5.6.1. Protección frente a la inflamación causada por bacterias .....	123
<b>5.7. Los efectos de la leche en los estímulos inflamatorios sobre el epitelio intestinal ..</b>	<b>124</b>
<b>5.8 Limitaciones del estudio.....</b>	<b>125</b>
<b>6. Conclusiones y perspectivas .....</b>	<b>128</b>
<b>6.1 Conclusiones.....</b>	<b>128</b>
<b>6.2. Impacto del estudio .....</b>	<b>129</b>
<b>6.3 Perspectivas.....</b>	<b>129</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>131</b>
<b>8. Agradecimientos .....</b>	<b>145</b>

## *ABREVIATURAS*

BLH – Banco de Leche Humana

DLG – Dieta libre de gluten

EC – Enfermedad celíaca

FA - Fase acuosa

GALT - Tejido linfoide asociado al intestino

GLD - Gliadina

GM – Glándula mamaria

IP - Ioduro de propidio

LP – Lámina propia

MC – Madres celíacas

MS – Madres sanas

pdGLD - Péptidos deamidados de gliadina

pGLD - Péptidos de gliadina obtenidos por digestión con pepsina-tripsina

ppsGLD - Pool de peptidos sintéticos de gliadina

PS - Proteínas de soja

psGLD - Péptido sintético de gliadina (P9, P2 y P31-43)

TT - Toxoide tetánico

tTG, TG2 – Transglutaminasa tisular

## Resumen

La leche materna es el único alimento que cumple todos los requerimientos nutricionales para el recién nacido y que aseguran su desarrollo y crecimiento. Sus beneficios trascienden lo nutricional conteniendo componentes bioactivos que participan en procesos fisiológicos vitales como la protección contra infecciones, mantenimiento de la homeostasis intestinal y generación de la tolerancia oral. Con respecto a esta última, los componentes presentes en la leche asociados son los antígenos provenientes de la dieta materna, así como citoquinas inmunosupresoras y anticuerpos específicos que median la internalización de los antígenos.

En la enfermedad celíaca (EC) hay una ruptura de la tolerancia a ciertas proteínas del gluten, así como una sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias y en receptores de transporte de proteínas. Estas modificaciones podrían tener un impacto en ciertos componentes de la leche de madres con esta enfermedad..

En este trabajo se estudiaron algunos componentes nutricionales e inmunológicos de la leche de madres sanas y de madres con enfermedad celíaca que se encontraban en el primer año de lactancia. En cuanto a las madres celíacas se solicitó que estuviesen en dieta libre de gluten y que hayan sido diagnosticadas en un período previo a dos años de la donación. En el análisis, se consideró la variabilidad entre muestras y el tiempo post-parto en el cual se realizó la donación.

La composición de macrocomponentes de la leche de madres sanas y de madres celíacas no mostró diferencias significativas, considerando contenido calórico, grasa, lactosa, sales y proteínas. Con respecto a los componentes inmunológicos de la leche, la concentración de IgA e IgM secretorios fue menor en leche de madres celíacas, acentuándose esta diferencia en la lactancia posterior a los 6 meses. En cuanto a la IgG no se observaron modificaciones. Al considerar la contribución relativa de anticuerpos específicos se observó una mayor proporción de anticuerpos anti gliadina y una menor proporción de anticuerpos anti toxoide tetánico en madres celíacas. La IgG sigue la misma tendencia que los otros dos isotipos. Al evaluar el potencial microbicida de la lisozima, no se observaron diferencias en cuanto a su actividad entre el grupo de leches de madres sanas y el de madres celíacas. Las citoquinas y receptores solubles estudiados presentaron un balance proinflamatorio en la leche de madres celíacas.

Los ensayos in vitro mostraron que la leche de MC no modula la inflamación inducida por TNF- $\alpha$ , aunque potencia la activación inducida por psGLD y TNF- $\alpha$ . Además, potencia el efecto del IFN- $\gamma$  de expresar HLA-DR, y modula el efecto débil de los psGLD de inducir HLA-DR.

Las diferencias observadas en el aporte de componentes inmunológicos potencialmente implicados en el desarrollo de tolerancia oral podrían ser significativos en la programación inmunológica del neonato, por lo cual este estudio aporta a la interpretación de los estudios prospectivos que se encuentran en marcha y a posibles estrategias de intervención posteriores.

# 1. Introducción

## 1.1. El sistema inmune en la mucosa intestinal

### 1.1.1. La barrera intestinal

La mucosa intestinal representa la mayor superficie de interacción que posee el cuerpo humano con el mundo exterior, abarcando aproximadamente  $400 \text{ m}^2$ <sup>1,2</sup>. La interacción de esta mucosa con el ambiente implica el contacto masivo y crónico con un sinnúmero de moléculas potencialmente antigénicas. Por este motivo el intestino cuenta con mecanismos altamente regulados que permitan diferenciar eficientemente los patógenos de los componentes propios o inocuos. Estos mecanismos implican particularidades tanto anatómicas como fisiológicas del compartimento que contribuyen a una respuesta efectora adecuada y, por lo tanto, a la homeostasis intestinal<sup>3</sup>.

En la mucosa intestinal se pueden distinguir 3 estructuras principales: el epitelio intestinal, componentes del lumen (moléculas, microbiota comensal y mucus) y tejido linfoide asociado (del inglés GALT, Gut Associated Lymphoid Tissue). Además, debajo del epitelio se encuentra la lámina propia colonizada por diversos tipos celulares del sistema inmune como macrófagos, células dendríticas, plasmocitos y mastocitos. El epitelio tiene una estructura y componentes que representan la barrera epitelial, mientras que este, en conjunto con componentes del lumen y de la lámina propia, constituyen la barrera mucosa. Una vez que un antígeno ingresa al lumen intestinal, antes de ser procesado por el sistema inmune, debe atravesar las barreras mencionadas previamente.

El epitelio que limita con el medio externo está formado por una monocapa de enterocitos, células que tienen la particularidad de contar con microvellosidades en el extremo apical que aumentan enormemente la superficie de exposición al exterior. La función de protección al individuo del epitelio resulta en una alta tasa de recambio de los enterocitos, lo cual es posible, en parte, por la presencia de células madre presentes en las criptas intestinales: el sector más profundo de las vellosidades. Estas células formarán mayoritariamente, las células epiteliales, células productoras de péptidos antimicrobianos (células de Paneth) y células productoras de mucus (células de Goblet)<sup>4</sup>.

Los enterocitos proveen de una barrera con permeabilidad selectiva que evita el ingreso indiscriminado de moléculas grandes y microorganismos. Estas propiedades se basan en un complejo sistema de uniones entre los enterocitos que comprende las uniones estrechas, las uniones adherentes y desmosomas. Las uniones estrechas son las más importantes para mantener la integridad del epitelio y están integradas por proteínas de la familia de las claudinas y ocludinas (figura 1).

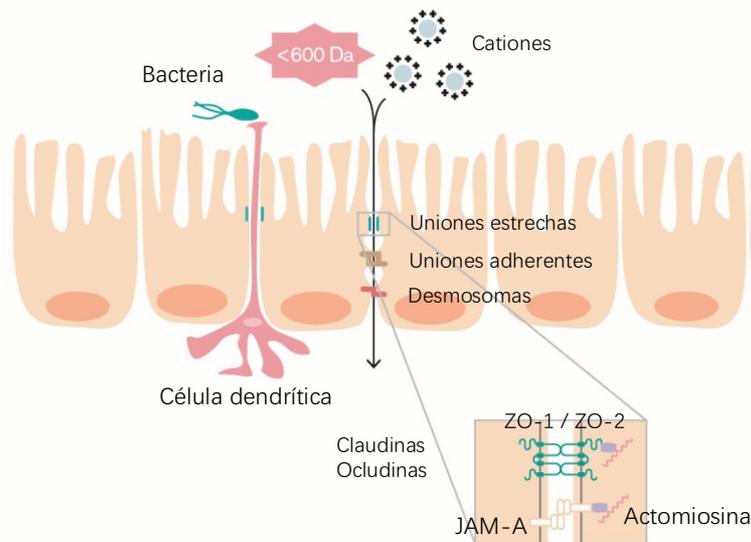


Figura 1. Transporte de antígenos paracelular. Este tipo de transporte depende directamente de las uniones celulares como las estrechas, adherentes y desmosomas. Las uniones estrechas limitan el pasaje de moléculas al estar constituidas por un complejo de proteínas transmembrana tales como la claudina, ocludina o JAM-A que forman un poro. Estas proteínas se conectan a la actomiosina del citoesqueleto celular mediante proteínas ZO-1 o ZO-2. En condiciones normales, las uniones estrechas permiten el pasaje de iones (mayoritariamente cationes) y moléculas de menos de 600 daltons.

Algunas citoquinas y factores de crecimiento como EGF, TGF- $\beta$  e IL-10 contribuyen con la barrera epitelial, al disminuir la permeabilidad intestinal actuando sobre las uniones estrechas. En contraste, estas uniones se ven afectadas por respuestas inmunes inflamatorias que aumentan la permeabilidad, en particular TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ <sup>1</sup>. De hecho, se ha observado que al tratar pacientes con enfermedad de Crohn utilizando anticuerpos neutralizantes para TNF- $\alpha$  se reduce la inflamación y la reconstitución de la barrera epitelial se ve favorecida<sup>5</sup>.

En humanos, las alteraciones de la función barrera del epitelio intestinal se asocian a varias enfermedades, o al riesgo de padecer las mismas, tales como la enfermedad celíaca (EC) y la diabetes tipo 1. En estas condiciones se ha encontrado que la disfunción de las uniones estrechas se correlaciona con niveles elevados de zonulina<sup>6,7</sup> (pre-haptoglobina-2), un regulador natural de la permeabilidad que actúa sobre el ensamblaje de las uniones estrechas<sup>8</sup>. En este sentido la administración de antagonistas de este péptido se plantea como una estrategia terapéutica para el tratamiento de la EC, y se ha constatado que la administración de un péptido sintético inhibidor de la zonulina disminuyó la permeabilidad paracelular, e inhibió la producción de citoquinas proinflamatorias y síntomas gastrointestinales en pacientes celíacos<sup>9</sup>.

Los componentes extracelulares presentes en el lumen intestinal también contribuyen a la función barrera al interactuar con los agentes externos antes de que tomen contacto con el epitelio. Los principales componentes son: el mucus, la microbiota intestinal, la inmunoglobulina A secretoria (sIgA) y péptidos antimicrobianos (figura 2).

El mucus

El mucus es una secreción constituida por proteínas altamente glicosiladas, que toman el nombre de mucinas, secretadas por células epiteliales especializadas denominadas células de Goblet. Su función primaria es interferir en el contacto directo de material particulado con el epitelio intestinal.

La principal mucina secretada en el intestino es MUC2, la cual integra una capa interna de mucus que representa una barrera para las bacterias; esta capa se va transformando en una capa externa menos organizada y permeable, lo cual permite que las bacterias comensales puedan degradarla y unirse a MUC2 usando sus abundantes glicanos como fuente de energía<sup>10</sup>. Debido a esto, genera un hábitat adecuado para la microbiota, colaborando en la relación simbiótica entre las bacterias y el hospedero.

Debido a sus propiedades biofísicas, el mucus puede retener moléculas que son secretadas desde el epitelio intestinal y cumple diversas funciones que colaboran en la homeostasis. El mucus interacciona con colectinas, péptidos antimicrobianos, lisosima y regiones altamente glicosiladas de la IgA secretoria<sup>4,11</sup> cuyas propiedades antibacterianas son de gran importancia para la protección del tejido epitelial.

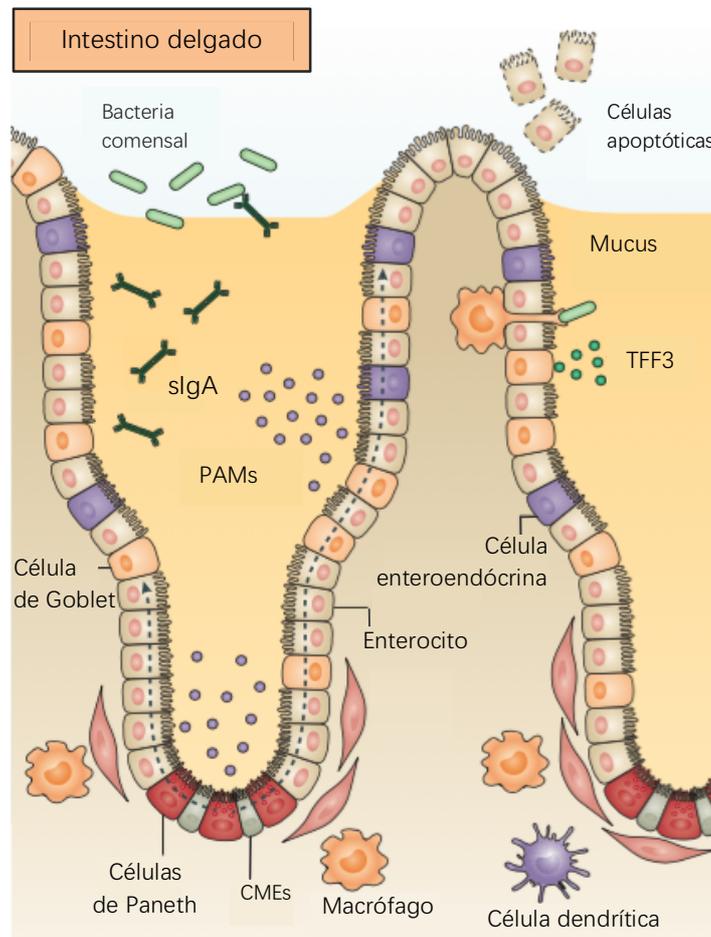


Figura 2. Barrera epitelial intestinal. Las células epiteliales intestinales forman una barrera física que protege la integridad intestinal. Células madres epiteliales (CMEs) presentes en las criptas de las vellosidades se diferencian en las distintas células que forman el epitelio intestinal. La presencia de componentes como el mucus, slgA, péptidos antimicrobianos (PAMs), bacterias comensales y otros factores en el lumen contribuyen con el mantenimiento del epitelio intestinal favoreciendo la homeostasis local. Células del sistema inmune presentes en la lámina propia del intestino median la captación de antígenos luminales a través del epitelio y su posterior transporte a los tejidos linfoides asociados. Adaptado de [ 4 ]

Algunas mucinas que integran el mucus no son secretadas (MUC3, MUC12 y MUC17), sino que forman parte del glicocálix y se asocian a otras funciones vinculadas a la presentación de antígenos bacterianos por parte de los enterocitos<sup>12</sup>.

Tanto el exceso como la escasez de mucus tienen efectos patológicos que se asocian a enfermedades tales como la fibrosis quística o colitis ulcerosa respectivamente<sup>11,13</sup>. En el caso de la EC la hidrofobicidad característica del mucus puede verse afectada, lo cual provoca una capacidad disminuida de repeler antígenos lumenales<sup>14</sup>.

#### La microbiota

En estrecha relación con el mucus, se encuentran trillones de bacterias colonizando el tracto intestinal. Las más de 1000 especies de bacterias comensales contribuyen a la homeostasis de las mucosas de diversas formas y proveen de innumerables beneficios a los individuos<sup>15</sup>. La microbiota comensal es una potencial amenaza para el organismo cuando la integridad del intestino está dañada y bacterias aparentemente inofensivas pueden generar una infección grave. Esto implica dos factores importantes: el primero es que la microbiota debe mantener una composición y cantidad relativamente estable para que no se desencadene una respuesta inflamatoria y la segunda es que el sistema inmune debe balancear su respuesta a las bacterias comensales, tomando en cuenta el riesgo que puede significar daño del tejido en una respuesta de tipo inflamatoria.

El éxito del mutualismo entre la microbiota intestinal y el hospedero depende no solo de mecanismos físicos de barrera, sino también de un muestreo activo y la respuesta tolerogénica del sistema inmune hacia las mismas. Para esto es indispensable una interacción directa entre la microbiota y el sistema inmunológico<sup>16</sup>.

La colonización por las bacterias comensales se inicia principalmente durante el parto vaginal; la composición de la microbiota desarrollada en el niño dependerá de diversos factores como la edad gestacional, la alimentación neonatal y principalmente, la microbiota materna<sup>17</sup>. La lactancia es una fuente muy importante de bacterias, no solo por las que se encuentran en la leche, sino por el contacto piel con piel que implica el acto en sí. Las bacterias que primero colonizan el intestino son cepas de *Escherichia coli* y de *Enterococcus*. Si el neonato se alimenta con leche materna, en la

microbiota predominan las bifidobacterias, mientras que los alimentados con preparado comercial suelen colonizarse con *Bacteroides*<sup>18</sup>.

Los grandes cambios en la composición de la microbiota (disbiosis) durante la vida pueden conducir a respuestas inmunológicas que propicien el desarrollo de distintas enfermedades en individuos genéticamente susceptibles como la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn<sup>19</sup>, cáncer colorectal<sup>20</sup>, alergias alimentarias, así como enfermedades sistémicas metabólicas, obesidad<sup>21-23</sup>, patologías autoinmunes<sup>24</sup> y neurológicas<sup>18,25</sup>.

En particular, en los niños prematuros, la disbiosis se asocia a la enterocolitis necrotizante que tiene una tasa de mortalidad de hasta un 30%<sup>26</sup>. La lactancia disminuye en 6 veces la ocurrencia de esta enfermedad por lo cual el comienzo de la misma inmediatamente luego del parto está mundialmente recomendada<sup>27</sup>.

Los factores genéticos también pueden condicionar la composición de la microbiota; se han asociado disbiosis con presencia de ciertos alelos de MHC que modifican diferencialmente la activación de la respuesta inmune hacia la tolerancia o la eliminación de la microbiota<sup>16,28</sup>. Interesantemente, se encontró una relación entre el haplotipo 8.1 (o HLA-DR3) y el proceso de colonización intestinal en los primeros años de vida que es particularmente importante si la madre es quien posee el alelo, debido a que su propia microbiota se ve aumentada en bacterias asociadas al riesgo de padecer EC (*E. coli*, *E. rectale*, *C. coccooides* y *C. lituseburensis*)<sup>29</sup>.

## Inmunoglobulina A secretoria

La estrategia del organismo para generar protección inmune en una forma no inflamatoria en las principales vías de entrada de los patógenos es a través de la producción de grandes cantidades de IgA que se producen diariamente en respuesta a antígenos muestreados por células especializadas del GALT. Se produce en forma dimérica por las células plasmáticas de la lámina propia y son transportadas a través del epitelio mediante su unión al receptor de poli Inmunoglobulina (poli-IgR) resultando IgA secretoria (IgAs) unido a un componente secretor.

En el lumen gran parte de la sIgA interacciona con los patógenos, la microbiota y componentes solubles, donde la principal función es la exclusión inmune, evitando el ingreso de patógenos, bloqueando epítopes con efectos proinflamatorios y manteniendo la homeostasis de la microbiota<sup>30</sup>.

Interesantemente, estos anticuerpos en el lumen intestinal pueden unirse selectivamente a las células M adyacentes a las placas de Peyer, realizando un transporte transcelular de antígenos como inmunocomplejos en forma independiente de su especificidad. Este proceso representa una forma de muestreo que tiene relación con los mecanismos de generación de tolerancia oral.

Otra función de la IgA es su participación activa en la amplificación o inhibición de la producción de citoquinas locales modulando la producción de citoquinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por células de la lámina propia<sup>31</sup>. El mecanismo de inducción de estas respuestas involucra el receptor Fc $\alpha$ RI o CD89 y proteínas accesorias para la señalización en neutrófilos, monocitos, eosinófilos, macrófagos y algunas células dendríticas CD103<sup>+</sup><sup>32</sup>. El perfil de citoquinas a secretar será condicionado por los receptores que colaboren con Fc $\alpha$ RI, el tipo celular estimulado y la conformación y afinidad de la IgA que se una al receptor.

### 1.1.2. Mecanismos de tolerancia oral

La tolerancia oral implica una ausencia de respuesta de tipo inflamatoria que se da hacia un antígeno específico que ingresa por vía oral<sup>33</sup>. La falta de respuesta inflamatoria no representa un proceso pasivo, sino que por el contrario es el resultado de mecanismos complejos que involucran varios actores. La mucosa intestinal no funciona como una barrera absoluta, y en condiciones de salud hay un pasaje de pequeñas cantidades de moléculas que contienen antígenos dietarios así como de microorganismos<sup>34,35</sup>. El muestreo de estos antígenos representa el primer paso para la inducción de una respuesta inmune intestinal. Las células presentadoras de antígenos (CPA) que participan en el muestreo son macrófagos y células dendríticas que activarán linfocitos T vírgenes en el GALT. Además, los enterocitos pueden realizar un muestreo “no profesional” debido a la potencialidad de expresar moléculas de MHC-II y activar linfocitos T memoria presentes en la lámina propia<sup>36</sup>. Posteriormente se da el transporte del antígeno, y presentación de péptidos del mismo en los sitios inductores, donde se activarán los linfocitos vírgenes. El conjunto de sitios de inducción que integran el GALT son estructuras linfoides altamente especializadas distribuidas estratégicamente: las placas de Peyer (PP) ubicadas en el intestino delgado adyacentes a las células M, los folículos linfoides (FL) y los ganglios mesentéricos<sup>3</sup> (figura 3).

Los linfocitos T activados y diferenciados a efectores en la mucosa intestinal son reprogramados para migrar selectivamente a este sitio, debido a la expresión de la integrina  $\alpha 4\beta 7$ , cuyo ligando se expresa fuertemente en los vasos de las mucosas.

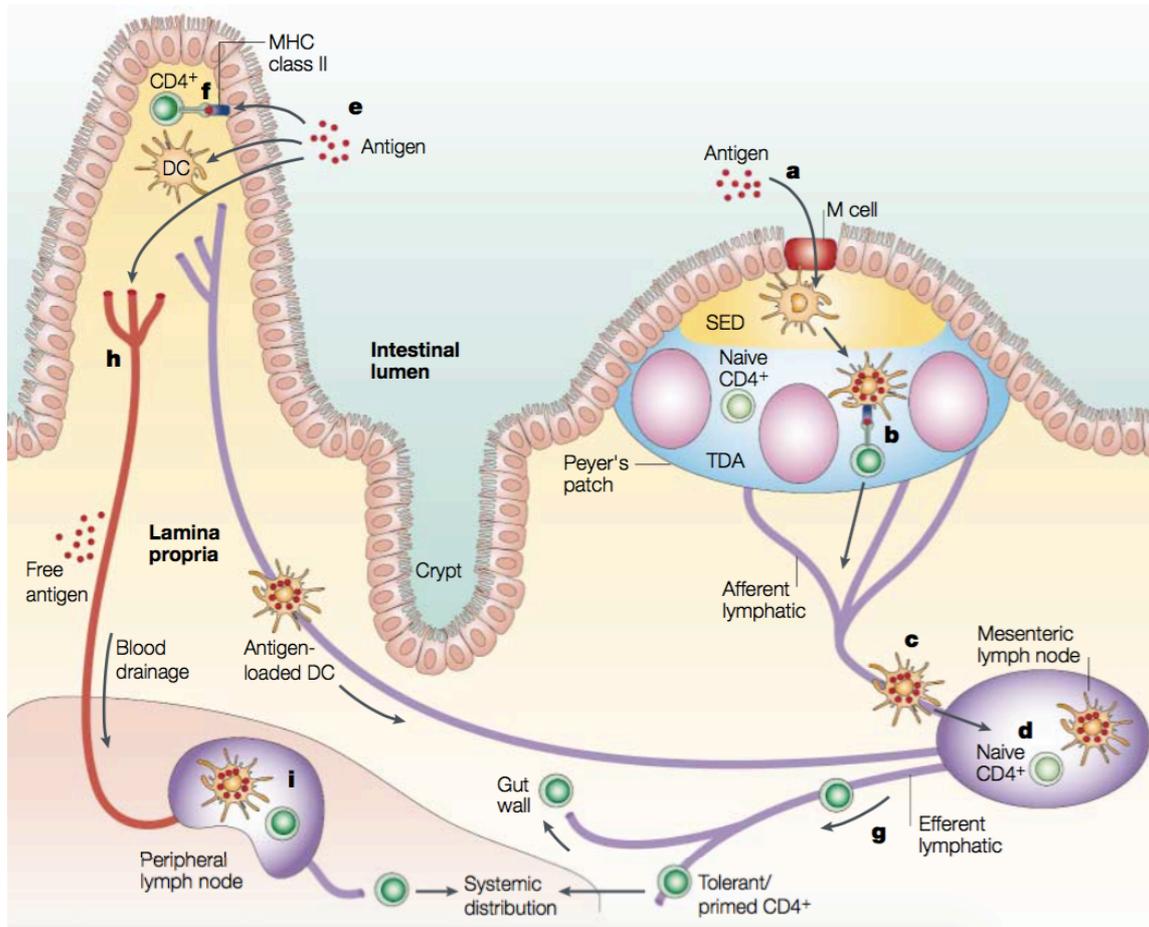


Figura 3. Muestreo de antígenos y reconocimiento por parte de linfocitos CD4+ en el intestino. Diferentes antígenos pueden ingresar a través de las células M del GALT (a) y tras ser transferidos a CD pueden ser presentados directamente a linfocitos T presentes en las Placas de Peyer (b). En forma alternativa, las CD pueden trasladarse hasta los ganglios mesentéricos (c) y presentar el antígeno a células T (d). En el caso de que el antígeno ingresara a la lámina propia a través del epitelio (e), los mismos enterocitos MHC II pueden officiar de células presentadoras de antígenos (f), además de las CD presentes que podrán migrar a los ganglios mesentéricos. Independientemente de la vía de entrada del antígeno, los linfocitos T CD4+ comienzan a expresar la integrina  $\alpha 4\beta 7$  y el receptor de quimioquina CCR9 por lo que regresarán a la lámina propia de la mucosa a través de los vasos sanguíneos o hacia el sistema inmune periférico. A su vez, los antígenos pueden ingresar directamente a los vasos sanguíneos (h) e interactuar con tejido linfóide periférico.

Tomado de [ 3 ]

El tipo de respuesta efectora generada, tanto por los linfocitos T como los B, dependerá en gran medida de los receptores expresados por las células presentadoras de antígenos<sup>37</sup>. Una respuesta de tipo tolerogénica hacia el antígeno requiere un microambiente específico; las células dendríticas en ausencia de estímulos inflamatorios, expresarán tanto marcadores como citoquinas características de un perfil regulador (TGF- $\beta$  o IL-10); como consecuencia, al activar a los linfocitos T vírgenes, provocarán su diferenciación a linfocitos T reguladores o Th3/Tr1<sup>38,39</sup>. Contrariamente, el muestreo de un antígeno bajo estímulos inflamatorios (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-8) tendrá como consecuencia la diferenciación de linfocitos vírgenes a perfiles Th1, Th2 o Th17.

En cuanto a la activación y diferenciación de los linfocitos B se favorece un cambio de clase predominante a IgA bajo la presencia de factores como TGF- $\beta$ , IL-10 y otras señales presentes en la célula presentadora de antígenos. Al igual que ocurre con los linfocitos T efectores, los plasmocitos productores de IgA son programados a colonizar la lámina propia intestinal. Durante el segundo tramo del embarazo y la lactancia, son movilizados por efecto de hormonas hacia la glándula mamaria, cuyos vasos comienzan a expresar ligandos para las moléculas de adhesión.

Los linfocitos encargados de generar la respuesta tolerogénica son los T reguladores (LTreg) que migran a la mucosa luego de ser inducidos. Las CD inductoras se caracterizan por la expresión de la molécula CD103, que junto con el TGF- $\beta$  y el ácido retinoico promueven la diferenciación a este tipo celular<sup>40</sup> (figura 4).

La ausencia de CD103- imposibilita la diferenciación a LTregs, independientemente de la concentración de TGF- $\beta$ <sup>41</sup>. Sin embargo, cuando se encuentra presente TGF- $\beta$  y ácido retinoico la molécula CD103 deja de ser imprescindible.

Por otro lado, los factores anteriormente mencionados (mucus y microbiota) tienen una implicancia directa en los mecanismos de tolerancia oral. Ratones knockout para Muc2 alimentados por sonda con solución de ovoalbúmina (OVA), no generaron tolerancia local ni sistémica al antígeno. Sin embargo, al realizar este mismo modelo, pero con OVA en presencia de MUC2, la tolerancia oral fue restablecida. MUC2 es muestreado por células dendríticas y sus glicanos asociados se ensamblan a receptores activadores de la  $\beta$ -catenina, factor de transcripción que interfiere con la expresión de citoquinas inflamatorias al inhibir la transcripción de NF- $\kappa$ B<sup>42</sup>.

El componente genético de cada individuo también tiene una influencia importante en la generación de una respuesta tolerogénica adecuada; en este sentido se ha reportado que en ratones con insuficiencia en la producción de IL-10 se genera respuestas inflamatorias hacia antígenos dietarios y la microbiota.

### 1.1.3. Particularidades inmunológicas del intestino neonatal

El intestino neonatal cuenta con diferencias morfológicas y funcionales con respecto al intestino del adulto. Las estructuras intestinales y el GALT se irán desarrollando a lo largo de su vida; sin embargo, hasta que el niño no posea un sistema inmune completamente maduro existe una carencia o menor producción de algunos mediadores como citoquinas y moléculas con actividad microbicida, así como la capacidad para hacer estallido respiratorio. La diversidad de la microbiota se ve disminuida 3 veces en comparación con el intestino adulto y hay una menor expresión de mucinas por lo cual su capa de mucus es más fina.

En cuanto a las células inmunes, los LTregs y los linfocitos B comienzan a poblar el intestino poco después del nacimiento, sin embargo, la expresión de moléculas solo permite un homing a las PP donde permanecerán vírgenes durante la fase neonatal. La mucosa neonatal no produce IgA, y es deficiente en varias moléculas como factores de crecimiento o citoquinas, que las proveerá la madre a través de la leche materna. Por lo tanto, la lactancia es de suma importancia para el neonato para su correcto desarrollo.

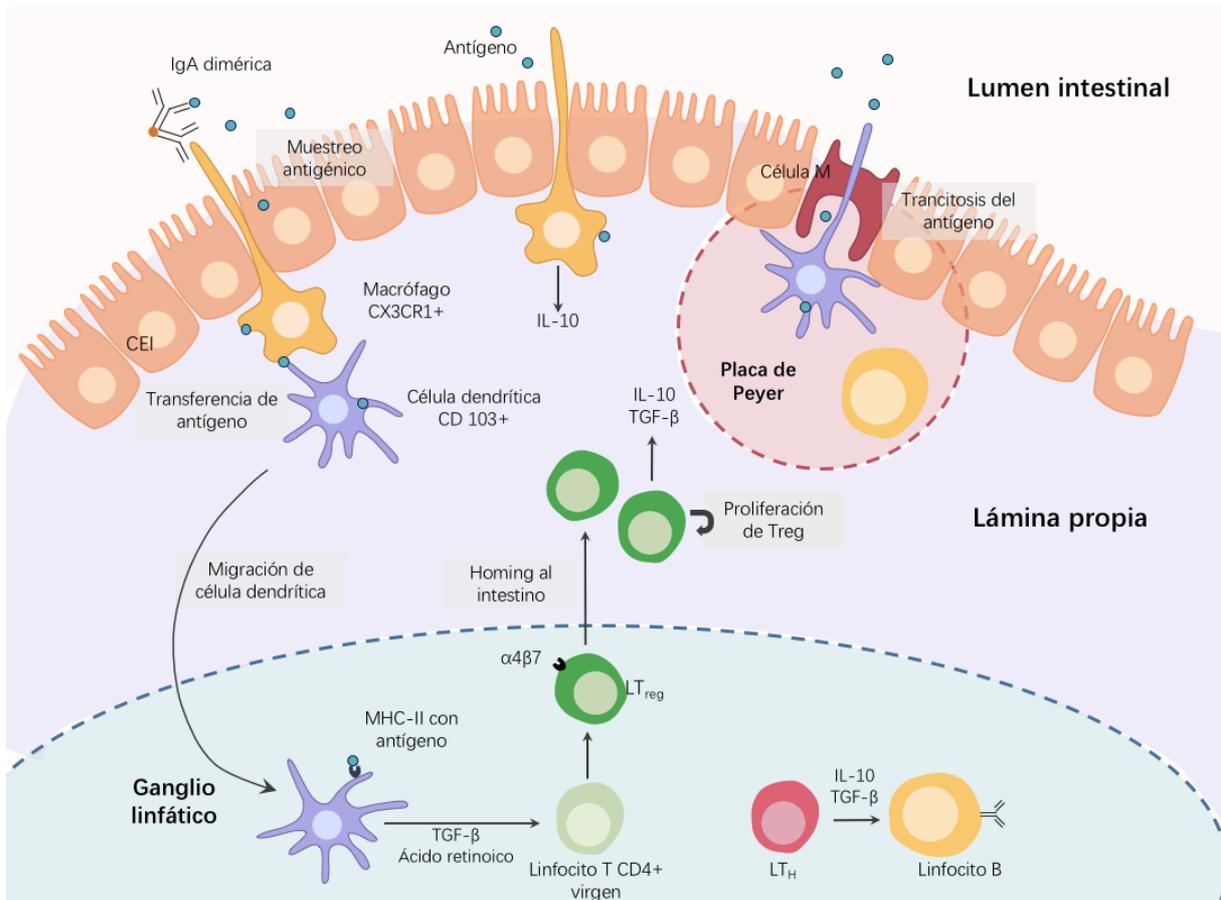


Figura 4. Mecanismos de tolerancia oral en el intestino. Los macrófagos CXCR1 muestrean antígenos presentes en el lumen a través de las células epiteliales utilizando prolongaciones celulares. El antígeno es transferido a células dendríticas CD103+ que migrarán desde la lámina propia a los ganglios linfáticos, donde la expresión de TGF- $\beta$  y ácido retinoico promoverá la diferenciación de linfocitos T CD4+ vírgenes en células T reguladoras (LTreg). La proliferación de LTregs se ve favorecida por la expresión de IL-10 por parte de macrófagos. La expresión de  $\alpha 4\beta 7$  le proporciona la capacidad de homing a las LTregs a la lámina propia intestinal donde podrán apagar respuestas inflamatorias contra el antígeno. Células dendríticas CD103+ también pueden muestrear antígenos a través de las células M mediante trancitosis. Clonas de linfocitos B específicas para el antígeno pueden sufrir un cambio de clase en los órganos linfoides secundarios con la ayuda de linfocitos T helper (LT<sub>H</sub>), también pudiendo migrar a la lámina propia.

Adaptado de [ 33 ]

## 1.2. Aspectos inmunológicos de la leche materna y la lactancia

### 1.2.1. Propiedades generales de la leche materna

La variedad de beneficios que aporta la lactancia refleja la diversidad de funciones que cumple la leche materna y su participación en diversos aspectos del desarrollo del neonato, así como de su impacto en la salud a largo plazo<sup>43</sup>.

En primer lugar, la leche materna es reconocida como el alimento ideal del recién nacido ya que su composición dinámica garantiza el adecuado crecimiento y completo desarrollo del niño durante los primeros meses de vida. La leche es un fluido muy complejo y de composición dinámica; se observan cambios composicionales que ocurren a medida que evoluciona la fisiología del niño, no solo desde un punto de vista nutricional, sino también otros aspectos como la competencia inmunológica<sup>44,45</sup>.

La composición de la leche es compleja (tabla 1): contiene una fase acuosa con proteínas dispersas en forma de micelas (caseínas) así como componentes solubles (lactosa, proteínas, oligosacáridos y componentes de menor tamaño)<sup>46</sup>. En la fase acuosa también se encuentran partículas en suspensión, que comprenden células de origen materno (epiteliales y leucocitos) así como componentes de la microbiota intestinal y cutánea. Aquí se encuentran la mayoría de los componentes con actividad biológica: enzimas, inmunoglobulinas, péptidos con actividad inmunomoduladora, factores de crecimiento y quimioquinas que se asocian con la migración de células a la leche<sup>47,48</sup>, además de otros. Por otro lado, hay glóbulos de grasa formados por una membrana lipídica derivada de la célula epitelial que rodea a un núcleo de grasa y vitaminas liposolubles.

Con el correr de los años es cada vez más evidente que los beneficios de la leche materna trascienden a la función nutricional debido a su gran contenido de componentes bioactivos. En relación al rol inmunológico de la leche, se ha asociado clásicamente a la protección contra infecciones debido a la transferencia pasiva de distintas moléculas. También se ha observado que hay varios factores presentes que colaboran en el mantenimiento de la integridad epitelial y la homeostasis del intestino neonatal<sup>49,50</sup>.

Más recientemente, se ha puesto en evidencia que además de las proteínas endógenas de origen materno, la leche transfiere proteínas exógenas al neonato que ingresan a la madre por la vía digestiva o respiratoria. Se han encontrado antígenos dietarios y ambientales en cantidades del orden de ng-μg/ml, incluyendo alérgenos y antígenos dietarios<sup>51</sup>. Se considera que el pasaje fisiológico de los antígenos ambientales y dietarios a la leche tiene como finalidad “educar” al sistema inmune intestinal del neonato que está en etapa de desarrollo.

Tabla 1. A la izquierda tabla de componentes mayoritarios de la leche materna (LM) y a la derecha tabla de los principales componentes bioactivos.

<i>Componentes mayoritarios de la LM</i>	<i>Principales componentes bioactivos de la LM</i>
<b>Proteínas</b>	<b>Células</b>
Caseínas	Macrófagos
α-lactalbúmina	Neutrófilos
Lactoferrina	Linfocitos T
Albúmina sérica	<b>Inmunoglobulinas</b>
Lisozima	sIgA/IgA
Lipasa	IgG
Lactosa	sIgM
<b>Carbohidratos</b>	Componente secretor libre (CS)
Lactosa	<b>Citoquinas</b>
Oligosacáridos: (combinaciones de)	TGF-β
Glucosa	IL-6
Galactosa	IL-7
Fructosa	IL-10
N-acetil-glucosamina	TNF-α
<b>Lípidos</b>	<b>Factores de crecimiento</b>
Triglicéridos	EGF
Ácidos grasos:	VEGF
Ácido oleico	NGF
Ácido palmítico	Eritropoyetina
Ácido linoleico	<b>Hormonas</b>
<b>Vitaminas</b>	Calcitonina
C, D, E, A	Somatostatina
K (baja concentración)	Leptina
<b>Minerales</b>	<b>Componentes antimicrobianos</b>
Ca, Mg, Fe, Co, Zn, P	Lactoferrina
	Lactadherina
	<b>Oligosacáridos y glicanos</b>
	HMOs
	Gangliósidos
	Glicosaminoglicanos
	<b>Mucinas</b>
	MUC 1
	MUC 4

De esta forma, podrá responder a estos componentes dietarios con un perfil tolerogénico, una vez que ingresen a su organismo en la etapa en que comienza a ingerir alimentos<sup>52</sup>.

Como se explicitó anteriormente, para que se desarrolle una respuesta de tipo tolerogénica frente a un antígeno, es necesaria la presencia de factores inmunosupresores en el microambiente de muestreo de antígeno tales como TGF- $\beta$ , IL-10 o el ácido retinoico, entre otros<sup>53-56</sup>. En este sentido, se considera que la leche materna colabora en la inducción de la tolerancia oral, debido a la gran cantidad de componentes inmunológicos que favorecen el microambiente antiinflamatorio en el intestino del neonato.

En modelos experimentales se ha demostrado que la sola presencia de un antígeno administrado vía oral no es suficiente para generar una respuesta tolerogénica en ratones neonatos; sin embargo, la administración del antígeno mediante leche materna logra inducir la tolerancia oral<sup>51</sup>. A su vez, en un modelo murino, se observó que la exposición a maní durante la preñez y lactancia disminuyó significativamente la respuesta anafiláctica de sus crías frente a una primera exposición<sup>52</sup>.

Los resultados anteriores nos dejan entrever que además de la presencia de los antígenos, otros componentes que se encuentran en la leche contribuyen con la tolerancia oral. En particular, los anticuerpos de distinto isotipo también pueden contribuir en la tolerancia oral en el intestino neonatal. En un modelo de asma se observó la importancia de los anticuerpos específicos que pueden mediar la internalización de los antígenos a las células presentadoras en el intestino en una forma tolerogénica, fundamentalmente de isotipo IgG1 en el ratón<sup>56</sup>. El potencial tolerogénico de la leche humana dependería, por lo tanto, del aporte de los antígenos ambientales y dietarios en determinadas cantidades, del balance de mediadores pro y antiinflamatorios y otros factores que participan en el condicionamiento de las células dendríticas para la inducción de linfocitos T reguladores.

### 1.2.2. EL proceso de formación de la leche materna

La glándula mamaria (GM) consiste de lóbulos subdivididos en alveolos, unidad básica secretora de la leche. Los alveolos se encuentran agrupados alrededor de conductos que convergen al pezón, rodeados por una red capilar extensa, esencial para la llegada de los componentes sanguíneos que formarán la leche. Delimitando al alveolo se encuentra una monocapa de células epiteliales que separan el lumen del alveolo del estroma. Debajo del epitelio se encuentran otros tipos celulares que colaboran con la eyección y producción láctea (adipocitos, fibroblastos, etc)<sup>57</sup>.

La formación de la leche se da por el transporte de componentes maternos a través del epitelio mamario, o por la producción de componentes por parte de estas células. Su producción abarca oligosacáridos, lactosa, proteínas como las caseínas que serán excitadas al lumen y los lípidos, en su mayoría triglicéridos que serán secretados como glóbulos de grasa<sup>58</sup>.

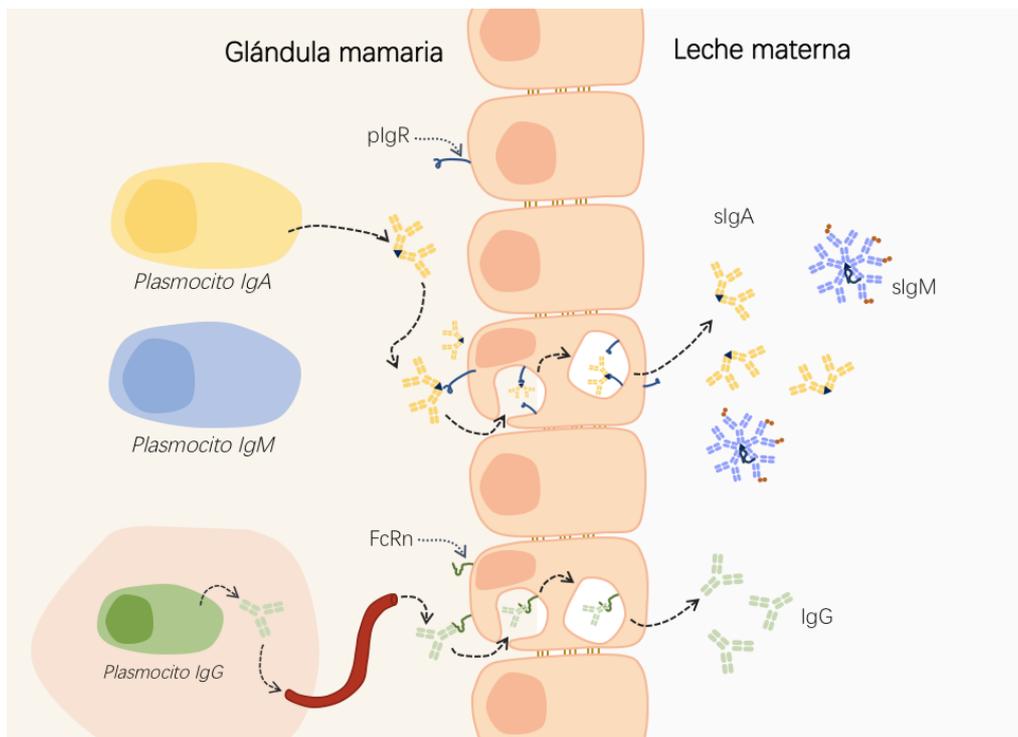


Figura 5. Transporte de anticuerpos hacia la leche materna. Las inmunoglobulinas producidas por los plasmocitos que se encuentran en la glándula mamaria pasan a través de las células epiteliales hacia la leche mediante transcitos. En dicho proceso, la inmunoglobulina se une a un receptor específico expresado por las células epiteliales (pIgR para el caso de IgA e IgM, y posiblemente el receptor FcRn para IgG) y es transportada en vesículas a través de la célula, siendo liberadas en la leche. En el caso de la IgA e IgM, una porción del receptor pIgR queda unido a la inmunoglobulina, denominado componente secretor, constituyendo las inmunoglobulinas secretoras sIgA y sIgM.

Otros nutrientes y componentes que se requieren para la síntesis de la leche llegan a la glándula mamaria a través de la sangre o el sistema linfático y difunden a través del espacio intersticial hasta la zona basal de las células epiteliales. Las vías de transporte en la célula epitelial dependen de la naturaleza del componente; las proteínas transportadoras están implicadas en el pasaje de iones, glucosa, aminoácidos y agua. La transcitosis permite el pasaje de varios componentes como las inmunoglobulinas, albúmina, transferrina, insulina, estrógeno, citoquinas y lipoproteín lipasa. En el caso del transporte de la sIgA a la leche, el mecanismo es el mismo que ocurre en su secreción intestinal a través del pIgR expresado en la superficie basolateral de las células del epitelio mamario; de forma análoga es transportada la IgM de la leche, que también contiene el componente secretorio.

En cuanto a los anticuerpos IgG provienen mayoritariamente de la sangre y son transportados por el receptor neonatal (FcRn) expresado en el epitelio mamario<sup>59</sup> (figura 5).

### 1.2.3. El Circuito bronco-entero-mamario

Inicialmente, se consideraba que la IgA y la IgM presentes en la leche materna llegaban a la glándula mamaria a través de los vasos sanguíneos y eran posteriormente transportadas a través de las células epiteliales. Sin embargo, existe evidencia de que estos anticuerpos son de producción local en el tejido mamario, secretados por plasmocitos que han migrado principalmente desde la lámina propia del intestino materno.

Los trabajos en modelos experimentales han aportado a la comprensión de estos aspectos. En un estudio en cerdos, se cuantificó la cantidad de plasmocitos productores de IgA en el tejido de glándulas mamarias<sup>60</sup>. El número de estas células aumentó en un factor de 6.5 entre la etapa previa al parto y el octavo día postparto. Una tendencia similar se había observado previamente en roedores<sup>61</sup>, constatando que la ubicación de las células era próxima al epitelio acinar de los alveolos mamaros y a vasos sanguíneos. Existen, a su vez, evidencias indirectas de la producción local de anticuerpos de isotipo IgA en la GM, comparando la reactividad de los anticuerpos en sangre y leche en la misma mujer<sup>62</sup>. Estos resultados llevaron a considerar que los plasmocitos presentes en la glándula mamaria migraran desde los sitios inductores para concretar su producción de anticuerpos localmente.

Intentando profundizar en los mecanismos de la migración de las células B, se estudió la expresión de MAdCAM-1, proteína extracelular del endotelio vascular que actúa como ligando de los receptores de homing de los linfocitos. Esta proteína se expresaba mayoritariamente al final de la gestación y al inicio de la lactancia, con un aumento progresivo de su expresión y una disminución de la misma durante la lactancia. En un modelo en cerdos se pudo observar que la interacción entre las moléculas de adhesión VCAM-1 y MAdCAM-1 junto con la quimioquina CCL28 expresada por las células de la mucosa puede reclutar específicamente plasmoblastos IgA+ no solo desde el intestino, sino de lugares extraintestinales a la glándula mamaria durante la lactancia<sup>63</sup>.

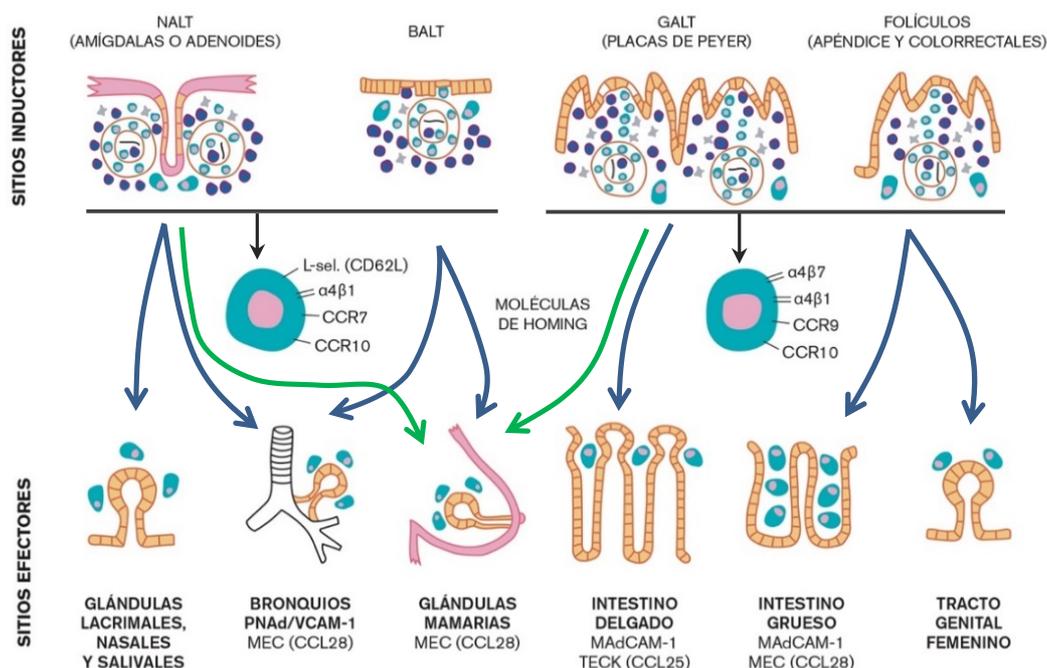


Figura 6. El 'homing' de células desde los sitios inductores hacia los sitios efectores está principalmente determinado por la integrina  $\alpha 4\beta 7$  presente en las células activadas que interactúan con MAdCAM-1 expresado en el endotelio vascular de la lámina propia. La retención en el intestino delgado de células que expresan CCR9 también está mediada por la quimioquina CCL25/TECK, mientras que CCL28/MEC interactúa con CCR10 principalmente en el intestino grueso. Otras moléculas de adhesión como CD26L/L-selectina y  $\alpha 4\beta 1$  se unen a PNA/VCAM-1 y a VCAM-1 respectivamente. Estos receptores suelen ser expresados principalmente por linfocitos B estimulados en el NALT y BALT. Tanto el tracto genital femenino comparte moléculas de 'homing' con el tracto superior aerodigestivo y el intestino grueso. En cuanto a las glándulas mamarias comparten moléculas de homing con el NALT y GALT con una efectividad mayor de migración que el tracto genital femenino.

En azul se muestra el camino preferencial de migración de cada sitio inductor. Las flechas en verde indican los principales sitios inductores desde donde migran células hacia la glándula mamaria.

Adaptado de [ 63 ]

La influencia de las hormonas en la lactancia también ha sido estudiada en relación con la migración celular hacia la GM. La prolactina fue capaz de aumentar el flujo celular de linfocitos T en un 50% y de linfocitos B en un 100% en GM de rata. Este aumento fue específico de la GM ya que no se observó un aumento en el número total de linfocitos a nivel sistémico. A su vez, en experimentos in vitro, el agregado de prolactina aumentó la expresión de las moléculas quimioatrayentes CCL2 y CXCL1, en particular en las células epiteliales de la glándula mamaria mientras que al depletar el medio de cultivo de estas dos moléculas, se observó una reducción en la migración celular de macrófagos/monocitos y neutrófilos<sup>64</sup> (figura 6).

La importancia de la migración de los plasmocitos hacia la glándula mamaria se evidencia al observar que el repertorio de anticuerpos presentes en la leche es muy variado y abarca antígenos muy diversos (proteínas provenientes de alimentos, antígenos respiratorios o antígenos de patógenos), lo cual es sumamente importante para el desarrollo del sistema inmune neonatal y en la protección del neonato.

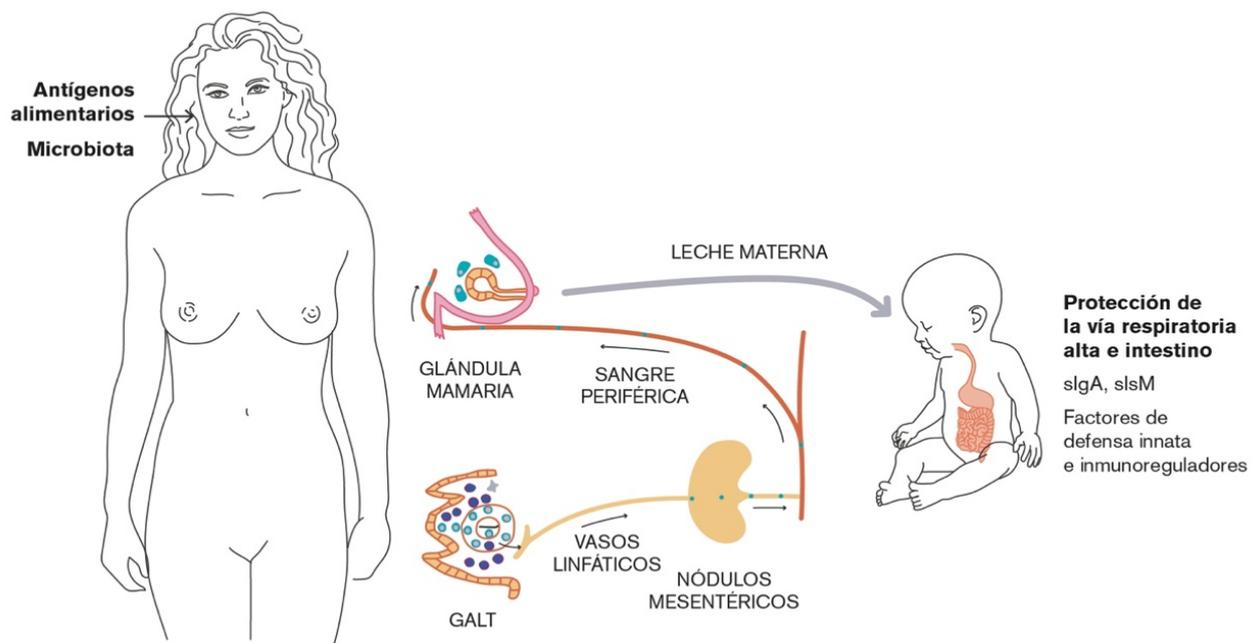


Figura 7. Migración de linfocitos B desde el GALT hacia la glándula mamaria. Mediante la expresión de moléculas de 'homing' los linfocitos B productores de isotipo IgA e IgM migran a través de los vasos sanguíneos a la glándula mamaria, donde se dará la producción local de anticuerpos. El pasaje de los anticuerpos hacia la leche materna proveerá anticuerpos contra patógenos y contra antígenos dietarios.

Adaptado de [ 63 ]

El repertorio de anticuerpos en el neonato será, en última instancia, un reflejo de los plasmocitos presentes en la mucosa materna, pero a su vez de los plasmocitos generados por su historial de encuentro con patógenos a lo largo de su vida, gracias a los plasmocitos de larga vida presentes en la LP. Eventualmente, el infante comenzará a producir su propio repertorio de anticuerpos gracias a su propia experiencia inmunológica en la medida que se complete el desarrollo de su función inmunológica<sup>65</sup> (figura 7).

#### 1.2.4. La Lactancia y protección contra enfermedades con componente inmunológico

La lactancia se considera como un factor ambiental que tiene incidencia sobre el desarrollo en el niño de enfermedades con una base inmunológica<sup>45,66,67</sup>. La mayoría de los estudios se orientan a enfermedades alérgicas<sup>49,68,69</sup>. En humanos, los estudios se limitan a trabajos de corte epidemiológico, donde se analiza la correlación entre la exposición materna a determinados alérgenos y la evolución de los neonatos en relación al desarrollo de patologías alérgicas y asma principalmente<sup>70-74</sup>. La desventaja de este tipo de estudios es que la diversidad de variables existentes puede llevar a que distintos estudios obtengan resultados opuestos. Otras variables que se han comenzado a estudiar son la edad del niño al momento de la introducción de proteínas alérgicas y la cantidad de las mismas<sup>117</sup>. En algunos países está tomando protagonismo la recomendación de comenzar a introducir alimentos en pequeñas cantidades en forma concomitante a la lactancia en un periodo entre los 4 y 6 meses, acortando el periodo de lactancia exclusiva para propiciar la inducción de los mecanismos de tolerancia oral en el neonato<sup>68</sup>.

### 1.3. La enfermedad celíaca

#### 1.3.1. Generalidades

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía inflamatoria crónica, con un componente autoinmune, mediada por una respuesta desencadenada por proteínas (prolaminas) presentes en el trigo, cebada, centeno y avena en menor medida. Se caracteriza por una lesión en el primer tramo del intestino delgado caracterizada por infiltración linfocitaria, diversos grados de atrofia vellositaria e hiperplasia de las criptas. Actualmente, el único tratamiento disponible es una dieta estricta libre de gluten (DLG) que en la mayoría de los casos revierte el daño intestinal y eventualmente las manifestaciones sistémicas en un plazo no menor a los seis meses<sup>75-77</sup>.

[25]

La prevalencia de la enfermedad a nivel mundial es estimada en aproximadamente un 1%, aunque al haber individuos asintomáticos se estima que se encuentra subdiagnosticada (figura 8). Actualmente no existen datos de la prevalencia de la EC en Uruguay, aunque se estima que es de 1:100/300 de acuerdo a la Guía de detección precoz, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad Celíaca del Ministerio de Salud Pública. La prevalencia de la EC en Argentina de acuerdo a un estudio realizado en La Plata, Buenos Aires, estimó que 1 persona en 167 padece la enfermedad<sup>78</sup>.

El riesgo de tener EC aumenta entre un 7.5 a 17% dependiendo de la existencia de uno o más familiares de primer grado con EC<sup>79</sup>. La susceptibilidad genética está fuertemente asociada a ciertos alelos de las moléculas DQ2 y DQ8 de los antígenos leucocitarios humanos (HLA) que son responsables de cerca del 50% de la heredabilidad de la enfermedad. El 90% de los pacientes celíacos presentan al menos una copia del heterodímero DQ2.5, molécula conformada por cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  codificadas por los alelos HLA DQA1\*05 y DQB1\*02<sup>80,81</sup>.

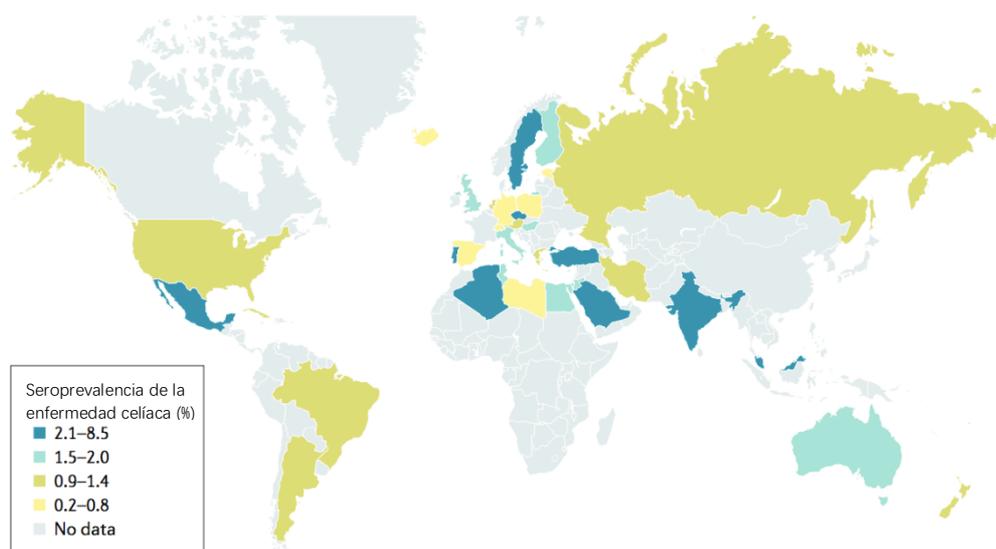


Figura 6. Seroprevalencia global de la EC. Mapa realizado con estudios que consideraron anticuerpos positivos para transglutaminasa tisular y anticuerpos anti endomisio. La intensidad del color indica un aumento en la prevalencia. Los países mostrados en gris no presentan datos oficiales de prevalencia. Figura tomada de [60]

Entre un 20 y un 30% de la población no celíaca es portadora de este gen, indicando que los HLA implicados no son suficientes para generar la enfermedad, existiendo factores ambientales y otros genes determinantes aún no completamente definidos. Los pacientes celíacos que no son portadores de la variante de HLA DQ2, normalmente son portadores de la variante DQ8 y aquellos que no expresan ninguno suelen presentar al menos uno de los alelos DQA1\*05 y DQB1\*02.

Se han asociado otros genes con la susceptibilidad, muchos de ellos relacionados con la función inmunológica (producción de IgA, IL-21, citotoxicidad de LT)<sup>82,83</sup>.

La aplicación de algoritmos de predicción para la coexpresión de algunos genes sugiere que estarían involucrados en la función de barrera epitelial, especialmente en mecanismos de adhesión celular y rearrreglos del citoesqueleto. Consistentemente, una función barrera alterada es una característica de la EC y otras patologías autoinmunes con las que hay solapamiento de genes asociados a susceptibilidad (ej. Artritis reumatoidea, Crohn, diabetes tipo 1, colitis ulcerosa)<sup>84</sup>.

La EC tiene un perfil clínico muy diverso que puede abarcar complicaciones sistémicas, con o sin sintomatología gastrointestinal la cual puede asociarse a diversos trastornos (diarrea, dolor abdominal crónico, vómitos, constipación crónica, abdomen distendido). La heterogeneidad sintomática hace que el diagnóstico sea complejo, muchas veces postergado en el tiempo, con un inicio tardío del tratamiento que expone a mayor riesgo de complicaciones<sup>76</sup>.

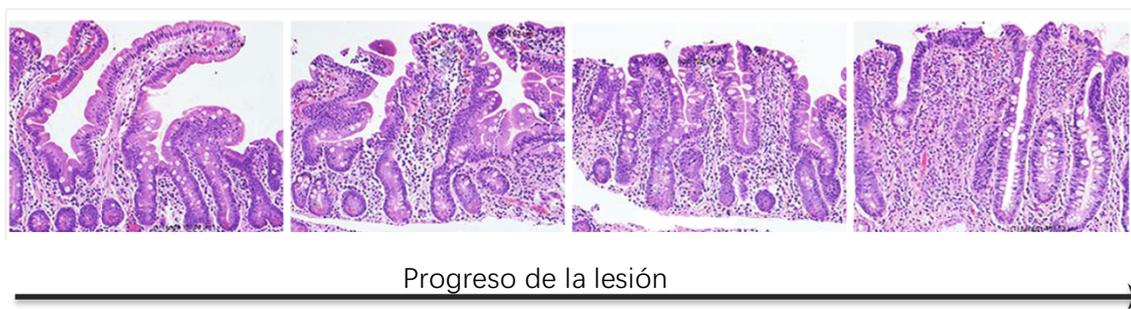


Figura 7. Progreso de la lesión en el intestino degado inducida por GLD en una persona con EC previo (derecha) y posterior a una DLG estricta (izquierda). Las figuras muestran cortes perpendiculares al lumen intestinal. Se puede observar cómo las estructuras de las vellosidades se atrofian y las criptas desarrollan una hiperplasia. Figura adaptada de [60]

El diagnóstico de la enfermedad implica el estudio de marcadores serológicos: anticuerpos IgA contra endomisio y transglutaminasa tisular (tTG), anticuerpos IgG e IgA contra péptidos deamidados de gliadina<sup>85,86</sup>. Si la serología es positiva, se continúa con una biopsia de intestino delgado en el cual se puede evidenciar la lesión intestinal; aunque existe un pequeño número de personas con EC cuya serología es negativa (figura 9).

### 1.3.2. La gliadina y la barrera intestinal

#### Defectos en la barrera epitelial

Varios trabajos reportan que la fisiología de la barrera epitelial en los individuos que desarrollan la EC puede estar alterada y favorecer el ingreso de gliadina sin degradar y propiciar la cascada patogénica que conduce a la lesión intestinal<sup>41</sup>. El aumento de la permeabilidad se puede atribuir a varios factores como la apoptosis aumentada en el epitelio intestinal como consecuencia del proceso inflamatorio, así como defectos en las uniones estrechas. Los defectos en las uniones podrían ser inducidas por la gliadina que conduce a sobreproducción de zonulina.

Por otra parte, la sobreproducción de IFN- $\gamma$  que caracteriza a la EC actúa a nivel del transporte para y transcelular lo que favorecería un bucle que propicia la entrada de mayor cantidad de gliadina que perpetúa el daño<sup>87</sup>.

La mucosa intestinal durante la fase activa de la EC se caracteriza por la sobreexpresión de IL-15, una citoquina que se expresa en membrana celular y es secretada formando parte de la cascada patogénica mediada por linfocitos intraepiteliales, concomitantemente a la expresión de otros factores. Además, la IL-15 promueve la producción de Ki67 (marcador de proliferación celular), FAS e IFN- $\gamma$ <sup>85,88</sup> y se ha asociado al aumento de permeabilidad por incremento de la apoptosis de enterocitos.

Otra particularidad de la barrera epitelial en la EC es la sobreexpresión ectópica de CD71 (receptor de transferrina) en la cara apical de los enterocitos, una proteína que media el retrotransporte de complejos inmunes de sIgA del lumen intestinal al medio interno y, por lo tanto potenciando el acceso de péptidos de gliadina sin degradar a la mucosa intestinal<sup>89,90</sup>

## Respuesta innata inducida por gliadina

Las principales proteínas del trigo que son tóxicas para el intestino en la EC son mayoritariamente las gliadinas (Figura 10); durante el proceso de amasado las gliadinas interaccionan químicamente con las gluteninas para formar el gluten que le otorga propiedades cohesivas, viscoelásticas y capacidad de retener gases a la masa<sup>91-93</sup>. Las gliadinas representan un grupo sumamente polimórfico de proteínas monoméricas con peso moleculares que varían entre 30,000 y 80,000 kDa. Son particularmente ricas en los aminoácidos prolina (15%) y glutamina (30%) lo cual causa una resistencia al procesamiento proteolítico y a las enzimas pancreáticas. Los péptidos resultantes son relativamente largos y se acumulan en el intestino delgado<sup>92,94</sup>. Durante la digestión del gluten se genera una diversidad de péptidos que tienen la potencialidad de ocasionar daño en los pacientes con EC<sup>95</sup>. Los péptidos derivados de la  $\alpha$ -gliadina son los que inducen respuestas más fuertes en la mayoría de los pacientes, en particular los péptidos como el 33-mer (p55-87) y el 25-mer (p31-55)<sup>96</sup> que permanecen sin digerir. El péptido 33-mer, además de contener epítopes T repetidos que lo hacen muy inmunogénico<sup>97</sup>, contiene secuencias que tienen la potencialidad de estimular la respuesta innata e inducir cambios en el epitelio intestinal de los individuos celíacos. Varios trabajos ponen en evidencia el potencial proinflamatorio de la gliadina y péptidos derivados que al interactuar con monocitos/macrófagos inducen la producción de varias citoquinas proinflamatorias, involucrando la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B<sup>98-100</sup> así como de la activación del inflamasoma<sup>101</sup>.

La gliadina aumenta la permeabilidad del epitelio intestinal<sup>6</sup>, la producción de mediadores inflamatorios como TNF- $\alpha$  en forma dependiente de MyD88 en la línea Caco-2<sup>102</sup> y sinergiza la expresión de moléculas de MHC-II inducida por IFN- $\gamma$  en la línea HT-29, propiciando la presentación de péptidos en el compartimento intestinal<sup>103</sup>. Estas propiedades de la gliadina podrían estar exacerbadas en el intestino de neonatos susceptibles donde la función barrera y los mecanismos de homeostasis intestinal aún no están completamente desarrollados.

## La respuesta adaptativa en la EC

En relación a la respuesta específica inducida por la gliadina, se han logrado identificar los epítopes T que dan cuenta del 90% de las respuestas inmunológicas específicas desencadenadas por la gliadina, utilizando varias técnicas. En los proteomas completos del trigo, cebada y centeno se

identificaron los péptidos derivados de la  $\alpha$ -gliadina (ELQPFQPELPYPQPQ),  $\omega$ -gliadina/C-hordeina (EQPFQPEQPFQWQP), y  $\beta$ -hordeina (EPEQPIPEQPQPYPQQ)<sup>104</sup>.

Los epítopes altamente inmunogénicos de los péptidos de gliadina tienen en común la presencia de múltiples residuos de prolina y glutamina que aportan características funcionales y estructurales particulares.

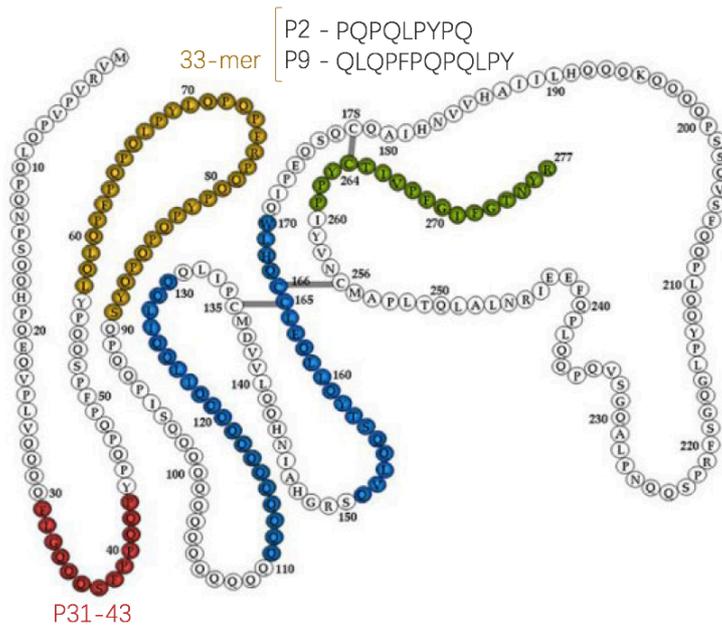


Figura 8. Estructura de la gliadina. En color amarillo se muestra el péptido inmunodominante 33 mer que contiene los motivos solapados P2 y P9. P31-P43 corresponde a un péptido con acción directa sobre el epitelio.

En primer lugar, como se mencionó son excepcionalmente resistentes a las enzimas digestivas y en particular las estructuras ricas en prolina adoptan una conformación helicoidal que favorece la unión a los ligandos de MCH de clase II. Por último, hay varios péptidos del gluten que pueden unirse a los HLA sin modificaciones previas, aunque una gran mayoría sufren la deamidación de residuos de glutamina por la enzima transglutaminasa tisular, aumentando su inmunogenicidad al generar residuos de ácido glutámico que se acomodan muy bien en las moléculas de MHC II asociadas a susceptibilidad<sup>105</sup>.

Como resultado se produce una respuesta efectora mediada por linfocitos T CD4+ específicos contra el gluten con perfil Th1, acompañada de la producción de citoquinas como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  que promueven la inflamación y el daño intestinal. Una vez activados, los linfocitos Th específicos pueden estimular linfocitos B que conducirán a la producción de anticuerpos específicos anti-gliadina (figura 11).

Las clonas de los linfocitos T CD4+ específicos pueden permanecer hasta décadas en la sangre y los tejidos mantenidos por ingestas mínimas de gluten<sup>106</sup> ya que una dieta libre de gluten estricta puede ser muy difícil de llevar a cabo.

Por otra parte, la formación de anticuerpos contra la tTG es la característica que aporta el componente autoinmune a la EC. Al ser una enzima ubicua de varios tejidos corporales se vinculan con muchos de los síntomas extraintestinales; se han encontrado depósitos de anticuerpos específicos contra la tTG en diversos órganos como el cerebro, los riñones, hígado y placenta<sup>107</sup>. En cuanto a los mecanismos que explican la formación de los anticuerpos anti-tTG se postula que la enzima por reacción de transamidación se entrecruza con péptidos de gliadina que son internalizados por linfocitos B específicos para la tTG, a su vez si los péptidos están deamidados son presentados eficientemente a los linfocitos Th que colaboran para la producción de los autoanticuerpos.

La producción local de los anticuerpos específicos se asocia con una plasmocitosis en la lámina propia, en forma simultánea a las demás alteraciones de la lesión intestinal. Un 10% de los plasmoblastos son específicos contra la tTG y mayoritariamente producen anticuerpos de isotipo IgA<sup>108</sup>. La presencia abundante de este autoantígeno colabora en la formación de complejos inmunes que puede aumentar el nivel de respuesta inflamatoria por mecanismos como la unión del complejo a bacterias comensales mediando su pasaje a través de la lesión<sup>109,110</sup>.

La transglutaminasa microbiana se usa a nivel de la industria alimenticia como aditivo y cuya funcionalidad imita a la transglutaminasa humana. Recientemente se ha demostrado que puede inducir la producción de anticuerpos específicos en pacientes con EC pudiendo convertirse en otro factor ambiental de la enfermedad<sup>76</sup>.

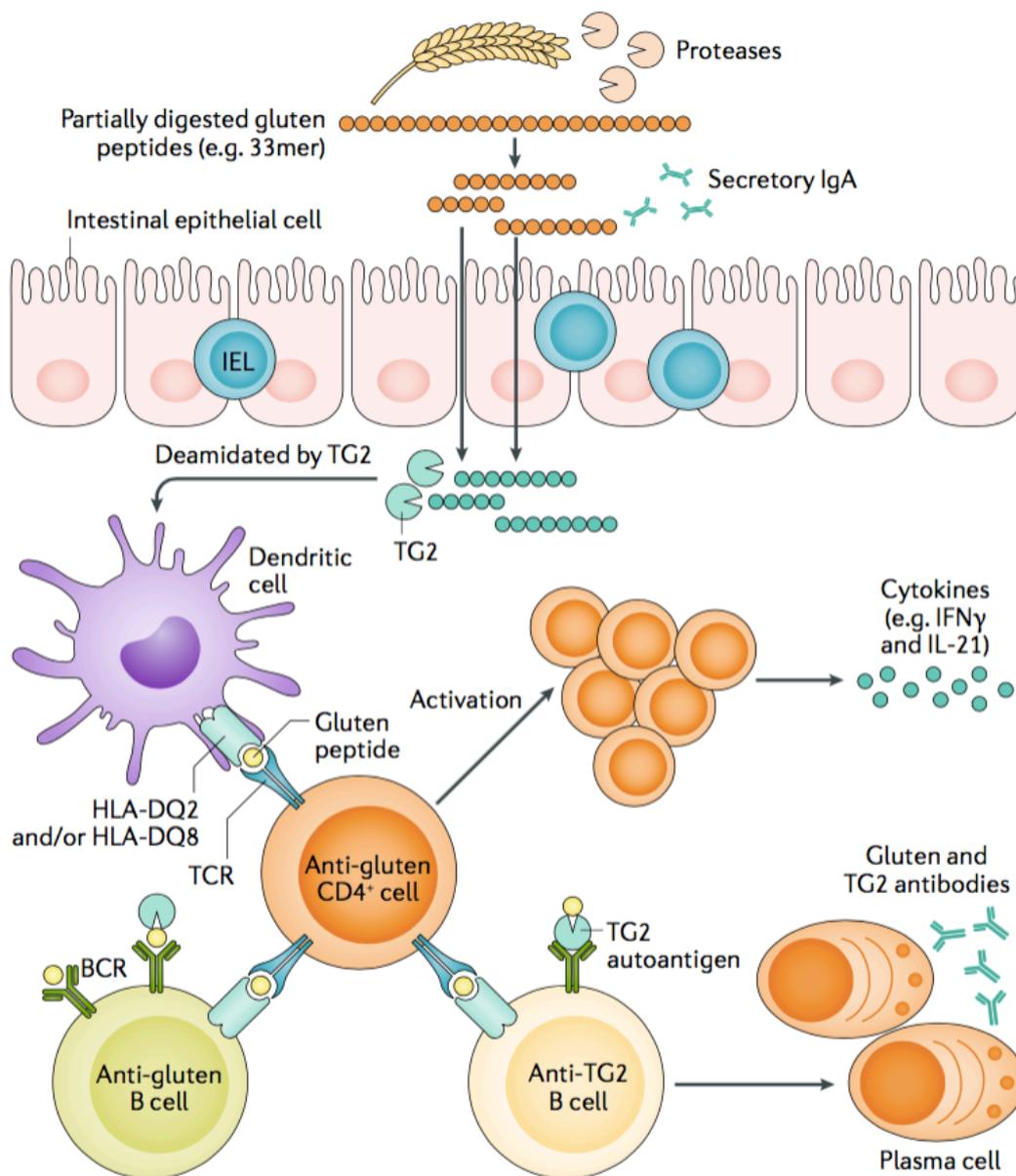


Figura 9. Respuestas del sistema inmune adaptativo implicados en la EC. Los péptidos de gliadina, al ser particularmente resistentes a la degradación proteolítica ingresan a la lámina propia (LP) por transporte paracelular, por un transporte activo o desencadenado por el daño en la barrera epitelial. Una vez en la LP son deamidados por la transglutaminasa tisular aumentando la afinidad de los HLA-DQ2 o HLA-DQ8 por los mismos. Los péptidos serán tomados por células presentadoras de antígenos y presentados a linfocitos CD4+ específicos para el gluten. Se ha postulado que tanto linfocitos B específicos para el gluten como para la transglutaminasa actúan como células presentadoras de antígenos en la EC. Los receptores BCR de superficie reconocerían los antígenos para internalizarlos y presentarlos a los linfocitos CD4+. Esta interacción activaría a los linfocitos B desencadenando la secreción de citoquinas inflamatorias por parte de los linfocitos CD4+ y de anticuerpos específicos por plasmocitos diferenciados a partir de los linfocitos B.  
IEL: linfocitos intraepiteliales.

### 1.3.3. Enfermedad celíaca y leche materna

Entre los factores etiológicos que estarían implicados en el desarrollo de la EC en individuos genéticamente susceptibles se plantean como principales hipótesis la historia de cuadros infecciosos, así como los patrones de alimentación temprana que tienen en consideración el período de lactancia, la conducta respecto a la introducción del gluten a la dieta (edad del niño y cantidades). Las alteraciones en la barrera epitelial, así como la tolerancia oral serían los procesos condicionados, sin dejar de considerar el rol de la microbiota, aunque hasta el momento se discute si las disbiosis asociadas a la EC son causa o consecuencia.

En relación a los últimos factores fue muy sugerente el fenómeno ocurrido en Suecia en la década de los 80 denominado la "epidemia sueca"; la incidencia de EC en ese país aumentó notablemente en asociación con el alto consumo de papillas conteniendo gluten, y retorno a sus valores basales al cambiar estos hábitos de alimentación y promoviendo la lactancia.

Se han realizado una gran variedad de estudios que evalúan el rol protector de la lactancia frente a la EC. Si bien algunos estudios retrospectivos mostraron un rol protector en cuanto a la lactancia prolongada, los resultados son considerados controversiales, principalmente sobre la base de estudios prospectivos con seguimiento de niños con riesgo familiar y/o genético a largo plazo que no han confirmado estas observaciones<sup>111,112</sup>.

Actualmente se están desarrollando varios estudios multicéntricos y prospectivos, para analizar el rol de factores genéticos y ambientales en el desarrollo de la enfermedad celíaca mediante el seguimiento a largo plazo de los niños participantes. En el marco de uno de los estudios actualmente en curso (CELIPREV, The Risk of Celiac Disease and Age at Gluten Introduction)<sup>113,114</sup>, se dispone de resultados en relación a la influencia de la edad del niño en la cual se introduce el gluten en la dieta (6 vs 12 meses de edad) así como el período de lactancia, aunque contemplando niños con riesgo familiar y no necesariamente riesgo por línea materna. Los autores concluyen que el factor genético es el más importante, y no establecieron correlación de estos factores de la nutrición temprana con el desarrollo de EC en los primeros años de vida.

Trabajos posteriores enmarcados en el mismo estudio multicéntrico CELIPREV, han considerado otros factores como el tipo de nacimiento (vaginal versus cesárea) sin encontrar una relación con el

desarrollo de EC. Una dieta no restrictiva en los niños con sospecha de EC no parece afectar el curso natural de la EC, evaluado en un período de 10 años. Si bien el tiempo de lactancia fue registrado, el número de niños que desarrollaron la EC fue pequeño para establecer conclusiones, y en ningún caso la madre era celíaca<sup>113</sup>.

Por otro lado, se ha estudiado la cantidad ingerida de gluten en las primeras etapas de la vida. Mediante un estudio (PREVENTCD) en el cual se realizó una intervención dietaria, se pudo evaluar lo anterior. Se introdujo 100 mg de gluten entre las 16 y 24 semanas en la dieta de uno de los grupos de estudio y se comparó con un grupo que recibió placebo en la misma cantidad y período estudiado. Hasta los 3 años de edad, no se encontraron diferencias significativas en el desarrollo de la EC entre ambos grupos. Por otra parte, el hecho de recibir leche materna durante el período de introducción del gluten en pequeñas cantidades, no influyó sobre los resultados; en este caso no se consideró si la lactancia fue exclusiva o no<sup>115</sup>.

Otro estudio multicéntrico en curso, (The Environmental Determinants of Diabetes in the Young, TEDDY) implica un seguimiento de niños con riesgo genético para la EC, hasta los 15 años, aunque no en todos los casos la madre era la portadora de la enfermedad. Este trabajo muestra correlación entre la seroconversión de los niños y la cantidad de gluten administrada en las primeras etapas de la vida. Sin embargo, hasta los dos años de edad de los niños, no demuestran correlación entre el tiempo de lactancia ni la edad de introducción del gluten en la dieta<sup>116</sup>.

Los estudios mencionados anteriormente no discriminaron que el pariente de primer grado con EC de los niños seleccionados para el estudio, fuese la madre. Hay estudios que evidencian que esto puede ser de importancia. El primer reporte en relación a la composición inmunológica de la leche de madres celíacas (MC)<sup>117</sup> fue un estudio realizado a partir de la leche de madres al mes posparto, proveniente de 12 mujeres celíacas en DLG, como mínimo, por 2 años. Se evaluó la composición de la microbiota, oligosacáridos (HMO) y algunos componentes inmunológicos, focalizándose en citoquinas (pro y anti-inflamatorias) así como anticuerpos totales (sIgA). Interesantemente, encontraron que las mujeres celíacas presentaban menor cantidad de sIgA, TGF- $\beta$  y bifidobacterias, lo cual sugiere un potencial protector e inmunoregulador menor, aunque el impacto de estas características sobre el desarrollo de EC en los niños no se ha estudiado.

En cuanto a la concentración de sIgA, el estudio PREVENTCD reprodujo los resultados en un subgrupo de los participantes de Italia y España. Además, se analizó la presencia de IgA específica para gliadina, que fue similar entre ambos grupos de estudio, lo que sugiere que las madres en DLG tienen células productoras de estos anticuerpos. En relación al desarrollo de EC en los niños antes de los 6 años de edad, 7 de los 42 niños (17%) que recibieron leche de madre celíaca desarrollaron la enfermedad, mientras 2 de los 41 (5%) fueron diagnosticados para el caso de madres no celíacas. La concentración de IgA específica y total en leche no mostró correlación con el desarrollo de la enfermedad, aunque sería importante aumentar el número de casos<sup>118</sup>.

Otro estudio mostró que la presencia aumentada de *E. coli*, *E. rectale*, *C. lituseburens*, *Streptococcus* y *Lactococcus* en el intestino de infantes se correlacionaba con el hecho de que el familiar de primer grado con EC fuese la madre<sup>119</sup>. En el contexto de la leche materna como un factor importante en la colonización del neonato, la microbiota puede ser transferida a través de la leche materna y la presencia bacteriana puede condicionar la flora intestinal neonatal.

## 2. Hipótesis y objetivos

### Hipótesis

Una mujer con EC activa (durante el consumo de gluten) presenta alteraciones en el compartimento intestinal y sistémico que implican:

- Defectos en la barrera epitelial (a nivel de la permeabilidad, polaridad, expresión de receptores de transporte)
- Plasmocitosis en la lámina propia intestinal, con gran proporción células productoras de anticuerpos específicos de la enfermedad
- Mayor producción de mediadores inflamatorios de impacto local y sistémico (IFN- $\gamma$ , IL-15, etc).

Si bien hay poca información de la fisiología del epitelio mamario en la mujer en condiciones de salud y lactancia, se puede considerar que tiene una arquitectura similar al epitelio intestinal en relación a las uniones entre las células adyacentes y en la fisiología del transporte para y transcelular.

La composición inmunológica de la leche implica un circuito entero mamario en el cual hay una circulación de células desde la lámina propia del intestino y otros sitios mucosos a la glándula mamaria, desde etapas avanzadas del embarazo hasta el destete. Además de los componentes sintetizados por células inmunes que colonizan el tejido subepitelial del alveolo, en el líquido intersticial subepitelial hay componentes inmunológicos solubles derivados del compartimento sistémico que llegan por sangre. El transporte de estos componentes en un contexto de cambios en la permeabilidad, composición celular y de mediadores inflamatorios puede afectar el pasaje de componentes a la leche, por ejemplo, el pasaje de moléculas menores a 600 Da o sales.

En base a estas consideraciones este trabajo se plantea la hipótesis de que la leche de MC puede diferir en su composición inmunológica respecto a la leche de madres sanas (MS) y en consecuencia sus propiedades biológicas en el intestino neonatal pueden estar alteradas. Hasta el presente no hay estudios prospectivos que demuestren un rol protector de la lactancia de hijos de madres celíaca frente al desarrollo de infecciones o enfermedades con una base inmunológica (ej. alergias o autoinmunes), pero una aproximación al estudio de los componentes de la leche puede contribuir en este aspecto.

### **Objetivo general:**

Evaluar las consecuencias de la EC sobre las propiedades inmunológicas de la leche materna, como forma de aportar en un futuro al planteo de estrategias preventivas para el desarrollo de EC en la primera infancia de niños con riesgo genético de primer grado.

### **Objetivos específicos:**

- Evaluar las propiedades nutricionales de la leche de MC en comparación con la leche de MS.
- Evaluar comparativamente la concentración de componentes inmunológicos en leche de MS y MC, teniendo en cuenta en este último grupo si hay adhesión estricta a una dieta libre de gluten.
- En base a las características dinámicas de la composición de la leche durante el primer año de lactancia, estudiar si la evolución temporal de los componentes inmunológicos y propiedades nutricionales es similar en mujeres celíacas y sanas.

- Evaluar la capacidad de la leche de modular los efectos de estímulos inflamatorios y de proteínas del gluten como agentes disparadores del daño intestinal en modelos in vitro con líneas celulares intestinales.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Muestras de estudio

##### 3.1.1. Recolección de muestras

###### Donantes de leche

Se realizó una convocatoria dirigida a madres con enfermedad celíaca (MC) que se encontraran en el primer año de lactancia, que tuvieran exceso de producción de leche suficiente para contribuir con la donación de una muestra de leche para estudio.

La convocatoria de donantes celíacas se realizó a través de la Asociación Celíaca del Uruguay (ACELU), el Banco de Leche Humana del Centro Hospitalario Pereira Rossell (BLH) y mediante redes sociales en grupos de madres en lactancia y de personas con enfermedad celíaca. Se consideraron mujeres que habían sido diagnosticadas, como mínimo, dos años previos al parto. Se realizó una encuesta incluyendo datos personales, condiciones de salud previas, complicaciones durante el embarazo, además de agregar una sección de preguntas sobre la EC en general (síntomas, diagnóstico, la DLG) y su situación durante la lactancia en particular.

Las muestras de leche de MS fueron proporcionadas en su mayoría por el BLH teniendo en cuenta los criterios de exclusión de la institución: madres portadoras de enfermedades infecto-contagiosas, uso de drogas o medicamentos que se excreten a través de la leche y produzcan efectos en los receptores de leche, que estén cursando un tratamiento de quimioterapia o radioterapia y casos de desnutrición. No se consideraron donantes con hijos nacidos antes de las 37 semanas de gestación.

###### Aspectos éticos.

El protocolo de investigación fue sometido a evaluación por el Comité de Ética en investigación con seres humanos de la Facultad de Química (Expediente No 101 900-000746-1 5) para la obtención de muestras de MC y otras donantes sanas. De igual forma, el protocolo para la obtención de una fracción de la leche para investigación fue sometido al Comité de Ética del Centro Hospitalario

Pereira Rossell, contemplando especialmente en este caso la disponibilidad de leche para administrar a los recién nacidos.

Todas las madres firmaron un consentimiento informado aprobado por el comité de ética de Facultad de Química y del Centro Hospitalario Pereira Rossell.

## Obtención de las muestras

El volumen máximo de cada muestra de leche donada fue de 20 ml de acuerdo a los criterios de los Comités de Ética.

Las muestras fueron recolectadas por goteo en el período de tiempo entre 2015 y 2017. Al final de la convocatoria se logró disponer de muestras de 41 donantes sanas y 33 celíacas, en algunos casos con más de una muestra. A los efectos del análisis se consideró un subagrupamiento de las muestras tomando como punto temporal los seis meses post parto como criterio, por tratarse del momento en el cual se incorporan alimentos al niño y la composición de la leche pudiera tener impacto sobre la tolerancia a los mismos. De todas formas, para integrar los grupos de estudio se consideraron solo muestras independientes, donadas por distintas madres.

### 3.1.2. Procesamiento y conservación de las muestras

La leche extraída por las MC se conservó en el domicilio en el freezer, y fueron transportadas al laboratorio de inmunología en un plazo no superior a 7 días y conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su análisis.

Una vez obtenidas las muestras, se procesaron mediante doble centrifugación: inicialmente por 10 minutos a 1.000 g y luego por 30 minutos a 10.000g, ambas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se separó la fase acuosa de la fase grasa y el sedimento sólido, descartando esta última y conservando la fase acuosa para su posterior análisis. Las muestras destinadas al análisis de citoquinas se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se apartaron alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para otros tipos de ensayos con un tiempo máximo de conservación de 1 año.

### 3.2. Análisis de macronutrientes: grasa, lactosa y proteínas

El análisis de los macronutrientes, aporte calórico y contenido de sales se realizó en el BLH con el asesoramiento del Lic. Arturo Puyol, utilizando un analizador automático de leche basado en tecnología de ultrasonido, calibrado para leche humana con los métodos de referencia para cada componente a valorar. Este equipo (Lactoscan SLP, Milkotronic LTD) permite medir simultáneamente varios parámetros de cada muestra utilizando un volumen relativamente pequeño de leche (5 ml) en 60 segundos por muestra. Los parámetros estudiados fueron: grasa, proteínas, lactosa y sales.

También se calculó el contenido calórico mediante la técnica del crematocrito propuesto por Lucas<sup>120</sup> que consiste en separar por centrifugación en capilares (15.000 rpm, 15 minutos) y medir con una regla milimetrada la fase grasa y el suero. El crematocrito se expresó como el porcentaje de crema con respecto a la longitud total de la columna la cual se correlaciona mediante una regresión lineal con el contenido calórico (Kcal/L); como resultado Lucas planteó la ecuación que se muestra abajo que contempla además de la grasa la contribución de lactosa y proteínas al contenido energético total.

$$\% \text{ crema} = \frac{\text{crema (mm)} \times 100}{\text{volumen total}} \frac{\text{Kcal}}{\text{l}} = \% \text{ crema} \times 66,8 + 290$$

#### 3.2.1 Determinación de proteínas

Para la valoración del contenido proteico en la fase acuosa de las muestras de leche, así como en las preparaciones antigénicas utilizadas en los ensayos de ELISA, se procedió con el método de Bradford utilizando las respectivas soluciones estándar para cada caso. El método de Bradford<sup>121</sup> adaptado a microplaca se realizó utilizando solución Coomassie Brilliant Blue G-250. La solución se almacena a 4 °C y al momento de utilizarla se debe diluir 1:5 en agua destilada y filtrarla con papel. El ensayo se lleva a cabo en placas de poliestireno de 96 pocillos. Se sembraron 10 µl de la solución de gliadina y de péptidos de gliadina sembrando 5 diluciones seriadas al medio. Las muestras se incuban con 200µl de reactivo de Bradford a temperatura ambiente por lo menos durante 5 minutos. Luego se mide la absorbancia a 600 nm y se procesan los datos a partir de una curva de calibración realizada con un estándar de seroalbúmina bovina a partir de 2 mg/ml.

### 3.3. Determinación de componentes con actividad inmunológica

#### 3.3.1 Determinación de la actividad lisozima

Se determinó mediante el método turbidimétrico de lisis de *Micrococcus Lysodeikticus* adaptado para el análisis de leche humana en nuestro laboratorio<sup>122</sup>. En este ensayo se prepara una cantidad suficiente de una suspensión de células *Micrococcus Lysodeikticus* a una concentración de 0,7 mg/ml en buffer fosfato de potasio 66 mM (pH 6.2) y se termostatiza a 30 °C previo a su uso. En una microplaca de titulación de 96 pozos se colocan 50 µl de la muestra de fase acuosa de leche a analizar o igual cantidad de las soluciones de lisozima estándar comercial (Sigma-Aldrich) para realizar una curva de calibración. Luego se le agregan 200 µl de la suspensión de *Micrococcus Lysodeikticus* a cada pocillo y se mide inmediatamente la DO a 450 nm ( $DO_{inicial}$ ) en un lector de placas (LabSystems Multiskan MS). Posteriormente, se incuba la placa en un baño de agua a 30 °C por 3 horas. Pasado ese tiempo se mide la absorbancia nuevamente a 450 nm ( $DO_{final}$ ) y se calcula para cada punto el porcentaje de DO (%DO) respecto a la lectura inicial. Se calcula la actividad de la muestra problema mediante la curva de calibración realizada con la lisozima estándar (UL/ml) vs % DO.

#### 3.3.2. Análisis de anticuerpos totales presentes en la leche

Para los ensayos de ELISA realizados se especifican los buffers utilizados en la siguiente tabla. En el caso de excepciones se detallan en el texto.

Tabla 2. Soluciones utilizadas para la detección de anticuerpos totales mediante ELISA

Soluciones utilizadas	
Buffer de bloqueo	PBS – BSA 1%
Buffer de dilución	PBS – BSA 0,02% - Tween 0,05%
Solución de revelado	12 ml de Acetato de Sodio 0.1 M (pH 5.5), 200 µl de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina 6 mg/ml en DMSO y 50 µl de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1%
Buffer de lavado	PBS – Tween 0,05%

## Metodología general de ensayo por ELISA de captura para la cuantificación de anticuerpos totales de isotipo IgA, IgM e IgG

Para valorar la concentración de cada isotipo se utilizó el mismo diseño general de ELISA con condiciones experimentales ajustadas para cada análisis particular, según se detalla en la tabla 3. Inicialmente se sensibilizaron placas de microtitulación de alta adherencia (Greiner bio-one) con 100 µl por pocillo de una solución del anticuerpo de captura correspondiente, diluido en PBS. Se incubaron las placas a 4°C toda la noche en cámara húmeda. Luego se bloquean las placas utilizando 200 µl/pocillo de una solución de bloqueo durante 1 hora a 37°C. Las muestras a valorar y la solución estándar se diluyeron utilizando un buffer de dilución a concentraciones adecuadas, fuera del rango de saturación. Se sembraron 100 µl/pocillo de cada solución y se incubaron toda la noche a 4°C.

Tabla 3. Descripción de los reactivos específicos utilizados para el ELISA para determinación de anticuerpos totales

Isotipo de anticuerpo a cuantificar	IgA	IgM	IgG
<b>Anticuerpos de captura</b>			
	Anti IgA humana	Anti IgM humana	Anti IgG humana
	Fc α específico	Fc μ específico	Fc γ específico
Producido en (especie)	Cabra	Conejo	Conejo
Marca comercial	Sigma Aldrich	Sigma Aldrich	Abcam
Concentración utilizada	10 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
Solución estándar	N Protein Standard SL, SIEMENS (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany).		
Concentración de soluciones stock	1.92 mg/ml	0.639 mg/ml	Ver
<b>Anticuerpo de detección- conjugado a PO (especie)</b>			
	Anti IgA humana,	Anti IgM humana,	Anti IgG humana
	Fc α específico	Fcμ específico	Fc γ específico
Producido en (especie)	Conejo	Conejo	Conejo
Marca comercial	Sigma Aldrich	Sigma Aldrich	Dako
Dilución utilizada	1:5.000	1:5.000	1:3.000

Una vez transcurrido ese tiempo, se colocaron 100 µl/pocillo de la dilución apropiada en buffer de dilución del anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa, correspondiente a cada isotipo a valorar. En el caso de los anticuerpos IgG se debe incubar por 1 hora a 37 °C, con agitación constante con suero normal de cabra al 1%. Posteriormente se incubaron las placas durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda.

Por último, se revelaron los ensayos agregando 200 µl/pozo de la solución de revelado. El tiempo que debe permanecer el sustrato en la placa se modificó según el anticuerpo a analizar. Se detuvo la reacción sembrando 50 µl/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se registró la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro para placas de ELISA (LabSystems Multiskan MS). Entre cada etapa del procedimiento se realizan 3 lavados de los pocillos utilizando 200 µl de buffer de lavado durante 5 minutos.

### 3.3.3. ELISA para valorar anticuerpos específicos

#### Anticuerpos específicos contra gliadina

Se utilizó un ELISA diseñado en el laboratorio para determinar los anticuerpos específicos contra gliadina nativa. Se preparó una solución stock de 500 mg/ml de gliadina en etanol al 60% utilizando gliadina comercial (Sigma-Adrich). Se filtró la solución utilizando papel de filtro y luego filtros esterilizantes (0.22 micras) de acetato de celulosa. Las soluciones se mantuvieron en observación a temperatura ambiente, y se valoró la concentración proteica periódicamente.

Se sensibilizaron placas de alta adherencia (Greinger Bio-one) con 100 µl/pocillo una solución de gliadina 5 µg/ml en PBS a partir de la solución madre y se incubó la placa a 4°C toda la noche en cámara húmeda. La placa fue incubada con 200 µl/pocillo de la solución de bloqueo durante 1 hora a 37 °C. Cien µl de las muestras fueron sembradas por pocillo en tres diluciones seriadas en el buffer de dilución y las placas incubaron toda la noche a 4°C. En cada placa se destinaron cuatro pozos al blanco conteniendo buffer de dilución en lugar de las muestras de estudio. También se incluyó una muestra como control interno, que consistió en una muestra de calostro con altos títulos de anticuerpos anti-gliadina. Una vez transcurrido ese tiempo, se colocaron 100 µl/pocillo del anticuerpo específico para el isotipo de inmunoglobulina a detectar, conjugado a peroxidasa, utilizando los mismos reactivos y concentraciones que para la determinación de anticuerpos totales por 1 hora a 37°C.

Por último, el revelado se realizó con la solución de revelado y se detuvo la reacción sembrando 50 µl/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se registró la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro para placas de ELISA (LabSystems Multiskan MS). Entre cada etapa del procedimiento se realizan 3 lavados de los pocillos utilizando 200 µl de buffer de lavado durante 5 minutos.

#### Anticuerpos específicos contra péptidos deamidados de gliadina

Se utilizó un kit comercial Quanta Lite® Gliadin IgA II ELISA (INOVA), que se basa en un ELISA utilizando péptidos de gliadina modificados in vitro por la reacción de deamidación catalizada por la enzima transglutaminasa tisular. Los resultados se expresaron de acuerdo a los lineamientos del kit utilizado para determinación de anticuerpos específicos en suero. Se calcularon las concentraciones en unidades arbitrarias, que se calculan en relación a un control débil suministrado por el kit que contiene 25 U.

#### Anticuerpos específicos contra Toxoides tetánico (TT)

Se procedió de forma análoga al ELISA descrito anteriormente para anticuerpos específicos contra gliadina, utilizando como antígenos inmovilizados una solución de toxoide tetánico en PBS (5µg/ml) preparado a partir de una solución stock donada por el Dr. Fernando Ferreira. Como estándar interno se utilizó un calostro con títulos altos de anticuerpos anti-toxoide tetánico previamente valorado en nuestro laboratorio (Rodríguez-Camejo, 2018).

Tabla 4. Diluciones utilizadas en las muestras de leche para detección de anticuerpos específicos contra gliadina y toxoide tetánico

Isotipo	Antígeno	
	Gliadina	Toxoide tetánico
IgA	1:100	1:100
IgM	1:20	1:20
IgG	1:20	1:60

Cálculo de los títulos de anticuerpos anti-gliadina y anti-toxoide tetánico.

Para ambos sistemas de detección los resultados se expresaron como títulos que se calcularon seleccionando una dilución única, habiendo comprobado por diluciones seriadas que no se encontraba en la zona de saturación. Las diluciones correspondientes a cada antígeno e isotipo se indican en la tabla 4. Se calcularon los títulos realizando una normalización respecto a un estándar interno utilizado en todas las placas.

### Anticuerpos específicos contra transglutaminasa tisular

El método para determinación de anticuerpos IgA específicos para la transglutaminasa tisular (tTG) en leche fue estandarizado en el Laboratorio de Inmunología por Pablo Bueno en el marco de un trabajo experimental desarrollado como parte de sus estudios de grado de la carrera de Químico Farmacéutico.

Se tomó como punto de partida el diseño del ELISA desarrollado en nuestro laboratorio para determinar anticuerpos anti-tTG en suero humano<sup>107</sup>. Las placas de máxima absorción se sensibilizaron con una solución de tTG comercial purificada de cobayo a una concentración de 10 µg/ml, 100 µl/pozo. Las etapas del ensayo se realizaron en forma similar que el ELISA para determinar anticuerpos específicos para gliadina, utilizando el mismo anticuerpo específico para IgA Fcα específico.

Como el ensayo no estaba validado para la detección de anticuerpos en la matriz leche, en una primera instancia se realizó el spiking de fase acuosa (FA) de leche de madre no celíaca, utilizando el suero de un paciente celíaco con alto título de anticuerpos de acuerdo a su valoración con un kit comercial (210 U). Una vez establecidas las condiciones del ensayo para obtener una consistencia entre el 80 y 120 % de recuperación, comparando los títulos de anticuerpos específicos en buffer de dilución respecto a una fase acuosa de leche diluida 1:50, se procedió a analizar el panel de muestras de estudio. Se sensibilizaron las placas con tTG de cobayo (Sigma Adrich) a una concentración de 10 µg/ml durante toda la noche a 4°C y se bloquearon con solución de bloqueo por 1 hora a 37°C. La detección se realizó con un anticuerpo secundario anti-IgA humana acoplado a peroxidasa (marca y dilución 1:4000). Por último, se revelaron los ensayos agregando 200 µl/pozo de la solución de revelado. El tiempo que debe permanecer el sustrato en la placa se modificó según el anticuerpo a analizar. Se detuvo la reacción sembrando 50 µl/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se registró la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro para placas de ELISA (LabSystems

Mulitskan MS). Entre cada etapa del procedimiento se realizan 3 lavados de los pocillos utilizando 200 µl de buffer de lavado durante 5 minutos.

Se construyó una curva de calibración con el suero humano diluido en FA, en diluciones seriadas desde 1:100, expresando los resultados en U y se calcularon las concentraciones de las muestras problema.

### 3.4. Determinación de gliadina soluble en leche

#### 3.4.1. Determinación de GLD o pGLD por ELISA competitivo diseñado en el laboratorio

##### Estandarización de un método de ELISA competitivo desarrollado

Para esta actividad se tomó como punto de partida el diseño de ELISA competitivo desarrollado en nuestro laboratorio durante la ejecución de un proyecto PAIE<sup>123</sup> (E. Villamil, 2014) para la detección de gliadina en alimentos sólidos. En este trabajo de tesis se optimizó el método, se adaptó y validó para determinación de gliadina en leche.

El protocolo básico previamente desarrollado consiste en sensibilizar las placas de poliestireno de alta adherencia (Greiner bio-one) con solución gliadina en etanol 60% (1 µg/ml) por incubación durante toda la noche a 4 °C y posterior bloqueo con la solución correspondiente. En paralelo, se hace una preincubación de cada muestra problema y las soluciones estándar de concentración conocida de gliadina o pGLD con una solución de un anticuerpo específico comercial producido en conejo (SIGMA, Product No. G 9144) en buffer de dilución, a una concentración previamente optimizada, durante 1 hora a 37 °C. Luego se incubó la placa a 4 °C toda la noche. La detección se completa con la incubación durante 1 hora a 37 °C con un anticuerpo secundario anti-inmunoglobulinas de conejo acoplado a peroxidasa. Por último, se revelaron los ensayos agregando 200 µl/pozo de la solución de revelado. El tiempo que debe permanecer el sustrato en la placa se modificó según el anticuerpo a analizar. Se detuvo la reacción sembrando 50 µl/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se registró la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro para placas de ELISA (LabSystems Mulitskan MS). Entre cada etapa del procedimiento se realizan 3 lavados de los pocillos utilizando 200 µl de buffer de lavado durante 5 minutos.

## Tratamiento de datos para ELISA competitivo

Para calcular el IC50 se calculó el valor de la concentración de la proteína que compete en fase líquida (ej. péptidos de gliadina) a la cual la DO disminuye un 50% respecto a los pozos incubados solo con el anticuerpo específico. Se utilizó el programa GraphPad Prism 6 para el análisis.

Por otro lado, para calcular el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) se utilizó el método de determinación del blanco, el cual se utiliza cuando la desviación estándar del blanco es distinta de cero. El límite de detección se expresa como la concentración del soluto correspondiente al valor del blanco sumado 3 desvíos estándar y el límite de cuantificación se expresa como la concentración del antígeno correspondiente al valor del blanco sumado a 10 desvíos estándar.

$$LOD = x + 3S$$

$$LOQ = x + 10S$$

Siendo  $x$  la media de la concentración del blanco y  $S$  la desviación estándar del blanco<sup>124</sup>.

En este trabajo se realizaron modificaciones al método inicial, en particular se optimizó la especificidad del método ya que fue necesario eliminar una reactividad cruzada con soja del anticuerpo comercial en uso. Además, se produjo un nuevo lote de péptidos de gliadina y se valoró el efecto de la matriz leche en la determinación, realizando una validación del método por spiking, que consiste en agregar concentraciones conocidas del componente a determinar a una muestra de la matriz en cuestión y realizar el ensayo. Se utilizaron seis muestras de FA de leche a las que se agregó pGLD a una concentración de 30 ppm. Para este ensayo se debe utilizar la muestra en la menor dilución posible ya que al diluir la muestra va desapareciendo el efecto matriz. Si bien esto puede ser una solución al efecto indeseado se debe buscar un equilibrio entre la solución al efecto y la dilución óptima para valorar el antígeno. Además de evaluar el efecto matriz, este ensayo permite validar el método, al cuantificar concentraciones conocidas del antígeno agregado a las muestras. Los valores de recuperación obtenidos en cada muestra individual se muestran en la tabla 8. El promedio de recuperación resultó ser 120 %. En general puede considerarse aceptable una

recuperación entre un 80 – 120% (Guidelines for Standard Method Performance Requirements AOAC Official Methods of Analysis (2016)).

### Preparación y caracterización de pGLD

Se produjeron hidrolizados de gliadina mediante digestión secuencial con pepsina-tripsina utilizando material apirógeno para controlar la contaminación con endotoxinas por un método estandarizado en el laboratorio.. Brevemente, se preparó una solución de gliadina comercial (Sigma) en ácido acético 1 M y pH=3 a una concentración de 10 mg/ml y se le agregó una solución de pepsina porcina (Sigma-Aldrich) a una relación de 1:1000 (enzima:proteína). Se incubó por 2 horas en agitación a 37 °C. Luego de llevar el pH a 6,5 con NaOH, 5 M, se agregó una solución de tripsina (0,25 mg en 1 l de NaCl, 0,15 M, pH= 6,5) y quimiotripsina (0,5 mg en 1 l de NaCl, 0,15 M, pH= 6,5) y se incubó por 2 horas a 37 °C. La reacción se detuvo con solución inhibidora de tripsina y quimiotripsina (0,5 mg en 1 l de NaCl, 0,15 M, pH= 6,6) y posteriormente se dializó contra agua por 24 horas.

Se determinó la concentración de péptidos mediante la técnica de Bradford utilizando BSA como proteína estándar. Se comprobó la digestión mediante un SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12%, según método estándar, comparando con gliadina nativa, sembrando 30 µg de proteína por carril. El gel fue revelado con la técnica estándar de tinción con plata.

### Reactividad del anticuerpo anti-GLD contra los péptidos de gliadina producidos (pGLD)

Para corroborar la unión entre el anticuerpo específico contra gliadina y el hidrolizado de péptidos de gliadina producidos se utilizó método de ELISA. Para esto se sensibilizó la placa con la solución de péptidos de gliadina a 1 µg/ml toda la noche a 4 °C, se bloqueó la placa con solución de bloqueo por 1 hora a 37°C, y se incubó con el anticuerpo anti-gliadina comercial en diluciones seriadas a partir de 1:5.000 en buffer de dilución por 1 hora a 37 °C. La detección se realizó con un anticuerpo contra inmunoglobulinas de conejo conjugado a peroxidasa a una dilución de 1:2000. Por último, se reveló el ensayo agregando 200 µl/pozo de la solución de revelado. El tiempo que debe permanecer el sustrato en la placa se modificó según el anticuerpo a analizar. Se detuvo la reacción sembrando 50 µl/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se registró la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro para placas de ELISA (LabSystems Multiskan MS). Entre cada etapa del

procedimiento se realizan 3 lavados de los pocillos utilizando 200 µl de buffer de lavado durante 5 minutos.

### Estandarización del ELISA competitivo utilizando los pGLD producidos

En primera instancia se verificó que los pGLD en fase soluble fuesen capaces de inhibir el reconocimiento de la GLD en fase sólida por el anticuerpo comercial. Para ello se sensibilizó una placa de 96 pocillos con 1 µg/ml de gliadina nativa y se bloqueó la placa con solución de bloqueo. La concentración del anticuerpo comercial contra pGLD fue determinada en base a los resultados obtenidos en el ELISA directo de reactividad del anticuerpo comercial contra los pGLD en fase sólida. Para verificar la inhibición de la reactividad del anticuerpo anti-gliadina por los pGLD, se realizó la preincubación con los pGLD a una concentración de 200 µg/ml en buffer de dilución durante 1 hora a 37 °C y luego se transfirió 100 µl a la placa sensibilizada por 2 horas a 37 °C. Luego se incubó con un anticuerpo contra gamaglobulinas de conejo acoplado a peroxidasa (1:3.000) por 1 hora a 37 °C. El ensayo se reveló agregando 200 µl/pozo de la solución de revelado. El tiempo que debe permanecer el sustrato en la placa se modificó según el anticuerpo a analizar. Se detuvo la reacción sembrando 50 µl/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se registró la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro para placas de ELISA (LabSystems Multiskan MS). Entre cada etapa del procedimiento se realizan 3 lavados de los pocillos utilizando 200 µl de buffer de lavado durante 5 minutos.

### Control de la reactividad cruzada frente a proteínas de soja

Para los ensayos se utilizaron varios extractos de proteínas de soja producidos en el Laboratorio de Ciencia y Tecnología de los Alimentos en Facultad de Química (cedidos por el Dr. Luis Panizzolo y Dra. C. Abirached). Se trabajó con tres extractos crudos (PS1, PS2 y PS3) y dos enriquecidos en las fracciones proteicas más abundantes en la soja: beta-conglicinina (7s) y glicinina (11s).

La concentración proteica de los extractos de soja se realizó mediante el método del ácido bicinonínico mediante el kit QuantiPro™ BCA (Sigma Aldrich), procediendo según las instrucciones del fabricante y utilizando BSA como estándar. Para el análisis los extractos de soja liofilizados se disolvieron en PBS, realizando diluciones seriadas partir de 10 µg/ml para su análisis.

Se realizó el mismo modelo de ELISA competitivo, aunque con una modificación: En la etapa de preincubación del anticuerpo anti-gliadina con pGLD, se adicionó los péptidos de soja. La placa fue sensibilizada y bloqueada tal como se describió anteriormente. En paralelo, el anticuerpo específico contra gliadina se utilizó en una dilución 1:5000 en el buffer de dilución y se realizó la preincubación por 1 hora a 37°C con los extractos de soja en varias diluciones en el rango comprendido entre 30 - 0,23 µg/ml o las soluciones de pGLD. Se transfirió 100 µl a la placa sensibilizada con GLD y se incubó por 2 horas a 37 °C. Por último, el ensayo se reveló agregando 200 µl/pozo de la solución de revelado, se detuvo la reacción sembrando 50 µl/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se registró la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro para placas de ELISA.

Se calcularon los IC<sub>50</sub> de las curvas correspondientes a las incubaciones con pGLD y extractos de soja. Para evaluar si la competencia o reactividad cruzada que se produce por los péptidos de soja es significativa se calculó la relación entre el IC<sub>50</sub> de la curva con soja y el IC<sub>50</sub> de la curva con pGLD. Se consideró un valor de 14 (expresado en %) para considerar significativa la competencia con los péptidos de soja.

#### Evaluación del efecto matriz

El método del ELISA del cual se partió para realizar la puesta a punto fue propuesto para alimentos sólidos en los cuales se realizaba una extracción con solvente para luego cuantificar la proteína solubilizada. Sin embargo, en este caso, la muestra que se analizará es líquida y de composición compleja por lo que se debe validar el método mediante spiking. Se calcula el porcentaje de recuperación, comparando con el valor teórico de acuerdo a la cantidad agregada del soluto a determinar. Se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de recuperación} = \frac{[M + S] - [M]}{[S]} \times 100$$

Donde [M+S] es la medida de la concentración de la muestra con el spiking, [M] es la concentración original de soluto en la muestra y [S] es la concentración de soluto agregado.

Idealmente este porcentaje sería un 100%, pero los valores aceptados son entre un 80% y un 120%. Fuera de ese rango, se considera que la matriz de la muestra está afectando la cuantificación del antígeno.

### 3.4.2. Determinación de GLD por método comercial

Se utilizó un kit comercial cuyo uso está destinado a la detección de gliadina en alimentos que que sufrieron procesos de hidrólisis o fermentación (RIDASCREEN® Gliadin competitive, Cod. R7021), si bien no se ha reportado su uso específico para leche materna. El método consiste en establecer competencia entre una solución conteniendo hidrolizados de prolaminas de trigo, cebada y centeno, generadas por digestión con pepsina y tripsina producidos por el grupo de trabajo del Dr.Köhler (German Research Centre for Food Chemistry) y la gliadina adsorbida en la fase sólida, la detección se realiza con un anticuerpo monoclonal R5 acoplado a peroxidasa. El anticuerpo R5 detecta principalmente el motivo QQPFQ, y otros relacionados que están presentes en forma repetida en el péptido inmunodominante 33-mer<sup>125</sup>. El ensayo utiliza como estándar para la curva de calibración las soluciones de hidrolizados de cereales TACC en el rango entre 10 y 270 ng/ml. La muestra se diluye para su análisis en un buffer de extracción, resultando una dilución final 1:500. Finalmente, el límite de cuantificación de gliadina es 5 mg/L (5 ppm en el alimento).

### 3.5. Determinación de componentes inmunoreguladores en la leche

#### 3.5.1. Determinación de complejos inmunes específicos contra gliadina de isotipo IgA

Se sensibilizaron placas de microtitulación con una solución de anticuerpos específicos para gliadina (marca) a una concentración de 5µg/ml toda la noche a 4 °C. Se descartó la solución y se bloquearon las placas con PBS-BSA 1%. Se sembraron las muestras de leche utilizando diluciones de 1:2 para inmunocomplejos de isotipo IgG y 1:10 para los de isotipo IgA. Se incubaron toda la noche a 4 °C. Se incubó por 1 hora a 37 °C con 100 µl/pocillo de una solución de los conjugados específicos para cada isotipo conjugados a peroxidasa, preincubados con suero normal de conejo al 1% en PBS por 1 hora a 37 °C. Luego se reveló el ensayo con TMB, como se describió anteriormente, y se detuvo la reacción con 50 µl/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### 3.5.2. Determinación de citoquinas, quimioquinas, receptores solubles y otros factores

Se realizó mediante ensayos de ELISA de captura utilizando reactivos comerciales. Los kits utilizados proporcionan los reactivos básicos para el ensayo que consisten en: un anticuerpo monoclonal o policlonal inmovilizado en la fase sólida, un anticuerpo policlonal específico biotinilado (producido en cabra o conejo), la proteína recombinante y estreptavidina peroxidasa como sistema de detección.

Tabla 5. Componentes analizados mediante kits comerciales. Se indica el rango de detección del método y la dilución a la cual la muestra fue analizada.

Componente a analizar	Rango de detección (pg/ml)	Dilución de la muestra
IL-6	9.38 – 600	S/D
IL-8/CXCL8	31.2 – 2000	1:2
TNF- $\alpha$	15.6 – 1000	S/D
IL-10	31.2 – 2000	S/D
CCL20/MIP-3 $\alpha$	15.6 – 1000	S/D
sCD14	62.5 – 4000	1:1000
sTLR2	125.0 – 8000	S/D
TGF- $\beta$ 2	31.0 – 2000	1:1,8
TFF3	7.8 – 500	S/D
ELISA development Kit (PeproTech)		
CCL2/MCP-1	10.3 – 250	S/D
EGF	0 – 1000	1:50
IL-12	62.5 – 8000	S/D

En todos los casos se utilizaron microplacas de alta adherencia NUNC para la inmovilización del anticuerpo de captura a la concentración recomendada.

El desarrollo de color se realizó en la mayoría de los ELISA con TMB tal como se describió previamente para los ensayos de ELISA desarrollados en el laboratorio, al igual que las soluciones

utilizadas para dilución de muestras, reactivos y lavados. En casos excepcionales se utilizó ATBS según recomendaciones del fabricante Peprotech (se indican en tabla 5).

Las concentraciones de uso de los anticuerpos y del rango de las proteínas recombinantes utilizadas como para las curvas de calibración fueron utilizadas según instrucciones del fabricante. Las diluciones apropiadas para la valoración de cada citoquina en muestras de leche madura fueron puestas a punto previamente por nuestro equipo de investigación y se indican en la tabla 5.

### 3.6. Ensayos con modelos celulares in vitro para evaluar efectos biológicos de la FA de la leche

La estrategia de trabajo consistió en someter cultivos de células de epitelio intestinal a diferentes estímulos y una vez estandarizadas las condiciones experimentales para obtener un efecto medible estudiar el efecto modulador de la FA de la leche de MC en comparación con la correspondiente a MS.

Para esta etapa del trabajo, no se utilizaron muestras individuales sino pools de muestras de cada grupo y subgrupo de estudio. En la tabla 6 se muestran los buffers que se utilizaron para los ensayos in vitro y la composición de los mismos.

#### Estímulos inflamatorios. IFN- $\gamma$ y TNF- $\alpha$

El IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  utilizado fueron adquiridos en Peprotech. En ambos casos se utilizó para los ensayos in vitro una concentración final de 1 ng/ml.

#### Péptidos de gliadina.

Se utilizó la preparación de péptidos de gliadina (pGLD) obtenidos por digestión (sección 3.4) la cual fue esterilizada por filtración para utilizar en los cultivos celulares.

Además, se utilizaron péptidos sintéticos de gliadina (psGLD) que se mandaron a sintetizar por SBS Genetech Co., Ltd. con secuencias seleccionadas en base a trabajos previos en los que mostraron distintos efectos sobre células epiteliales, así como en células del sistema inmune innato<sup>6</sup>.

Las secuencias y las denominaciones son las siguientes: LGQQQPFPPQQPY (P31-43), PQPQLPYPQ (P2) y QLQFPQPQLPY (P9). Los péptidos liofilizados fueron conservados a -80 °C hasta su uso y reconstituídos en DMSO según instrucciones del fabricante obteniendo una solución stock de 2 mg/ml.

Tabla 6. Composición de las distintas soluciones utilizadas en los ensayos in vitro	
<b>Solución crioprotectora</b>	
DMSO	
10 % SFB	
<b>Medio de cultivo HT-29 y HT-29-GFP</b>	
RPMI	
10 % SFB	
1% Penicilina	
1% Estreptomicina	
<b>Medio de cultivo Thp-1</b>	
RPMI	
10 % SFB	
Piruvato de sodio 0,001%; glutamina 0,0025%; β-mercaptoetanol 5 mM	
1% Penicilina	
1% Estreptomicina	
<b>Solución de tripsina</b>	
0,25% tripsina	
H2O	
<b>Solución de azul de tripán</b>	
0,5% azul tripán	
PBS	
<b>Ioduro de propidio</b>	
Ioduro de propidio 20	
<b>Buffer FACs</b>	
PBS	
0,02% BSA	

Líneas celulares.

Se utilizaron dos tipos celulares: la línea comercial HT-29 derivada de adenocarcinoma de colon (ATCC®) y células reporteras estables HT-29-NF-κB-GFP F6 (Green Fluorescent Protein) generadas

en la Unidad de Biología Celular del Institut Pasteur de Montevideo<sup>126</sup>. En este caso, las células HT-29 están transfectadas con el plásmido pNF- $\kappa$  B-hrGFP; el gen reportero de la GFP se expresa bajo el control de un promotor que contiene múltiples sitios de unión a NF- $\kappa$ B. El plásmido codifica para un gen que confiere resistencia a la higromicina bajo la regulación del promotor de la timidina quinasa que permite la selección de las células transfectadas en forma estable. La activación de la vía NF-  $\kappa$ B puede ser analizada mediante citometría de flujo o microscopía.

Preservación y condiciones de cultivo de las líneas celulares HT-29 y HT-29-GFP.

Ambas líneas celulares se conservaron mediante congelación en una solución crioprotectora. Para el procedimiento de congelación se utilizó una cámara con isopropanol que permite el enfriamiento de las células a 1 °C por minuto, previniendo un shock térmico. La concentración de células por vial de congelamiento fue de  $3 \times 10^6$  células/ml y se conservaron en nitrógeno líquido. Para el descongelado se colocó un criotubo en un baño de agua a 37 °C y rápidamente se resuspendieron las células en medio de cultivo. Las células fueron centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos y el medio fue descartado. El pellet resultante se resuspendió en medio de cultivo. El recuento celular se realizó con cámara de Neubauer y la viabilidad celular se controló con solución de azul de tripan.

Ambos tipos celulares se mantuvieron en cultivo en botellas de 25 cc Greiner bio-one (F 010 013) durante su expansión y generación de un banco de trabajo. Se cultivaron con medio de cultivo en incubador a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. En el caso de las HT-29-NF- $\kappa$ B-GFP F6 además se incorporó higromicina (1:666) cada 15 días para mantener la selección de las clonas transfectadas.

Se utilizaron como máximo 8 pasajes de la línea celular, tal como se menciona en las indicaciones del productor.

### 3.6.1. Metodología general de los ensayos in vitro para HT-29 y HT-29-GFP

En una placa de 96 pocillos (Greiner bio-one - Cod: 655-180) se sembraron 50.000 células/pocillo con medio de cultivo en un volumen de 200  $\mu$ l y se mantuvieron durante 24 horas a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub>. Una vez confirmado el crecimiento confluyente, se descartó el medio y se sembraron los distintos estímulos en 200  $\mu$ l de medio fresco para evaluar los efectos sobre las células. Los ensayos se realizaron en pozos por triplicado dejando igual número de pocillos como control. Los estímulos utilizados fueron: TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y psGLD.

[55]

Para el análisis de los efectos moduladores de la leche, se compararon los resultados obtenidos con y sin preincubación con la leche. Las condiciones específicas se indican a continuación en cada sección.

Los efectos estudiados con las células HT-29 fueron la evaluación de la expresión de HLA-DR inducida por IFN- $\gamma$  y pGLD, y la producción de IL-8 y TNF- $\alpha$  inducida por IFN- $\gamma$  y pGLD. También se incubaron células Thp-1 con el sobrenadante de HT-29 estimuladas por 24 horas con IFN- $\gamma$  y pGLD y se evaluó la producción de IL-8 y TNF- $\alpha$ . Por otra parte, en cuanto a la línea celular HT-29-GFP se analizó la activación de la vía inflamatoria NF- $\kappa$ B.

### 3.6.2. Evaluación de la expresión de HLA-DR inducida por IFN- $\gamma$ y pGLD

En la etapa de estandarización se estimuló las células con IFN- $\gamma$  rh en las concentraciones 1 y 10 ng/ml. Se dejaron células sin estimular como control. Luego de 24 hs de incubación se cosecharon las células utilizando solución de tripsina, y tras un lavado con PBS se realizó el inmunomarcado por metodología estándar para moléculas de superficie<sup>127</sup> utilizando 200.000 células correspondientes a 4 pozos de la misma condición en cuanto a estímulo. El marcaje se realizó con un anticuerpo monoclonal FITC Mouse Anti-Human HLA-DR (Biolegend) en un volumen de 100  $\mu$ L de PBS-BSA 1% a una dilución de 1:25 y se incubó durante 30 minutos en hielo y oscuridad. Luego se realizó un lavado con PBS-BSA 1% frío previa centrifugación por 5 minutos a 260 g. Se descartó cuidadosamente el líquido por volcado, y las células se resuspendieron en 300  $\mu$ L de buffer FACs para la adquisición en el citómetro de flujo (BD FACSCalibur™, BD Biosciences). Se realizó la adquisición de 10000 eventos en un gate seleccionado en el FSC-SSC dot plot teniendo en cuenta la exclusión de las células muertas mediante tinción con Ioduro de Propidio. Como control isotópico se utilizó un anticuerpo contra IgG2a de ratón Serotec (MCA292F).

Luego de seleccionadas las condiciones óptimas para la inducción de la expresión de HLA-DR se realizó el ensayo descrito, incorporando pozos con una preincubación de 6 horas con solución acuosa de leche, previamente esterilizada por filtración. Se analizó el incremento de la expresión de HLA-DR en cada caso y los resultados se expresaron normalizados sobre la condición basal (células sin estimular).

### 3.6.3. Producción de IL-8 y TNF- $\alpha$ por células HT-29

Se separaron los sobrenadantes de cultivo de las células HT-29 incubadas en condiciones basales y en presencia de los estímulos IFN- $\gamma$  y pGLD por 24 horas. Se recolectaron los sobrenadantes y se centrifugaron a 3000 g por 5 minutos. Se almacenó en alícuotas a -80 °C para su posterior análisis. Los sobrenadantes fueron diluidos en PBS-BSA 0,02% Tween 0,01% para su valoración por ELISA de captura utilizando kits comerciales PeproTech.

Para analizar los efectos moduladores de la leche se procedió de igual forma realizando una incubación de diluciones 0,02% de leche, durante 6 hs, previo al agregado del estímulo inflamatorio. La concentración de leche utilizada fue puesta a punto en el laboratorio por el Lic. Claudio Rodríguez, ya que la incubación de células HT-29 con un 1% de leche generó una producción significativamente mayor a las células sin estimular.

### 3.6.4. Activación de la vía inflamatoria NF- $\kappa$ B en las células HT-29-GFP

En una placa de 96 pocillos se sembraron 50.000 células/pocillo en medio RPMI completo. Luego de verificar crecimiento confluyente a partir de las 24 horas se renovó el medio de cultivo y se incorporaron los estímulos detallados a continuación en pozos por triplicado, dejando pozos control. Se utilizaron concentraciones de 1 y 10 ng/ml para el TNF- $\alpha$ . Los psGLD se utilizaron a una concentración de 200  $\mu$ g/ml. Además, debido al posible efecto sinérgico entre citoquinas inflamatorias y péptidos de gliadina se realizó el ensayo combinando la presencia de ambos componentes: TNF- $\alpha$  + péptidos de gliadina o IFN- $\gamma$  + péptidos de gliadina.

Luego de 24 horas de incubación las células fueron cosechadas con solución de tripsina y se agregó 300  $\mu$ l de buffer FACs para su posterior análisis por citometría de flujo.

En una etapa posterior para analizar el potencial efecto modulador de la leche sobre la activación inducida por los estímulos, se incubaron soluciones de fase acuosa de leche previamente esterilizadas por filtración, a una dilución 1% durante 6 horas y posteriormente se agregaron los estímulos que indujeron activación de la vía NF- $\kappa$ B durante 18 hs adicionales, en las concentraciones determinadas como óptimas. Las células se cosecharon como se describió anteriormente, se lavan y se analizan por citometría de flujo utilizando PBS-BSA 0.02% para la resuspensión y análisis de las células.

Para el análisis de la activación de la vía NF- $\kappa$ B por citometría de flujo se utilizó un BD FACSCalibur™ (BD Biosciences) equipado con láser 488 nm. Se realizó la adquisición, utilizando el software CellQuest, de 10.000 eventos en un gate seleccionado en el FSC-SSC dot plot teniendo en cuenta la exclusión de las células muertas mediante tinción con Ioduro de Propidio.

Los umbrales de fluorescencia se definieron con los pozos control (sin estímulo). Los resultados se expresaron como la relación entre el porcentaje de células GFP positivas de los pozos con los estímulos respecto al porcentaje de células GFP positivas en los pozos control. Se utilizó el software libre Flowing para el análisis.

### 3.7. Tratamiento estadístico

#### Análisis univariable

Se constató para la mayoría de las variables estudiadas una distribución no normal (test de Shapiro Wilk), por lo que se utilizaron tests no paramétricos para comparar las concentraciones de cada componente analizado en los grupos de MS, MC y los subgrupos de acuerdo al tiempo de lactancia. Se utilizó Mann-Whitney y Kruskal-Wallis para comparación muestras independientes de dos y más grupos respectivamente. Para analizar la asociación entre dos variables continuas se utilizó el test de correlación de Spearman y para variables categóricas el test de asociación de Chi cuadrado.

Cuando en algunas variables experimentales no se detectaron niveles significativos en una proporción importante de las muestras, se realizó análisis de variables dependientes categóricas binarias; se utilizó la Prueba exacta de Fisher para tablas de contingencia 2x2 o la Prueba de Mantel-Haenszel cuando se analizaban más de dos muestras independientes.

Para los estudios con células, en los que se desarrollaron al menos tres réplicas de cada condición experimental en un mismo ensayo utilizando las líneas celulares HT-29- GFP o HT-29, se asumió normalidad y se utilizó el test ANOVA y el test de Holm-Sidak para las diferencias entre grupos.

#### Análisis con variables múltiples

Para las variables inmunológicas categóricas se realizó un análisis descriptivo exploratorio por componentes principales utilizando el paquete estadístico FactoMineR.

Para analizar las potenciales asociaciones entre las variables inmunológicas (categóricas) con la condición de salud y el tiempo de lactancia de las donantes que integran los grupos de estudio, se utilizaron modelos de regresión logística binaria utilizando el software R.

El nivel de significancia estadística para cada test se indica en los gráficos o tablas utilizando el siguiente código: \*  $0.01 < p \leq 0.05$ , \*\*  $0.001 < p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ . Las tendencias se muestran en los gráficos con líneas punteadas y representan valores de p entre 0.05 y 1.

## 4. Resultados

### 4.1 Características del grupo de estudio

Un total de 37 MC donaron leche para el estudio. Varias de las madres donaron leche en distintos tiempos posparto, por lo cual se dispone de más de 37. De todas formas, solo una muestra de cada madre fue utilizada para los ensayos en esta investigación, el criterio para seleccionar la muestra de estudio fue equiparar el número de muestras entre subgrupos de estudio. Dos muestras se debieron retirar del estudio al tratarse de calostro, ya que fue imposible generar un grupo de este periodo de lactancia que presenta propiedades muy particulares. Por otro lado, se excluyeron 2 muestras correspondientes a madres diagnosticadas con sensibilidad al gluten, pero no con enfermedad celíaca. Finalmente, se utilizaron para este estudio un total de 33 muestras de MC y 41 de MS.

En el caso de las MC se mantuvo una breve entrevista para corroborar los requisitos solicitados para formar parte del estudio. Los datos obtenidos con respecto a la edad, factores relacionados con la enfermedad celíaca y aspectos relacionados con la gestación se encuentran en la tabla 7. Todas las madres realizaban una dieta libre de gluten por lo menos hace 2 años, coincidiendo el comienzo la misma con el momento del diagnóstico. De todas las MC, un 10% reconoce haber trasgredido la dieta durante el período de embarazo o lactancia. Además del gluten, solo 5 madres tenían restricciones en su dieta siendo los únicos alimentos la leche de vaca y la glucosa.

Con respecto al diagnóstico, un gran porcentaje de las madres no recordaba la serología al momento del mismo. En cuanto a las MC con serología positiva (44,4%), todas presentaron los 3 tipos de anticuerpos utilizados para el diagnóstico: IgA anti transglutaminasa, IgA anti péptidos deamidados de gliadina e IgA anti endomisio. Es importante aclarar que ninguna de las madres en el estudio tenía insuficiencia de IgA. Ninguno de los niños nacidos fue prematuro, considerando esta condición como niños nacidos previo a la semana 37 de gestación.

Tabla 7. Datos generales del grupo de estudio de MC y MS. Se muestra la edad en formato mediana y rango. El resto de las características se expresan en porcentaje con respecto al total de madres.

	MC n= 33	MS n= 41
Edad (años)		
Mediana ± rango	32 (18-40)	31 (18-41)
Edad gestacional (%)		
Nacimiento a término	100	100
Nacimiento prematuro	0	0
Semanas de gestación (%)		
37	6	4
37 a 40	50	88
>40	44	8
Años en DLG (%)		
<2	0	-
>2	44	-
>6	56	-
Otras restricciones alimentarias (%)		
Leche de vaca	6	8
Glucosa	11	0
Anticuerpos positivos en diagnóstico (%)		
IgA anti transglutaminasa	44	-
Anti péptidos deamidados	44	-
Anti endomisio	44	-
No sabe	56	-

## 4.2. Caracterización de macronutrientes en leche materna

Inicialmente se decidió estudiar el aporte de macronutrientes en la leche de MS y de madres con EC. Si bien en términos generales el estado nutricional de la madre no suele afectar en gran medida el aporte de macronutrientes de la leche para preservar la nutrición del infante, las posibles diferencias en la fisiología de la GM en los grupos de estudio podrían reflejarse en el contenido de algún componente mayoritario. Como punto de partida de la caracterización de la leche nos interesó explorar el aporte energético y los componentes mayoritarios que contribuyen con el mismo: proteína, lactosa, y grasa (figura 12). Estos parámetros fueron valorados por un analizador automático (Lactoscan®), que requiere de un volumen de entre 4 y 5 ml por muestra. Debido a lo anterior, se trabajó con las muestras cuyos volúmenes permitieron el análisis.

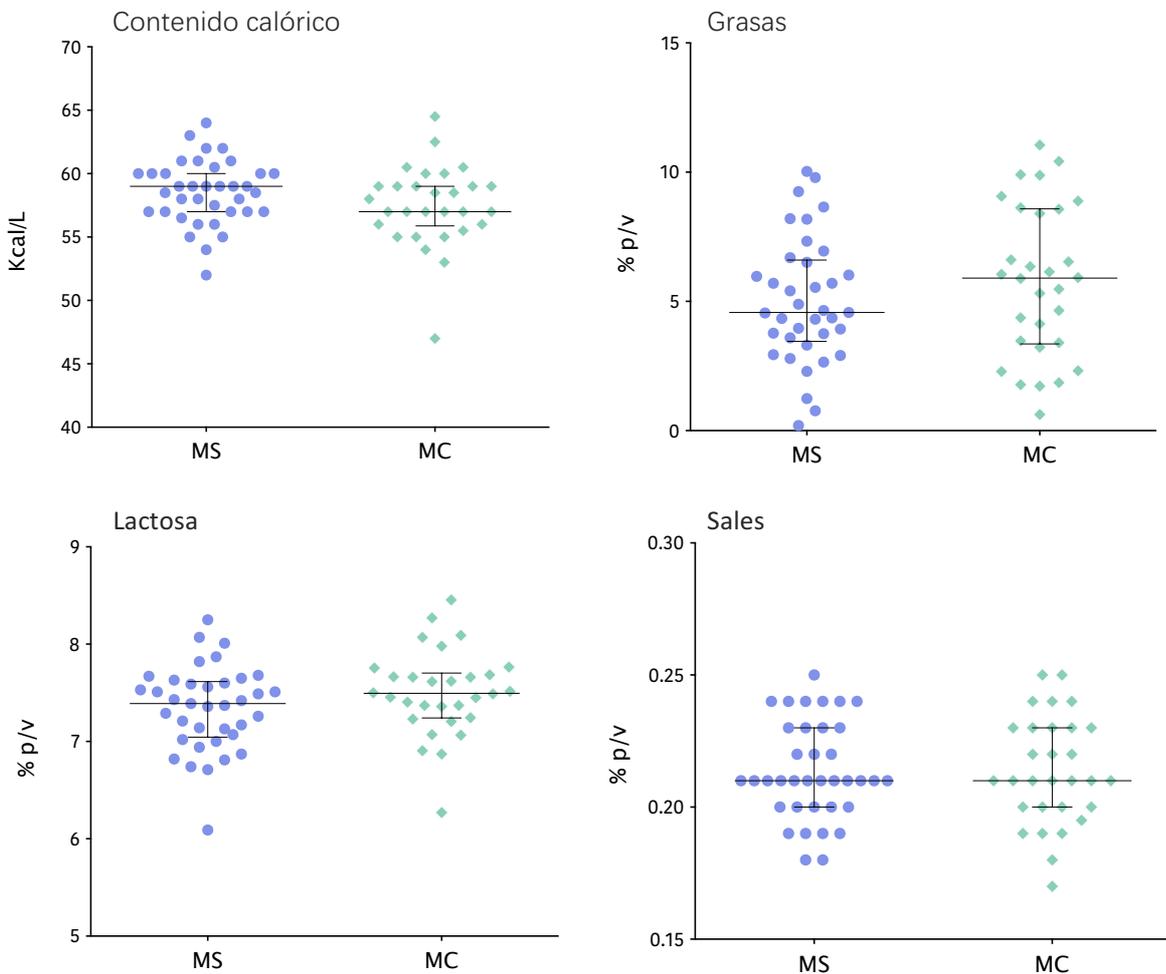


Figura 10. Medida de contenido calórico, grasa, lactosa y sales en leche entera. Para cada componente se muestran los valores de concentración obtenidos para cada muestra individual. Se indican las medianas y rangos intercuartiles para cada grupo (25 – 75 %).

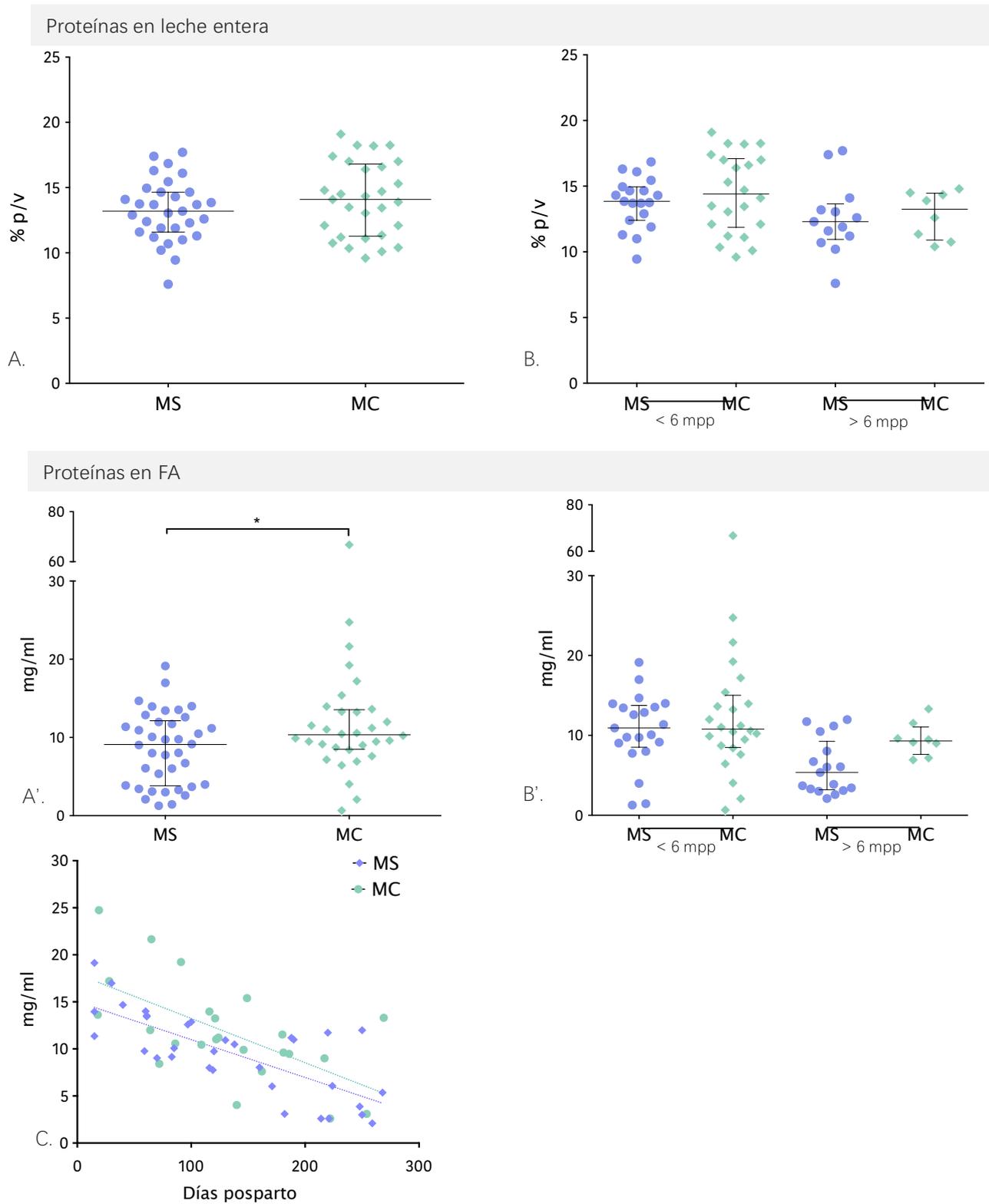


Figura 11. Proteínas totales en leche entera y proteínas de FA. En A. y A' se observan los valores de concentración proteica obtenidos en leche entera en cada muestra individual del grupo de MC y MS. En B. y B' se observan los mismos resultados separando a las muestras de acuerdo al período de lactancia en el que fueron obtenidas: antes de los seis meses post parto (<6m) o posteriormente (>6m). En C. se muestra la concentración proteica de cada muestra individual con el día de correspondiente a su extracción y las líneas punteadas indican tendencias correspondientes a proteínas en fase acuosa. Se indican las medianas y rangos intercuartiles para cada grupo (25 – 75 %). Las barras horizontales y asteriscos indican diferencias.

Los principales componentes que aportan calorías a la leche (grasas y lactosa) no mostraron diferencias significativas en el aporte energético. En cuanto a las sales, el interés se centró principalmente en su posible relación con el estado de la glándula mamaria, ya que los estados inflamatorios pueden causar desbalances en iones mayoritarios como sodio, cloruro y potasio.

De todas formas, en ninguna de las determinaciones anteriores se encontraron diferencias significativas en cuanto a los valores medidos (lactosa, contenido graso ni sales) tanto en los grupos totales (figura 12.) como los subgrupos de acuerdo al tiempo de lactancia (datos no mostrados).

La concentración total proteica fue valorada tanto por (Lactoscan®) como por la técnica Bradford. La valoración por Lactoscan® requiere de una muestra de leche entera, es decir, tanto la fase acuosa como la fase lipídica de la misma. Para realizar el método de Bradford, se utiliza solamente la fase acuosa (FA) debido a interferencias que se presentan con los lípidos y otros componentes, por lo que los resultados obtenidos en este método excluyen la concentración proteica presente en la fase grasa.

La concentración proteica medida por Lactoscan® no presenta diferencias significativas en relación a la condición de salud materna, ni en cuanto al tiempo posparto (figura 13).

Sin embargo, la valoración de muestras realizadas por Bradford arrojó resultados diferentes. La fase acuosa de la leche muestra un contenido mayor en la muestra de MC, acentuándose esta diferencia en el período mayor a 6 meses posparto (figura 13).

A su vez, como la composición de la leche es variable con el tiempo, a pesar de no disponer de un seguimiento individual resultó de interés visualizar comparativamente la dinámica de la concentración de proteínas a lo largo del tiempo en ambos grupos (figura 13-C). Si bien se constató una tendencia a la disminución durante el primer año de lactancia en ambos grupos, la gran variabilidad interindividual en la composición de la leche no permite establecer si las cinéticas son diferentes.

Considerando que el analizador automático es de uso rutinario en el BLH, y que la mayor parte de proteínas con valor bioactivo se encuentran en la fase acuosa, se analizó la correlación entre ambos métodos. Como se indica en la figura 14 se obtuvo correlación positiva significativa utilizando el Test de Spearman ( $r= 0,385$   $p=0,0043$ ).

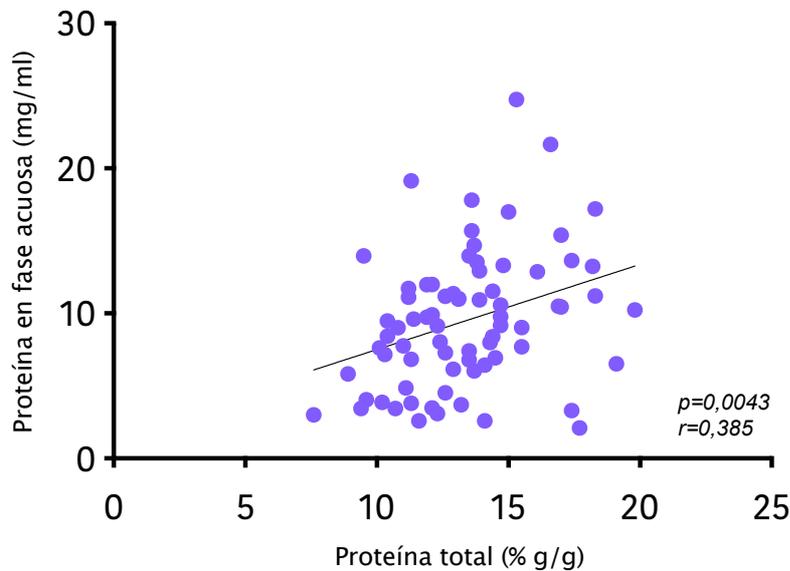


Figura 12. Estudio de correlación entre las proteínas en fase acuosa (mg/ml) y proteínas totales (% p/v) tomando en cuenta la totalidad de las muestras de estudio.

### 4.3. Análisis de componentes inmunológicos

#### 4.3.1 Anticuerpos totales

Inicialmente, se cuantificó la concentración de anticuerpos totales de isotipos IgA, IgM e IgG en la fase acuosa de la leche. En cuanto a la IgA (figura 15 A<sub>A</sub>, B<sub>A</sub> y C<sub>A</sub>) se observó una concentración significativamente mayor en la leche de MS.

Esta diferencia se acentúa en el período posterior a 6 meses posparto. En cuanto a las concentraciones de IgM se reproduce el comportamiento observado para la IgA (figura 15 A<sub>M</sub>, B<sub>M</sub> y C<sub>M</sub>) en las muestras posteriores a los 6 meses con una diferencia significativa. En contraste a lo observado con los anticuerpos secretorios, el análisis de IgG mostró un comportamiento diferente,

ya que no se observaron diferencias significativas con respecto a la concentración entre ambos grupos independientemente del tiempo de extracción (figura 15 A<sub>G</sub>, B<sub>G</sub> y C<sub>G</sub>).

#### 4.3.2. Anticuerpos específicos

##### Anticuerpos específicos contra gliadina

Se analizó el nivel de los anticuerpos específicos contra gliadina, de los isotipos IgA, IgM e IgG tanto en los grupos totales de MS y MC como en los subgrupos de acuerdo al tiempo posparto. Los anticuerpos IgM de MC mostraron una tendencia al aumento con respecto a las MS; por otro lado, los anticuerpos de isotipo IgG son significativamente menores en madres con EC. Este comportamiento se destaca particularmente después de los 6 meses posparto (figura 16).

Al normalizar los anticuerpos específicos anti gliadina de cada muestra respecto a los anticuerpos totales respectivos, se observó que los anticuerpos IgM presentan una contribución significativamente mayor en MC. El aumento significativo en el grupo posterior a los 6 meses, no solo se evidencia en estos anticuerpos, sino también en los de isotipo IgA. Por otro lado, la contribución de los anticuerpos específicos IgG es menor en las MC, tanto en el grupo total, como en el grupo posterior a los 6 meses (figura 17).

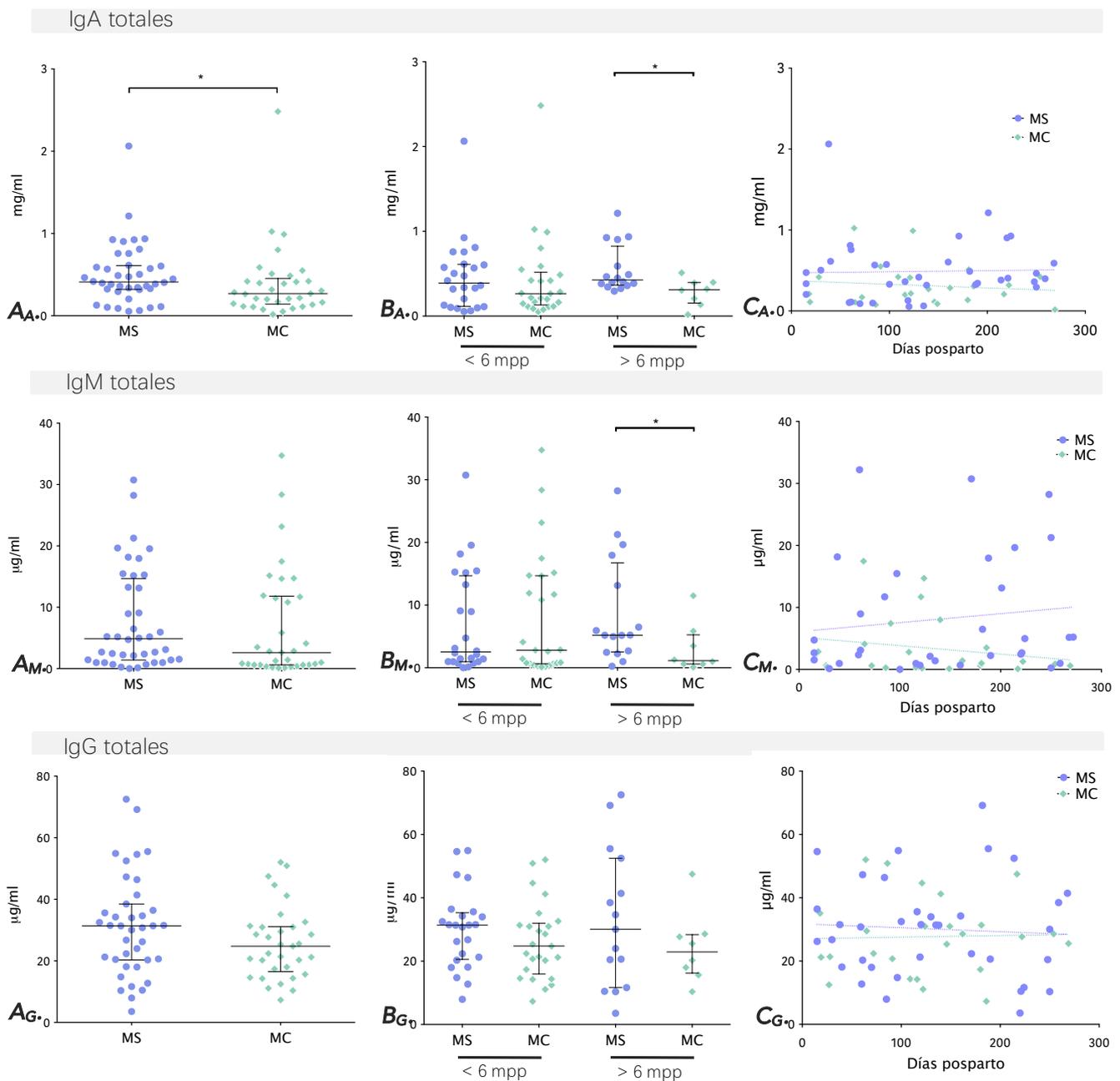


Figura 13. Anticuerpos totales. En  $A_A$ ,  $A_M$  y  $A_G$  se observan las concentraciones de IgA, IgM e IgG respectivamente para las muestras individuales del grupo de MC y MS. En  $B_A$ ,  $B_M$  y  $B_G$  se observan los mismos resultados separando a las muestras de acuerdo al período de lactancia en el que fueron obtenidas: antes de los seis meses post parto (<6m) o posteriormente (>6m). En  $C_A$ ,  $C_M$  y  $C_G$  se muestra la concentración de anticuerpo de cada muestra individual de acuerdo al día correspondiente a su extracción y las líneas punteadas indican tendencias. Se indican las medianas y rangos intercuartiles para cada grupo (25 – 75 %). Las barras horizontales y asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos.

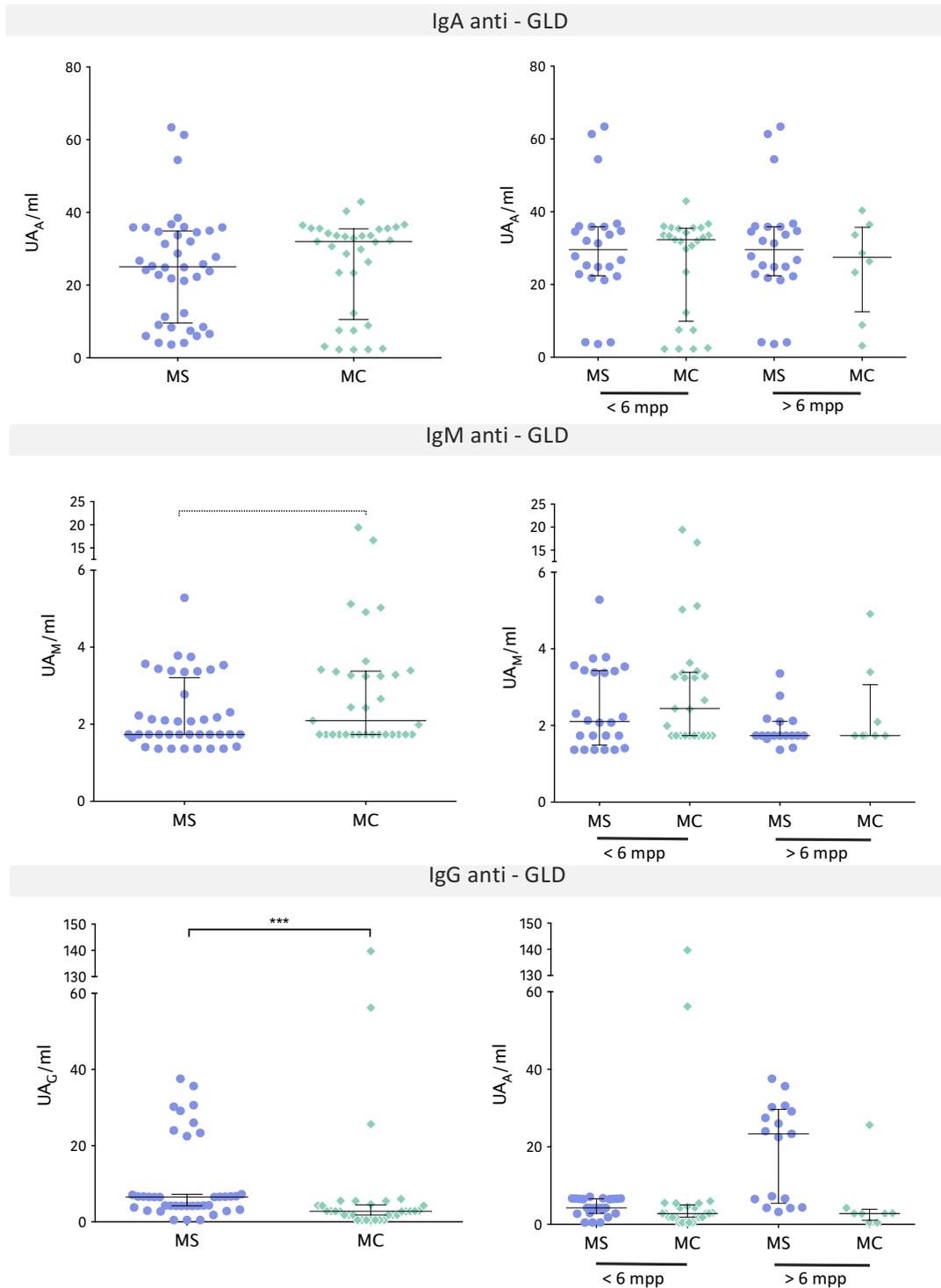


Figura 14. Anticuerpos específicos contra gliadina. Se muestran los títulos de anticuerpos específicos para gliadina de isotipos IgA, IgM, IgG para cada muestra individual del grupo de MC y MS, en los grupos totales y en los subgrupos de acuerdo al tiempo de lactancia respetivamente. Se indican las medianas y rangos intercuartiles para cada grupo (25 – 75 %). Las barras horizontales y asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos; las barras punteadas indican tendencias.

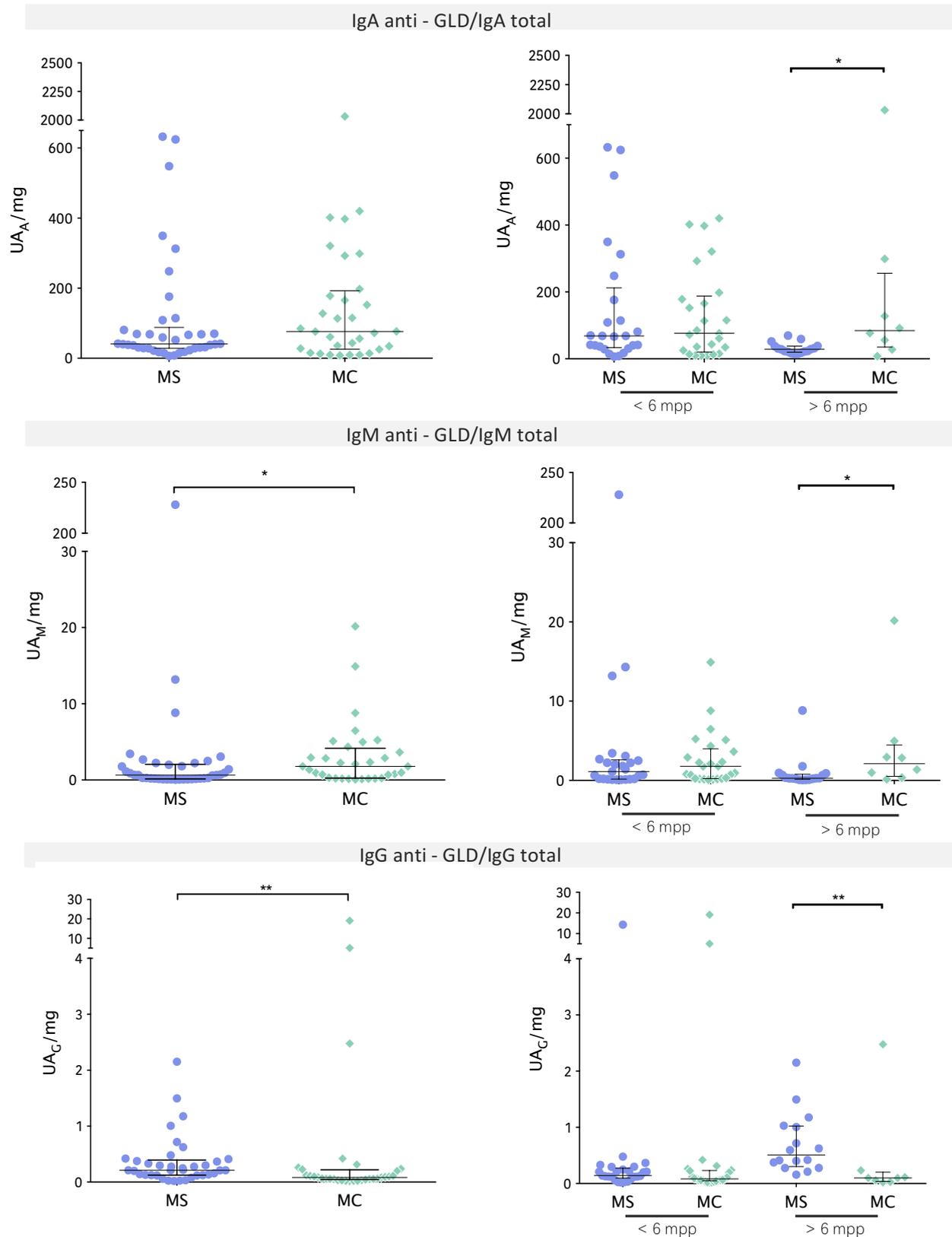


Figura 15. Anticuerpos específicos contra gliadina normalizados contra anticuerpos totales. Se muestran los títulos de anticuerpos específicos para gliadina de isotipos IgA, IgM, IgG normalizados, para cada muestra individual del grupo de MC y MS, en los grupos totales y en los subgrupos de acuerdo al tiempo de lactancia respetivamente. Se indican las medianas y rangos intercuartiles para cada grupo (25 – 75 %). Las barras horizontales y asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos; las barras punteadas indican tendencias.

## Anticuerpos anti toxoide tetánico

Se decidió evaluar la concentración de anticuerpos en la leche con una especificidad diferente, que no estuviera vinculada a la condición patológica y a su vez que estuvieran expresados al menos en la sangre las mujeres que integran el estudio. En este sentido, en base a la obligatoriedad de la vacuna antitetánica y a su control durante el embarazo, consideramos el análisis de los anticuerpos anti toxoide tetánico en leche (Acs anti-TT).

Se evaluó la concentración de estos anticuerpos de isotipos IgA, IgM e IgG. Con respecto a los títulos de los anticuerpos anti-TT de isotipos IgA e IgM no se observaron diferencias significativas entre los grupos de MS y MC, ya sea en los grupos totales o al tener en cuenta el periodo de lactancia (figura 18). En cuanto a la IgG anti-TT se encontraron diferencias significativas siendo los títulos en MC menores que en MS.

Al normalizar la fracción de Acs anti-TT respecto a la concentración total de anticuerpos para cada isotipo, se observó que tanto para IgA como para IgM las MS presentaban niveles significativamente superiores a las MC. Este comportamiento se mantiene al considerar los subgrupos de muestras según el tiempo de lactancia; se observó diferencia significativa entre MS y MC para la IgA anti-TT/IgA considerando los subgrupos en ambos períodos de lactancia. En forma análoga, los IgM anti-TT/IgM resultaron ser significativamente menores en la MC en ambos períodos de lactancia. En contraste a los anticuerpos secretorios, los anticuerpos IgG anti-TT mostraron títulos similares en la leche de MS y MC, independientemente del período de lactancia (figura 19).

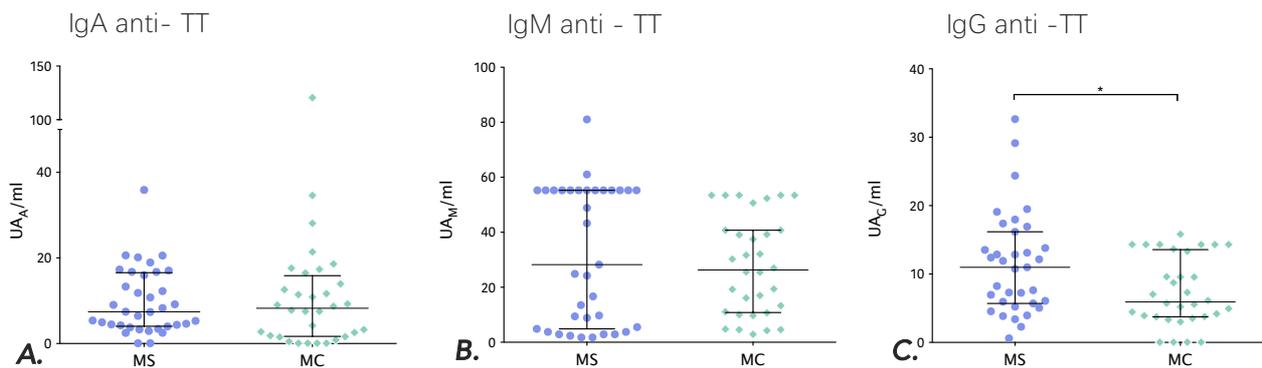


Figura 16. Anticuerpos contra toxoide tetánico. Se muestran los títulos de anticuerpos específicos de isotipos IgA (A.), IgM (B.) e IgG (C.) para cada muestra individual. Se indican las medianas y rangos intercuartiles para cada grupo (25 – 75 %). Las barras horizontales y asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos.

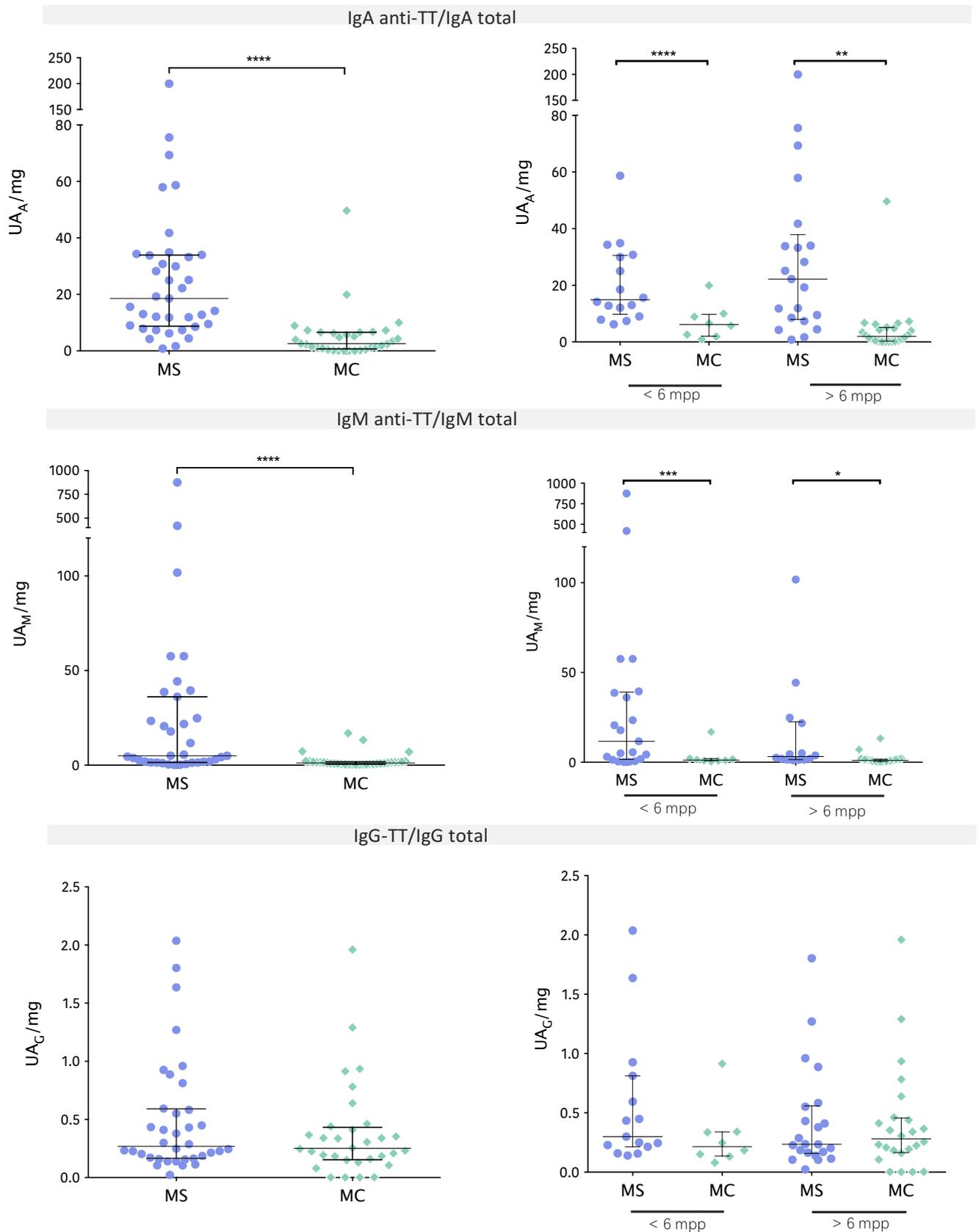


Figura 17. Anticuerpos contra toxoide tetánico totales normalizados contra concentración total de anticuerpo. Se observan las concentraciones de IgA, IgM e IgG para los grupos totales y en los subgrupos de acuerdo al tiempo de lactancia. Se indican las medianas y rangos intercuartiles para cada grupo (25 – 75 %). Las barras horizontales y asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos.

### 4.3.3. Actividad lisozima

Para comparar un parámetro indicativo de una de las propiedades microbicidas de la leche, se analizó la actividad lisozima en las muestras de fase acuosa de las muestras de MC y MS. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos totales ni en relación a los dos períodos de tiempo evaluados (figura 20).

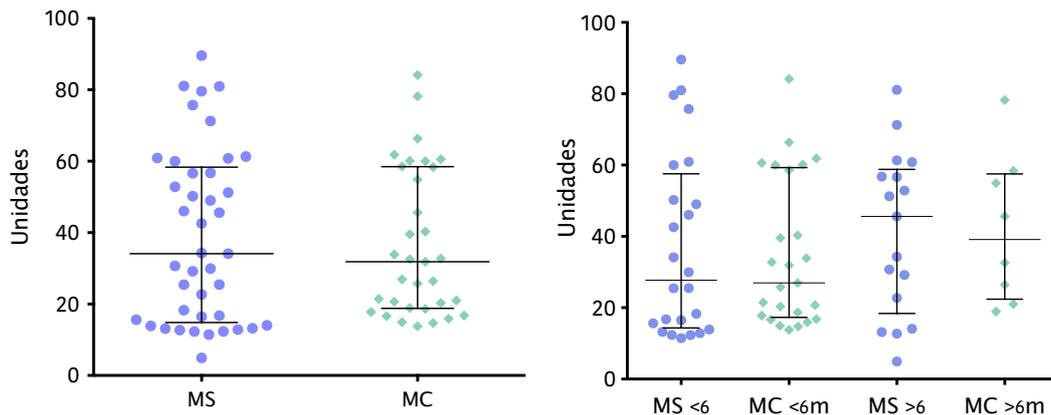


Figura 18. Actividad de la lisozima en la fase acuosa de la leche. Se indican los valores de actividad en las muestras individuales de cada grupo de muestras, expresado en unidades definidas para el test turbidimétrico utilizado. Se indican las medianas y los rangos intercuartiles (25 – 75 %) para cada grupo o subgrupo en función del tiempo de lactancia (anterior o posterior a los seis meses post parto).

### 4.3.4. Anticuerpos específicos de la Enfermedad celíaca

#### Anticuerpos específicos contra péptidos deamidados de gliadina

Los anticuerpos específicos contra péptidos de gliadina modificados por deamidación por la enzima transglutaminasa tisular (péptidos deamidados de gliadina) de isotipos IgA e IgG tienen valor diagnóstico dentro de los exámenes serológicos específicos para la EC. Por tratarse de muestras de leche en las que la IgA es el isotipo predominante, se analizó la presencia de estos anticuerpos en las muestras de ambos grupos de estudio utilizando un kit de uso para diagnóstico serológico. No hay datos de uso de este kit en leche por lo que no disponemos de valores de referencia en la población general. Se siguieron las instrucciones para el ensayo con suero o plasma, y considerando un umbral de detección definido en base a la DO del blanco del ELISA, un 93% y un 94 % de las muestras de FA de leche de MS y de MC respectivamente mostraron valores medibles de anticuerpos específicos. Sin embargo, no se dispone de información respecto a la relevancia

biológica de estos valores de concentración ya que no hay estudios de correlación de concentraciones de estos anticuerpos específicos en sangre y leche. En sangre, la población general sana presenta valores que oscilan en 5.5 U, siendo el valor de 20 U el umbral para definir una posible enfermedad celíaca a confirmar. Teniendo en cuenta que la concentración de IgA en leche es mayor que en sangre, es posible que los niveles fueran superiores a 20U. En este sentido una muestra de leche de MC y tres de MS muestran valores llamativamente altos, considerando una DLG prolongada (figura 21).

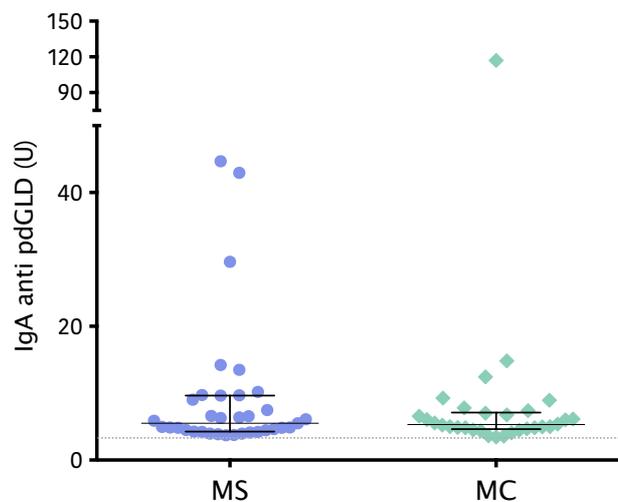


Figura 19. Anticuerpos IgA específicos para péptidos deamidados de gliadina. Se muestran los títulos de las muestras individuales de los grupos de MC y MS. Los resultados se expresan en unidades (U) valoradas con el kit Quanta Lite® Gliadin IgA II ELISA. Se indican las medianas y rangos intercuartiles para cada grupo. La línea horizontal representa el umbral de detección del ensayo.

### Anticuerpos anti transglutaminasa tisular

La generación de anticuerpos autoreactivos dependientes de gluten contra la transglutaminasa tisular (tTG) es una característica muy específica de la EC que aporta al diagnóstico y por otra parte se le han atribuido efectos patogénicos a nivel local y sistémico. El nivel de estos anticuerpos se normaliza con una DLG en la mayoría de los pacientes. En este contexto nos pareció interesante analizar la presencia de anticuerpos específicos contra la tTG, y en particular de isotipo IgA que son los más específicos de la EC.

Como no existe un método comercial estandarizado para cuantificar los anticuerpos anti-tTG en leche, previamente se estudiaron las condiciones experimentales para tener en cuenta los posibles efectos de la matriz mediante spiking. Para ello se utilizó un suero positivo fuerte para anticuerpos anti-tTG (219 U, siendo 20U el umbral para considerar una muestra positiva) previamente valorado con un kit comercial (Quanta Lite® h-tTG IgA; INOVA Diagnostics) como fuente de anticuerpos específicos a incorporar en una muestra de FA de leche de madre sana. Una vez constatada una recuperación de entre el 80 y 120 % de los valores de concentración determinados por el ensayo respecto a los valores teóricos, se valoraron las muestras utilizando una curva de calibración con los Acs-anti tTG valorados, diluidos en la FA de una leche de madre no celíaca. Se detectaron anticuerpos en un total de 4 muestras de MS y 6 de MC. Las muestras que tenían más de 20 U de Acs anti-pdGLD (figura 21) presentaban niveles detectables de anticuerpos anti-tTG.

#### 4.4 Determinación de gliadina soluble y formando complejos inmunes

En base a la importancia que tiene la leche materna para realizar un muestreo de componentes de su dieta en el intestino del niño para generar mecanismos de tolerancia oral, analizamos en la leche de MS y MC los niveles de gliadina y de complejos inmunes (CI). Si bien las MC reportaron estar adheridas a una DLG no es posible descartar exposiciones involuntarias, que de acuerdo a la sensibilidad de los métodos de detección pudieran ser analizadas en este trabajo.

##### 4.4.1. Detección de GLD soluble en leche

A nivel comercial hay disponibles kits en base a ensayos de ELISA para determinar gliadina/gluten en alimentos; los formatos de los ELISA son de captura o competitivo, siendo estos últimos de un uso más restringido y usados principalmente para alimentos procesados en los cuales hay presencia de péptidos de degradación de la gliadina, que no sería detectables por un ELISA de captura.

Si bien se ha reportado la presencia de la molécula de gliadina nativa en la leche materna<sup>128</sup>, consideramos de interés utilizar un formato de ELISA competitivo que permita detectar también péptidos de gliadina debido a los efectos biológicos que tienen algunos de ellos sobre el epitelio intestinal; utilizamos un método desarrollado en el laboratorio que fue adaptado para su aplicación

en muestras de fase acuosa de la leche y se comparó con el uso de un kit comercial, que no está validado por el fabricante para uso en leche humana.

En primer lugar, se generó una preparación de péptidos de gliadina por digestión secuencial de pepsina (pGLD) y una vez verificado su reconocimiento por un anticuerpo policlonal comercial anti-GLD (Sigma Adrich) en un ELISA directo mediante la inmovilización del antígeno en fase sólida (10  $\mu\text{g/ml}$ ) se procedió a analizar su uso en la fase soluble de un ELISA competitivo en el cual las placas fueron sensibilizadas con GLD nativa. Para ello, el primer paso fue verificar la capacidad de los pGLD de inhibir la unión del Ac anti-GLD a la GLD nativa inmovilizada en la fase sólida y determinar el rango de diluciones de uso (figura 22).

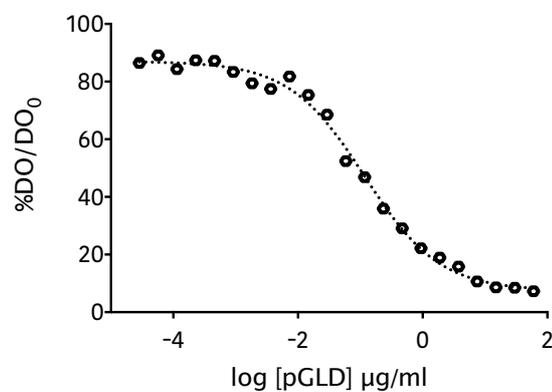


Figura 20. Curva de inhibición utilizando la preparación de pGLD producidos en el laboratorio, en el formato de ELISA competitivo con GLD inmovilizada en fase sólida. Se indica el porcentaje de inhibición de la lectura de densidad óptica para cada concentración de pGLD en relación a la condición sin agregado del analito en fase soluble (DO<sub>0</sub>)

Como punto de partida se disponía del diseño de un ELISA generado en el marco de un proyecto de CSIC desarrollado por E. Villamil (Programa de Apoyo de Investigación Estudiantil) para la detección de péptidos de gliadina en alimentos sólidos. Dado que se constató que el anticuerpo comercial tenía reactividad cruzada contra proteínas de soja, se procedió a optimizar las condiciones del ELISA competitivo teniendo en cuenta la posible presencia de otras proteínas dietarias en la leche materna, conduciendo a resultados falsos positivos, por lo cual se procedió a una re-estandarización del método para eliminar tal reactividad. Se consideró particularmente importante ya que la soja suele ser un alimento muy frecuentemente utilizado en la población con EC.

La reactividad cruzada se bloqueó incorporando en los ensayos extractos de proteínas de soja obtenidas por el grupo del Dr. Luis Panizzolo (Laboratorio de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Química). Se utilizaron tres extractos de proteína de soja (PS) crudos y dos extractos enriquecidos en las fracciones proteicas más abundantes en la soja (7s y 11s). Para evaluar la reactividad cruzada del anticuerpo anti-GLD a los extractos de soja en el modelo de ELISA competitivo, se realizaron curvas de inhibición utilizando solamente los PS en varias concentraciones, así como la incubación simultánea con los pGLD (figura 23).

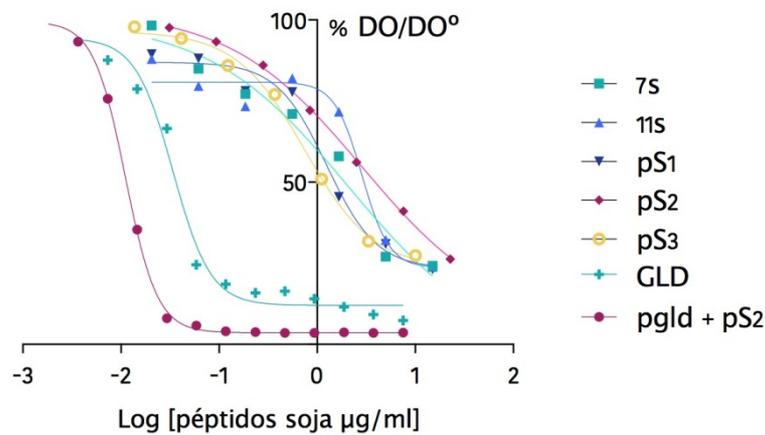


Figura 21. Se muestran las curvas de inhibición obtenidas con los distintos extractos de proteínas de soja, pGLD y la incubación en simultáneo de ambos.

Se verificó la inhibición de la reactividad del Ac anti-GLD por los PS aunque con valores de IC50 muy superiores que en el ELISA con los pGLD, lo cual es un reflejo de la menor sensibilidad, indicando que la interferencia ocurriría con cantidades mucho más altas de soja respecto a gliadina. A su vez se observa que la incubación de los PS con los pGLD mejoró la sensibilidad del ELISA al disminuir el IC50 (de 2,068 a 0,011), y se incorporaron en todos los ensayos.

Al evaluar el efecto matriz mediante el spiking se pudo observar que los porcentajes de recuperación obtenidos fueron aceptables y que el método es adecuado, si bien en algunas muestras se obtuvieron valores superiores que merecerían un ajuste mejor para poder plantear la aplicabilidad general del método (tabla 8).

A los efectos de esta tesis se utilizó igualmente como un método exploratorio para evaluar la posible presencia de gliadina en leche.

Al verificar lo anterior, también se evaluó el límite de detección (LOD: 0.011 ppm) y límite de cuantificación (LOQ: 0.116 ppm) resultando en términos generales superior al método comercial (5 ppm de gliadina), aunque como se desarrollará más adelante no es estrictamente comparable.

En base a estos resultados en principio consideramos posible la aplicabilidad del método a la matriz leche y procedimos a analizar las muestras de los grupos de MS y MC. Se detectó gliadina en la totalidad de las muestras (tabla 9).

En paralelo realizamos el ensayo en un grupo de muestras de MS y MC utilizando el kit comercial. Encontramos que las tres MC que presentaban niveles relativamente altos de Acs anti tTG y anti pdGLD presentaban en leche niveles detectables de gliadina libre.

Tabla 8. Ensayo de spiking con pGLD en muestras de fase acuosa de leche.

Muestra de leche	Concentración de pGLD (ppm)		% recuperación
	<i>inicial</i>	<i>final</i>	
1	1,9	44,89	143,3
2	1,02	36,21	117,3
3	2,58	38,5	119,7
4	0,96	22,84	72,9
5	0,63	45,59	149,9
6	1,68	37,33	118,8

Tabla 9. Se indica el número de muestras positivas sobre el total de muestras valoradas por cada método, así como el rango de concentraciones y la mediana de las muestras que contenían valores detectables para cada método. En el caso del método desarrollado en el laboratorio, se muestra a su vez el número de muestras positivas utilizando el cutoff del método comercial.

	Método Ridascreen	Método desarrollado en laboratorio	
	LOQ 5 ppm	LOQ 0.116 ppm	
MC	14/33 (42%)	31/33	4/33 (12% $\geq$ 5 ppm)
	$\leq$ 5 – 15.3 ppm	0.116 – 7.4 ppm	
	6.2 ppm	5.8 ppm	
MS	6/24 (25%)	35/38	9/38 (23% $\geq$ 5 ppm)
	$\leq$ 5 – 9.8 ppm	0.116 – 15.76 ppm	
	6.8 ppm	8.6 ppm	

#### 4.4.2 Complejos inmunes de gliadina

El análisis de inmunocomplejos IgA específicos y GLD tiene varios puntos de interés para esta investigación. Por un lado, la unión de los anticuerpos a la GLD puede enmascarar la GLD libre presente en la leche. A su vez, los inmunocomplejos tienen una importancia funcional, que varía en distintas situaciones. Se ha asociado a los mismos en la generación de la tolerancia oral siendo verificado particularmente a nivel de anticuerpos IgG con unión a ovolatoalbúmina.

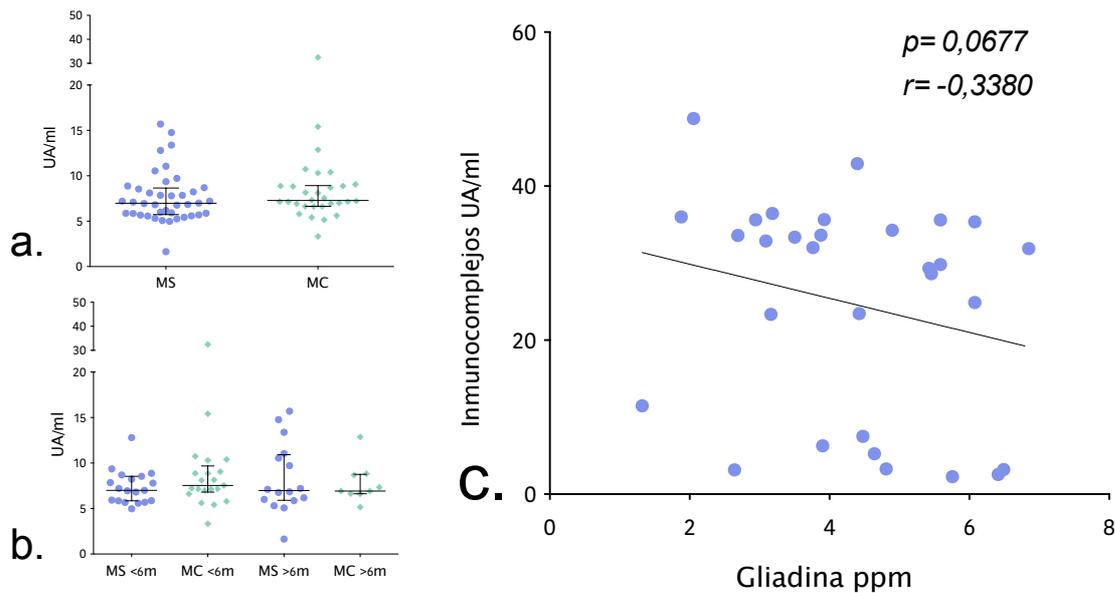


Figura 22. Concentración de complejos inmunes IgA anti GLD – GLD. En A. se observa los grupos totales, en B. los grupos separados por tiempo posparto y en C. la correlación entre los complejos inmunes y la concentración de GLD en leche de MC. Se indican las medianas y rangos intercuartiles para cada grupo (25 – 75 %). Se indica el p y r del test de Spearman para la correlación mostrada.

Por otro lado, los inmunocomplejos se asocian con respuestas inflamatorias activando la vía clásica del complemento al unirse a C1q. Con respecto al análisis, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de los mismos entre MC y MS, ni en el grupo total ni en los subgrupos de tiempo posparto. De todas formas, en cuanto a las MC se encontró una correlación entre la concentración de GLD en leche y los inmunocomplejos presentes, mientras esto no ocurrió en las MS (figura 24).

#### 4.5 Componentes reguladores de la respuesta inmune y de la función barrera epitelial

Se analizaron componentes inmunológicos en la FA de la leche con propiedades proinflamatorias, antiinflamatorias, quimiotácticas para leucocitos y con efectos directos sobre la función barrera del epitelio intestinal; algunos de los componentes tienen más de una de estas propiedades, tal es el caso del TGF- $\beta$ , TFF3, y a los efectos de la discusión y ordenar la presentación de los resultados se los clasificó en base a su función principal.

Todos los factores inmunológicos analizados se detectaron al menos en alguna de las muestras de cada grupo de estudio; las frecuencias de detección fueron muy variables de acuerdo al componente, oscilando entre el 8% para TNF- $\alpha$  hasta el 100% para los componentes mayoritarios sCD14 y TGF- $\beta$ .

En base a estas variaciones se realizó en primera instancia un análisis de frecuencia de detección mediante la prueba exacta de Fisher y Test de Mantel Hanzsel; como se muestra en la figura 25 y tabla 10, la FA de las muestras de MC presentaron valores detectables de las citoquinas IL-6, TNF- $\alpha$  y la quimioquina para monocitos/macrófagos MCP-1 en una proporción significativamente mayor de las muestras de MS. Además, se encontró una frecuencia de detección menor de sTLR2 y TFF3 en las muestras de MC respecto al grupo control de MS.

Por otra parte, en el grupo de MS se correlacionaron en forma negativa la detección de IL-8, TNF- $\alpha$  con sTLR2 ( $p=0.0065$  y  $p=0.026$  respectivamente), mientras que esta correlación no se observó para las muestras del grupo de MC.

Tabla 8. Componentes reguladores de la respuesta inmune y de la función barrera epitelial. Se indican para cada grupo de muestras de MS y MC la frecuencia de detección para cada componente en base al límite de detección del método (LOD) así como los valores de concentración en las muestras que presentaron niveles detectables (mediana y rango intercuartil).

El análisis estadístico para los valores categóricos se realizó con la prueba exacta de Fischer y se indican con código de asteriscos las diferencias significativas entre frecuencias. Al considerar como segunda variable los días post parto, se aplicó el test de Mantel-Haenzsel, y se indican las diferencias significativas o tendencias entre paréntesis.

Se muestran las concentraciones para cada componente como medianas y rango intercuartil de las muestras positivas. # indican tendencias.

	LOD (pg/ml)	Frecuencia de detección (%)			Concentración en muestras positivas	
		MS	MC		MS	MC
<b>CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS INFLAMATORIAS</b>						
					mediana (rango intercuartil)	
IL-12	62,5	76	75		0,47pg/ml	0,77 pg/ml
					0,34 - 0,77	0,378- 2,07
IL-6	9,38	37	69	** (**)	22,27 pg/ml	36,25 pg/ml
					15,77 - 600	17,11 - 91,25
TNF- $\alpha$	15,6	8	27	* (#)	41,06 pg/ml	31,18 pg/ml
					16,69 - 109,2	16,62 - 101,0
IL-8	31,2	21	19		46,93 pg/ml	92,42 pg/ml
					43,86 - 84,79	39,66 - 114,8
MCP-1	10,3	13	34	* (#)	24,33 pg/ml	37 pg/ml
					13,17- 58,83	30 - 78,33
MIP-3 $\alpha$	15,6	11	9		55,00 pg/ml	158,6 pg/ml
<b>CITOQUINAS ANTIINFLAMATORIAS</b>						
					39,64 - 829,9	57,14-602,9
IL-10	31,2	76	75		0,120 ng/ml	0,17 ng/ml
					0,046-4,09	0,10-2,00
TGF- $\beta$	31	61	59		48,61 ng/ml	40,25 ng/ml
<b>RECEPTORES SOLUBLES</b>						
					20,29-88,56	19,98-165,9
sTLR2	125	68	41	* (*)	0,9743 ng/ml	1,534 ng/ml
					0,68-23,28	0,89-14,17
sCD14	62,5	100	100		2,41 $\mu$ g/ml	2,87 $\mu$ g/ml
<b>FACTORES QUE ACTUAN SOBRE EL EPITELIO INTESTINAL</b>						
					1,38-3,55	1,31-4,00
EGF	2,5	100	100		4,97 ng/ml	5,60 ng/ml
					3,60-7,27	4,12-10,39
TFF3	7,8	42	22	#	46 pg/ml	104 pg/ml
					25,50-143,5	16,00-194,0

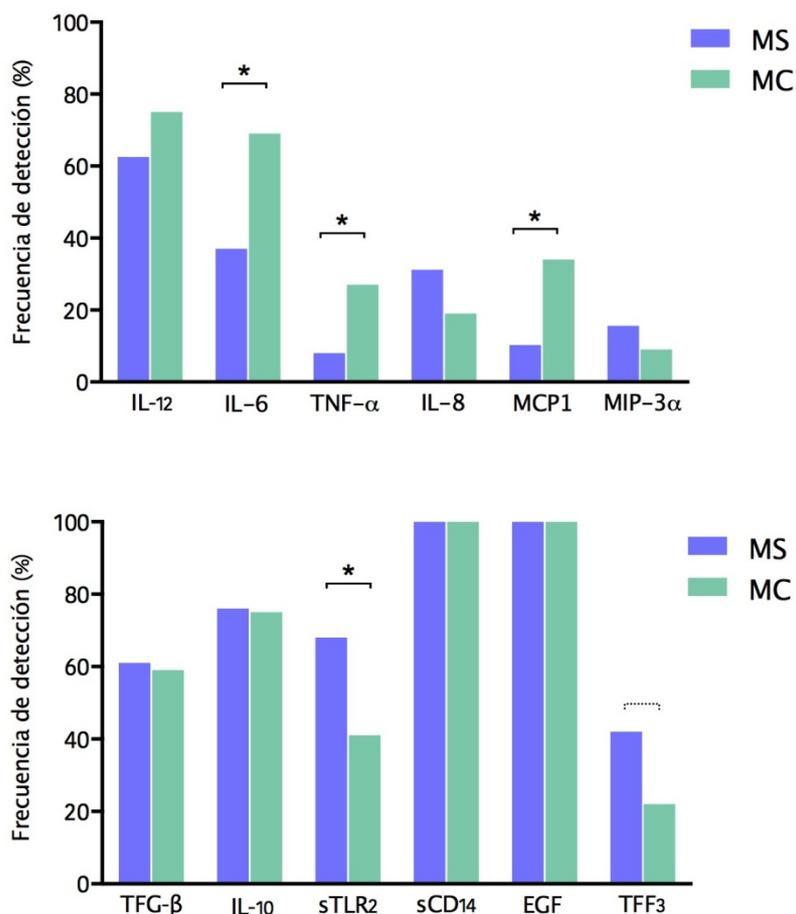


Figura 23. Se muestran las frecuencias de detección década componente estudiado en la FA de la leche de MS (MS) y MC (MC). Las barras horizontales y asteriscos indican diferencias significativas entre grupos (Prueba exacta de Fisher). La línea punteada indica tendencia. Se muestran gráficas correspondientes a componentes con perfil inflamatorio (arriba) y antiinflamatorios (abajo).

También se realizó un análisis mediante modelos de regresión simple y múltiple. Los resultados del modelo de regresión simple en el cual se considera cada componente en forma independiente de los demás, teniendo en cuenta la condición materna respecto a la EC así como el tiempo post parto se muestran en la tabla 11 y se esquematizan en la figura 26. Los resultados confirman los anteriormente descritos.

Cuando todas las variables se tuvieron en cuenta en forma simultánea mediante la aplicación de un modelo múltiple, los resultados siguen la misma tendencia, con excepción del TFF3 que pierde consistencia estadística (tabla 11B).

Tabla 9. Resultados del modelo de Regresión logística binaria simple (A) y múltiple (B).

A.	Modelo de regresión simple						
	Estimate	Std. Error	Z value	Pr(>  z )	OR	2,50%	97,50%
IL-12	0,05659	0,57076	0,099	0,921	1,0582186	0,3457386	3,238941
IL-8	-0,06576	0,61549	-0,107	0,915	0,9363546	0,2802417	3,128584
IL-6	1,2693	0,5144	2,467	0,0136	3,558245	1,2982783	9,752229
TNF- $\alpha$	1,5012	0,7439	2,018	0,0436	4,4870153	1,044191	19,281257
MCP-1	1,4385	0,6428	2,238	0,0252	4,2141839	1,1955249	14,854853
MIP3 $\alpha$	0,07021	0,83072	0,085	0,933	1,0727319	0,2105605	5,465193
IL-10	-0,02342	0,56837	-0,041	0,967	0,9768531	0,320652	2,975943
TGF- $\beta$	0,12414	0,51033	0,243	0,808	1,1321714	0,4164102	3,078244
sTLR2	-1,0792	0,5083	-2,123	0,0337	0,3398743	0,1255129	0,9203401
TFF3	-1,1117	0,5606	-1,983	0,0474	0,3290109	0,10966	0,9871254

B.	Modelo de regresión múltiple						
	Estimate	Std. Error	Z value	Pr(>  z )	OR	2,50%	97,50%
dpp	-0,6027	0,7554	-0,798	0,425	0,5473551	0,12452992	2,4058285
IL-12	0,3464	0,7752	0,447	0,655	1,4139092	0,30946512	6,4599824
IL-8	-0,9011	0,852	-1,058	0,2902	0,4061136	0,07646364	2,1569501
IL-6	1,7871	0,7555	2,366	0,018	5,9723859	1,35854275	26,2556281
TNF- $\alpha$	2,1937	1,0993	1,996	0,046	8,9683831	1,03998212	77,33969
MCP-1	2,1652	0,9601	2,255	0,0241	8,715997	1,32760048	57,2224888
MIP3 $\alpha$	0,3366	1,1505	0,293	0,7699	1,400131	0,14684764	13,349665
IL-10	-0,3348	0,8441	-0,397	0,6916	0,7154942	0,13681642	3,7417437
TGF- $\beta$	-1,5575	0,8093	-1,925	0,0543	0,2106604	0,04312227	1,0291157
sTLR2	-2,0509	0,7974	-2,572	0,0101	0,1286214	0,02695204	0,6138108
TFF3	-1,5336	0,8062	-1,902	0,0572	0,2157654	0,04443327	1,0477445

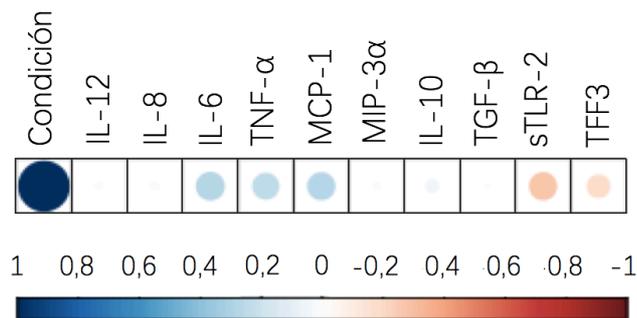


Figura 24. El diagrama representa esquemáticamente los resultados obtenidos en el modelo lineal simple. Los puntos azules indican correlación positiva entre la condición celíaca y la presencia del marcador y los puntos rojos una correlación negativa.

En términos generales se observó una mayor contribución de citoquinas proinflamatorias y la quimioquina de monocitos/macrófagos en el grupo de MC. En particular, las principales diferencias se observaron con la IL-6, cuya frecuencia fue significativamente superior en el panel de muestras de MC que el de MS y esta diferencia es sostenida en ambos subgrupos de acuerdo al tiempo de lactancia. En segundo término, las frecuencias de detección de TNF- $\alpha$  y MCP-1 también fueron significativamente superiores en el grupo de muestras de MC. Si bien no se encontró consistencia estadística, en ambos casos se observó una tendencia a mayor frecuencia de detección en los primeros seis meses de lactancia.

En las figuras 28, 29, 30 Y 31 se muestran para cada componente las concentraciones detectadas en las muestras individuales, indicando en cada caso el límite de detección y las muestras negativas para la sensibilidad de cada ensayo. No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones cuando se tomaron en cuenta solo las muestras positivas. En base a la limitante de disponer de muy pocas muestras positivas para varios de los componentes, también se realizó el análisis estadístico con la aproximación (sobreestimación) de asignar el valor del LOD correspondiente a cada ensayo para las muestras negativas. Con esta aproximación obtuvo significancia estadística una mayor concentración de IL-6 en las muestras de MC respecto a las MS ( $p=0.007$ ); en particular en el grupo de MC en lactancia anterior a los seis meses ( $p=0.025$ ) En relación al TNF- $\alpha$  se observó una mayor concentración en el grupo de MC en etapa más tardía de lactancia ( $p=0.0487$ ).

Se comparó la presencia de receptores solubles que actúan modulando la activación frente a componentes bacterianos, sCD14 que une LPS fundamentalmente, así como sTLR2 cuyos ligandos corresponden a varias estructuras de paredes bacterianas y levaduras, como ácido lipoteicoico y betaglicanos. La frecuencia de muestras positivas para sTLR2 fue menor en el grupo de MC es acompañado con una tendencia a menores concentraciones ( $p=0.09$ ), mientras que el aporte de sCD14, un componente que se encuentra en concentraciones muy superiores es similar entre los grupos de estudio.

Para evaluar el potencial tolerogénico de la leche se cuantificaron algunas citoquinas antiinflamatorias esenciales en el proceso de la generación de la tolerancia oral. No se observaron diferencias significativas con excepción de la IL-10 en el grupo de muestras correspondientes a lactancia más tardía; sorprendentemente las muestras del grupo de MC presentaban niveles superiores al grupo de MS.

Finalmente, se aplicó estadística descriptiva mediante el análisis de componentes principales que transforma nuestro conjunto de 11 variables correlacionadas en un conjunto reducido de nuevas variables o componentes principales (CP1 y CP2) que explican la mayor parte de la variación de los datos experimentales. En nuestro caso, consistentemente con los tests estadísticos el sTLR2 se presenta como una variable que aporta gran parte de la variabilidad entre grupos, tal como lo indican los coeficientes y el diagrama de vectores (figura 27).

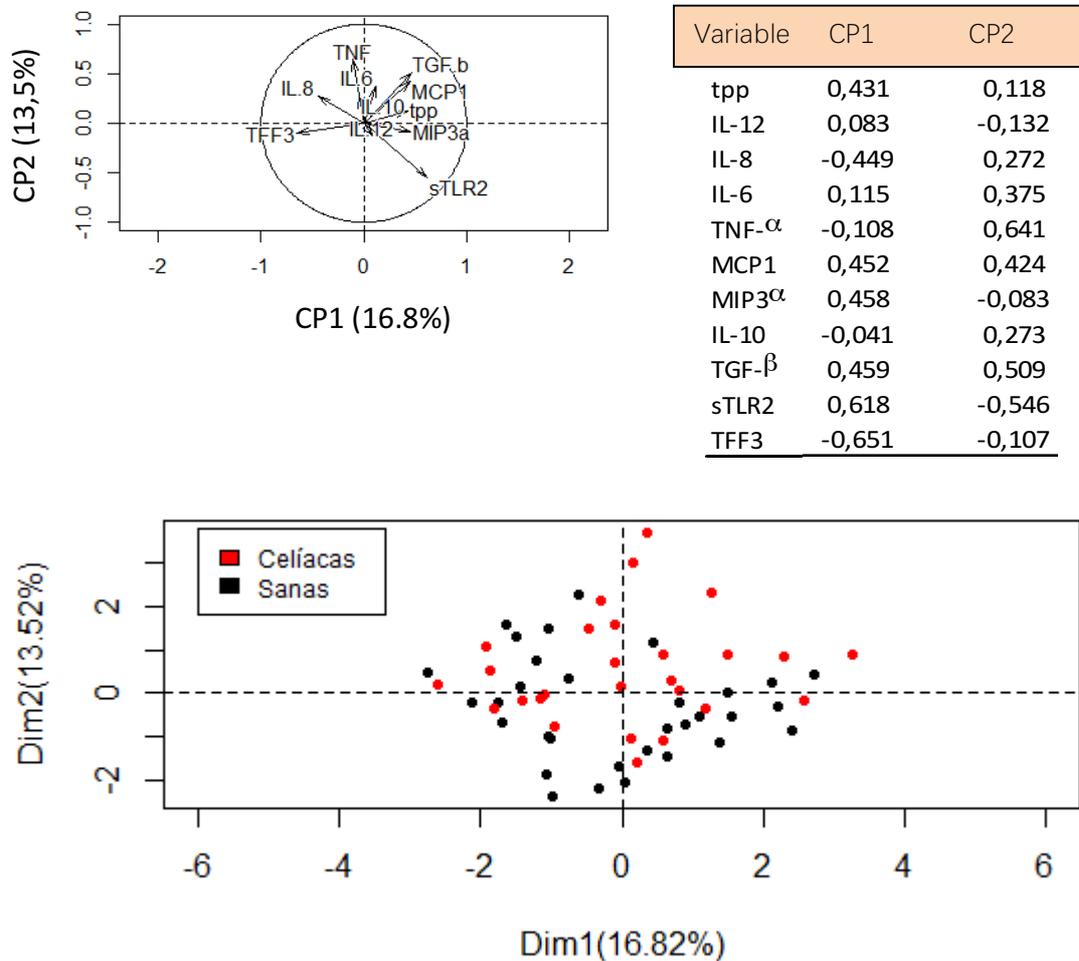


Figura 25. Se muestra el diagrama de vectores representando el peso de cada componente (arriba). A su vez, se observa la distribución de las muestras de MS (rojo) y MC (negro) de acuerdo a los dos componentes de mayor peso.

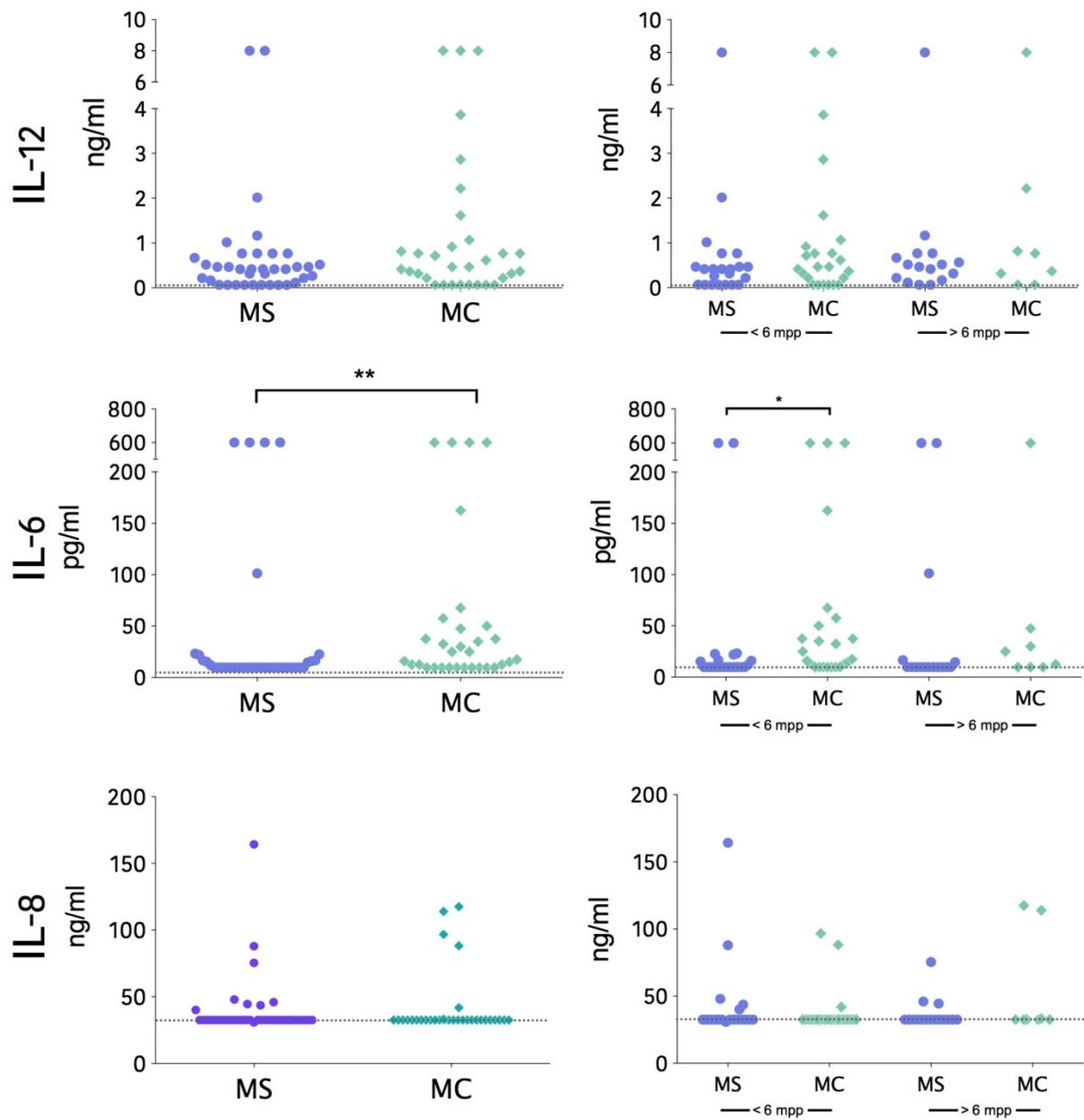


Figura 26. Gráficos de concentración de componentes inmunoreguladores en MS y MC. A la izquierda se muestran los grupos totales y a la derecha los subgrupos divididos según el tiempo posparto.

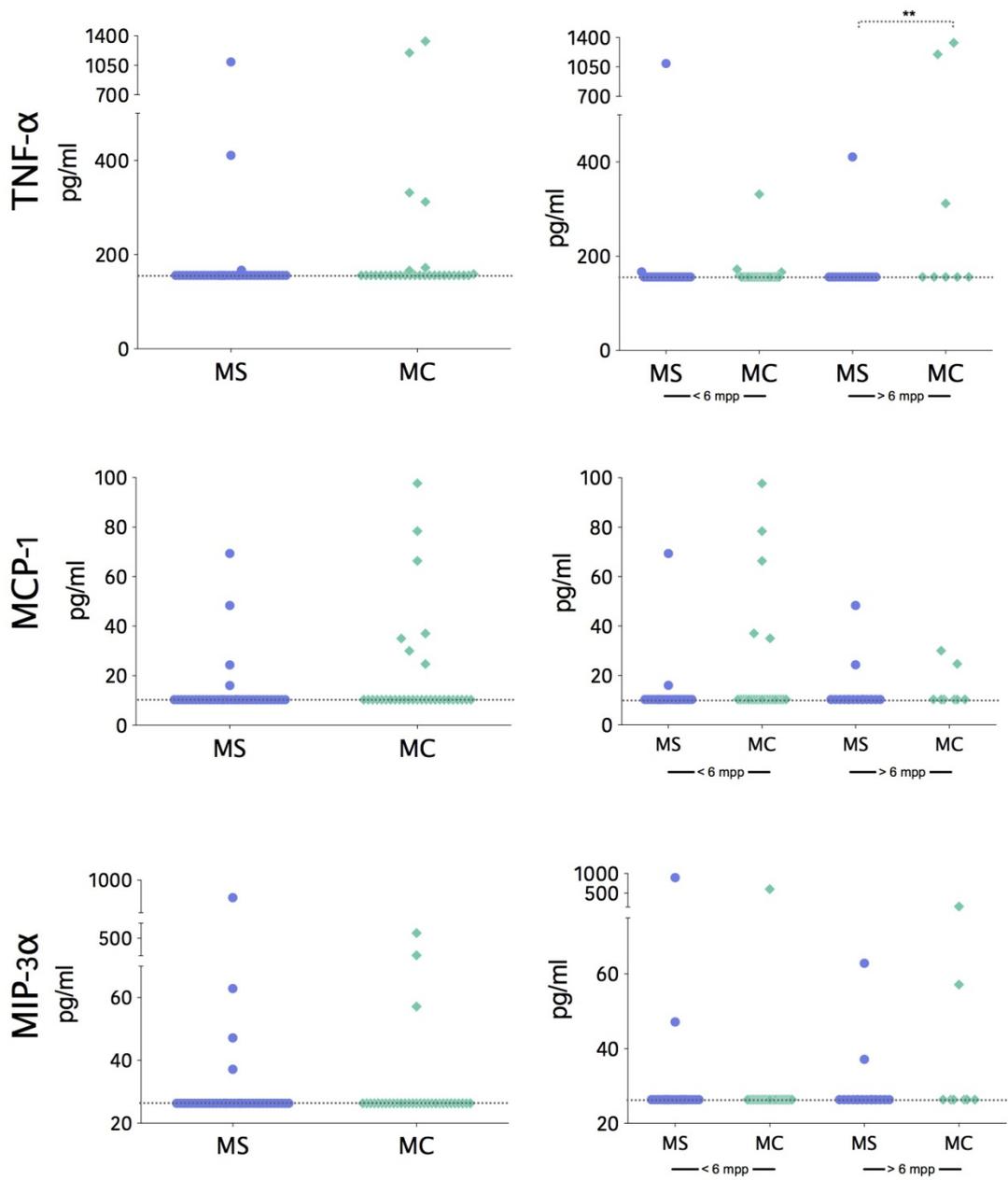


Figura 27. Gráficos de concentración de componentes inmunoreguladores en MS y MC. A la izquierda se muestran los grupos totales y a la derecha los subgrupos divididos según el tiempo posparto.

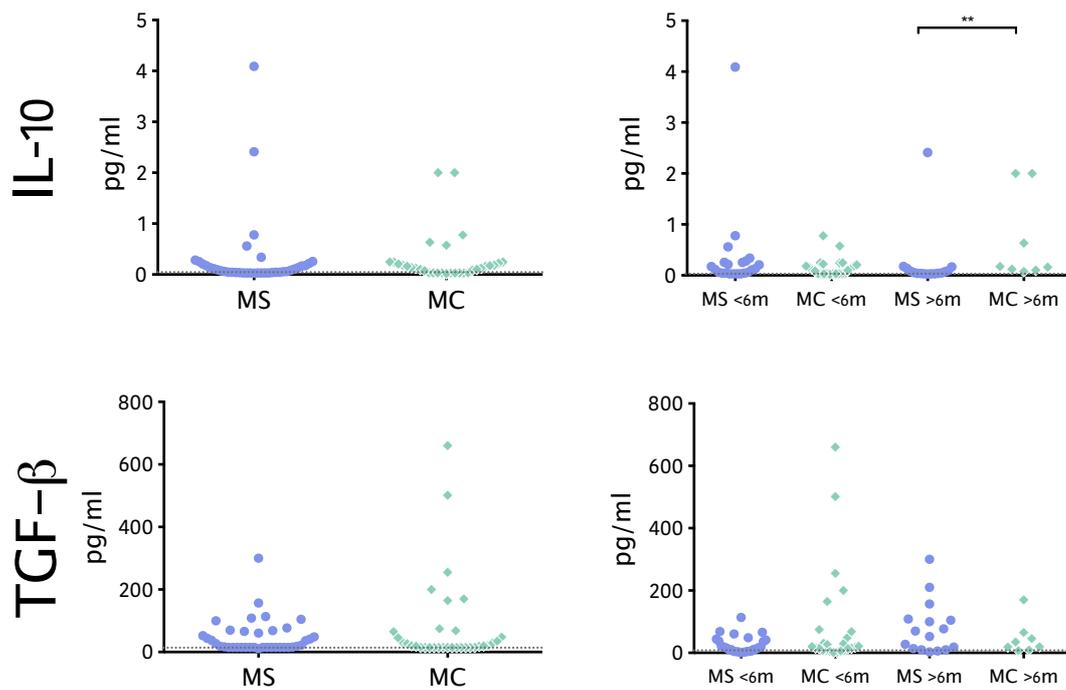


Figura 30. Componentes anti-inflamatorios. Concentraciones de IL-10 y TGF-beta correspondiente a los grupos totales de MC y MS y las mismas muestras separadas en subgrupos de acuerdo al tiempo posparto. Las barras horizontales y asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos.

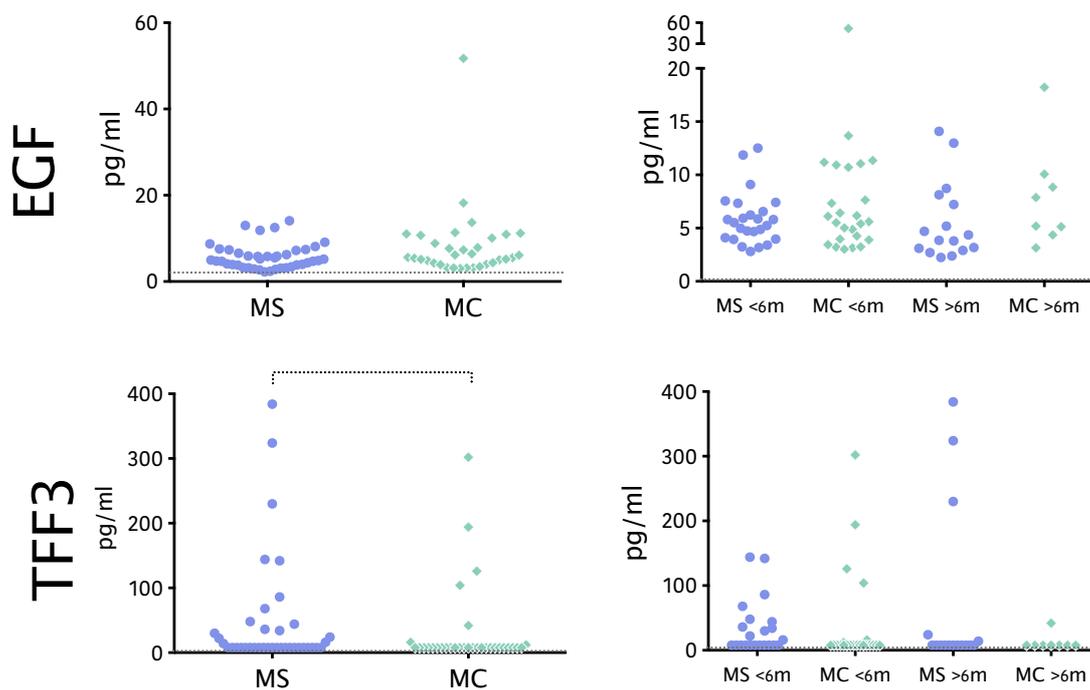


Figura 28. Concentraciones de EGF y TFF3 correspondiente a los grupos totales de MC y MS y las mismas muestras separadas en subgrupos de acuerdo al tiempo posparto. Las barras horizontales y asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos.

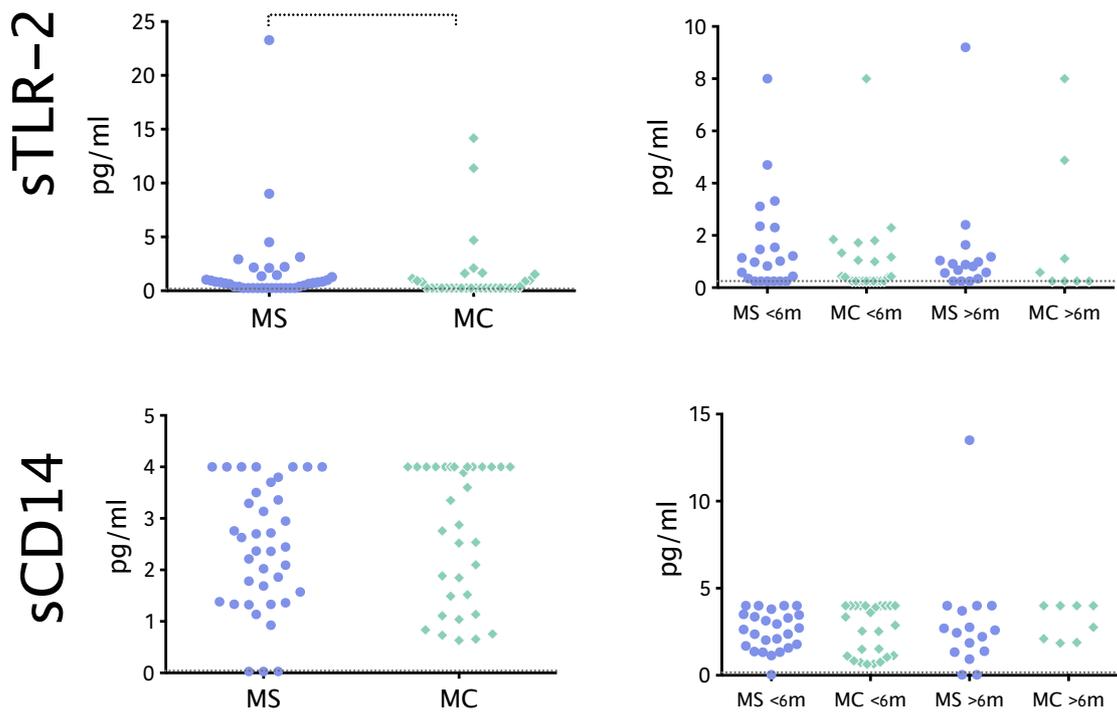


Figura 29. Concentraciones de sTLR2 y sCD14 correspondiente a los grupos totales de MC y MS y las mismas muestras separadas en subgrupos de acuerdo al tiempo posparto. Las barras punteadas indican tendencias.

## 4.6 Estudios con modelos celulares *in vitro* para evaluar efectos biológicos de la FA de la leche

### 4.6.1. Ensayos con la línea celular HT-29-GFP: efectos sobre la vía NF- $\kappa$ B

#### Estandarización de las condiciones experimentales

#### Estímulos inflamatorios

Para poder realizar los ensayos *in vitro* planteados, se llevó a cabo una puesta a punto de las concentraciones óptimas de los estímulos inflamatorios, teniendo en cuenta la respuesta a medir en las células así como la viabilidad celular. El TNF- $\alpha$  es el estímulo que produce un efecto más potente en esta clona<sup>126</sup> y es una citoquina muy producida en el intestino durante la EC con una lesión activa, por lo cual fue seleccionada para su uso en este trabajo.

La incubación con TNF- $\alpha$  produjo una activación de la vía NF- $\kappa$ B significativa tanto a una concentración de 10 ng/ml como de 1 ng/ml con niveles aceptables de viabilidad celular (menos de 5% de muerte celular en todos los ensayos). Por lo tanto, se definió continuar el trabajo con la concentración de 1 ng/ml. El IFN- $\gamma$  es una citoquina muy agresiva para el epitelio intestinal; a pesar de que no participa en la activación de la vía NF- $\kappa$ B se incorporó como control adicional y se utilizó esta línea celular para evaluar su efecto sobre la viabilidad celular. Como se observa en la figura 32. IFN- $\gamma$  causa más muerte celular que el TNF- $\alpha$  a las mismas concentraciones.

#### Estímulo con péptidos de gliadina (pGLD)

En base a reportes de la bibliografía sobre los efectos proinflamatorios de la gliadina se ensayó la incubación de las células epiteliales con pGLD, producidos en el laboratorio por digestión enzimática, utilizando concentraciones desde 25  $\mu$ g/ml hasta un máximo de 200  $\mu$ g/ml. Estas concentraciones no indujeron la activación de la vía NF- $\kappa$ B, así como tampoco se observó que provocaran un aumento significativo de la muerte celular. En base a estos resultados, para las etapas siguientes se decidió utilizar péptidos sintéticos de gliadina (psGLD), en la concentración de 200  $\mu$ g/ml, siendo cercano a la concentración alcanzada en el intestino según la bibliografía<sup>102</sup> (figura 33).

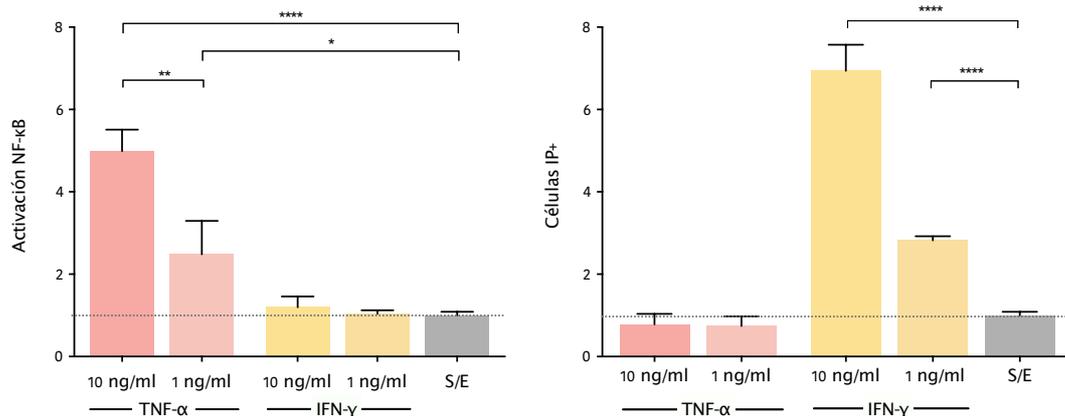


Figura 32. Puesta a punto de las concentraciones del estímulo inflamatorio TNF- $\alpha$  para medir la activación de la vía NF- $\kappa$ B. Para cada condición se indican medias y las barras de error son los desvíos estándar de determinaciones por triplicado. Los datos se encuentran expresados como cociente respecto a la condición sin estímulo (S/E). A la izquierda se muestra la activación de la vía NF- $\kappa$ B y a la derecha se muestran la proporción de células muertas (IP+).

S/E: células sin estimular en medio de cultivo.

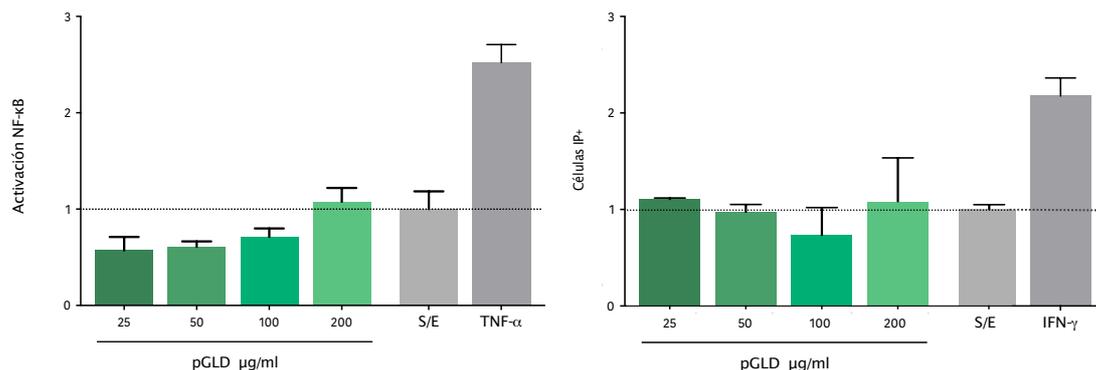


Figura 33. Efectos de los péptidos de gliadina (pGLD) sobre la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Incubación de HT-29-GFP con distintas concentraciones de péptidos de gliadina. A la izquierda se observa la activación de la vía, y a la derecha el porcentaje de células muertas (% IP). Para cada condición se indican medias y las barras de error son los desvíos estándar de determinaciones por triplicado. Los datos se encuentran expresados como cociente respecto a la condición sin estímulo (S/E).

pGLD (péptidos de gliadina); S/E (sin estimular, células incubadas con medio de cultivo).

Concentraciones utilizadas: TNF- $\alpha$ : 1 ng/ml

## Efectos directos de la FA de la leche sobre la vía NF- $\kappa$ B

Se realizaron ensayos previos con muestras de leche madura de MS que no pertenecían al grupo de estudio para definir las condiciones de trabajo. Se evaluó si la incubación de las células con la FA de la leche producía efectos sobre la activación o la viabilidad celular. A una concentración de 5% de FA, las células fueron activadas de forma significativa con respecto a la condición basal sin modificar la viabilidad. De este modo, se decide continuar trabajando con una concentración de 1% de leche para comparar los efectos moduladores de la inflamación de las muestras de estudio de este trabajo.

Una vez seleccionada la concentración de FA de leche a utilizar, se procedió a evaluar el efecto de las muestras de leche correspondiente a los dos grupos de estudio. Se utilizaron pools de muestras de los grupos de MS y MC, y a su vez se realizó con pools de las muestras de los subgrupos correspondientes a los dos periodos de tiempo posparto.

En cuanto a los efectos de la FA de la leche en la activación de la vía NF- $\kappa$ B, no se observan mayores diferencias respecto a las células sin estimular ni entre los grupos de estudio, con una activación significativa con respecto al TNF- $\alpha$  (figura 34).

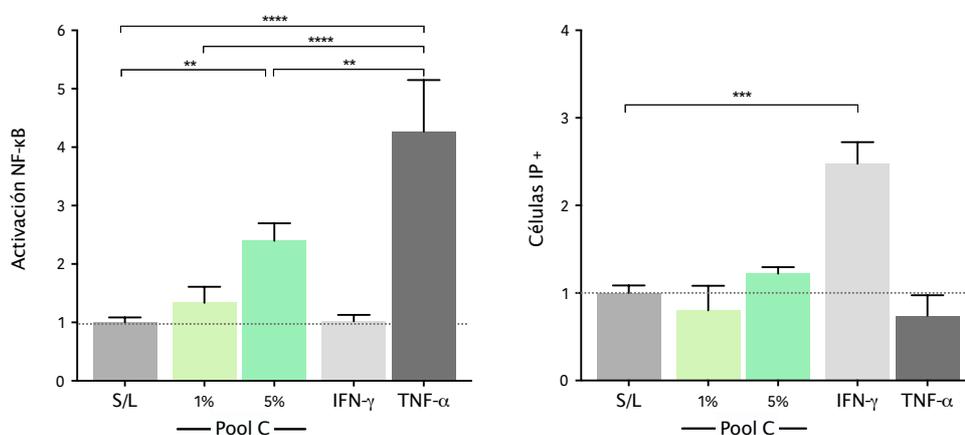


Figura 30. Activación de la vía NF- $\kappa$ B al incubar con fase acuosa de un pool de leche control (Pool C) a 1 y 5%. S/L (control sin estímulo). Las barras horizontales y asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos. Se indican medias y las barras de error corresponden al desvío estándar de determinaciones por triplicado. Los datos se encuentran expresados como cociente respecto a la condición sin estímulo. Concentraciones utilizadas: IFN- $\gamma$ : 1 ng/ml; TNF- $\alpha$ : 1 ng/ml

La incubación de las células con un pool de leches de MS, al igual que con un pool de leches de MC mostró una disminución de la muerte celular. Al comparar el pool de MS con el pool de MC se observó que este último mostraba una tendencia al aumento de la muerte celular. Por otro lado, al dividir los subgrupos de pooles de acuerdo al tiempo posparto, se observó una disminución significativa de la muerte celular en el pool de MS con respecto a un pool de MC en leches menores a 6 meses de lactancia. De todas formas, la leche de MC en este subgrupo no aumentó la muerte celular con respecto al control sin leche. En todos los casos, se observó diferencias significativas con IFN- $\gamma$  utilizado como control de aumento positivo de muerte celular (figura 35).

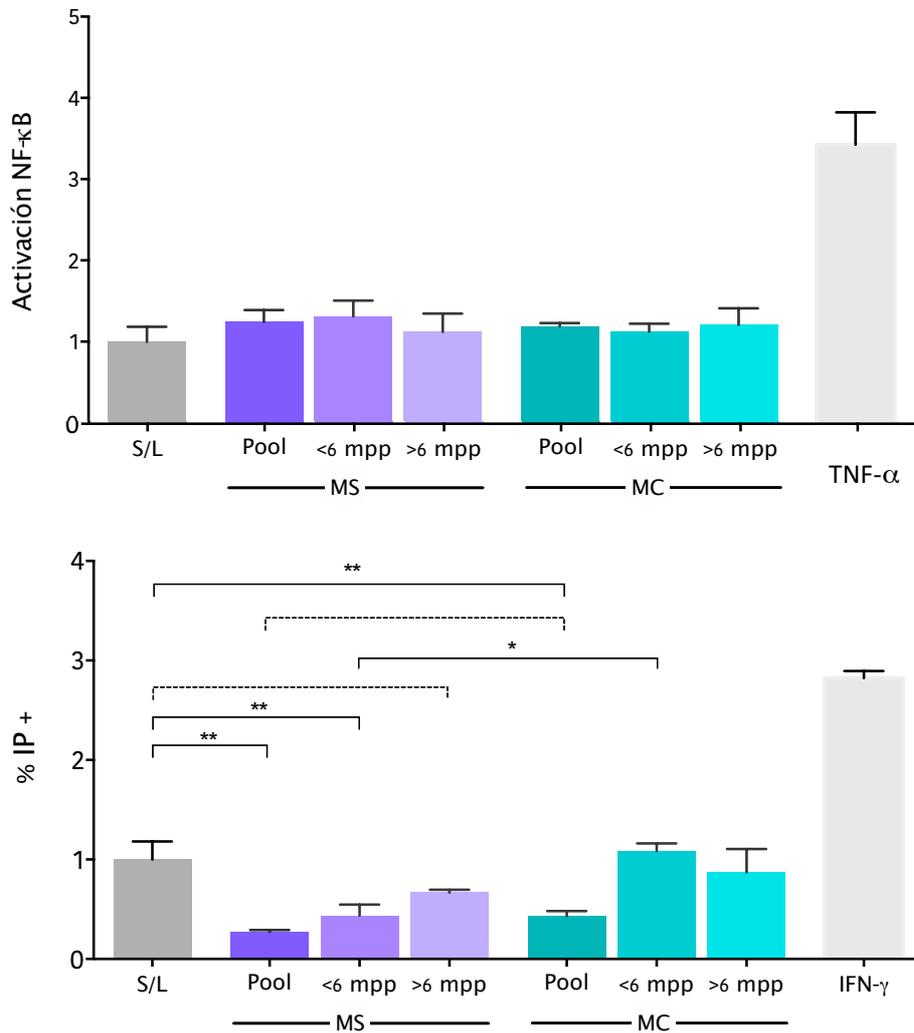


Figura 31. Efecto de la fase acuosa de la leche sobre la activación de NF-κB y la viabilidad celular. Las barras horizontales y asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos. Para cada condición se indican medias y las barras de error son los desvíos estándar de determinaciones por triplicado. Las barras horizontales y asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos. Los datos se encuentran expresados como cociente respecto a la condición sin estímulo (S/E). S/L indica las condiciones basales de células incubadas solo con medio de cultivo. MS (pool de leche de MS); MC (pool de leche de MC); <6 (menor a 6 meses posparto); >6 (mayor a 6 meses posparto). Concentraciones utilizadas: IFN-γ: 1 ng/ml; TNF-α: 1 ng/ml; FA de leche 1%.

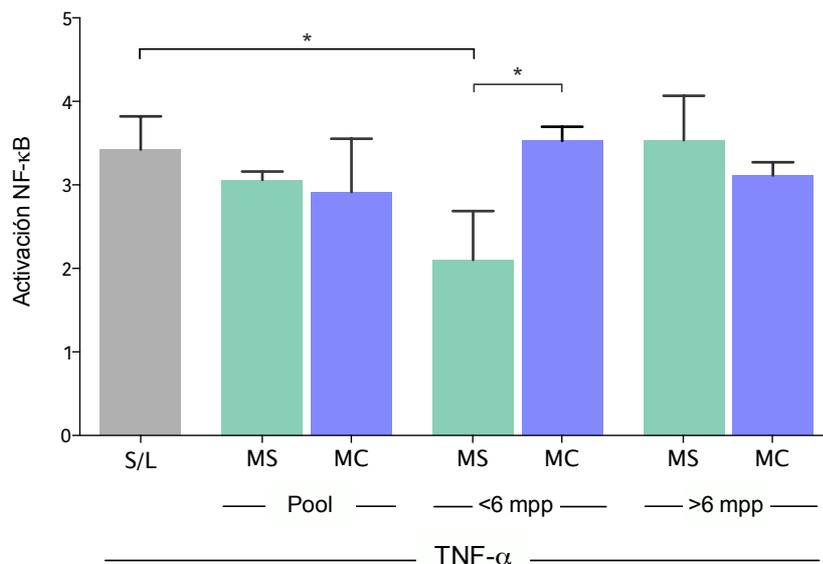


Figura 32. Efectos de la preincubación de las células HT-29-GFP con muestras de FA de leche 6 hs previas a la adición del estímulo inflamatorio (TNF- $\alpha$  1 ng/ml) en la activación de la vía NF- $\kappa$ B. Para cada condición se indican medias y las barras de error son los desvíos estándar de determinaciones por triplicado. Los datos se encuentran expresados como cociente respecto a la condición sin estímulo. Las barras horizontales y asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos. S/L indica las condiciones basales de células incubadas con TNF- $\alpha$ . MS (pool de leche de MS); MC (pool de leche de MC); <6 (menor a 6 meses posparto); >6 (mayor a 6 meses posparto). Concentraciones utilizadas: TNF- $\alpha$ : 1 ng/ml; FA de leche 1%.

#### 4.6.2. Estudio de efectos moduladores de la FA de la leche sobre los efectos inducidos por TNF- $\alpha$

La preincubación de las células con la FA de la leche (1%) previamente al estímulo inflamatorio de TNF- $\alpha$  (1 ng/ml) mostró un efecto modulador en el caso de la leche de MS, en particular en el pool de muestras correspondientes a tiempos inferiores a 6 meses posparto, al compararlo con las células sin la preincubación con leche (figura 36). En cuanto a la viabilidad celular, si bien siempre se observaron valores inferiores al 5% de muerte celular frente al estímulo inflamatorio, se observó un efecto 'protector' al realizar la preincubación de las células con fase acuosa de la leche. Independientemente del grupo de estudio, tanto la fase acuosa de los pooles de la leche de MS como de MC moduló la muerte celular causada por el efecto de la estimulación con TNF- $\alpha$ , sin diferencias significativas entre los grupos (figura 37).

A su vez los efectos fueron independientes del tiempo de lactancia para cada subgrupo correspondiente a las MS y MC, y no se observaron diferencias significativas entre los efectos de la leche derivada de los distintos grupos o subgrupos de estudio (figura 37).

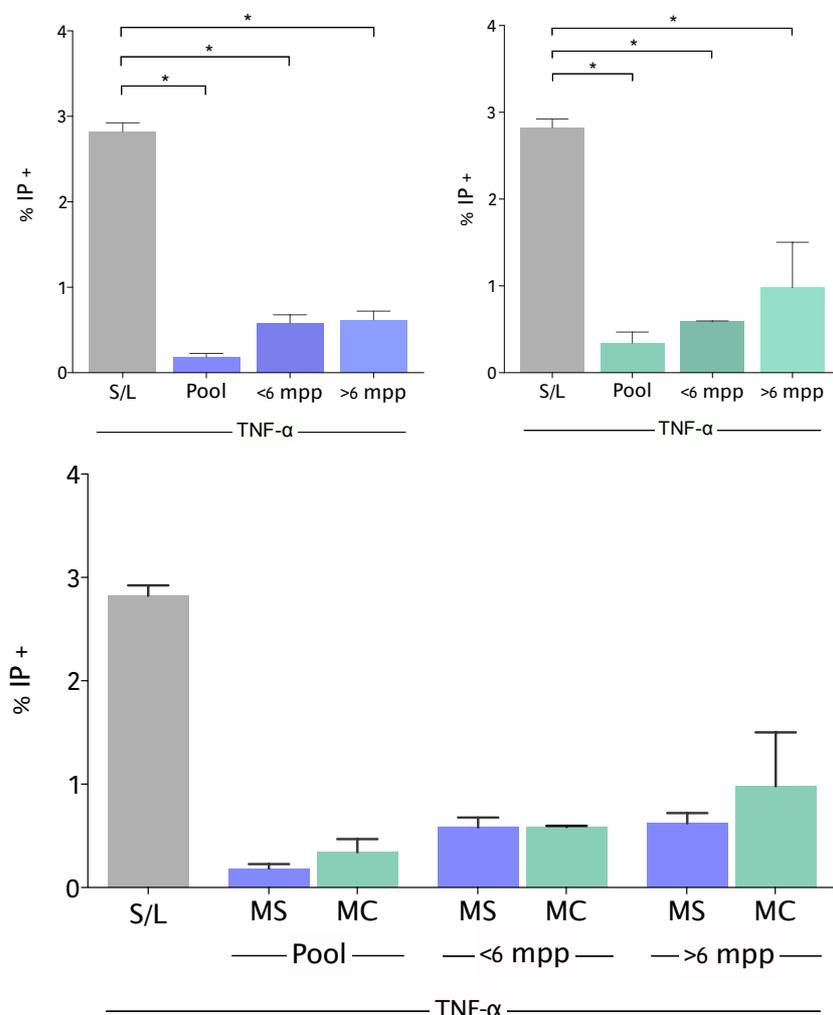


Figura 33. Efectos de la preincubación de las células HT-29-GFP con muestras de FA de leche 1% 6 hs previo a la adición del estímulo inflamatorio (TNF- $\alpha$  1 ng/ml) en la viabilidad celular. En A. se observa el efecto de la preincubación con leche de MS, en B. la preincubación con leche de MC y en C. la comparación entre subgrupos temporales. Los datos se encuentran expresados como cociente respecto a la condición sin estímulo. Para cada condición se indican medias y las barras de error son los desvíos estándar de determinaciones por triplicado. Las barras horizontales y asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos. S/L indica las condiciones basales de células incubadas solo con TNF- $\alpha$ .

MS (pool de leche de MS); MC (pool de leche de MC); <6 (menor a 6 meses posparto); >6 (mayor a 6 meses posparto).

Concentraciones utilizadas: TNF- $\alpha$ : 1 ng/ml; FA de leche 1%.

#### 4.6.3 Efectos de la leche sobre la estimulación con péptidos de gliadina.

Se analizó en primera instancia la capacidad de los péptidos sintéticos de gliadina, a la concentración de 200 µg/ml, de activar la vía. Al igual que con la preparación de péptidos generados en el laboratorio (pGLD) no se observó efecto significativo.

Sin embargo, al evaluar los efectos de la incubación de los distintos péptidos sintéticos de GLD (psGLD) posteriormente a una preincubación de 6 hs con pooles de leche, se pudo observar que la preincubación con el pool de MC y el P9 como estímulo la activación mostró una tendencia al aumento de la activación de la vía, mientras que tanto P2 como P31-43 no mostraron efectos significativos con respecto a la activación de la vía NF-κB (figura 38).

Hay varios factores a mencionar con respecto a la muerte celular. Células incubadas previamente con leche de MC muestran una tendencia a una mayor muerte celular que células preincubadas con leche de MS. Tomando como referencia células que fueron preincubadas con leche, pero sin la presencia de los péptidos como estímulo, se puede observar que la adición de P2 o P9 disminuyó significativamente la muerte celular cuando la leche utilizada fue de MS. Por otro lado, el factor preincubación con leche de MS disminuyó significativamente la muerte de células estimuladas únicamente con P9. Por último, la presencia del péptido P31-43 en células preincubadas con leche de MC mostró una tendencia a aumentar la muerte celular.

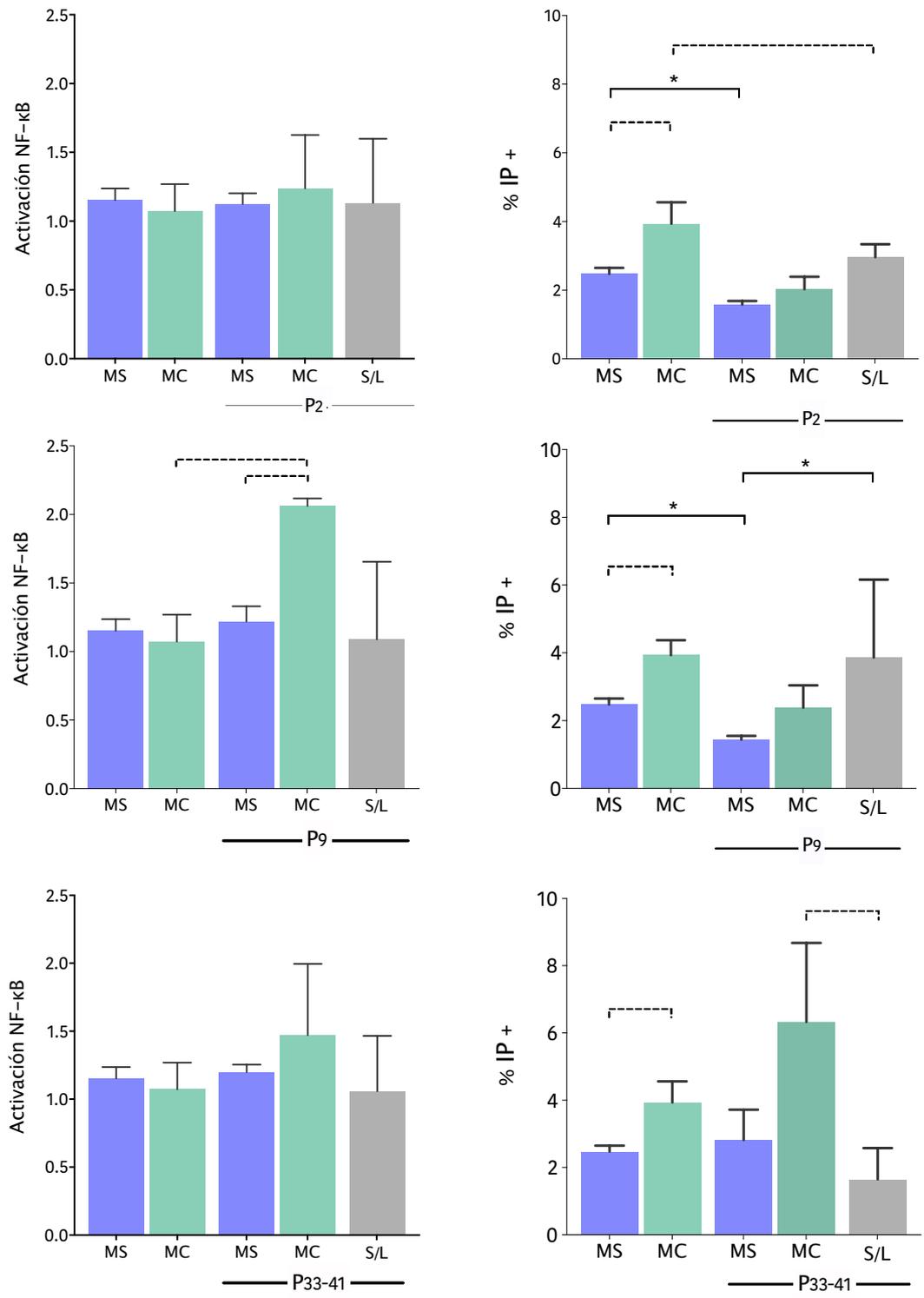


Figura 34. Efectos de los psGLD (P2, P9 y P31-43) en las células HT-29-GFP con muestras de FA de leche 1%, 6 hs previo a la adición de los mismos en la viabilidad celular (izquierda) y la muerte celular (derecha). Los datos se encuentran expresados como cociente respecto a la condición sin estímulo. Para cada condición se indican medias y las barras de error son los desvíos estándar de determinaciones por triplicado. Las barras horizontales y asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos. MS (pool de leche de MS); MC (pool de leche de MC). Concentraciones utilizadas: P2, P9 y P31-43: 200 ng/ml; FA de leche 1%.

[98]

#### 4.6.4. Efectos de la leche sobre la coestimulación con péptidos de gliadina y citoquinas inflamatorias

Al agregar TNF- $\alpha$  a la condición anterior se observó que independientemente del péptido incorporado, la preincubación con FA de leche de MC incrementó significativamente la activación de la vía NF- $\kappa\beta$  en comparación tanto a células preincubadas con leche de MS, como a células que no recibieron una preincubación (figura 39). En cuanto a la muerte celular, no se observaron mayores diferencias considerando los distintos estímulos (no se muestra en las gráficas).

Si bien el IFN- $\gamma$  no induce la activación de la vía NF- $\kappa\beta$ , por los efectos que tiene sobre las células epiteliales se quiso explorar si se presentaba algún efecto potenciador sobre la acción de los péptidos. No se observaron diferencias significativas, aunque existe una tendencia a una disminución de la muerte celular comparando la incubación sin leche de P31-43 con el mismo péptido preincubado con leche de MS (figura 40). La activación de la vía NF- $\kappa\beta$  no mostró diferencias significativas al analizar la muerte celular considerando los subgrupos temporales, se observó una diferencia significativa al incubar P31-43 e IFN- $\gamma$  simultáneamente entre leches de MC y MS, en particular en el grupo menor a 6 meses, mostrando las MC una mayor muerte celular.

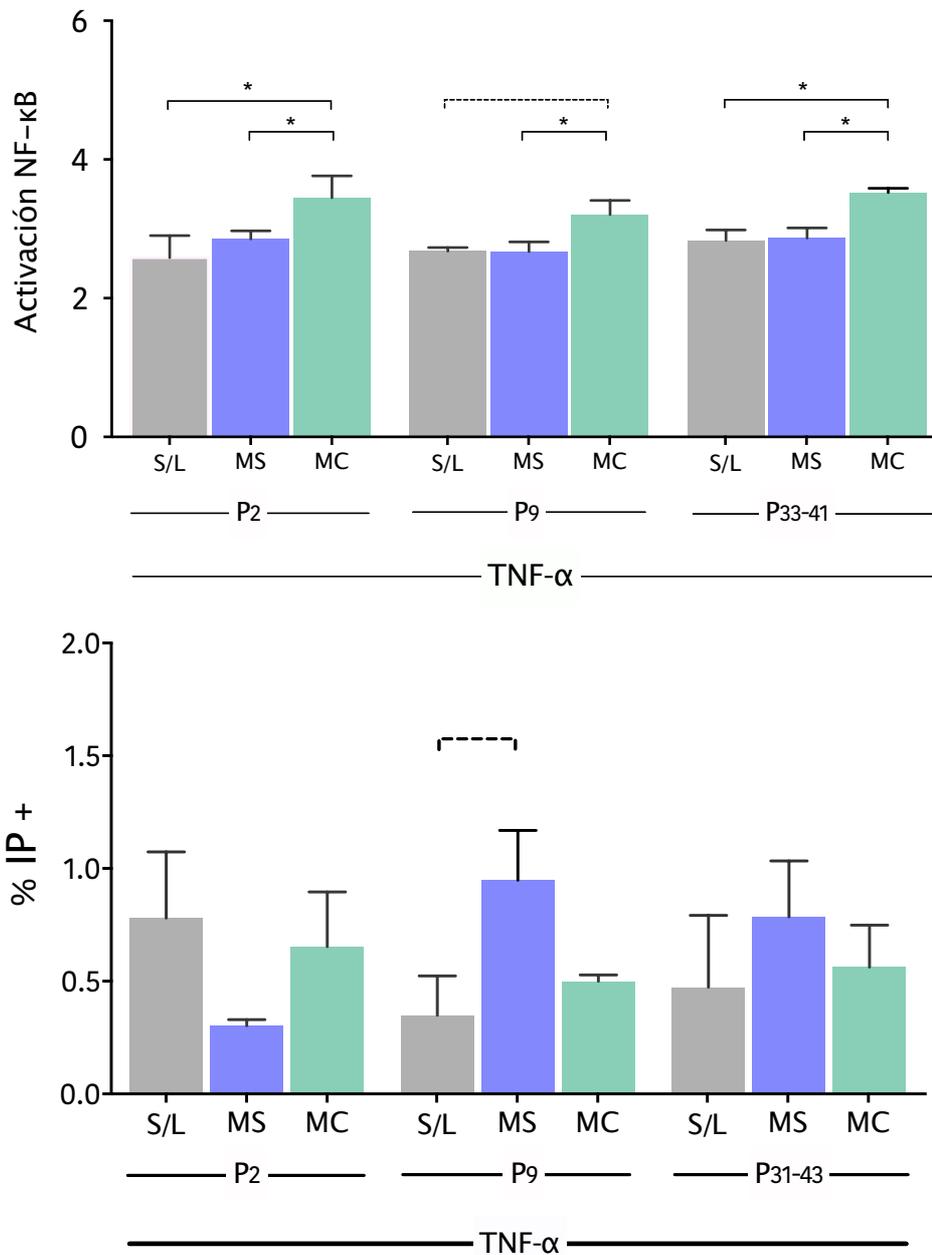


Figura 35. Las células HT-29-GFP preincubadas con FA de leche de MS y de MC fueron estimuladas con los péptidos sintéticos de gliadina (P2, P9 o P31-43, 200 µg/ml) en simultáneo con 1 ng de TNF-α (A) o 1 ng/ml de IFN-γ (B). Los datos se encuentran expresados como cociente respecto a la condición sin estímulo. Las barras indican las medias y desviación estándar de determinaciones por triplicado. Las líneas horizontales y asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos.  
 S/L (sin leche); MS (pool de leche de MS); MC (pool de leche de MC).  
 Concentraciones utilizadas: TNF-α: 1 ng/ml; FA de leche 1%.

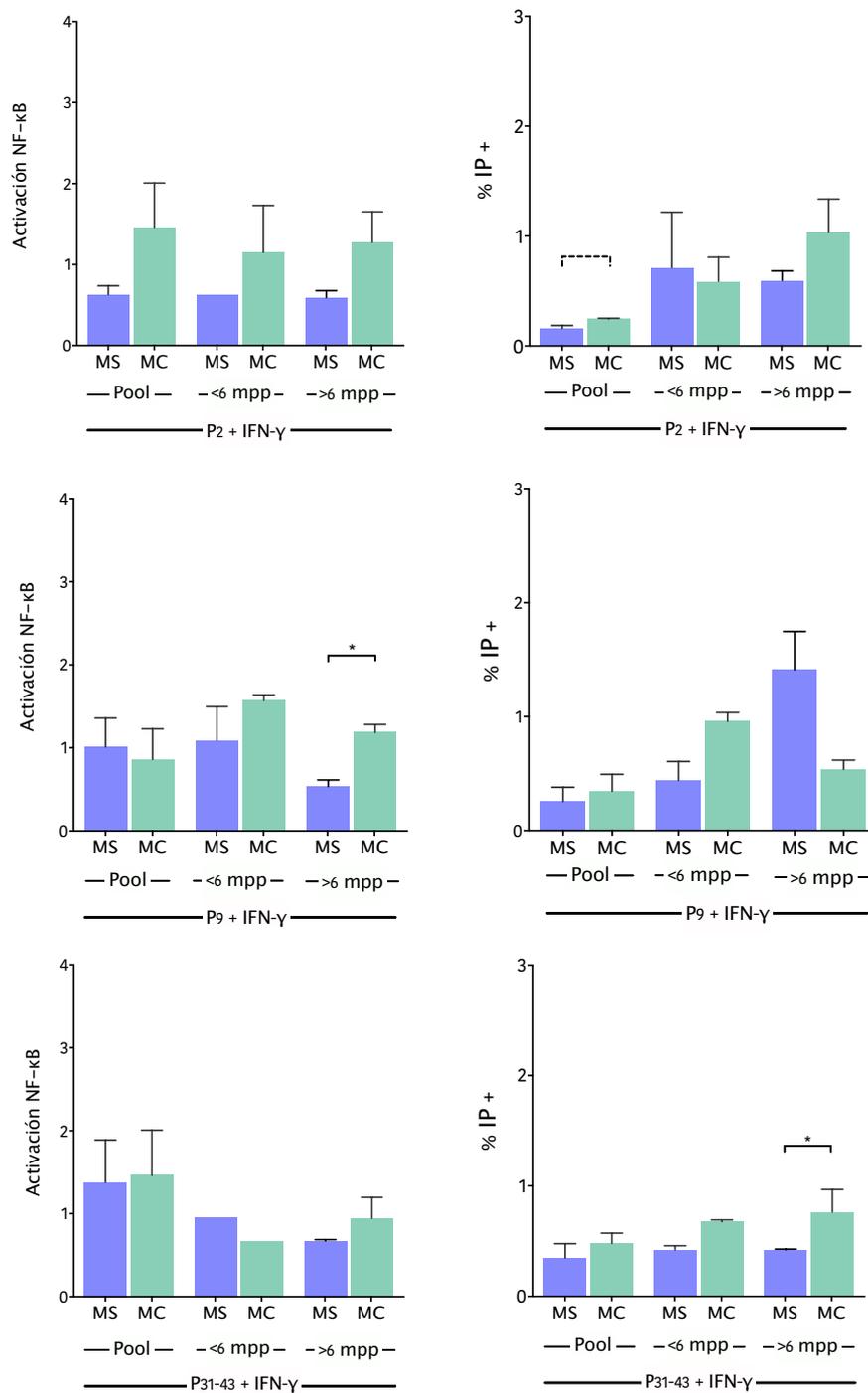


Figura 36. Estimulación de células HT-29-GFP con leche de MS y de MC y psGLD (P2, P9 y P31-43) e IFN- $\gamma$  simultáneamente. A la izquierda se observa la activación de la vía NF- $\kappa$ B y a la derecha la muerte celular. Para cada condición se indican medias y las barras de error son los desvíos estándar de determinaciones por triplicado. Los datos se encuentran expresados como cociente respecto a la condición sin estímulo (S/E). Las barras horizontales y asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos. MS (pool de leche de MS); MC (pool de leche de MC). Concentraciones utilizadas: IFN- $\gamma$ : 1 ng/ml; FA de leche 1%.

## 4.7. Ensayos con la línea celular HT-29

### 4.7.1. Efectos de la FA de la leche sobre la expresión de HLA-DR

En este ensayo, se realizaron las preincubaciones con leches de ambos grupos tal como en los ensayos anteriores, adicionando un estímulo inflamatorio IFN- $\gamma$  y/o una solución de un pool de pGLD, al representar condiciones que podrían afectar el epitelio intestinal de un individuo celíaco incrementando la expresión de moléculas de MHC-II y por lo tanto la potencialidad de activar linfocitos Th memoria que contribuyan con la cascada patogénica.

Respecto al IFN- $\gamma$ , se utilizaron condiciones previamente optimizadas para inducir la expresión máxima de HLA-DR con mínima pérdida de viabilidad celular. Respecto a los péptidos, se utilizó un pool de concentración total de 200  $\mu\text{g/ml}$ , conteniendo cantidades iguales de cada pG (P2, P9 y P31-43).

Como era de esperar la máxima inducción de HLA-DR se observó con el IFN- $\gamma$ , que incrementó en un factor de 5 la expresión de la molécula de superficie, mientras que los péptidos tuvieron un efecto moderado sobre la inducción de la expresión de HLA-DR, sin observarse sinergismos con ambos estímulos en simultáneo.

Interesantemente, la preincubación con fase acuosa de leche de MC en contraste con la leche de MS, potenció significativamente la expresión de HLA-DR; además, este efecto fue observado con el pool de leche de los subgrupos correspondientes a los dos períodos de lactancia. En contraste, la preincubación con la leche de MS no mostró efectos significativos sobre la expresión de HLA-DR, aunque con la leche del grupo de mujeres sanas en lactancia más tardía (>6m) se observó una tendencia (figura 41).

Al incubar únicamente con el pool de péptidos de gliadina, se observó una tendencia a aumentar la expresión de HLA-DR en células preincubadas con leche de MC previas a los 6 meses posparto con respecto a la preincubación con leche de MS.

Al estimular con IFN- $\gamma$  y péptidos de gliadina simultáneamente, se reprodujo el efecto observado con el IFN- $\gamma$ .

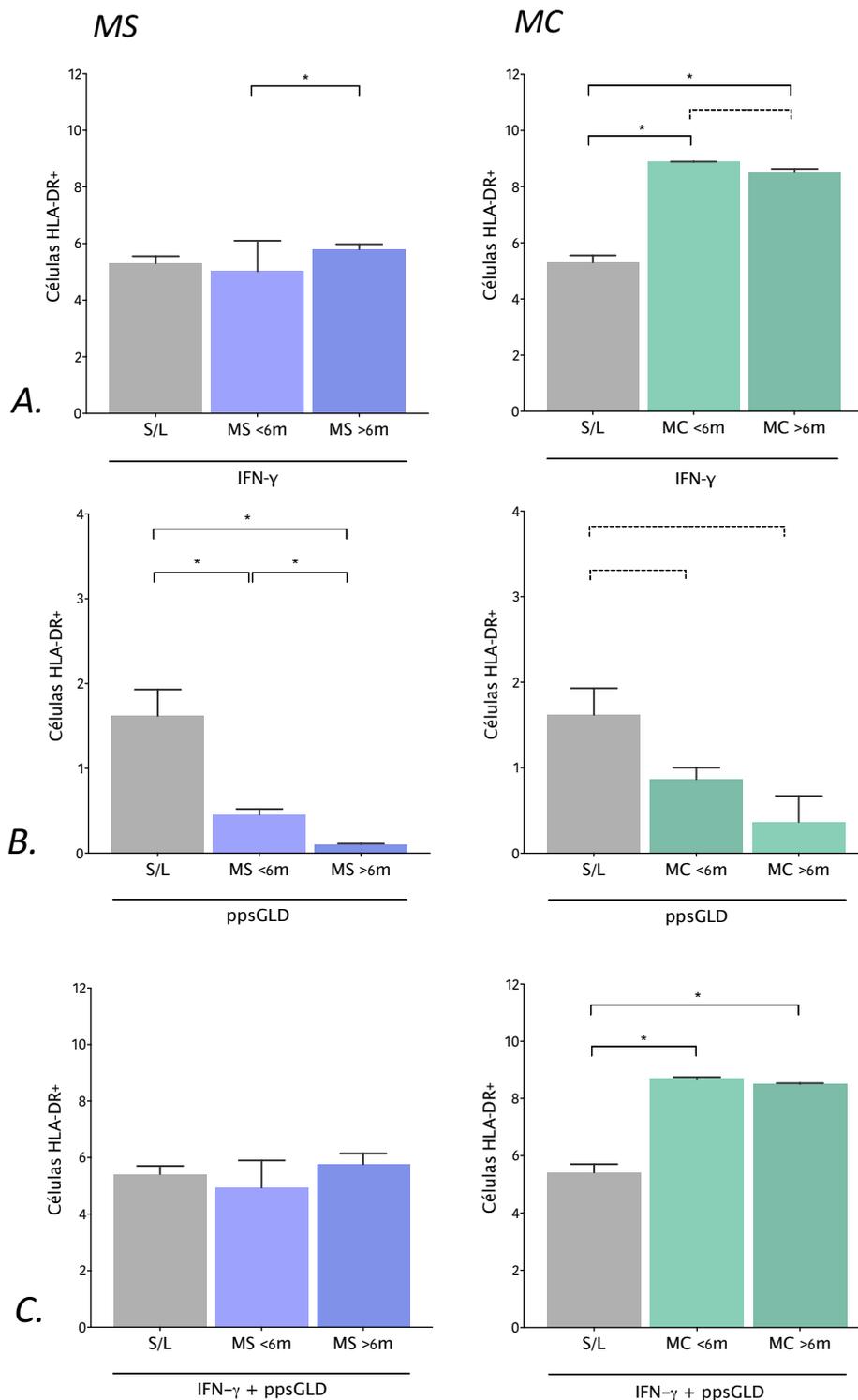


Figura 37. Efectos de la leche sobre la expresión de la molécula HLA-DR en las células HT-29. Se muestran los cambios en la expresión de HLA-DR respecto a la condición basal cuando las células fueron estimuladas con IFN- $\gamma$  1 (A.), pool de péptidos sintéticos de gliadina (ppsGLD) (B.) o la combinación de ambos estímulos (C.), con o sin preincubación con el pool de la fase acuosa de la leche de MS o MC, correspondientes a las dos etapas de lactancia estudiadas (<6 o >6 meses posparto). Los datos se encuentran expresados como cociente respecto a la condición sin estímulo (S/E). Las barras horizontales y asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos. IFN- $\gamma$ : 1 ng/ml

## 5. Discusión

### 5.1. Aspectos generales sobre el grupo de estudio

Las características socio demográficas, el estado de salud, aspectos antropométricos y fisiológicos maternos están incluidos entre los múltiples factores que pueden incidir sobre los parámetros bioquímicos e inmunológicos de la leche. En este sentido, para integrar el grupo de estudio de este trabajo se consideraron exclusivamente MS o que padecieran EC como única condición patológica; la mayoría de las MS eran donantes al Banco de Leche humana, y considerando en todos los casos los criterios de inclusión del mismo, que descarta condiciones infecciosas y otras patologías no transmisibles que pudieran impactar en la composición de la leche. Adicionalmente el grupo de estudio solo incluye residentes en zona urbana de Montevideo, como forma de acotar variabilidad en cuanto a las condiciones ambientales, ya que está reportado que la exposición a diferentes patógenos condiciona la composición e influyen en varios componentes bioactivos de la leche<sup>129,130</sup>.

Por otra parte, factores operacionales en relación a la extracción y conservación de las muestras contribuyen a la variabilidad. Se entregó un instructivo a las donantes explicando de qué forma se debía realizar la extracción para minimizar la variabilidad.

### 5.2. Composición

#### 5.2.1. Macronutrientes

En general, la composición de macronutrientes de la leche es independiente del estado nutricional materno con excepción de algunos componentes no proteicos como vitaminas liposolubles y algunos minerales<sup>131,132</sup>. En particular, el aporte de proteínas de la leche no está generalmente condicionado por el estado nutricional materno como forma de preservar la nutrición del lactante. Es posible que la DLG se asocie con un mayor consumo proteico de origen animal y otros cereales como soja, pero en este trabajo no es posible correlacionar el discreto aumento proteico en FA de las MC con la diferencia de dieta entre los grupos, aunque no se descarta que podría tener cierta influencia sobre la composición relativa. En este sentido un perfil aminoacídico aportaría más

información y en el caso de obtener diferencias significativas podrían incidir sobre la valoración de proteínas por el método de Bradford, ya que es dependiente de la composición de las proteínas.

En este contexto general, como punto de partida de la caracterización de la leche nos interesó explorar el aporte energético y los componentes mayoritarios que contribuyen con el mismo: lípidos, lactosa y proteínas.

En contraste, el perfil lipídico y el aporte de algunos micronutrientes puede estar condicionado por la dieta materna, y la suplementación puede aumentar la concentración de los mismos en la leche además de mejorar el estado de salud materno (ácidos omega 3, Tiamina, Riboflavina, vitaminas B6, B12, A, D así como selenio y yodo)<sup>131</sup>. En contraste, la deficiencia de otros micronutrientes no se ve reflejado en la leche (Folato, calcio, hierro, zinc, cobre).

Si bien la EC se caracteriza por una lesión en el intestino delgado no hay correlaciones bien establecidas entre déficits de algún nutriente y grado de la lesión intestinal.

El síndrome malabsortivo asociado a la EC activa puede asociarse al déficit de algunos minerales y vitaminas mientras se mantiene la lesión intestinal, la cual remite luego de varios meses de dieta estricta libre de gluten. Se ha reportado deficiencias de vitaminas A, D, B12, B6 y ácido fólico en un rango variable entre el 7.5 y 20% entre las mujeres estudiadas en una población italiana, mientras que la deficiencia de zinc fue mucho más frecuente (67%)<sup>133</sup>. Por lo tanto, no es posible descartar que existan diferencias en el aporte de algunas vitaminas en la leche de MC si no recibieron suplementación durante el embarazo y lactancia. Desde el enfoque inmunológico de nuestro trabajo, sería de interés determinar los niveles de vitaminas A y D, por su rol en el desarrollo de la tolerancia oral.

Las proteínas de la leche humana se encuentran mayoritariamente en la fase acuosa y las caseínas que integran las micelas representan una fracción menor al comparar con la leche de otras especies (entre el 30-40 % de las proteínas en FA de leche humana madura)<sup>134-136</sup>. A su vez, los componentes con actividad inmunológica representan hasta el 10% del total de las proteínas de la leche, en su mayoría presentes en la fase acuosa.

En una primera instancia comparamos el contenido proteico valorado en dicha fracción por el método de Bradford.

[105]

Si consideramos el rango intercuartil de ambos grupos de estudio, el grupo de MC tiene un contenido proteico en la fase acuosa comprendido entre 8.0-13.5 mg/ml (mediana 10.1), mientras que en el grupo de mujeres sanas el rango fue de 3.8-11.9 mg/l (mediana 9.03). Interesantemente los resultados muestran un mayor contenido proteico en la leche de mujeres celíacas, en particular en la leche obtenida más tardíamente (luego de 6 meses).

Pero, por otra parte, desde el punto de vista del aporte total de proteínas que recibe el niño, nos interesó analizar la leche entera, lo cual no es posible por el método de Bradford debido a interferencias con componentes lipídicos; se utilizó entonces la metodología que se utiliza de rutina en el BLH del CHPR. La correlación significativa obtenida entre los valores obtenidos por ambos métodos es consistente con el hecho de que la fase lipídica de la leche representa una fracción muy minoritaria de las proteínas totales. Las diferencias en los valores absolutos de concentración proteica, también se atribuyen a que ambos métodos se basan en distintos conceptos para valorar las proteínas. Mientras que en el método de Bradford se basa en la formación de un complejo coloreado entre los aminoácidos básicos de las proteínas con el colorante azul Coomassie, el equipo automatizado Lactoscan, utiliza tecnología de ultrasonido para valoración de cualquier tipo de leche, cuando cada parámetro es valorado por un método de referencia con la leche de la especie específica en estudio.

Las proteínas mayoritarias que integran la FA de la leche humana son: caseínas (~30-40%) lactoferrina y alfa-lactoalbúmina (20% cada una), sIgA, lisozima y seroalbúmina (entre 10 y 15%). No fue posible determinar en este trabajo si el mayor nivel proteico de la leche de MC se debe a la mayor contribución de alguna de estas proteínas específicas; la única proteína mayoritaria valorada específicamente fue la sIgA que mostró una tendencia opuesta como se discutirá en la siguiente sección.

Las proteínas de la fase acuosa son producidas por los lactocitos o son transportadas a través de estos hacia el lumen por distintos mecanismos, que involucran receptores de membrana (ej. anticuerpos) o procesos de exocitosis de vesículas (ej. caseínas).

El epitelio representa una interfase entre dos medios de composición diferente y se debe controlar la interdifusión de los componentes que presentan distinta concentración en ambos compartimentos, como las proteínas de la leche, la lactosa y las sales como sodio y cloruro que son

mucho menores en la leche; en este sentido el pasaje intercelular está limitado a moléculas pequeñas (<600 Da) en condiciones de salud de la GM.

El hecho de que la concentración salina determinada con el Lactoscan no muestre diferencias significativas entre la leche de los dos grupos de estudio, puede argumentar a favor de un estado normal de las uniones estrechas entre los lactocitos, si bien una determinación específica de estos iones sería pertinente para profundizar en este aspecto.

Nuestra hipótesis de que el epitelio de la GM de las mujeres celíacas presentara características parecidas al epitelio intestinal con posible defecto en las uniones estrechas se exploró en forma indirecta también analizando la posible correlación entre proteínas totales y anticuerpos IgG que derivan principalmente de sangre y al ser monoméricos su difusión por la vía paracelular sería más favorable en comparación con IgA e IgM, pero no se encontró una correlación significativa. El análisis de otra proteína específica mayoritaria también aportaría al análisis.

Uno de los factores que en las mujeres celíacas contribuye a la mayor permeabilidad intestinal es la producción de altos niveles de zonulina, un péptido con acción sobre células epiteliales y endoteliales<sup>137</sup>. Aunque no se dispone de información sobre los posibles efectos de la zonulina sobre el epitelio mamario, la determinación de sus niveles en la sangre de estas mujeres enriquecería el análisis.

En relación a los factores de crecimiento valorados en este trabajo que pudieran tener impacto sobre la función barrera epitelial a nivel de la GM se encuentran el TGF- $\beta$  y EGF, para los cuales no encontramos diferencias significativas; de todas formas, la principal acción de estos factores se espera que ocurra en etapas previas al establecimiento de la lactancia.

En suma, con los elementos considerados en este trabajo en forma indirecta podríamos sugerir que no habría una alteración de la permeabilidad del epitelio de la GM en mujeres celíacas en DLG, aunque se requerirían estudios más específicos como la determinación de zonulina o de marcadores de daño epitelial como productos de degradación de citoqueratina.

## 5.2.2. Anticuerpos totales

La menor concentración de IgA que detectamos en la leche de mujeres celíacas también se refleja al comparar la contribución relativa (IgA/proteínas totales), es consistente con los obtenidos por los otros dos grupos que han analizado muestras de leche de MC, a pesar de las diferencias en la integración de los grupos; en el trabajo de Olivares (2014)<sup>138</sup> se analiza un panel de 12 muestras de leche de un mes post parto (n=12), y obtienen valores de IgA significativamente menores.

En un trabajo más reciente, Roca et al (2017)<sup>118</sup> plantea un grupo de estudio más comparable al de nuestro trabajo en relación al número de donantes y adicionalmente realizan un seguimiento longitudinal para algunas madres, pero el estudio está limitado a los seis primeros meses de lactancia. Por otra parte, el panel de estudio presenta una heterogeneidad mayor al incorporar madres que residen en varios países europeos y llamativamente los menores niveles de IgA en leche de MC solo se observan en un pequeño grupo de madres italianas.

En suma, la menor contribución de IgA de la leche de MC es una característica observada en los estudios realizados al respecto y que requiere un análisis profundo de las posibles causas fisiológicas.

Nuestro trabajo amplía esta información ya que encontramos un patrón similar para la IgM que no fue estudiada en los trabajos mencionados. Mientras que la IgG que deriva mayormente de sangre se encuentra en niveles similares entre ambos grupos, las IgA e IgM, que comparten un mecanismo de secreción a la leche a través del receptor de poli-Ig, son afectadas en las MC. Al analizar los posibles factores que conllevan a tener menores niveles de IgA en leche de mujeres celíacas se pueden considerar varios aspectos que podrían estar alterados y a su vez interrelacionados: *i.* la cantidad de plasmoblastos y/o plasmocitos que llegan al compartimento mamario y estén produciendo localmente en la GM los anticuerpos; *ii.* el proceso de diferenciación de plasmoblastos que completan su desarrollo en la GM; *iii.* la cantidad de anticuerpos secretados por célula; *iv.* el proceso de secreción por el epitelio mamario; *v.* la densidad de expresión de los receptores de transporte.

Por otra parte, el control hormonal que gobierna la expresión de receptores en la GM es un parámetro no explorado en humanos. En general, existe muy poca información en relación a la fisiología molecular y regulación de la lactancia en humanos, en parte debido a las dificultades en acceder a muestras de tejido en condiciones de salud.

Los modelos experimentales brindan información parcial debido a las diferencias fisiológicas entre especies. Por ejemplo, si bien la IgA es el isotipo predominante en los ratones, en contraste con lo que ocurre en humanos los niveles van aumentando progresivamente durante la lactancia, en forma concomitante con el aumento de la expresión de MadCAM-1 y pIgR<sup>139</sup>.

Por otra parte, si bien hay gran interés en la fisiología de la GM de los rumiantes por aspectos productivos, las diferencias en el tipo de placentación acompañan la diferencia en la composición inmunológica de la leche donde predomina la IgG, que formarán parte de los anticuerpos circulantes del neonato que nace sin anticuerpos en sangre.

A nivel inmunológico, las diferencias en el tipo de placentación entre estas especies que se vinculan al rol de la leche materna a nivel del sistema inmune neonatal son importantes y se hace necesario disponer de información en humanos. De hecho, se mantiene aún cierta controversia sobre aspectos como las moléculas de adhesión implicadas en el homing de las células del GALT a la GM.

Una aproximación indirecta que podría aportar a esta temática sería mediante el análisis de células presentes en la leche; esta estrategia ha permitido obtener información muy valiosa sobre el transcriptoma en distintos momentos y condiciones de salud durante la lactancia<sup>140</sup>. Las células epiteliales son las mayoritarias en leche madura, variando entre el 50-90% del total<sup>141,142</sup>.

En relación a nuestro trabajo sería una herramienta valiosa estudiar la expresión del receptor de poli-IgR en células epiteliales purificadas de leche fresca, y explorar si las diferencias en los niveles de IgA se pudieran explicar por este mecanismo. Sin embargo, no fue posible realizar este tipo de estudio en el marco de esta tesis ya que se requiere leche fresca y cantidades relativamente grandes.

Entre las funciones de la sIgA en el intestino neonatal están proteger de la invasión de patógenos, participar en los mecanismos de tolerancia oral y regular la homeostasis de la microbiota por mecanismos de exclusión.

Algunos modelos experimentales dejan en evidencia un diálogo bidireccional ya que la microbiota influye sobre la expresión del receptor pIgR en las células epiteliales. La ausencia de IgA maternas en los animales *knock out* propició la traslocación de bacterias aerobias oportunistas a los ganglios mesentéricos y alteraciones en la composición de la microbiota en la etapa adulta con cierto

paralelismo entre especies características de individuos con enfermedad inflamatoria intestinal pediátrica<sup>143</sup>.

En el caso de la leche de MC se observa una disminución en el aporte de IgA y el impacto de esta característica en la salud neonatal es difícil de ponderar. De todas formas, teniendo en cuenta que la inmunodeficiencia selectiva de IgA en pacientes celíacos es mayor que en la población general<sup>144</sup>, es interesante tener en cuenta estos resultados para eventualmente tomar medidas profilácticas respecto a la adecuada colonización del intestino neonatal en tales situaciones.

### 5.2.3. Anticuerpos específicos

#### Anticuerpos anti-toxoide tetánico

La presencia de anticuerpos en la leche responde a producción materna local y sistémica. En este último contexto se basa la protección neonatal adquirida por la vacunación materna frente a patógenos virales (virus de la gripe), bacterianos (tos convulsa) y toxinas (tetánica), altamente recomendadas durante el embarazo<sup>46</sup>. En particular la vacunación antitetánica vigente es de control rutinario en el embarazo, por lo que nos pareció interesante considerar a estos anticuerpos específicos como un parámetro inmunológico de la respuesta adaptativa sistémica común a toda la población de estudio. En forma consistente con un trabajo anterior de nuestro grupo, detectamos anticuerpos específicos en la mayoría de las muestras<sup>145</sup>. El resultado obtenido de mayor proporción de anticuerpos específicos en relación a los anticuerpos totales para los isotipos IgA e IgM en el grupo de MS respecto a las MC sugiere diferencias en el repertorio de especificidades en los plasmocitos del compartimento intestinal. El resultado en cambio no es significativo para el isotipo IgG, que se vincula con un mecanismo de transporte distinto a partir de circulación (receptor neonatal).

#### Anticuerpos anti-gliadina

Después de una ingesta, un individuo tiene en la circulación cantidades detectables de antígenos dietarios que pueden llegar a la leche; varios autores han reportado gliadina, ovoalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina en forma intacta en leche materna, en el orden de ng- $\mu$ g/ml<sup>128,146,147</sup> libre o formando inmunocomplejos.

La presencia de antígenos dietarios en sangre plantea la posibilidad de la generación de anticuerpos específicos no solo en el compartimento de las mucosas sino también a nivel sistémico<sup>148</sup>; consistentemente en un trabajo previo hemos detectado anticuerpos IgG específicos contra ovoalbúmina y gliadina en calostros donados por mujeres sanas<sup>145,149</sup>.

La mayor proporción de anticuerpos específicos contra gliadina en mujeres celíacas respecto a las mujeres sanas puede reflejar diferencias en el repertorio de plasmocitos de la mucosa intestinal en esta condición. Si bien las participantes celíacas han reportado una dieta libre de gluten durante al menos dos años, las transgresiones accidentales, así como la larga vida de los plasmocitos y células de memoria podrían explicar estos resultados.

Por otra parte, dado que el método de ELISA no es absoluto y los títulos están condicionados por la avidéz de los anticuerpos, sería bueno analizar si existen diferencias cualitativas en la respuesta antigliadina analizando esta propiedad mediante la determinación del índice de avidéz en ambos grupos de estudios. La producción de anticuerpos IgA en forma T-independiente asociado a una menor afinidad de los anticuerpos podría contribuir diferencialmente en los grupos de estudios e impactar en los resultados obtenidos y su interpretación.

A su vez, esta interpretación estaría en línea con la menor contribución relativa de anticuerpos contra el TT. En este contexto es interesante que en el grupo control se observó correlación significativa entre los anticuerpos anti TT y anti GLD mientras que en el grupo de celíacas no se encontró significancia estadística, respaldando también el concepto de un repertorio sesgado hacia una producción dominante de anticuerpos contra GLD en este grupo.

Nuestros resultados contrastan con los reportados por Roca et al<sup>118</sup>, ya que no observaron diferencias significativas en relación a los anticuerpos anti gliadina entre las mujeres celíacas y sanas. Estas diferencias se podrían explicar porque no estudiaron muestras de leche extraídas durante la lactancia más tardía, que es la condición en la cual se observa significancia estadística en nuestro grupo de estudio.

No es posible descartar que una vez que se comienzan a incorporar alimentos sólidos, incluidos aquellos conteniendo gluten, se propicie un contacto del antígeno con el sistema inmune local de la GM. El flujo retrógrado de leche desde la boca del niño hacia la GM está reportado así como los

cambios en la composición inmunológica de la leche en respuesta a infecciones del niño, en condiciones de salud materna, sugiriendo un muestro del patógeno con inducción de una respuesta local materna<sup>150</sup>. Por lo tanto es posible que una producción local a partir de la activación de linfocitos T y B memoria específicos que han colonizado la GM contribuya también con los mayores niveles de anticuerpos específicos observados en las MC, al tener una mayor población de células memoria específicas.

Por otra parte, no hay información disponible sobre los posibles efectos de la gliadina sobre la respuesta innata en el epitelio mamario, por lo que sería de interés considerar estos aspectos en estudios futuros en algún modelo experimental in vivo para profundizar en la temática.

Los resultados en relación a las diferencias en los títulos de anticuerpos anti gliadina merecen una discusión respecto al posible impacto en el intestino neonatal.

Los anticuerpos IgA pueden contribuir con los mecanismos de tolerancia oral en el intestino neonatal cuando el antígeno como complejo inmune interactuando con un receptor expresado en las células M. Estos mecanismos a su vez son potenciados si el microambiente tisular es rico en componentes como TGF- $\beta$ <sup>151</sup>. En estudios con madres alérgicas a proteínas de la leche de vaca se ha establecido que el riesgo a desarrollar alergia en el niño es mayor cuando la madre no tiene anticuerpos específicos en leche para las proteínas bovinas<sup>152,153</sup>. A su vez en modelos experimentales se ha demostrado que la administración de inmunocomplejos en presencia de las citoquinas mencionadas protege contra una respuesta alérgica<sup>56</sup>.

En este contexto los resultados que muestran mayores niveles de anticuerpos IgA anti gliadina en las mujeres celíacas puede representar un componente potencialmente protector para el niño, aunque hasta el momento no se ha podido establecer correlación entre protección a la EC y lactancia. Roca et al (2017) no encontraron correlación entre los niveles de anticuerpos específicos anti gliadina y el desarrollo de la EC en niños con riesgo genético ya que encontraron niveles similares de anticuerpos específicos en los niños que desarrollaron la EC (n=9) y los que permanecieron sanos (n=74) luego de seis años de seguimiento.

En suma, si bien en valor absoluto el aporte de anticuerpos IgA es menor en mujeres celíacas, la dieta restrictiva no es una limitante para el aporte de anticuerpos anti gliadina que son importantes para el establecimiento de los mecanismos de tolerancia oral.

#### 5.2.4. Anticuerpos específicos de la EC

Los anticuerpos específicos de la EC en sangre disminuyen su concentración y llegan a hacerse indetectables en la mayoría de los casos luego de dietas prolongadas libres de gluten. No hay reportes del estudio de estos anticuerpos ni otros parámetros en leche de MC con enfermedad activa, y nos pareció de interés de todas formas estudiar su posible presencia en leche de madres con DLG prolongadas, ya que pueden existir transgresiones involuntarias a la dieta con reactivación de la respuesta adaptativa a partir de los linfocitos memoria.

Se detectaron uno o ambos tipos de anticuerpos específicos en seis de MC y sorprendentemente también en cuatro MS. No disponemos valores de referencia en leche como para afirmar que se trata de concentraciones significativas desde el punto de vista de la lesión intestinal; sin duda una limitante de este trabajo es no disponer de muestras pareadas de sangre materna. Sólo disponemos de información al momento del diagnóstico, en el cual un 44% de las madres eran seropositivas para anticuerpos anti tTG, anti pdGLD y anti endomisio.

Desde el punto de vista de la salud neonatal, teniendo en cuenta que el pasaje a sangre está muy limitado en el intestino del lactante fuera de condiciones de prematuridad, la presencia de estos anticuerpos en el lumen intestinal tendría escaso potencial patogénico a menos que la molécula blanco fuera expresada fuertemente en el epitelio intestinal y pudieran alterar la función epitelial. Como se mencionó anteriormente, no disponemos de información sobre la significancia biológica de los niveles de anticuerpos detectados en leche y menos aún en el intestino.

La presencia de anticuerpos anti-tTG en leche podría reflejar la persistencia de plasmocitos de larga vida en la mucosa intestinal o su generación in situ en la GM. En este último caso, al ser autoanticuerpos dependientes del gluten, la GM debería responder a la entrada de gluten y a la presencia de tTG en el tejido mamario en condiciones tales que transcurra la reacción de entrecruzamiento para formar los complejos tTG-GLD, requeridos para que los LB anti-tTG tengan

la colaboración de los LTh, específicos para gliadina. La tTG es una enzima ubicua y su presencia en tejido mamario se ha reportado, por lo que no es posible descartar la idea en un principio

En particular, el ingreso de gliadina a través del flujo retrogrado del lactante, cuando este ya consume gluten podría representar una vía de entrada. La muestra q reportó un elevado título de Acs anti-tTG corresponde a seis meses post parto, por lo que no se posible descartar esta hipótesis.

### 5.2.5 Gliadina y complejos inmunes de gliadina

Como la presencia de anticuerpos anti tTG y anti pGLD en algunas MC podría reflejar transgresiones, nos planteamos que una forma de verificar esto fue analizar la presencia de péptidos de gliadina en leche, así como de complejos inmunes. El pasaje de antígenos dietarios intactos a sangre en individuos sanos es un proceso fisiológico descrito para varias proteínas.

En particular fue estudiado para proteínas alergénicas como betalactoglobulina<sup>154</sup> y ovoalbúmina<sup>147</sup> así como para la gliadina<sup>128,155</sup>. Chirido et al, 1998 detectaron la gliadina nativa en todas las muestras de leche madura de un grupo de 49 donantes sanas, en un amplio rango de concentraciones (5 ppb-1.2 ppm) con valores y frecuencia de detección en leche superiores que en sangre. Consistentemente Troncone et al 1987 estudiaron los niveles de gliadina luego de una ingesta controlada de 20 g de gluten, encontrando también concentraciones variables máximas a las dos horas de la ingesta (5-95 ppb) en un 68 % de las muestras. Sin embargo, la gliadina en leche de grupos de MC no fue estudiada previamente.

No se conocen los mecanismos de transporte de proteínas intactas a través del epitelio intestinal, se plantea que la vía paracelular así como el transporte por endocitosis podrían estar implicados<sup>151</sup>. Por lo tanto, la permeabilidad intestinal alterada podría tener un rol central. En este sentido se han encontrado concentraciones mayores de gliadina en la sangre de niños celíacos en comparación con los sanos, en asociación con el estado de la mucosa intestinal<sup>156</sup>. Por lo tanto, es posible que las MC con lesión intestinal o en condiciones de una mayor permeabilidad inducida por consumo ocasional de gliadina, presenten mayor transporte a leche de proteínas dietarias, ya sea en forma libre o a través de inmunocomplejos.

Nuestros resultados en relación a la detección de gliadina en leche en el grupo de mujeres sanas presentan gran variabilidad, tal como fue reportada con los trabajos citados anteriormente, y

obtuvimos frecuencias de detección menor que las reportadas. Esta diferencia podría deberse a que no se controló en nuestro caso el tiempo desde el consumo de alimentos conteniendo gluten y la extracción de la muestra.

El resultado respecto a la detección de péptidos de gliadina en el orden de ppm en una alta proporción de las MC en DLG es muy llamativo y difícil de explicar. Si bien se ha reportado una permanencia de antígeno durante períodos de dietas de exclusión, no se analizaron en períodos tan prolongados, con excepción de una única muestra de madre celíaca en el trabajo de Chirido 1998, en el cual no detectó gliadina libre. Por otra parte, la presencia de inmunocomplejos de gliadina también estaría indicando la permanencia de gliadina en sangre.

El seguimiento del contenido de alérgenos en la leche de mujeres en ayunas y en distintos tiempos después de consumir la proteína en cuestión mostraron resultados erráticos respecto al tiempo de máxima detección de la proteína luego de la ingesta, entre las primera dos horas<sup>154</sup>, hasta 8-12 horas según el estudio. A su vez, la persistencia de la proteína en leche también fue variable y sorprendentemente prolongada luego de la restricción de la misma en la dieta materna<sup>154</sup>; incluso encontraron valores superiores de alérgenos después de la restricción y Chirido et al (1998), detectaron la gliadina intacta en leche luego de 9 días de DLG en mujeres sanas. El estudio no fue realizado con mujeres celíacas con excepción de una donante que estaba adherida a una DLG por dos años, y en este caso no detectó gliadina, con un método con sensibilidad de 1 ppb.

Sin embargo, no es posible comparar los resultados obtenidos con nuestro método en términos absolutos de concentración, ya que en nuestro trabajo están expresados en concentración de péptidos de gliadina en contraste con los métodos que utilizan gliadina nativa como estándar<sup>128,155</sup> tanto en formatos de ELISA competitivos como de captura.

En cuanto a la comparación con las concentraciones determinadas por el método comercial, si bien se utiliza una preparación de péptidos generados por hidrólisis para la curva de calibración, los resultados se expresan en concentración equivalente de gliadina según criterios del fabricante. En nuestro caso en cambio se expresaron en relación a la preparación de pGLD generada en el laboratorio. En este sentido, los valores absolutos de concentración no son comparables.

Por otra parte, las moléculas reconocidas por ambos métodos no son necesariamente iguales en base a las diferencias en los diseños del ELISA. El anticuerpo policlonal utilizado en el método desarrollado en el laboratorio reconocería un espectro más amplio de péptidos en comparación con el comercial que utiliza el anticuerpo monoclonal R5<sup>125</sup> que reconoce el motivo QPFFQ y análogos, que están presentes en forma repetida en el péptido inmunodominante 33-mer, otorgándole al método un mayor grado de especificidad pero excluyendo algunos péptidos no inmunodominantes pero con posibles efectos tóxicos directos sobre el epitelio.

En relación a la validación del método por el *spiking* realizado con el agregado de 20 ppm de gliadina a seis muestras, se obtuvieron valores que se consideran adecuados para pruebas inmunoquímicas, y se encuentran el orden de los reportados para el método comercial competitivo para determinar gliadina en preparados fermentados (81-166%, Ridascreen Gliadin competitive, R7021).

Sin embargo, para la prueba de *spiking* (tabla 8) se seleccionaron dos muestras seriadas de tres donantes que se extrajeron leche antes y después de una ingesta conteniendo gluten. Las muestras seriadas son las 1-2, 3-4, y 5-6; es llamativo en las muestras 2, 4 y 6 que corresponden al ayuno presenten gliadina detectable. En las muestras seriadas la concentración de anticuerpos específicos anti-gliadina no sería un factor de variabilidad, ya que se ha reportado que no varía significativa con la cantidad de gluten ingerido<sup>157</sup> por lo que consideramos que otros factores podrían estar incidiendo sobre estos resultados.

El límite de gluten según el Codex Alimentario para definir a un alimento como libre de gluten es de 20 ppm (lo cual equivale a un 50% de gliadina). No está bien establecida la correlación entre la cantidad ingerida y el daño intestinal o la sintomatología clínica; en base a algunos estudios de desafío o epidemiológicos se considera que los efectos adversos se presentan a partir del consumo de 100 mg/día y que serían tolerados entre 4 y 14 mg/día. Se estima que  $10^{-5}$  de la proteína ingerida podría pasar a sangre después de una ingesta<sup>151</sup>. En el caso de ingerir 100 mg por día de gliadina, podría detectarse un máximo de 1µg en sangre, lo cual podría estimarse en una concentración de 0.2 µg/L (ppb) en sangre. Por lo tanto, aun considerando características particulares de los péptidos de gliadina en cuanto a su secuencia poco susceptible a proteasas y a un posible transporte selectivo de gliadina a la leche, resulta difícil explicar los resultados obtenidos.

En cuanto a los aspectos técnicos que pudieran estar sobrevalorando el contenido de gliadina, consideramos que, si bien el método de ELISA desarrollado en el laboratorio fue validado por *spiking*, el distinto efecto de los anticuerpos específicos contra gliadina en las muestras podría contribuir a una sobreestimación, dependiendo de su concentración e índice de avidéz. Los anticuerpos anti gliadina generados en los pacientes, están dirigidos en su mayor parte a epítopes conformacionales<sup>158</sup> por lo tanto podríamos considerar que su interacción con el antígeno soluble y competencia con el anticuerpo comercial anti-gliadina utilizado es baja, pero no es posible descartar esta interferencia, que podría ocurrir en una extensión variable dependiendo de la muestra. Estos aspectos también han sido cuestionados por otros autores, aunque en ningún caso se reportó correlación significativa entre la concentración de antígeno libre y de anticuerpos específicos<sup>128,159</sup>.

La depleción de los anticuerpos específicos contra gliadina podría considerarse para verificar esta hipótesis, aunque es un procedimiento que no ha mostrado buenos rendimientos en trabajos previos del laboratorio, mediante inmovilización de GLD en un soporte hidrofóbico de Octadecil sílica. Consideramos de todas formas que es necesario profundizar en este aspecto del trabajo, teniendo un seguimiento más riguroso de la ingesta de la madre en el período de donación de las muestras, y que el complemento del estudio disponiendo de muestra de sangre pareada a la muestra de leches sería de gran valor.

Respecto a las limitaciones de la metodología analítica utilizada, debería plantearse una validación con un método no inmunoquímico, como ser un análisis por proteómica en algunas muestras secuenciales de leche de las madres en DLG para confirmar los resultados.

Finalmente, en base a los cuestionamientos que nos planteamos consideramos que no es posible en esta tesis sacar conclusiones respecto a los valores absolutos del aporte de gliadina a través de la leche en nuestros grupos de estudio. De todas formas, el aporte de anticuerpos específicos para gliadina, con niveles de TGF- $\beta$  comparable a la de MS, indicaría que el potencial para inducir tolerancia oral no estaría afectado en MC una vez que el niño comienza a ingerir gluten antes del destete.

### 5.3. Componentes inmunoreguladores y de acción sobre la función barrera epitelial

Las citoquinas presentes en la leche pueden tener distintos orígenes: ser secretadas al lumen del alvéolo por células epiteliales o células inmunes, o alternativamente derivar de las células contenidas en la leche. En condiciones de salud el aporte de citoquinas en leche puede interpretarse como un mecanismo compensatorio para el intestino, en la etapa que hay una escasa producción de estos mediadores; pueden tener efectos directos sobre el epitelio intestinal o interactuar con receptores en células inmunes en la interfase como las células dendríticas.

Por otra parte, el análisis de citoquinas en leche puede aportar información sobre el estado de la glándula mamaria, lo cual a su vez puede impactar sobre la composición de la leche. En base a estas consideraciones se analizan estos dos aspectos en relación a los resultados obtenidos en este trabajo.

### 5.4. En relación a la funcionalidad de la glándula mamaria

En los últimos años se ha puesto más énfasis en características particulares del epitelio intestinal en las personas celíacas y su rol en la fisiopatogenia. Clásicamente la alta permeabilidad intestinal en la EC puede atribuirse a los defectos causados por la cascada inmunológica que conducen a apoptosis aumentada de enterocitos<sup>160</sup>. Además, hay variaciones en la expresión de las moléculas que integran las uniones entre los enterocitos, con posible afectación de los rearrreglos de proteínas del citoesqueleto y moléculas de adhesión<sup>161</sup>.

En base a al vínculo entero-mamario estas modificaciones podrían estar presentes en el epitelio mamario y reflejarse en variaciones de la composición de la leche.

El epitelio mamario tiene características estructurales parecidas al epitelio intestinal, si bien hay poco conocimiento en condiciones de salud en la mujer. Las uniones estrechas forman parte de un complejo de unión entre células epiteliales y endoteliales conservados en vertebrados. Además de actuar como una barrera paracelular limitando el transporte de moléculas pequeñas a través del epitelio están implicadas en mecanismos de señalización en procesos vinculados a la apoptosis.

Una particularidad es la dinámica de las uniones estrechas en la GM siendo esenciales para iniciar y mantener el proceso de formación y secreción de leche. Luego del parto, con la caída de los niveles de progesterona las uniones estrechas quedan totalmente establecidas y la permeabilidad disminuye drásticamente.

Las uniones estrechas son particularmente sensibles al efecto de citoquinas inflamatorias, causando alteraciones en la permeabilidad. Algunos trabajos muestran cambios en la composición de la leche ante un estado inflamatorio de la GM como ser la mastitis subclínica, observando un aumento de citoquinas proinflamatorias en la leche, como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-17 y otros<sup>127</sup>. En este contexto y en base a las características de la EC nos planteamos analizar el contenido de citoquinas inflamatorias en leche, algunas de ellas producidas específicamente por células de la respuesta inmune como monocitos/macrófagos (ej. IL-12) mientras que otras como IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  también podrían ser secretadas por las células epiteliales del epitelio mamario<sup>162</sup>.

A su vez, las citoquinas podrían derivar de las células que permanecen viables en la leche, y mantener in vivo la producción de mediadores solubles por cierto tiempo. Si bien se podría suponer una muy baja probabilidad de que mantengan su actividad en el intestino neonatal, hay estudios en animales que demuestran la viabilidad de las células al pasar por el tracto digestivo en etapas tempranas de la vida, al tener propiedades distintas a las del adulto (pH gástrico y contenido de enzimas digestivas)<sup>163,164</sup>.

Nuestros resultados mostraron mayor prevalencia de IL-6 en la leche de MC que la de MS (71 vs 37% respectivamente). A su vez el test de Mantel-Haenszel nos permite afirmar que hay dependencia de estos resultados con el tiempo de lactancia, siendo más pronunciado al aumento en las muestras de la lactancia más temprana (< 6 meses posparto) lo cual es acompañado de concentraciones mayores. Es interesante destacar que la IL-6 se ha detectado también con métodos basados en su actividad biológica, lo cual le otorga más significancia biológica al hallazgo<sup>162</sup>; en relación con esto hay reportes que argumentan a favor de una actividad biológica in vivo debido a la compleja composición de la leche y la fisiología digestiva neonatal menos agresiva<sup>165</sup>.

Interesantemente la expresión de TNF- $\alpha$  y la quimioquina MCP-1 están en línea con los resultados observados para la IL-6, sugiriendo un perfil más inflamatorio para la leche de MC respecto a las

sanas, ya que no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de detección de las citoquinas inmunosupresoras IL-10 y TGF- $\beta$ .

En este sentido, es interesante contrastar nuestros resultados con el único reporte disponible de estos mediadores en leche de MC<sup>138</sup>. Si bien los autores no estudiaron a la IL-6 encontraron niveles significativos menores de IL-12, y una tendencia similar con el IFN- $\gamma$  en leche de MC, aunque con prevalencias similares para ambos grupos.

Una menor producción de ambos mediadores en mujeres celíacas resulta un hecho llamativo y contraintuitivo, si consideramos que la GM sería un reflejo de la respuesta inmunológica en el compartimento intestinal y que la elevada producción de ambos mediadores caracteriza a la EC. De todas formas, a diferencia de nuestro estudio el análisis se realizó en términos de cantidad de citoquina producida y no obtuvieron variaciones en la prevalencia, que fue cercana al 75% en estos casos.

Las discrepancias entre datos de citoquinas en leche está ampliamente reportado, podrían contribuir factores como la utilización de distintos métodos analíticos, la interacción de las citoquinas con otros componentes de la leche, su detección condicionada a la presencia en forma monomérica versus polimérica en algunos casos y su detección diferencial según el diseño del inmunoensayo y/o parámetros relacionadas al procesamiento y conservación de las muestras, en base a la gran labilidad de las citoquinas<sup>162,166</sup>. En nuestro caso utilizamos ensayos independientes para cada citoquina por ELISA mientras que el método utilizado por Olivares implica la detección simultánea por citometría de flujo utilizando perlititas fluorescentes específicas para cada citoquina.

Sin duda, el análisis de estos mediadores en baja concentración y lábiles en una única muestra por madre tiene sus limitaciones y sería apropiado complementar el estudio con alguna muestra secuencial, para evaluar si se trata de un estado transitorio.

La presencia de niveles mayores de IL-6 en la leche podría ser indicador de una inflamación local de bajo grado y sería interesante poder realizar estudios de correlación con otros marcadores más específicos de inflamación local y alteraciones del epitelio.

En cuanto al sTLR2, no hemos encontrado datos sobre la expresión del receptor en el epitelio mamario y de la regulación del shedding del mismo hacia la leche; podría provenir de células

[120]

inflamatorias de la GM. La correlación negativa entre sTLR2 y IL-8 en la totalidad de las muestras podría indicar diferentes orígenes de estos mediadores, aunque es imposible determinar una relación causa efecto con la información disponible.

En cuanto a los factores de crecimiento que están involucrados en el desarrollo de la GM, como ser TGF- $\beta$  y EGF no hay mucha información en humanos; de todas formas, como las uniones estrechas son una propiedad del desarrollo final de la GM es posible que no tengan efecto en las últimas etapas de la lactogénesis<sup>167</sup> y cómo se desarrolla a continuación el análisis de estos factores lo orientamos a sus efectos sobre el intestino del lactante.

## 5.5. En relación a la barrera epitelial y la función inmunológica del intestino del lactante

Varios componentes de la leche contribuyen a fortalecer la función barrera de la mucosa, ya sea a nivel del epitelio o en su globalidad teniendo en cuenta la tríada del mucus-enterocitos-IgA.

La leche contiene varios componentes que actúan en forma sinérgica para mantener una función barrera epitelial con permeabilidad adecuada, en este trabajo analizamos algunos de ellos: EGF, TGF- $\beta$  y TFF3.

El EGF es un componente detectado en la totalidad de las muestras que no mostró diferencias significativas en las concentraciones entre los grupos de estudio mientras que el TFF3, producido por las células de Goblet y con efectos sobre la consistencia del mucus, fue detectado en un menor número de muestras de leche de MC aunque sin consistencia estadística.

Una particularidad de estos componentes es la polifuncionalidad, que se hace muy evidente para el TGF- $\beta$  que además de actuar sobre la integridad epitelial contribuye con la función inmunológica del intestino.

El niño va adquiriendo progresivamente la capacidad de producir anticuerpos de isotipo IgA, y esto va en paralelo con la capacidad de producir los mediadores inmunológicos relacionados al cambio de clase como el TGF- $\beta$ <sup>30</sup>. Por otra parte, un microambiente rico en TGF- $\beta$  y IL-10 es necesario para la diferenciación de LTreg por las CD de la mucosa intestinal<sup>168,169</sup>. En suma, el TGF- $\beta$  participa en los

mecanismos de tolerancia oral en forma aislada o actuando en conjunto con la sIgA que media el ingreso de componentes del lumen.

Los niveles de producción de estas citoquinas en el intestino se van desarrollando progresivamente y la leche compensaría estas deficiencias en las primeras etapas de la vida. Su rol en la tolerancia oral se ha puesto en evidencia en trabajos experimentales en modelos murinos, mientras que los estudios de correlación en humanos entre el aporte de este factor y el desarrollo de enfermedades con una base inmunológica son aún controversiales<sup>170,171</sup>.

En relación a la EC, hemos detectado niveles significativos de TGF- $\beta$ 2 en un promedio de 43% de las muestras, independientemente de su condición clínica y del período de lactancia; estos valores son comparables a los reportados por Olivares et al (2014) para el TGF- $\beta$ 1. Sin embargo, los resultados contrastan en cuanto los autores encontraron menor cantidad de este factor en las muestras de leche de un mes de mujeres celíacas en comparación con las sanas. Las diferencias metodológicas y el hecho de estar midiendo dos moléculas distintas de la misma familia podrían explicar esas diferencias, siendo el TGF- $\beta$ 2 el predominante en leche materna, lo que hemos constatado en análisis de calostros en trabajo anteriores del grupo<sup>172</sup>.

Si bien un microambiente rico en TGF- $\beta$  en presencia de otras citoquinas como la IL-10 contribuyen a disminuir los efectos antiinflamatorios, las células dendríticas en un microambiente rico en TGF- $\beta$ , IL-6 y posiblemente IL-23, pueden condicionar la diferenciación de LT hacia un perfil Th17, un fenotipo altamente inflamatorio que junto con los linfocitos Th1 caracterizan a la lesión celíaca<sup>173</sup>.

En este sentido la presencia de altos niveles de IL-6 podría considerarse un factor desfavorable a nivel de la respuesta adaptativa generada en el intestino neonatal, aunque no es posible estimar la relevancia fisiológica de estos resultados ya que no hay suficiente información de la actividad biológica de las citoquinas exógenas a nivel del intestino neonatal.

Las otras citoquinas y quimioquinas inflamatorias encontradas en mayor frecuencia en las muestras celíacas (TNF- $\alpha$ , MCP1) en paralelo con menor detección de sTLR2, indicarían con conjunto un balance más proinflamatorio de la leche de MC respecto a las MS.

## 5.6. En relación a factores con efectos moduladores de la inflamación intestinal

### 5.6.1. Protección frente a la inflamación causada por bacterias

Una alteración de la barrera epitelial tendría como consecuencia la translocación microbiana y sus componentes. En particular, el lipopolisacárido (LPS) es un disparador clave de los efectos deletéreos sobre la barrera epitelial a través de su interacción con el TLR4 y moléculas accesorias de membrana CD14 y MD-2, que tiene como consecuencia la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y el aumento de la expresión del receptor<sup>174,175</sup>. De forma análoga, otros componentes microbianos, de levaduras y señales de peligro endógenas actúan sobre el TLR2, conduciendo a la activación de las mismas cascadas inflamatorias.

En ambos casos, la inflamación puede inducir la producción de las formas solubles (sTLR2, sCD14) con efectos moduladores sobre la inflamación<sup>176,177</sup>.

En este contexto, la presencia de receptores solubles en la leche aporta un mecanismo fisiológico de regulación de la respuesta inflamatoria en el lactante, y de exclusión de componentes bacterianos, lo cual es importante porque en edades tempranas el intestino es más susceptible a respuestas inflamatorias exacerbadas, muy especialmente en condiciones de prematuridad<sup>178,179</sup>.

El análisis de sCD14 resulta particularmente interesante en las MC porque se ha estudiado en sangre como posible marcador de seguimiento del estado del epitelio intestinal; se encontraron niveles mayores en pacientes tanto con enfermedad activa como en DLG respecto a la población sana<sup>180</sup>. El sCD14 también se encontró aumentado en pacientes con sensibilidad al gluten en ausencia de EC, logrando una disminución significativa con adherencia a la dieta restrictiva<sup>181</sup>. En este contexto se podía esperar niveles aumentados en la leche de MC, por transporte desde la sangre o producción local.

sCD14 es producido tanto por monocitos como por células epiteliales. Los niveles aumentados en leche podrían reflejar un estado inflamatorio en la GM, o bien un mecanismo compensatorio inducido en la célula epitelial por estímulos no establecidos aún. En nuestro trabajo no encontramos diferencia significativa de sCD14 entre los grupos ni una correlación significativa con la IL-12, una citoquina producida principalmente por monocitos/macrófagos.

Por lo tanto, el potencial protector de la leche de MC frente al LPS no estaría modificado. La menor expresión de sTLR2 podría limitar los efectos frente a estímulos bacterianos, aunque los efectos globales son difíciles de predecir teniendo en cuenta la gran complejidad y polifuncionalidad de los componentes de la leche. Se debería recurrir a ensayos funcionales para analizar el impacto de estas diferencias.

## 5.7. Los efectos de la leche en los estímulos inflamatorios sobre el epitelio intestinal

Varios trabajos con experimentos in vitro evidencian un potencial proinflamatorio y sobre la permeabilidad intestinal de algunos péptidos de gliadina<sup>21-25; 27-29</sup>. Estos efectos de la gliadina podrían estar potenciados en el intestino neonatal donde la función barrera y los mecanismos de homeostasis intestinal aún no están completamente desarrollados y es posible plantear que algunos componentes de la leche puedan antagonizar algunos efectos.

En este contexto, la caracterización respecto a citoquinas que antagonizan la inflamación y protegen el epitelio no mostró diferencias significativas (IL-10 y TGF- $\beta$ ). De todas formas, se decidió realizar un análisis exploratorio sobre la capacidad de la leche de modular los efectos inflamatorios inducidos por citoquinas inflamatorias y péptidos de gliadina.

En términos generales podemos afirmar que la leche de MC tendría un potencial menor que la de MS para inhibir la respuesta inflamatoria inducida por TNF- $\alpha$  así como los efectos del IFN- $\gamma$ ; además, en algunos casos potenciaría la acción de los péptidos de gliadina en un contexto inflamatorio.

Se trata de resultados preliminares en el sentido que fueron realizados con pools de muestras de cada grupo y sería apropiado realizar los estudios con muestras individuales que cuenten con la caracterización de los componentes individuales posiblemente implicados en los efectos. La gran complejidad en la composición de la leche, la presencia de componentes con efectos sinérgicos, redundantes y antagónicos no permiten correlacionar directamente la información obtenida en la caracterización con los efectos observados en los ensayos in vitro. Para avanzar en este sentido se necesitarían ensayos en los cuales se neutralice la acción de componentes específicos para mediante

anticuerpos neutralizantes u otros antagonistas o suplementar con las moléculas que se encuentren en menor concentración.

A nivel mundial se plantea el desafío de lograr suplementar la leche materna o de fórmulas cuando no hay acceso a lactancia o bancos de leche, con componentes con efectos antiinflamatorios para recién nacidos susceptibles<sup>179</sup>.

## 5.8 Limitaciones del estudio

Sobre la integración de los grupos de estudio.

Nuestro trabajo puede tener cierto sesgo en los resultados debido a las características de la convocatoria de MC; es posible que al tratarse de donaciones las mujeres con problemas en la lactancia no se presentaran en forma voluntaria.

Si bien no tenemos registro de la producción de leche diaria de las donantes ni cómo evolucionó la lactancia en las madres que donaron en los primeros meses post parto, podemos afirmar que al momento de la donación todas tenían una buena producción de leche. El sesgo puede ser más evidente para el grupo control, al estar integrado por mujeres sanas que eran donantes al BLH lo cual implica que su producción superaba las necesidades del niño.

Las complicaciones para sostener la lactancia prolongada fueron reportadas durante la EC, de hecho, en un trabajo previo de nuestro grupo de investigación registramos un período de lactancia breve en 4 de 50 mujeres que integraban un panel de estudio, en el que aproximadamente el 42% presentaba alguna complicación gineco-obstétrica<sup>107</sup>.

Estas complicaciones si bien son multifactoriales podrían estar incidiendo en la composición de la leche, ya que puede verse afectada por la capacidad de producción. Es así que en un estudio con madres de USA que las que producían mayores volúmenes de leche, tenían menores concentraciones de grasa y proteína y menos de lactosa. Si bien en nuestro estudio se observa mayor contenido proteico en el grupo de mujeres celíacas no es posible vincularlo directamente con ese parámetro al no disponer del volumen de producción individual. Por otra parte, no se

observaron diferencias significativas con los otros macronutrientes, grasas y lactosa, por lo que es poco probable que la variable volumen de leche sea determinante<sup>182</sup>.

No fue posible obtener muestras secuenciales de todas las madres por lo que el análisis temporal es una aproximación realizada con muestras independientes.

Por otro lado, el criterio diagnóstico utilizado para MC en este estudio fue el de la realización de la biopsia intestinal. Sin embargo, en las MS no se contaba con este dato para descartar totalmente que la MS no padeciera EC.

Sobre el estado de la EC.

Si bien las mujeres reportaron estar en DLG por período prolongado, sería muy interesante disponer de muestras de sangre pareadas con las muestras de leche para poder constatar eventuales transgresiones y evaluar su impacto sobre la composición de la leche.

Sobre el método de recolección de leche y variables que afectan la composición.

La composición de macronutrientes en la leche es variable en múltiples sentidos. A nivel individual la composición de la leche es dinámica a lo largo del periodo de lactancia, depende del régimen de alimentación y aun es variable entre el inicio y final de una toma. Entre mujeres la variabilidad depende de aspectos fisiológicos y genéticos; la composición es afectada por la edad, partos anteriores y dieta materna.

En base a las variaciones circadianas en la composición de la leche, el método considerado gold standar consiste en recolectar varias muestras durante un período de 24 horas<sup>182,183</sup>. Si bien este criterio se siguió estrictamente para las muestras obtenidas a través del BLH, no fue así en la totalidad de las muestras donadas por mujeres celíacas que no eran donantes del BLH. De todas formas, para homogeneizar y minimizar variaciones de este parámetro se solicitó a las donantes que descartasen los primeros 5 ml de leche extraída.

La falta de homogeneidad en el protocolo de obtención de muestras de leche para estudio es un aspecto extensamente cuestionado en la literatura. En particular el método de extracción de la leche (manual versus mecánico con ordeñadora) también influye, al afectar la función secretora del lactocito, en relación a las vesículas y particularmente a los glóbulos de grasa. En este sentido

[126]

nuestros grupos son homogéneos en cuanto siempre se utilizó ordeñadora. De hecho, la dispersión intragrupo el contenido graso es similar, en forma consistente con este factor, aunque no se puede descartar la influencia de otros factores como la dieta.

En suma, algunos de estos parámetros se han controlado en nuestro trabajo mientras que otros podrán incidir sobre los resultados obtenidos.

### Sobre los modelos celulares

En relación a los estudios in vitro, el modelo celular utilizado de las líneas HT-29 corresponde a células de colon derivadas de individuos adultos, por lo que más allá de las limitaciones de extrapolar resultados obtenidos con una línea tumoral se le suman las diferencias con la fisiología del intestino durante las primeras etapas de la vida por ejemplo la susceptibilidad a respuestas inflamatorias exacerbadas frente a LPS, menor producción de citoquinas y otros mediadores<sup>179</sup>,

Por otra parte, el tipo de ensayo limita bastante la posibilidad de realizar los estudios con muestras individuales por lo que el estudio con pooles representa una primera aproximación. En este sentido nuestros resultados se consideran una base para realizar estudios más exhaustivos con muestras individuales, focalizándose en los efectos biológicos que han revelado efectos más significativos, para poder explorar en profundidad mecanismos moleculares y vincular los efectos con mediadores específicos.

## 6. Conclusiones y perspectivas

### 6.1 Conclusiones

La leche materna tiene una composición compleja que varía no solo de una madre a otra, sino dentro de la misma madre, a lo largo del día y la lactada. La condición de salud o enfermedad materna condiciona, en algunos aspectos, la composición de la leche, lo cual ha sido reportado en varios estudios. En este estudio se contemplaron algunos componentes nutricionales e inmunológicos de la leche de MC y de MS y se pudo obtener varias conclusiones.

En cuanto a madres con EC en DLG prolongada, no se observó una diferencia en el aporte de macronutrientes ni el aporte energético durante el primer año de lactancia.

La concentración de anticuerpos de tipo secretorios (IgA e IgM) en la leche de MC en DLG es inferior a la condición de salud, particularmente durante la lactancia más tardía (>6 mpp).

Hay diferencias en la contribución relativa de anticuerpos con distinta especificidad: las MC tienen una mayor proporción de anticuerpos específicos contra GLD y una menor de proporción de anticuerpos específicos contra TT. Esta diferencia se resalta particularmente en lactancia tardía. Estos resultados sugieren diferencias en el repertorio de plasmocitos entre MS y MC, o posibles diferencias en los mecanismos de transporte de los mismos.

La concentración de IgG total es similar en MS y MC, pero los títulos y proporción de anticuerpos anti GLD y anti TT siguen la misma tendencia, siendo menores en las MC. Esto puede significar cambios en la respuesta sistémica a estos antígenos, cambios en los mecanismos de transporte o permeabilidad del epitelio mamario. En este aspecto, contar con muestras de sangre de las madres donantes ayudaría a aclarar los mecanismos involucrados.

El potencial microbicida a través de la lisozima no se ve alterado en la leche de MC.

De las citoquinas y receptores solubles estudiados, la leche de MC tiene un balance proinflamatorio comparado con la leche de MS.

La leche de MC en DLG aporta anticuerpos anti gliadina en concentraciones similares a la leche de MS. Aunque se puede observar una tendencia a menor frecuencia de detección en TGF- $\beta$  y un aumento significativo de la IL-10 en leches de madres en lactancia tardía.

Los resultados respecto a la detección de anticuerpos anti-tTG y anti-pdGLD así como gliadina libre en algunas muestras de MC, plantea interrogantes respecto a transgresiones de la dieta o células memoria de muy larga vida que al colonizar la GM y producir anticuerpos se alcanzan niveles superiores que en sangre.

En cuanto al rol modulador de la inflamación de la leche sobre el epitelio intestinal los ensayos in vitro mostraron que la leche de MC no modula la inflamación inducida por TNF- $\alpha$ , aunque potencia la activación inducida por psGLD y TNF- $\alpha$ . Además, potencia el efecto del IFN- $\gamma$  de expresar HLA-DR, y modula el efecto débil de los psGLD de inducir HLA-DR. Con respecto a estos resultados, sería de interés un estudio de estimulación de células con las muestras individuales y así poder correlacionar con los componentes específicos involucrados en estos efectos.

## 6.2. Impacto del estudio

Esta información se considera de utilidad para la interpretación de los estudios prospectivos en marcha, respecto al rol protector de la lactancia sobre el desarrollo de la EC en niños con riesgo genético.

Aporta información útil para posibles estrategias de intervención teniendo en cuenta, además, los resultados obtenidos por otros autores respecto a las diferencias en la microbiota de la leche de MC. La fortificación de la leche materna con componentes inmunoreguladores es una estrategia actualmente en expansión (por ejemplo, con lactoferrina, HMO o probióticos).

## 6.3 Perspectivas

Una profundización de los resultados descriptivos obtenidos en este estudio se podría realizar mediante el análisis de muestras de leche fresca, para evaluar los componentes celulares que

puedan reflejar el estado de la glándula mamaria, y analizar el origen de alguno de los componentes encontrados diferencialmente en ambos grupos como la IL-6.

En paralelo, un estudio en sangre como reflejo del estado de la mucosa intestinal aportaría información complementaria.

El seguimiento individualizado de los niños en los primeros años de vida respecto a la seroconversión sería de gran valor, para establecer posibles correlaciones entre propiedades de la leche y valor protector.

A su vez, sería de interés estudiar la persistencia de la gliadina en leche en un modelo animal en DLG.

## 7. Bibliografía

1. Turner, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 799–809 (2009).
2. Varol, C., Zigmond, E. & Jung, S. Securing the immune tightrope: mononuclear phagocytes in the intestinal lamina propria. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 415–26 (2010).
3. Mowat, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 331–41 (2003).
4. Peterson, L. W. & Artis, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 141–53 (2014).
5. Baert, F. J. *et al.* Tumor necrosis factor  $\alpha$  antibody (infliximab) therapy profoundly down-regulates the inflammation in Crohn's ileocolitis. *Gastroenterology* **116**, 22–28 (1999).
6. Lammers, K. M. *et al.* Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology* **135**, 194–204.e3 (2008).
7. Drago, S. *et al.* Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand. J. Gastroenterol.* **41**, 408–19 (2006).
8. Tripathi, A. *et al.* Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 16799–804 (2009).
9. Mazzone, E. & Cuzzocrea, S. Role of TNF- $\alpha$  in lung tight junction alteration in mouse model of acute lung inflammation. *Respir. Res.* **8**, 75 (2007).
10. Hansson, G. C. Role of mucus layers in gut infection and inflammation. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 57–62 (2012).
11. Thornton, D. J., Rousseau, K. & McGuckin, M. A. Structure and Function of the Polymeric Mucins in Airways Mucus. *Annu. Rev. Physiol.* **70**, 459–486 (2008).
12. Pelaseyed, T. *et al.* The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol. Rev.* **260**, 8–20 (2014).
13. Png, C. W. *et al.* Mucolytic Bacteria With Increased Prevalence in IBD Mucosa Augment In Vitro Utilization of Mucin by Other Bacteria. *Am. J. Gastroenterol.* **105**, 2420–2428 (2010).
14. Bertolazzi, S. *et al.* Bio-physical characteristics of gastrointestinal mucosa of celiac patients:

- Comparison with control subjects and effect of gluten free diet-. *BMC Gastroenterol.* **11**, 119 (2011).
15. Sonnenburg, J. L. *et al.* Glycan Foraging in Vivo by an Intestine-Adapted Bacterial Symbiont. *Science (80-. ).* **307**, 1955–1959 (2005).
  16. Marietta, E. & Rishi, A. Immunogenetic control of the intestinal microbiota. 313–322  
doi:10.1111/imm.12474
  17. Tamburini, S., Shen, N., Wu, H. C. & Clemente, J. C. The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nat. Med.* **22**, 713–717 (2016).
  18. Alarcón, P., González, M. & Castro, É. The role of gut microbiota in the regulation of the immune response. *Rev. Med. Chil.* **144**, 910–916 (2016).
  19. Levy, M., Kolodziejczyk, A. A., Thaiss, C. A. & Elinav, E. Dysbiosis and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 219–232 (2017).
  20. Schwabe, R. F. & Jobin, C. The microbiome and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 800–812 (2013).
  21. Martínez-Medina, M. *et al.* Western diet induces dysbiosis with increased *E coli* in CEABAC10 mice , alters host barrier function favouring AIEC colonisation. *Gut* **63**, 116–124 (2014).
  22. Ley, R. E. *et al.* Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 11070–11075 (2005).
  23. Caricilli, A. M. *et al.* Gut Microbiota Is a Key Modulator of Insulin Resistance in TLR 2 Knockout Mice. *PLoS Biol.* **9**, e1001212 (2011).
  24. Giancchetti, E. & Fierabracci, A. Recent Advances on Microbiota Involvement in the Pathogenesis of Autoimmunity. *Int J Mol Sci* **2**, 283 (2019).
  25. Tremlett, H., Bauer, K. C., Appel-Cresswell, S., Finlay, B. B. & Waubant, E. The gut microbiome in human neurological disease: A review. *Ann. Neurol.* **81**, 369–382 (2017).
  26. Neu, J. & Walker, W. A. Necrotizing Enterocolitis. *N. Engl. J. Med.* **364**, 255–264 (2011).
  27. Herrmann, K. & Carroll, K. An exclusively human milk diet reduces necrotizing enterocolitis. *Breastfeed. Med.* **9**, 184–90 (2014).
  28. Palma, G. De, Capilla, A., Nadal, I., Nova, E. & Pozo, T. Interplay Between Human Leukocyte Antigen Genes and the Microbial Colonization Process of the Newborn Intestine. 1–10 (2008).
  29. Gambino, C. M., Aiello, A., Accardi, G., Caruso, C. & Candore, G. Autoimmune diseases and 8.1 ancestral haplotype: An update. *Hla* **92**, 137–143 (2018).

[132]

30. Cerutti, A. & Rescigno, M. The Biology of Intestinal Immunoglobulin A Responses. *Immunity* **28**, 740–750 (2008).
31. Hansen, I. S., Baeten, D. L. P. & Dunnen, J. Den. The inflammatory function of human IgA. *Cell. Mol. Life Sci.* (2018). doi:10.1007/s00018-018-2976-8
32. Hansen, I. S. *et al.* FcαRI co-stimulation converts human intestinal CD103+ dendritic cells into pro-inflammatory cells through glycolytic reprogramming. *Nat. Commun.* (2018). doi:10.1038/s41467-018-03318-5
33. Yu, W., Freeland, D. M. H. & Nadeau, K. C. Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 751–765 (2016).
34. Strobel, S. & Mowat, A. M. Immune responses to dietary antigens : oral tolerance. 173–181 (1998).
35. Macpherson, A. J. & Uhr, T. Induction of Protective IgA by Dendritic Cells Carrying Commensal Bacteria. *Science (80-. )*. **1662**, 1–8 (2008).
36. Snoeck, V., Goddeeris, B. & Cox, E. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect.* **7**, 997–1004 (2005).
37. Brandtzaeg, P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine* **25**, 5467–5484 (2007).
38. Schmitt, E. G. & Williams, C. B. Generation and function of induced regulatory T cells. *Front. Immunol.* **4**, 1–13 (2013).
39. Buckner, J. H. & Ziegler, S. F. Regulating the immune system: the induction of regulatory T cells in the periphery. *Arthritis Res. Ther.* **6**, 215–22 (2004).
40. Iwata, M. *et al.* Retinoic Acid Imprints Gut-Homing Specificity on T Cells. **21**, 527–538 (2004).
41. Schumann, M., Siegmund, B., Schulzke, J. D. & Fromm, M. Celiac Disease: Role of the Epithelial Barrier. *Cmgh* **3**, 150–162 (2017).
42. Shan, M. *et al.* Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. *Science* **342**, 447–53 (2013).
43. Lönnerdal, B. Human Milk: Bioactive Proteins/Peptides and Functional Properties. *Nestle Nutr. Inst. Workshop Ser.* **86**, 97–107 (2016).
44. Palmeira, P. & Carneiro-Sampaio, M. Immunology of breast milk. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **62**, 584–593 (2016).
45. Vieira Borba, V., Sharif, K. & Shoenfeld, Y. Breastfeeding and autoimmunity: Programing health

- from the beginning. *Am. J. Reprod. Immunol.* **79**, 1–11 (2018).
46. Ballard, O. & Morrow, A. L. Human Milk Composition. Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr. Clin. North Am.* **60**, 49–74 (2013).
  47. Hassiotou, F., Geddes, D. T. & Hartmann, P. E. Cells in Human Milk. *J. Hum. Lact.* **29**, 171–182 (2013).
  48. Witkowska-Zimny, M. & Kaminska-El-Hassan, E. Cells of human breast milk. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **22**, 11 (2017).
  49. Iyengar, S. R. & Walker, W. a. Immune factors in breast milk and the development of atopic disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **55**, 641–7 (2012).
  50. Lönnerdal, B. Biochemistry and physiological function of human milk proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* (1985).
  51. Bernard, H., Drumare, M., Verhasselt, V. & Wal, J. Peanut allergens are rapidly transferred in human breast milk and can prevent sensitization in mice. **69**, 888–897 (2014).
  52. López-Expósito, I., Song, Y., Järvinen, K. M., Srivastava, K. & Li, X.-M. Maternal peanut exposure during pregnancy and lactation reduces peanut allergy risk in offspring. *J. Allergy Clin. Immunol.* **124**, 1039–46 (2009).
  53. Rautava, S., Lu, L., Nanthakumar, N., Dubert-Ferrandon, A. & Walker, A. All-Trans Retinoic Acid Induces TGF- $\beta$ 2 in Intestinal Epithelial Cells via RhoA- and p38 $\alpha$  MAPK-Mediated Activation of the Transcription Factor ATF2. *Pediatr Gastroenterol. Nutr* **54**, 630–638 (2012).
  54. Oddy, W. & Rosales, F. A systematic review of the importance of milk TGF- $\beta$  on immunological outcomes in the infant and young child. *Pediatr. Allergy Immunol.* (2010).
  55. Ogawa, J., Sasahara, A. & Yoshida, T. Role of transforming growth factor- $\beta$  in breast milk for initiation of IgA production in newborn infants. *Early Hum. ...* (2004).
  56. Mosconi, E. *et al.* Breast milk immune complexes are potent inducers of oral tolerance in neonates and prevent asthma development. *Mucosal Immunol.* **3**, 461–74 (2010).
  57. Truchet, S. & Honvo-houéto, E. Physiology of Milk Secretion. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* (2017). doi:10.1016/j.beem.2017.10.008
  58. Mather, I. H. & Keenan, T. W. Origin and Secretion of Milk Lipids Origin and Secretion of Milk Lipids. (2014). doi:10.1023/A
  59. Van De Perre, P. Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine* **21**, 3374–3376 (2003).

60. Bourges, D. *et al.* New insights into the dual recruitment of IgA<sup>+</sup> B cells in the developing mammary gland. *Mol. Immunol.* **45**, 3354–3362 (2008).
61. Magnusson, U. Longitudinal study of lymphocyte subsets and major histocompatibility complex-class II expressing cells in mammary glands of sows. *Am. J. Vet. Res.* **60**, 546–8 (1999).
62. Seppo, A. E., Savilahti, E. M., Berin, M. C., Sampson, H. A. & Järvinen, K. M. Breast milk IgA to foods has different epitope specificity than serum IgA—Evidence for entero-mammary link for food-specific IgA? *Clin. Exp. Allergy* **47**, 1275–1284 (2017).
63. Salmon, H. Mammary gland immunology and neonate protection in pigs. Homing of lymphocytes into the MG. *Adv Exp Med Biol* **480**, 279–286 (2000).
64. Dill, R. & Walker, A. M. Role of Prolactin in Promotion of Immune Cell Migration into the Mammary Gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **22**, 13–26 (2017).
65. Brandtzaeg, P. The Mucosal Immune System and Its Integration with the Mammary Glands. *J. Pediatr.* **156**, S8 (2010).
66. Hennet, T. & Borsig, L. Breastfed at Tiffany's. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 508–518 (2016).
67. Bode, L. *et al.* It ' s Alive : Microbes and Cells in Human Milk and Their Potential Benefits to Mother and Infant 1 – 3. 571–573 (2014). doi:10.3945/an.114.006643.proposed
68. Greer, F. R., Sicherer, S. H. & Burks, a W. Effects of early nutritional interventions on the development of atopic disease in infants and children: the role of maternal dietary restriction, breastfeeding, timing of introduction of complementary foods, and hydrolyzed formulas. *Pediatrics* **121**, 183–91 (2008).
69. Tuokkola, J. *et al.* Maternal diet during pregnancy and lactation and cow's milk allergy in offspring. *Eur. J. Clin. Nutr.* **70**, 1–6 (2016).
70. Akobeng, A. K. & Heller, R. F. Assessing the population impact of low rates of breast feeding on asthma, coeliac disease and obesity: the use of a new statistical method. *Arch. Dis. Child.* **92**, 483–5 (2007).
71. Gdalevich, M., Mimouni, D. & Mimouni, M. Breast-feeding and the risk of bronchial asthma in childhood: a systematic review with meta-analysis of prospective studies. *J. Pediatr.* **139**, 261–6 (2001).
72. Bloch, A. M., Mimouni, D., Mimouni, M. & Gdalevich, M. Does breastfeeding protect against allergic rhinitis during childhood ? A meta-analysis of prospective studies. 275–279 (2002).
73. Gdalevich, M., Mimouni, D., David, M., Mimouni, M. & Aviv, T. Breast-feeding and the onset of

[135]

- atopic dermatitis in childhood: A systematic review and meta-analysis of prospective studies. 520–527 (2000). doi:10.1067/mjd.2001.114741
74. Fredriksson, P., Jaakkola, N. & Jaakkola, J. J. Breastfeeding and childhood asthma: a six-year population-based cohort study. *BMC Pediatr.* **7**, 39 (2007).
75. Arranz, E. & Garrote, J. A. Inmunología de la enfermedad celíaca. *Gastroenterol. Hepatol.* **33**, 643–651 (2010).
76. Aaron, L., Torsten, M. & Patricia, W. *Autoimmunity in celiac disease: Extra-intestinal manifestations. Autoimmunity Reviews* (Elsevier B.V, 2019). doi:10.1016/J.AUTREV.2018.09.010
77. Lebwohl, B., Sanders, D. S. & Green, P. H. R. Coeliac disease. *Lancet* **391**, 70–81 (2018).
78. Mora, M. Prevalencia de enfermedad celíaca: estudio multicéntrico en población pediátrica de cinco distritos urbanos de la Argentina. *Arch. Argent. Pediatr.* **110**, 490–496 (2012).
79. Singh, P. *et al.* Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 823–836.e2 (2018).
80. Fernández-jiménez, N., Plaza-izurieta, L. & Bilbao, J. R. La Enfermedad Celíaca : Marcadores genéticos. 103–121 (2013).
81. Pisapia, L. *et al.* HLA-DQ2 . 5 genes associated with celiac disease risk are preferentially expressed with respect to non-predisposing HLA genes : Implication for anti-gluten T cell response. *J. Autoimmun.* 1–10 (2016). doi:10.1016/j.jaut.2016.03.016
82. Ricaño-Ponce, I., Wijmenga, C. & Gutierrez-Achury, J. Genetics of celiac disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **29**, 399–412 (2015).
83. Forbes, J. D. *et al.* A comparative study of the gut microbiota in immune-mediated inflammatory diseases — does a common dysbiosis exist ? 1–15 (2018).
84. Kumar, V. *et al.* Systematic annotation of celiac disease loci refines pathological pathways and suggests a genetic explanation for increased interferon-gamma levels. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 397–409 (2015).
85. Gujral, N., Freeman, H. J. & Thomson, A. B. R. Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World J. Gastroenterol.* **18**, 6036–6059 (2012).
86. De Chaisemartin, L. *et al.* Application of deamidated gliadin antibodies in the follow-up of treated celiac disease. *PLoS One* **10**, 1–16 (2015).
87. Ménard, S., Cerf-Bensussan, N. & Heyman, M. Multiple facets of intestinal permeability and

- epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunol.* **3**, 247–259 (2010).
88. Maiuri, L. *et al.* Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology* **119**, 996–1006 (2000).
89. Matysiak-Budnik, T. *et al.* Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J. Exp. Med.* **205**, 143–154 (2008).
90. Papista, C. *et al.* Gluten induces coeliac-like disease in sensitised mice involving IgA, CD71 and transglutaminase 2 interactions that are prevented by probiotics. *Lab. Investig.* **92**, 625–635 (2012).
91. de la Vega Ruiz, M. C. G. Proteínas de la harina de trigo: clasificación y propiedades funcionales. *Temas Cienc. y Tecnol. - Univ. Tecnológica la Mix.* 27–32 (2009).
92. Giménez, M. J. & Barro, F. Variedades de trigo aptas para celíacos. *OmniaScience Monogr.* **0**, 463–477 (2013).
93. Taylor, P., Veraverbeke, W. S. & Delcour, J. A. Wheat Protein Composition and Properties of Wheat Glutenin in Relation to Breadmaking Functionality Wheat Protein Composition and Properties of Wheat Glutenin in Relation to Breadmaking. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37–41 (2010).
94. Lindfors, K. *et al.* Coeliac disease. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **5**, 3 (2019).
95. Stepniak, D. T. *et al.* Characterization of Cereal Toxicity for Celiac Disease Patients Based on Protein Homology in Grains. *Gastroenterology* **125**, 1105–1113 (2003).
96. Cebolla, Á., Moreno, M. de L., Coto, L. & Sousa, C. Gluten Immunogenic Peptides as Standard for the Evaluation of Potential Harmful Prolamin Content in Food and Human Specimen. *Nutrients* **10**, (2018).
97. Fraser, J. S. *et al.* Coeliac disease: in vivo toxicity of the putative immunodominant epitope. *Gut* **52**, 1698–702 (2003).
98. Lammers, K. M., Chaudhry, F., Kryszak, D., Puppa, E. L. & Casolaro, V. Identification of a novel immunomodulatory gliadin peptide that causes interleukin- 8 release in a chemokine receptor CXCR 3 - dependent manner only in patients with coeliac disease. 432–440 (2010).  
doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03378.x
99. Thomas, K. E., Sapone, a., Fasano, a. & Vogel, S. N. Gliadin Stimulation of Murine Macrophage Inflammatory Gene Expression and Intestinal Permeability Are MyD88-Dependent: Role of the Innate Immune Response in Celiac Disease. *J. Immunol.* **176**, 2512–2521 (2006).
100. Jelínková, L., Tucková, L., Cinová, J., Flegelová, Z. & Tlaskalová-Hogenová, H. Gliadin stimulates  
[137]

- human monocytes to production of IL-8 and TNF-alpha through a mechanism involving NF-kappaB. *FEBS Lett.* **571**, 81–5 (2004).
101. Palová-Jelínková, L. *et al.* Pepsin digest of wheat gliadin fraction increases production of IL-1 $\beta$  via TLR4/MyD88/TRIF/MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway and an NLRP3 inflammasome activation. *PLoS One* **8**, e62426 (2013).
  102. Laparra Llopis, J. M. & Sanz Herranz, Y. Gliadins induce TNFalpha production through cAMP-dependent protein kinase A activation in intestinal cells (Caco-2). *J. Physiol. Biochem.* **66**, 153–9 (2010).
  103. Mothes, T., Bendix, U., Pfannschmidt, C. & Lehmann, I. Effect of gliadin and other food peptides on expression of MHC class II molecules by HT-29 cells. 548–552 (1995).
  104. Tye-din, J. A. *et al.* Comprehensive , Quantitative Mapping of T Cell Epitopes in Gluten in Celiac Disease. (2010).
  105. Kim, C., Quarsten, H., Bergseng, E., Khosla, C. & Sollid, L. M. Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. **101**, 4175–4179 (2004).
  106. Risnes, L. F., Qiao, S.-W. & Sollid, L. M. Disease-driving CD4 + T cell clonotypes persist for decades in celiac disease The Journal of Clinical Investigation. **128**, 2642–2650 (2018).
  107. Sónora, C. *et al.* Celiac Disease and Gyneco-obstetrics Complications: Can Serum Antibodies Modulate Tissue Transglutaminase Functions and Contribute to Clinical Pattern? *Am. J. Reprod. Immunol.* **66**, 476–487 (2011).
  108. Mesin, L., Sollid, L. M. & Di Niro, R. The intestinal B-cell response in celiac disease. *Front. Immunol.* **3**, 313 (2012).
  109. Sónora, C. *et al.* Tissue Transglutaminase on Trophoblast Cells as a Possible Target of Autoantibodies Contributing to Pregnancy Complications in Celiac Patients. *Am. J. Reprod. Immunol.* **72**, 485–495 (2014).
  110. Martucciello, S., Paoella, G., Esposito, C., Lepretti, M. & Caputo, I. Anti - type 2 transglutaminase antibodies as modulators of type 2 transglutaminase functions : a possible pathological role in celiac disease. *Cell. Mol. Life Sci.* (2018). doi:10.1007/s00018-018-2902-0
  111. Lionetti, E. *et al.* Introduction of Gluten, HLA Status, and the Risk of Celiac Disease in Children. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1295–1303 (2014).
  112. Lionetti, E. *et al.* Prevalence and Natural History of Potential Celiac Disease in At-Family-Risk Infants Prospectively Investigated from Birth. *J. Pediatr.* **161**, 908–914.e2 (2012).

[138]

113. Lionetti, E. *et al.* Mode of Delivery and Risk of Celiac Disease: Risk of Celiac Disease and Age at Gluten Introduction Cohort Study. *J. Pediatr.* **184**, 81–86.e2 (2017).
114. Lionetti, E. *et al.* Long-Term Outcome of Potential Celiac Disease in Genetically at-Risk Children: The Prospective CELIPREV Cohort Study. *J. Clin. Med.* **8**, 186 (2019).
115. Vriezinga, S. L. *et al.* Randomized feeding intervention in infants at high risk for celiac disease. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1304–15 (2014).
116. Aronsson, A. *et al.* Early feeding practices seem to have no impact on the risk of developing celiac disease during childhood Primary Prevention of Celiac Disease : Environmental Factors with a Focus on Early Nutrition Primary Prevention of Celiac Disease : Early Nutrition. **67**, 43–50 (2015).
117. Olivares, M. *et al.* Human milk composition differs in healthy mothers and mothers with celiac disease. *Eur. J. Nutr.* **54**, 119–28 (2015).
118. Roca, M. *et al.* Anti - gliadin antibodies in breast milk from celiac mothers on a gluten - free diet. *Eur. J. Nutr.* (2017). doi:10.1007/s00394-017-1476-1
119. Pozo-rubio, T. *et al.* Influence of early environmental factors on lymphocyte subsets and gut microbiota in infants at risk of celiac disease ; the PROFICEL study. **28**, 464–473 (2013).
120. Lucas, A., Gibbs, J., Lyster, R. & Baum, J. Creatocrit: Simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. *Br Med J* **1**, 1018–1020 (1978).
121. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
122. Trend, S. *et al.* Levels of innate immune factors in preterm and term mothers' breast milk during the 1st month postpartum. *Br. J. Nutr.* **115**, 1178–1193 (2016).
123. Villamil, E. & Hernández, A. Productos exentos de gluten: una necesidad para los celíacos que exige la disponibilidad de métodos analíticos de control. (2014).
124. Shrivastava, A. & Gupta, V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles Young Sci.* **2**, 21 (2011).
125. Méndez, E., Vela, C., Immer, U. & Janssen, F. W. Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 1053–63 (2005).
126. Mastropietro, G., Tiscornia, I., Perelmuter, K., Astrada, S. & Bollati-Fogolín, M. HT-29 and Caco-2 Reporter Cell Lines for Functional Studies of Nuclear Factor Kappa B Activation. *Mediators Inflamm.* **2015**, 13 pages (2015).

[139]

127. Tiscornia, I. Desarrollo de modelos in vitro para el estudio de las propiedades inmunomoduladoras de bacterias del ácido láctico. (2010).
128. Chirido, F., Rumbo, M., Añón, M. & Fossati, C. Presence of high levels of non-degraded gliadin in breast milk from healthy mothers. *Scand J Gastroenterol.* **33**, 1186–92 (1998).
129. Nathavitharana, K. A., Catty, D. & McNeish, A. S. IgA antibodies in human milk: epidemiological markers of previous infections? *Arch.Dis Child Fetal Neonatal Ed* **71**, F192–F197 (1994).
130. Ruiz, L. *et al.* What's normal? Immune profiling of human milk from healthy women living in different geographical and socioeconomic settings. *Front. Immunol.* **8**, 1–17 (2017).
131. Allen, L. H. B Vitamins in Breast Milk: Relative Importance of Maternal Status and Intake, and Effects on Infant Status and function. *Adv. Nutr.* **3**, 362–369 (2012).
132. Bravi, F. *et al.* Impact of maternal nutrition on breast-milk composition: a systematic review. *Am. J. Clin. Nutr.* **104**, 646–662 (2016).
133. Wierdsma, N., van Bokhorst-de van der Schueren, M., Berkenpas, M., Mulder, C. & van Bodegraven, A. Vitamin and Mineral Deficiencies Are Highly Prevalent in Newly Diagnosed Celiac Disease Patients. *Nutrients* **5**, 3975–3992 (2013).
134. Lönnerdal, B., Erdmann, P., Thakkar, S. K., Sauser, J. & Destailats, F. Longitudinal evolution of true protein, amino acids and bioactive proteins in breast milk: a developmental perspective. *J. Nutr. Biochem.* **41**, 1–11 (2017).
135. Lönnerdal, B. Breast milk: a truly functional food. *Nutrition* **16**, 509–11
136. Lönnerdal, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* **77**, 1537S–1543S (2003).
137. Sturgeon, C. & Fasano, A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Tissue Barriers* **4**, e1251384 (2016).
138. Olivares, M. *et al.* Human milk composition differs in healthy mothers and mothers with celiac disease. *Eur. J. Nutr.* **54**, 119–128 (2014).
139. van der Feltz, M. J. *et al.* Lymphocyte homing and Ig secretion in the murine mammary gland. *Scand. J. Immunol.* **54**, 292–300 (2001).
140. Sharp, J. A., Lefèvre, C., Watt, A. & Nicholas, K. R. Analysis of human breast milk cells: gene expression profiles during pregnancy, lactation, involution, and mastitic infection. *Funct. Integr. Genomics* **16**, 297–321 (2016).

141. Boutinaud, M., Herve, L. & Lollivier, V. Mammary epithelial cells isolated from milk are a valuable, non-invasive source of mammary transcripts. *Front. Genet.* **6**, 1–12 (2015).
142. Boutinaud, M. & Jammes, H. Potential uses of milk epithelial cells: a review. *Reprod. Nutr. Dev.* **42**, 133–47
143. Rogier, E. W. *et al.* the Gut Microbiota and Intestinal Immune System of Breastfed Offspring. 663–668 (2014). doi:10.4161/19490976.2014.969984
144. Cataldo, F., Marino, V., Bottaro, G., Greco, P. & Ventura, A. Celiac disease and selective immunoglobulin A deficiency. *J. Pediatr.* **131**, 306–8 (1997).
145. Rodríguez-Camejo, C. *et al.* Antibody Profile of Colostrum and the Effect of Processing in Human Milk Banks: Implications in Immunoregulatory Properties. *J. Hum. Lact.* 089033441770635 (2017). doi:10.1177/0890334417706359
146. Fukushima, Y., Kawata, Y., Onda, T. & Kitagawa, M. Consumption of cow milk and egg by lactating women and the presence of beta-lactoglobulin and ovalbumin in breast milk. *Am. J. Clin. Nutr.* **65**, 30–35 (1997).
147. Kilshaw, P. J. & Cant, A. J. The passage of maternal dietary proteins into human breast milk. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **75**, 8–15 (1984).
148. Lovegrove, J. A., Morgan, J. B. & Hamptom, S. M. Dietary factors influencing levels of food antibodies and antigens in breast milk. *Acta Paediatr.* **85**, 778–84 (1996).
149. Rodríguez-Camejo, C. Anticuerpos específicos contra antígenos dietarios en calostro humano donado en banco de leche: efectos del procesamiento térmico sobre la reactividad inmunológica. (2015).
150. Hassiotou, F. *et al.* Maternal and infant infections stimulate a rapid leukocyte response in breastmilk. *Clin. & Transl. Immunol.* **2**, e3-10 (2013).
151. Brandtzaeg, P. Mechanisms of gastrointestinal reactions to food. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **4**, 9–24 (1997).
152. Savilahti, E. *et al.* Low colostrum IgA associated with cow's milk allergy. - PubMed - NCBI. *Acta Paediatr. Scand.* **80**, 1207–13 (1991).
153. Järvinen, K. M. & Chatchatee, P. Mammalian milk allergy: clinical suspicion, cross-reactivities and diagnosis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **9**, 251–258 (2009).
154. Sorva, R., Mäkinen-Kiljunen, S. & Juntunen-Backman, K. Beta-lactoglobulin secretion in human milk varies widely after cow's milk ingestion in mothers of infants with cow's milk allergy. *J. Allergy* [141]

- Clin. Immunol.* **93**, 787–92 (1994).
155. Troncone, R. *et al.* Passage of gliadin into human breast milk. *Acta Paediatr. Scand.* **76**, 453–6 (1987).
  156. Husby, S., Svehag, S. E. & Jensenius, J. C. Passage of dietary antigens in man: kinetics of appearance in serum and characterization of free and antibody-bound antigen. *Adv. Exp. Med. Biol.* **216A**, 801–12 (1987).
  157. Özkan, T., Özeke, T. & Meral, A. Gliadin-Specific IgA Antibodies in Breast Milk. *J. Int. Med. Res.* **28**, 234–240 (2000).
  158. Berti, C., Trovato, C., Bardella, M. T. & Forlani, F. IgA anti-gliadin antibody immunoreactivity to food proteins. *Food Agric. Immunol.* **15**, 217–223 (2003).
  159. Lovegrove, J. A., Osman, D. L., Morgan, J. B. & Hampton, S. M. Transfer of cow's milk beta-lactoglobulin to human serum after a milk load: a pilot study. *Gut* **34**, 203–7 (1993).
  160. Meresse, B., Ripoche, J., Heyman, M. & Cerf-Bensussan, N. *Celiac disease: from oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis.* **2**, (2009).
  161. Stelwagen, K. & Singh, K. The Role of Tight Junctions in Mammary Gland Function. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **19**, 131–138 (2014).
  162. Goldman, A. S., Chheda, S., Garofalo, R. & Schmalstieg, F. C. Cytokines in human milk: properties and potential effects upon the mammary gland and the neonate. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **1**, 251–258 (1996).
  163. Weiler, I. J., Hickler, W. & Sprenger, R. Demonstration that milk cells invade the suckling neonatal mouse. *Am. J. Reprod. Immunol.* **4**, 95–8 (1983).
  164. Sheldrake, R. F. & Husband, A. J. Intestinal uptake of intact maternal lymphocytes by neonatal rats and lambs. *Res. Vet. Sci.* **39**, 10–5 (1985).
  165. Gan, J., Bornhorst, G. M., Henrick, B. M. & German, J. B. Protein Digestion of Baby Foods: Study Approaches and Implications for Infant Health. *Mol. Nutr. Food Res.* **62**, (2018).
  166. Filteau, S. Measuring Trace Immune Factors in Human Milk. in *Breast-Feeding: Early Influences on Later Health* **639**, 331–337 (Springer Netherlands, 2009).
  167. Akers, R. M. Major Advances Associated with Hormone and Growth Factor Regulation of Mammary Growth and Lactation in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* **89**, 1222–1234 (2006).
  168. Steidler, L. *et al.* Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*

- 289**, 1352–5 (2000).
169. Ishizaka, S., Kimoto, M., Tsujii, T. & Saito, S. Antibody Production System Modulated by Oral Administration of Human Milk and TGF- $\beta$ . *Cell. Immunol.* **159**, 77–84 (1994).
  170. Hoppu, U., Isolauri, E., Laakso, P., Matomäki, J. & Laitinen, K. Probiotics and dietary counselling targeting maternal dietary fat intake modifies breast milk fatty acids and cytokines. *Eur. J. Nutr.* **51**, 211–219 (2012).
  171. Snijders, B. E. P. *et al.* Cytokines and soluble CD14 in breast milk in relation with atopic manifestations in mother and infant (KOALA Study) *Clinical and Experimental Allergy*.
  172. Puyol, A. *et al.* Valoración de componentes con actividad inmunológica y de los efectos de la pasteurización en calostros donados en el Banco de Leche Humana. (2014).
  173. Rossi, M. & Bot, A. The Th17 Cell Population and the Immune Homeostasis of the Gastrointestinal Tract. *Int. Rev. Immunol.* **32**, 471–474 (2013).
  174. Leaphart, C. L. *et al.* A Critical Role for TLR4 in the Pathogenesis of Necrotizing Enterocolitis by Modulating Intestinal Injury and Repair. *J. Immunol.* **179**, 4808–4820 (2007).
  175. Nanthakumar, N. *et al.* The Mechanism of Excessive Intestinal Inflammation in Necrotizing Enterocolitis: An Immature Innate Immune Response. *PLoS One* **6**, e17776 (2011).
  176. LeBouder, E. *et al.* Soluble Forms of Toll-Like Receptor (TLR)2 Capable of Modulating TLR2 Signaling Are Present in Human Plasma and Breast Milk. *J. Immunol.* **171**, 6680–6689 (2003).
  177. Langjahr, P. *et al.* Metalloproteinase-Dependent TLR2 Ectodomain Shedding is Involved in Soluble Toll-Like Receptor 2 (sTLR2) Production. *PLoS One* **9**, e104624 (2014).
  178. Patel, A. L. & Kim, J. H. Human milk and necrotizing enterocolitis. *Semin. Pediatr. Surg.* **27**, 34–38 (2018).
  179. Chatterton, D. E. W., Nguyen, D. N., Bering, S. B. & Sangild, P. T. Anti-inflammatory mechanisms of bioactive milk proteins in the intestine of newborns. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 1730–1747 (2013).
  180. Hoffmanová, I., Sánchez, D., Tučková, L. & Tlaskalová-Hogenová, H. Celiac Disease and Liver Disorders: From Putative Pathogenesis to Clinical Implications. *Nutrients* **10**, (2018).
  181. Uhde, M. *et al.* Intestinal cell damage and systemic immune activation in individuals reporting sensitivity to wheat in the absence of coeliac disease. *Gut* **65**, 1930–1937 (2016).
  182. Nommsen, L. A., Lovelady, C. A., Heinig, M. J., Lönnerdal, B. & Dewey, K. G. Determinants of

energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the first 12 mo of lactation: the DARLING Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**, 457–465 (1991).

183. Bauer, J. & Gerss, J. Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants. *Clin. Nutr.* **30**, 215–20 (2011).

## 8. Agradecimientos

Donantes de Leche y personal técnico del BLH

Lic. Arturo Puyol y Mag. Lic. Nut. Laura Fazio

Comisión Directiva de ACELU. Dra. Susana Tchekmeyan

### *Asesoramiento estadístico:*

Lic. Valentina Colistro. Asistente del Departamento de Métodos Cuantitativos, Facultad de Medicina. UdelaR.

Prof. José Fuentes. Departamento de Experimentación y Teoría de la Materia y sus Aplicaciones - DETEMA - Facultad de Química

### *Financiación:*

**PEDECIBA** Biología

**CSIC** – Proyecto Iniciación 03/2016 – 02/2018:

“Estudios sobre leche materna y efectos del gluten: implicancias sobre el efecto protector de la lactancia sobre el desarrollo de enfermedad celíaca.”

**ANII** – Beca de Maestría: 03/2018 – 02/2019:

“Estudio de los componentes y propiedades inmunológicas en la leche de MC”