



Sensibilización y desafío oral con ovoalbúmina en un modelo animal de alergia alimentaria

Miguel Ángel Vinuesa,* Norberto David Bassan,** Soledad Chaparro,* Adriel Martínez,* Rocío Batle,* Florencia Giacomozzi,* Valentín Torres*

RESUMEN

Antecedentes: la superficie mucosa intestinal y las estructuras linfáticas auxiliares forman parte del tejido linfático asociado al intestino (GALT); una de sus propiedades es la inducción de una respuesta supresora (tolerancia oral). La alteración de estos mecanismos puede conducir a fenómenos de alergia alimentaria.

Objetivo: evaluar las modificaciones histopatológicas e inmunohistoquímicas de la mucosa del intestino delgado en un modelo animal de alergia alimentaria inducida.

Métodos: se sensibilizó con ovoalbúmina por vía subcutánea a un grupo de conejos neozelandeses mediante dos dosis sucesivas, con una diferencia de 15 días, para luego ser desafiados por vía oral con el mismo antígeno 30 días después de la primera sensibilización. La identificación de las poblaciones celulares linfáticas y células anexas que infiltran la mucosa del íleon se obtuvo mediante histoquímica e inmunohistoquímica.

Resultados: en la mucosa intestinal de los animales sensibilizados se observó aumento en el número de eosinófilos y de IgE específica, junto con disminución en el número de células cebadas. En los conejos sensibilizados no retados se incrementó la cantidad de células CD25+.

Conclusiones: en este modelo animal para el estudio de la alergia alimentaria la sensibilización y el reto posterior con ovoalbúmina inducen la generación de IgE específica, respuesta inflamatoria anafiláctica, modifica el número de células estudiadas y la estructura mucosa intestinal.

Palabras clave: ovoalbúmina, alergia alimentaria, conejo, sensibilización, desafío oral.

ABSTRACT

Background: Gut-associated lymphoid tissue (GALT) is mainly formed by the gut mucosa and associated lymphatic structures that under normal conditions induces hyporesponsiveness, a phenomenon termed oral tolerance. However, the potential brakeup of oral tolerance could otherwise lead to disorders such as food allergy.

Objectives: The aim of the study is to characterise the histopathological and immunohistochemical modifications in intestinal gut mucosa in an animal model of food allergy.

Methods: New Zealand rabbits were subcutaneously sensitized twice with ovalbumin (OVA), on day 30 after first sensitization, animals were oral challenged with the same antigen. Lymphatic cell population and accessory cells from gut mucosa were studied by conventional histology, histochemistry and immunohistochemistry.

Results: An important increase in number of eosinophils were observed in sensitized and challenged group as well as CD25+ cells increase in sensitized animals without challenge.

Conclusions: Data obtained demonstrated that subcutaneous sensitization and challenge with OVA induced generation of specific IgE antibodies and an anaphylactic inflammatory response. This pattern induced quantitative modifications in studied cells and structural changes in mucosa like oedema at intestinal villi in sensitized and challenged rabbits in this animal model of food allergy.

Key words: Ovalbumin, Food allergy, Rabbit, Sensitization, Oral challenge.

La alergia alimentaria es una alteración del equilibrio homeostático del sistema inmunitario de las estructuras del aparato gastrointestinal: el tejido linfático asociado al intestino (GALT). La alergia alimentaria es un problema creciente de salud pública,^{1,2} con una prevalencia en la población general entre 2 a 10%,³ que se ha incrementado de 1997 a 2007 en 18%.⁴

Lo normal es que los alimentos se procesen en el intestino y que las moléculas absorbidas ingresen a la célula o al espacio paracelular en forma intacta, con el potencial antigénico indemne.⁵⁻⁷ Muchas de esas moléculas antigénicas son capturadas y procesadas en los ganglios linfáticos mesentéricos, donde inician la respuesta inmunitaria por activación linfocitaria.^{8,9} A su vez, los linfocitos activados migran por vía linfática y, posteriormente, sanguínea, se ubican en la lámina propia, las placas de Peyer del intestino o en el tejido linfático asociado con mucosas. En esas localizaciones proliferan los linfocitos y se diferencian en linfocitos T efectoros o en células plasmáticas productoras de IgE específica,¹⁰ que se une a sus receptores membranales en mastocitos y basófilos.

Un nuevo contacto del antígeno vía intestinal, mediante mastocitos sensibilizados, desencadena una reacción inflamatoria alérgica aguda local.^{11,12} Esta reacción causa modificaciones cualitativas de la mucosa y cuantitativas de las poblaciones celulares.¹³⁻¹⁵

Esta información ha surgido de modelos de investigación en animales que ha permitido conocer mejor los fenómenos inmunológicos del tubo digestivo, que involucran procesos de hiperreactividad y de tolerancia alimentaria.

El conejo, mamífero lagomorfo, tiene una homología génica con el humano¹⁶ y se ha utilizado como modelo en estudios de inmunidad intestinal: transporte hepato-biliar de IgA-secretora¹⁷ y reactividad celular contra infecciones virales (rotavirus),¹⁸ *Vibrio cholerae*,^{19,20} *Salmonella*,²¹ *Shigella*,²² y *Escherichia coli*.²³

El objetivo de este trabajo es evaluar algunos fenómenos del tejido linfoide asociados con el intestino (GALT) en un modelo animal de alergia alimentaria.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron 40 conejos neozelandeses adultos jóvenes, en condiciones normales de bioterio, alimentados con un producto balanceado comercial, con alimento y bebida *ad-libitum*. Los conejos se dividieron en cuatro grupos de 10 animales cada uno.

Grupo 1: control normal no sensibilizado; grupo 2, sensibilizado con ovoalbúmina administrada por vía subcutánea; grupo 3, sensibilizado con ovoalbúmina vía subcutánea y desafiado con solución amortiguadora salino-fosfato (PBS), grupo 4: sensibilizado con ovoalbúmina por vía subcutánea y desafiado con ovoalbúmina por vía oral.

Sensibilización

Los conejos de los grupos 2, 3 y 4 se sensibilizaron por vía subcutánea dos veces, con intervalo de 15 días. Se les aplicaron 2 mL de una solución de 70 µg de ovoalbúmina y 30 mg de hidróxido de aluminio/mL.²³

Determinación de la sensibilización

Los títulos de IgE específica sérica anti-ovoalbúmina de los conejos sensibilizados se determinaron mediante la prueba de anafilaxia cutánea pasiva (PCA)²⁴⁻²⁶ en ratas Wistar de ocho semanas. Se les inyectaron, por vía subcutánea, 0.05 mL de suero de conejo sensibilizado en diluciones de 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320, en cuatro lugares distintos en la parte posterior del tórax. Como control se administró suero de conejo no sensibilizado. Después de

* Laboratorio de Inmunohistoquímica. Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Santa Fe, Argentina.

** Profesor titular de la cátedra de Histología y de Genética. Universidad Abierta Interamericana. Rosario, Santa Fe, Argentina.

Correspondencia: Dr. Miguel Ángel Vinuesa, Superí 247, Rosario 2000 República Argentina. Correo electrónico: vinuesamiguel@gmail.com

Recibido: 23 de enero 2012. Aceptado: 15 de febrero 2012. Los autores declaran no tener conflicto de intereses en el presente artículo.

Este artículo debe citarse como: Vinuesa MA, Bassan ND, Chaparro S, Martínez A, Batle R, Giacomozzi F, Torres V. Sensibilización y desafío oral con ovoalbúmina en un modelo animal de alergia alimentaria. Revista Alergia México 2012;59(2):65-71.

48 horas se les inyectó a las ratas 1 mg de ovoalbúmina por vía endovenosa en 0.05 mL de PBS con azul de Evans al 1% y se sacrificaron 10 minutos después. Se consideraron positivas las diluciones que provocaron máculas azuladas de 5 mm o más de diámetro.

Reto con ovoalbúmina

Los conejos del grupo 4 se retaron 15 después de la última sensibilización y con 48 h de ayuno. El reto se efectuó mediante la instilación, por sonda intragástrica, de 150 mg de ovoalbúmina en 10 mL de PBS.¹³ Los conejos del grupo 3 sólo se retaron con PBS.

Todos los animales se sacrificaron por sobredosis de éter sulfúrico.

Muestras y fijación de tejidos

Las muestras para inmunohistoquímica se sumergieron en medio líquido y se congelaron en nitrógeno líquido. Se almacenaron a -20°C y se hicieron cinco cortes de 8 µm con crióstomo. Para el análisis de mastocitos, las muestras se fijaron en Carnoy, y para otros análisis de histología convencional e histoquímica se fijaron en formol neutro al 10%.

Anticuerpos monoclonales

Se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón anti-conejo CD4: (KEN-4, BALB/c IgG2a, Biosource, Camarillo, CA, USA) para identificar linfocitos T CD4²⁷; anti-conejo CD5 (KEN-5, BALB/C IgG1), y anti-conejo CD25 (KEI-alfa 1, BALB/C IgG2b) para identificar linfocitos T totales maduros y células activadas, respectivamente (Pharmingen, San Diego, CA).²⁷ Para la inmunotinción de las células positivas se utilizó Histostain Kit, (Zymed, South San Francisco, CA).

Inmunohistoquímica

Los cortes por congelación de intestino, fijados en alcohol al 100%, se incubaron con suero al 2% de conejos no sensibilizados, en solución amortiguadora TRIS salina (TBS) para evitar tinciones inespecíficas. Después se incubaron durante 60 minutos a 37°C con los anticuerpos monoclonales mencionados. Como control positivo se emplearon cortes de timo de conejo y como control negativo anticuerpos IgG1 e IgG2 de ratón (Zymed).

Histoquímica

Para la detección de mastocitos, las muestras fijadas en Carnoy se sumergieron en una solución de ácido clorhídrico 1 M y, enseguida, se incubaron con alcian blue al 1% en ácido clorhídrico a pH<1 y se lavaron con la solución precitada previo a su deshidratación y montaje en laminillas.^{13,14}

Cuantificación de células

Las células se contaron en 20 campos de 400x por muestra y se expresaron como la media aritmética por campo microscópico.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron en forma de promedios y errores estándar. La comparación entre las variables para los distintos grupos de estudio se efectuó por medio del análisis de variancia. Cuando no se cumplieron los parámetros de homogeneidad de variancias y distribución normal de la variable, las comparaciones se realizaron aplicando la prueba de Kruskal-Wallis o la prueba U de Mann-Whitney. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Rosario.

RESULTADOS

Los sueros de los conejos sensibilizados a la ovoalbúmina fueron positivos en la prueba de PCA a diluciones de 1:160, lo que sugiere concentraciones altas de IgE específica anti-ovoalbúmina. La prueba fue negativa en el grupo al que no se administró ovoalbúmina. La aplicación de ésta por vía oral produjo una reacción inflamatoria local en la mucosa del intestino delgado. En las muestras histológicas también se observó intenso edema en forma de parches, con ensanchamiento de la lámina propia, dilatación de los capilares linfáticos e infiltrado de eosinófilos en cúmulos próximos al epitelio intestinal en los animales desafiados con ovoalbúmina por vía oral (Figuras 1 y 2). En la Figura 3 puede distinguirse la disminución en el número de mastocitos en los conejos sensibilizados con ovoalbúmina y desafiados con el mismo antígeno por vía oral. Los resultados de

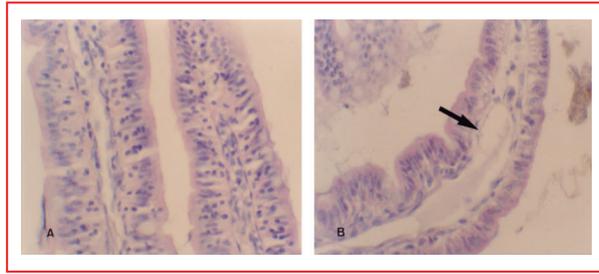


Figura 1. Cortes histológicos de intestino de conejo. **a)** Vellosidades intestinales sin alteraciones histopatológicas en conejo control. **b)** Vellosidades intestinales con edema principalmente en lámina propia (separación entre las células de lámina propia y de las células epiteliales) en conejo sensibilizado a OVA vía subcutánea y desafiado con OVA vía oral. La flecha indica una linfangiectasia (Tinción con Hematoxilina y Eosina, 400 aumentos).

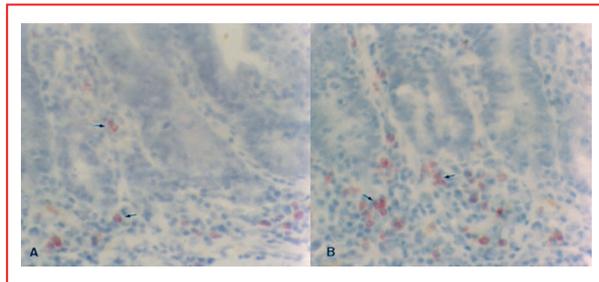


Figura 2. Eosinófilos en intestino de conejo sensibilizado a OVA vía subcutánea y desafiado con OVA por vía oral. **a)** Eosinófilos en mucosa intestinal de íleon. **b)** Abundante infiltración de eosinófilos. Las flechas señalan los finos gránulos citoplasmáticos correspondientes a eosinófilos. Tinción Cromotrope IIR, 400 aumentos.

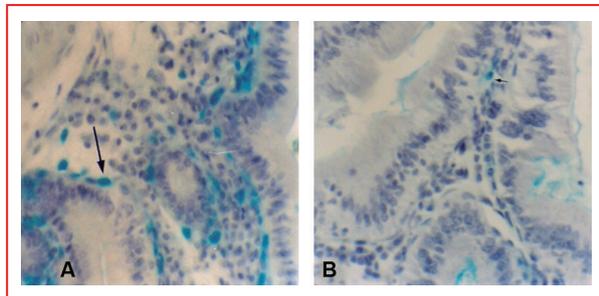


Figura 3. Mastocitos en intestino delgado de conejo. **a)** La flecha identifica mastocitos en mucosa de conejo sin sensibilizar e instilado con PBS por vía oral. **b)** Escasos mastocitos en lámina propia conejo sensibilizado a OVA por vía subcutánea y desafiado con OVA por vía oral. Tinción Alcian blue a pH bajo, 400 aumentos.

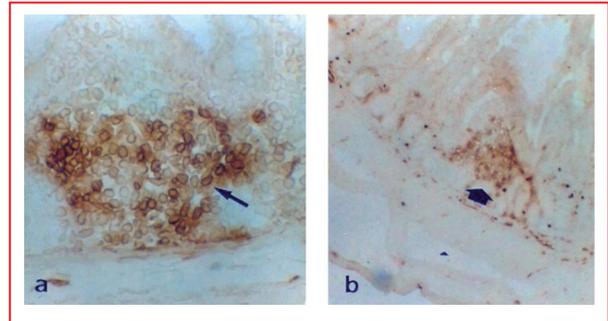


Figura 4. Células CD25 positivas en intestino de conejo sensibilizado a OVA por vía subcutánea e instilado con PBS vía oral. **a)** Células CD25+ en íleon (400 aumentos). **b)** Células CD25+ en lámina propia (100 aumentos). La flechas señalan a las células CD25+ distribuidas en cúmulos mucosos subepiteliales. Tinción con Avidina-biotina y peroxidasa.

las observaciones de eosinófilos muestran un incremento estadísticamente significativo en el grupo 4 comparado con el grupo de animales sensibilizados ya sea instilados con PBS o sin instilar (Figura 5). Se observó lo contrario en el número de mastocitos, que disminuyeron en forma significativa ($P < 0,001$) en el grupo 4 con respecto a las muestras histológicas de los otros grupos de estudio (Figura 6). Por lo que se refiere a la cantidad de las células CD25 positivas en las muestras histológicas, sólo se observó un incremento significativo en el grupo de conejos sensibilizados con ovoalbúmina por vía subcutánea, pero sin instilar con PBS o sin desafiar con ovoalbúmina por vía oral (Figura 7). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la cuantificación de las poblaciones celulares CD4 y CD5 positivas entre los distintos grupos estudiados.

DISCUSIÓN

La ovoalbúmina es un antígeno soluble que administrado en forma subcutánea en conjunción con hidróxido de aluminio, induce inflamación leve con infiltración de eosinófilos, hecho que favorece respuestas tipo Th2 con la consiguiente producción de IgE-específica.^{28,29} El desafío posterior en individuos sensibilizados con el antígeno ovoalbúmina origina una respuesta alérgica anafiláctica en el órgano digestivo retado a desafío.³⁰

En nuestro modelo de estudio se lograron generar concentraciones de IgE anti-ovoalbúmina en los grupos

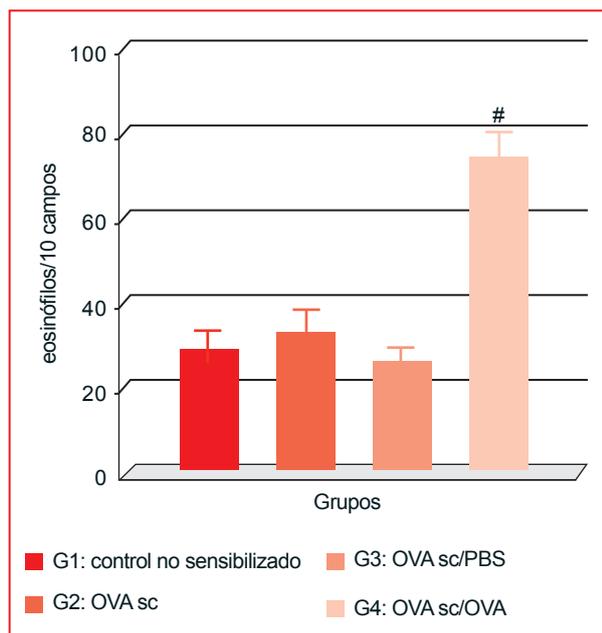


Figura 5. Eosinófilos cromotroppo IIR positivos en lámina propia de íleon. Cada barra representa la media y error estándar del número de eosinófilos positivos cada 10 unidades cripto-vellositarias. # = $P < 0,001$; $n = 10$.

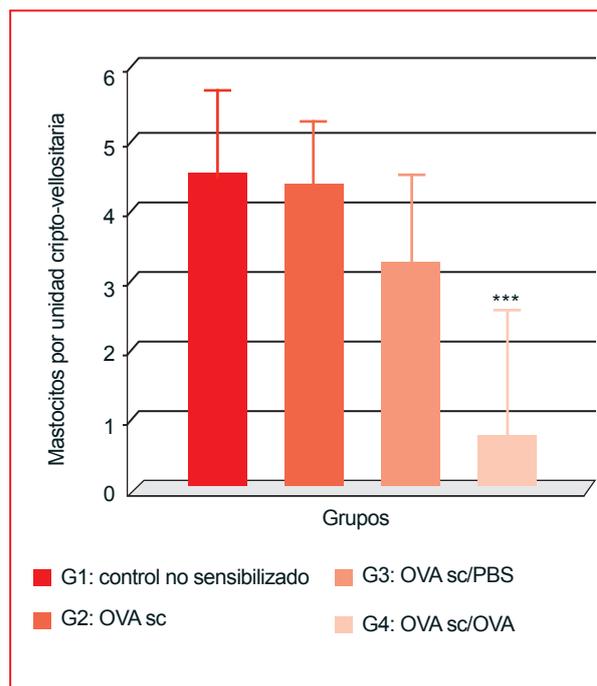


Figura 6. Mastocitos alcian blue positivos en lámina propia de íleon. Cada barra representa la media y error estándar del número de mastocitos positivos por unidad cripto-vellositaria. *** $P < 0,001$; $n = 10$.

sensibilizados por vía subcutánea, lo que se evidenció mediante la prueba de anafilaxia cutánea pasiva.³¹

En los animales sensibilizados por vía subcutánea con ovoalbúmina y desafiados por vía oral con el mismo antígeno, se observó abundante infiltración de eosinófilos en la mucosa vellositaria y disminución en el número de mastocitos con gránulos en la mucosa del intestino delgado.¹³⁻¹⁵ En su superficie, los mastocitos poseen receptores de alta afinidad para la porción Fc de la IgE que permiten la unión de cantidades importantes de este anticuerpo específico para la ovoalbúmina. Por lo tanto, en los animales sensibilizados por vía subcutánea la administración oral del antígeno causa entrecruzamiento de los anticuerpos IgE anti-ovoalbúmina unidos a los receptores de los mastocitos de la lámina propia intestinal. Éste, es un proceso que conduce a la liberación de mediadores preformados, además de la síntesis de una importante cantidad de nuevos mediadores. La liberación de las moléculas contenidas dentro de las vesículas en los mastocitos activados, es la causa de que estas células

no sean visibles con las tinciones específicas utilizadas, en comparación con los mastocitos en reposo previo desafío, identificables en la lámina propia.

El anticuerpo anti-CD25 identifica la cadena α del receptor para IL-2. Esta proteína, además de ser expresada en los linfocitos T activados, puede hallarse en linfocitos B y macrófagos activados de la mayoría de las especies animales.³² Su expresión génica es detectable entre las 4 y 6 horas luego de la estimulación antigénica; por ende, se la considera un marcador temprano del proceso de activación.³¹ Sin embargo, en procesos inflamatorios crónicos del intestino, como la enfermedad de Crohn, también se ha descrito incremento en el número de células que expresan este marcador.^{33,34}

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir que la sensibilización y el posterior desafío con ovoalbúmina muestran cambios histológicos que pueden considerarse

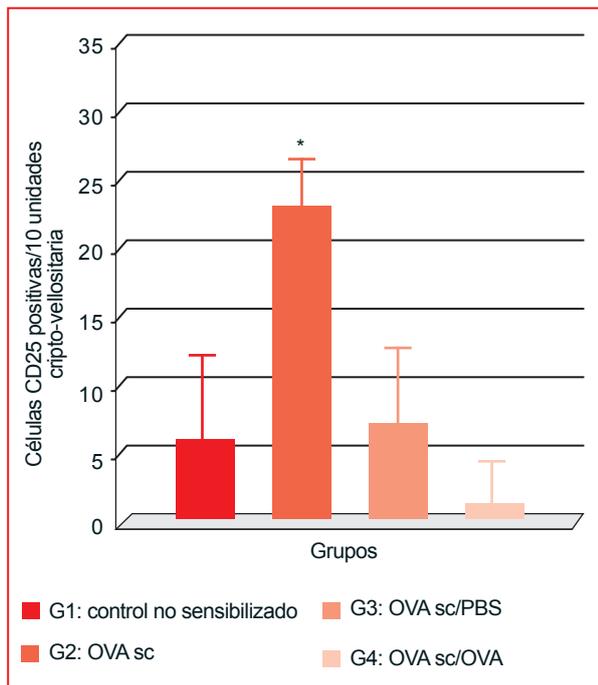


Figura 7. Células CD25 positivas en lámina propia de íleon. Las barras representan la media y error estándar del número de células CD25 positivas por cada 10 unidades cripto-velositarias. * P<0,05; n = 10

patrones inmunopatológicos de la reacción anafiláctica aguda local en la mucosa digestiva, lo que permite la utilización del conejo como modelo animal potencial para el estudio de la alergia alimentaria.

REFERENCIAS

- Liu A, Jaramillo R, Sicherer S, et al. National Prevalence and Risk Factors for Food Allergy and Relationship to Asthma: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *J Allergy Clin Immunol* 2010;12:798-806.
- Venter C, Arshad SH. Epidemiology of food allergy. *Pediatr Clin North Am* 2011;58:327-349.
- Sicherer SH. Food allergy. *Mt Sinai J Med* 2011;78:683-696.
- Branum AM, Lukacs SL. Food allergy among children in the United States. *Pediatr* 2009;124:1549-1555.
- Strait RT, Mahler A, Hogan S et al. Ingested allergens must be absorbed systemically to induce systemic anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:982-989.
- Yu LC. Intestinal epithelial barrier dysfunction in food hypersensitivity. *J Allergy* 2012;5:1-11.

- Yu LC. The epithelial gatekeeper against food allergy. *Pediatr Neonatol* 2009;50:247-254.
- Knight AK, Blázquez AB, Zhang S, et al. CD4 T cells activated in the mesenteric lymph node mediate gastrointestinal food allergy in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:1234-1243.
- van Esch BC, Schouten B, de Kivit S, et al. Oral tolerance induction by partially hydrolyzed whey protein in mice is associated with enhanced numbers of Foxp3(+) regulatory T-cells in the mesenteric lymph nodes. *Pediatr Allergy Immunol* 2011;21:820-826.
- Vickery BP, Chin S, Burks AW. Pathophysiology of food allergy. *Pediatr Clin North Am* 2011;58:363-376.
- Khodoun MV, Strait R, Armstrong L, Yanase N, Finkelman FD. Identification of markers that distinguish IgE- from IgG-mediated anaphylaxis. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108:12413-12418.
- Burton OT, Oettgen HC. Beyond immediate hypersensitivity: evolving roles for IgE antibodies in immune homeostasis and allergic diseases. *Immunol Rev* 2011;242:128-143.
- Fontanella G, Bassan N, Vinuesa M. Sensitization increases esterase-positive macrophage number in appendix from an animal model of food allergy. *Allergol Immunopath* 2005;33:277-281.
- Vinuesa M, Bassan N, Roma S, et al. Immunopathological modifications in the rectal mucosa from an animal model of food allergy. *Rev Esp Enferm Dig* 2005;97:629-636.
- Vinuesa M, Tanaka Y, Hakugawa J et al. In situ expression of interleukin-4,5 and 6 in Peyer's Patch from Ovalbumin (OVA)-sensitized BALB/c mice after oral challenge. *Int Allergol* 1997;46:243-247.
- Korstanje R, O'Brien PC, Yang F, et al. Complete homology maps of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and human by reciprocal chromosome painting. *Cytogenet Cell Genet* 1999;86:317-322.
- Jun LC, Kraehenbuhl JP. Role of rabbit secretory component, a secreted glycoprotein in the specific uptake of IgA dimer by epithelia cells. *J Biol Chem* 1979;254:11072-11081.
- Conner M, Gilger M, Estes M, et al. Serologic and mucosal immune response to rotavirus infection in the rabbit model. *J Virol* 1991;65:2562-2573.
- Kabir S. Simultaneous isolation of intestinal IgA and IgG in rabbits infected intraduodenally with vibrio cholerae 01 by combined lecithin affinity chromatography involving jacalin and protein A. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1993;16:153-161.
- Keren DF, Brown JF, Baron LS, et al. Secretory immunoglobulin A response in rabbits to Salmonella typhi strain harboring Shigella sonnei plasmid. *Infect Immunol* 1982;32:387-392.
- Keren DF, McDonald RA, Wassef JS, et al. The enteric immune response to shigella antigens. *Curr Top Microbiol Immunol* 1989;146:213-221.
- Fasano A, Kay BA, Russel BG, Maneval DR, Levine MM. Enterotoxin and cytotoxin production by enteroinvasive Escherichia coli. *Infect Immunol* 1991;58:3717-3724.
- Vinuesa MA, Bassan ND, Cases A et al. Montelukast treatment (cysteinyl leukotriene receptor antagonist) in a mo-

- del of food allergy: modifications in lymphatic cell population from rectal mucosa. *Rev Esp Enferm Dig* 2010;102:421-425.
24. Tomoe S, Iwamoto I, Yoshida S et al. The in vivo depletion of CD4+ T cells prevents antigen-induced eosinophil infiltration into mouse skin. *Jpn J Allergol* 1992;41:572-578.
 25. Nielsen B, Poulsen O. Reagin production in mice: effect of subcutaneous and oral sensitization with untreated bovine milk and homogenized bovine milk. *In Vivo* 1989;3: 271-274.
 26. Gerbrandy JLF, Bienenstock J. Kinetics and localization of IgE tetanus antibody response in mice immunized by intratracheal, intraperitoneal and subcutaneous routes. *Immunology* 1976;31:913-919.
 27. Kotani M. Generation and characterization of monoclonal antibodies against rabbit CD4, CD5 and CD11a antigens. *J Imm Meths*. 1993;157:241-252.
 28. Warren H, Vogel F, Chedid LA. Current status of immunological adjuvants. *Ann Rev Immunol* 1986;4:369-388.
 29. Gupta RK. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; 32:155-172.
 30. Perdue M, Chung M, Gall G. Effect of intestinal anaphylaxis on gut function in the rat. *Gastroenterol* 1984; 86: 391-397.
 31. Jarret E, Haig D, MacDougall W et al. Rat IgE production. II Primary and booster reaginic antibody responses following intradermal or oral immunization. *Immunol* 1976;30:671-677.
 32. Choy M, Walker –Smith J, Williams C et al. Differential expression of CD25 (interleukin-2 receptor) on lamina propria T cells and macrophages in the intestinal lesions in Chron's disease and ulcerative colitis. *Gut* 1990;31:1365-1370.
 33. Reed JC, Abidi H, Alpers J et al. Effect of cyclosporine A and dexamethasone on interleukin-2 receptor gene expression. *J Immunol* 1986;137:150-154.
 34. Pallone F, Fais S, Squarcia O et al. Activation of peripheral blood and intestinal lamina propria lymphocytes in Chron's disease. In vivo state of activation and in vitro response to stimulation as defined by the expression of early activation marker. *Gut* 1987;28:745-753.