

## Modelo biológico para la detección de antígenos alimentarios

Norberto Bassan, Miguel Vinuesa, Stella Roma y Fernando Pérez

Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario.  
Rosario, Argentina

**RESUMEN.** Algunos alimentos contienen macromoléculas potencialmente antigénicas capaces de producir reacciones inflamatorias alérgicas en individuos previamente sensibilizados. Nuestro objetivo es desarrollar un modelo animal para detectar antígenos alimentarios en la dieta a partir de la respuesta de hipersensibilidad. Conejos neozelandeses se dividieron en 5 grupos. Grupo 1 (G1): control. G2: sensibilizado con ovoalbúmina (OVA). G3: no sensibilizado y desafiado oralmente con OVA. G4: sensibilizado con OVA y desafiado con buffer fosfato. G5: sensibilizado y desafiado con OVA. Muestras de ciego se colorearon con sales de plata y Alcian Blue (AB) pH <1. Otras se inmunomarcaron con anticuerpos monoclonales anti CD5 y anti CD25. Niveles de IgE específica se detectaron mediante el test de PCA. Histopatológicamente el G5 mostró edema intenso parcheado, linfangiectasias e infiltrado eosinofílico. Se cuantificaron: mastocitos en G1: 1.33 células/ campo; G2: 12.80 y G5: 10.20. Células enteroendócrinas en epitelio superficial: G1: 1.6; G2: 6.0; G5: 4.2 y en epitelio criptal: G1: 3.0; G2: 12.0 y G5: 7.3. Linfocitos CD5+ en G1: 24.21; G2: 22.12 y G5: 23.97 y CD25+ en G1: 12.10; G2: 14.30 y G5: 21.68. El G3 resultó similar al G1 y el G4 al G2. Los mastocitos aumentaron por la inducción de la respuesta inmune por OVA. Las células enteroendócrinas incrementaron en los sensibilizados debido a una mayor expresión de gránulos citoplasmáticos o diferenciación de stem cells y disminuyeron en los desafiados por degranulación citoplasmática. Los linfocitos T totales no mostraron diferencias significativas; pero sí se elevó el número de linfocitos CD25+ en los sensibilizados y desafiados. Concluimos que el conejo sensibilizado y desafiado oralmente, es un modelo válido para estudiar los antígenos presentes en los alimentos y sus reacciones alérgicas digestivas.

**Palabras clave:** Alergia alimentaria, modelo en conejos, ciego, inmunohistoquímica.

**SUMMARY:** Biological model for detection of food antigens.

Antigenic macromolecules present in food can induce inflammatory allergic reaction in sensitized persons. The aim of the present work is the development of an animal model to detect food antigens based on hypersensitivity reaction after food ingestion. New Zealand rabbits were divided in 5 groups. Group 1 (G1): control. G2: Ovalbumin (OVA) sensitized. G3: sensitized and orally challenged with OVA. G4: OVA sensitized and phosphate buffer solution challenged (PBS). G5: sensitized and challenged with OVA. Samples from cecum were stained with Alcian Blue pH <1 for mast cells and with silver method for enteroendocrine cells (EEC). Other samples were immunostained with anti CD5 and CD25 monoclonal antibodies. Specific IgE levels were detected by PCA. Histopathology of G5 showed patchy edema, lymphangiectasia and eosinophilic infiltration. Results were expressed as cells per HPF (high power field); Mast cells in G1: 1.33; G2: 12.80 and G5: 10.20. Enteroendocrine cells in surface epithelium: G1: 1.6; G2: 6.0; G5: 4.2 and in deep epithelium: G1: 3.0; G2: 12.0 and G5: 7.3. Lymphocytes CD5+ in G1: 24.21; G2: 22.12 and G5: 23.97 and CD25+ in G1: 12.10; G2: 14.30 and G5: 21.68. Group 3 were similar to G1 and G4 to G2. We observed: mast cells increased in number probably due to OVA induced response. EEC showed an increase in sensitized animals because of higher expression of cytoplasmic granules or differentiation from stem cells. Decrease in EEC number in challenged groups was likely to be based on vesicles release. Total T cells showed no significant differences among groups. CD 25+ cells were higher in sensitized and challenged animals. We concluded that rabbit model of sensitization and oral challenge is valid to study ingested food antigens and potential digestive pathologic reactions.

**Key words;** Food allergy, rabbit model, cecum, immunohistochemistry.

### INTRODUCCION

La alergia digestiva corresponde a respuestas inmunes anómalas frente a sustancias alérgicas ingresadas por vía oral, en individuos previamente sensibilizados (1,2).

Los alérgenos pueden ser componentes normales de los nutrientes, formar parte de los aditivos o ser sustancias que normalmente no se encuentran en el producto natural, pero sí en variedades transgénicas de los mismos. El modo de preparación puede aumentar o disminuir la capacidad

antigénica de un alimento o modificar estructuras moleculares dando lugar a reacciones cruzadas (3).

Los alimentos capaces de producir alergia alimentaria más estudiados son: leche de vaca, huevo de gallina, trigo, tomate, chocolate, maní, pescados, ostras y mariscos (4).

Se estima que el 0,2 % de la población presenta síntomas de alergia a los alimentos. En USA el 5% de los menores de 3 años y el 1,5% de la población general (alrededor de 4.000.000) manifiesta síntomas de alergia a los alimentos (5).

Entre los factores que favorecen la entrada inapropiada de moléculas por la barrera mucosa del intestino y en consecuencia facilitan la sensibilización a un antígeno alimentario, se cuentan el déficit de IgA secretoria, frecuente en los niños, el alcohol, infecciones virales y bacterianas, drogas anti-inflamatorias, quimio y radioterapia, stress y todo aquello que pueda producir injuria a nivel intestinal (2).

El interés actual por el estudio de la alergia y la intolerancia alimentaria se manifiesta por la preocupación de la Comunidad Médica, la Industria Alimentaria y Organismos de Gobiernos de países como Canadá, USA y UK.

Estos Gobiernos exigen que el etiquetado de los alimentos contenga una lista de los ingredientes de ese producto, haciendo hincapié en aquel componente que podría causar una reacción adversa, a fin de evitar una consumición inadvertida del mismo. Además han desarrollado programas de educación para la industria alimenticia (6).

En 1995 la Organización de Alimentos y Agricultura de las Naciones Unidas, realizó un listado de los alimentos e ingredientes potencialmente alergénicos. Estos fueron: leche de vaca, huevos, crustáceos, pescado, soja, maní, nueces, sulfitos, trigo, cebada, centeno (7).

Determinar la presencia de componentes con capacidad antigénica directa o cruzada, dentro de un alimento puede resultar complejo. En muchos casos, la industria de los alimentos, utiliza el mismo equipamiento para procesar más de un tipo de producto alimentario. Ejemplo de esto sería pasta con huevo y pasta libre de huevo. Por lo tanto se requeriría una adecuada limpieza del equipamiento utilizado para impedir la persistencia del ingrediente alergénico.

En los alimentos elaborados comerciales es frecuente que las etiquetas no describan todos los componentes o lo hagan con nombres que no son fácilmente reconocibles. Por otra parte las pruebas in vitro no logran reflejar con exactitud lo que sucede en el organismo con los antígenos naturales y los tests cutáneos y los desaffos labiales u orales conllevan un importante grado de riesgo para el paciente (8).

El conejo es un mamífero lagomorfo cuyas características y respuestas biológicas son similares a los primates, permitiendo una extrapolación aceptable de los resultados obtenidos en él. (9).

En la fisiología digestiva del conejo, la cecotrofia es un mecanismo típico con una influencia decisiva, tanto en sus características nutricionales como en los procesos patológicos que se relacionan con la misma, el ciego es el sitio donde se producen importantes transformaciones y representa el órgano central de la cecotrofia.

El volumen relativo del ciego (49% del aparato digestivo), relacionado al de otras especies (16% caballo, 3% vaca, 5,6% cerdo), orienta sobre la importancia de este órgano. Los nutrientes ingeridos por el conejo son sometidos a una

digestión enzimática en el intestino delgado y luego pasan al ciego donde se realiza la digestión bacteriana. Allí macromoléculas en distintas etapas de degradación y potencialmente antigénicas, permanecen en contacto con la mucosa cecal entre dos a doce horas.

Si el producto de la digestión cecal abandona dicho órgano en las primeras horas de la mañana, recibe una envoltura de moco colónico, constituyéndose los cecotrofos. Estos salen por el ano y son ingeridos por el animal reiniciando el ciclo digestivo, que puede repetirse dos o tres veces.

Este mecanismo hace que el ciego se comporte, desde el punto de vista de la digestión, como el rumen de los poligástricos, es decir como una cuba de fermentación.

Si el producto de la digestión cecal sale del ciego en horas de la tarde se elimina como heces que no son reingeridas.

El mecanismo de la cecotrofia hace que lleguen, permanezcan y reciclen en el ciego moléculas en diferentes etapas de degradación y con diversa potencialidad antigénica, permitiendo el contacto de los antígenos con la barrera mucosa. Este hecho resulta favorable para el estudio de la reacción local de hipersensibilidad en el tubo digestivo (10-13).

En el intestino los antígenos alimentarios pueden ser incorporados por los enterocitos (entrada apropiada de moléculas) y contactar con linfocitos Th3 (T helper) gamma-delta intraepiteliales produciéndose una respuesta de tolerancia activa. (14).

Si la entrada de moléculas es inapropiada (barrera mucosa alterada), el antígeno activa linfocitos Th1 y Th2 e inmunocompromete linfocitos B sensibles al antígeno, que pasan al folículo, donde se activan. (15). Éstos drenan a los ganglios linfáticos mesentéricos donde proliferan y maduran, algunos a linfocitos B memoria y la mayoría a plasmoblastos (16). Por vía linfática pasan al torrente sanguíneo; luego a la lámina propia, a folículos de las placas de Peyer del intestino y al tejido linfático de otras mucosas. En estas localizaciones proliferan y se diferencian a plasmocitos sintetizadores de IgE (17,18) que se une a mastocitos y basófilos.

Un nuevo contacto del antígeno a nivel del intestino, con células inmunocompetentes (linfocitos y mastocitos sensibilizados) desencadena una cascada de hechos que conduce a la generación de una reacción inflamatoria aguda anafiláctica local (19,20). Esta reacción presenta modificaciones cualitativas de la mucosa y cuantitativas de células tales como linfocitos, mastocitos y células enteroendócrinas (CEE).

Los mastocitos mucosos, que predominan en intestino y pulmón, son T dependientes. Su proliferación depende de linfoquinas de células T, contienen condroitínsulfato y poca histamina. Sintetizan leucotrienos C4 y B4 y presentan

abundantes receptores de membrana para IgE (21- 24).

Las células enteroendócrinas (CEE) producen hormonas que actúan sobre la motilidad, secreción y absorción de nutrientes. Captan y decarboxilan precursores amínicos y contienen gránulos secretorios detectables con soluciones de plata amoniaca y anticuerpos monoclonales anti-cromogranina (25-28).

Se ha comprobado su participación en la regulación de la respuesta inmune gastrointestinal. Las CEE, mediante la secreción de sustancia P, actúan sobre receptores de membrana NK-1R de los linfocitos T, modulando la respuesta inmune (29,30). También producen una sustancia similar bombesina que atrae eosinófilos (31).

### Objetivo

Desarrollar un modelo biológico para la detección de antígenos presentes en los alimentos, basado en el estudio histoinmunopatológico de la reacción anafiláctica local del ciego de conejo, previamente sensibilizado.

## MATERIAL Y METODO

Se utilizó como modelo el ciego de conejo. En este animal se reprodujeron las condiciones inmunológicas de individuos que, una vez sensibilizados incorporan por vía oral, el antígeno al cual están sensibilizados y cuya presencia, como componente de un alimento, se investiga.

Se utilizaron conejos neocelandeses adultos jóvenes, en condiciones normales de bioterio, alimentados con balanceado comercial (17% de proteína bruta como máximo y 12% de fibra como mínimo), con alimento y bebida ad libitum.

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

Se formaron 5 grupos de 20 animales cada uno.

- Grupo 1: control normal.
- Grupo 2: sensibilizado con ovoalbúmina (OVA).
- Grupo 3: no sensibilizado con OVA y desafiado con solución de buffer fosfato (PBS).
- Grupo 4: sensibilizado con OVA y desafiado con PBS.
- Grupo 5: sensibilizado con OVA y desafiado con OVA.

### Sensibilización

Los conejos de los grupos 2, 4 y 5 fueron sensibilizados por vía intraperitoneal en dos oportunidades, con 15 días de diferencia entre ambas. Se les aplicó 2 ml de una solución de 70 µg de OVA y 30 mg de ALUM / ml. (19, 32)

### Determinación de la sensibilización

Los títulos de IgE específica sérica anti OVA de los conejos sensibilizados se determinaron por el test de

anafilaxia cutánea pasiva (PCA). (32). Ésta se desarrolló en ratas Wistar de 8 semanas. Se les inyectó subcutáneamente, en cuatro lugares distintos de la piel del lomo, 0,05 ml de suero de conejo sensibilizado en diluciones de 1/40; 1/80; 1/160 y 1/320. Como control se administró de la misma forma con suero de conejo no sensibilizado. Después de 48 horas, las ratas fueron inyectadas por vía endovenosa con una solución de 1 mg de OVA en 0,05 ml de PBS con Evan Blue al 1%. Las ratas fueron sacrificadas 10 minutos después de la inyección endovenosa. Se consideró como positivas aquellas diluciones que provocaron máculas azuladas de 5 mm o más de diámetro.

### Desafío

Los grupos 3 y 5 fueron desafiados con 15 días de posterioridad a la última sensibilización y con 48 hs de ayuno. El desafío se efectuó mediante la instilación, por sonda intragástrica, de 150 mg de OVA en 20 ml de una solución de PBS (19).

Los conejos del grupo 4 (control de desafío) fueron instilados de igual manera, pero sólo con la solución de PBS.

Los animales se sacrificaron por sobredosis de éter sulfúrico. Los de los grupos desafiados y los controles de desafío, 24 hs después del desafío oral. Los del grupo 1 y 2, 15 días después de la última sensibilización.

### Muestras y fijación de tejidos

Del ciego de cada animal se obtuvieron 3 muestras para cada técnica a realizar.

Las muestras para inmunohistoquímica se sumergieron en medio líquido protector para congelación rápida (OCT) y se congelaron en nitrógeno líquido, se almacenaron a -20 grados centígrados y se cortaron a 8 µ con crióstomo, realizándose 5 cortes de cada muestra.

Muestras para histoquímica de mastocitos se fijaron en Carnoy y muestras para histología convencional e histoquímica de CEE en formol neutro al 10%.

El material para histología convencional y para histoquímica se incluyó en parafina y cortó a 6µ, efectuándose 5 cortes de cada muestra para cada técnica.

### Anticuerpos monoclonales

- Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron:
- Ratón anti-conejo CD5 (KEN-5, BALB/C IgG 1, Pharmingen, San Diego, California) para la identificación de células T totales maduras (33).
  - Ratón anti-conejo CD25 (KEI-alfa 1, BALB/C IgG 2b, Pharmingen, San Diego, California), marcador de activación (33).

Para la inmunotinción de las células positivas se utilizó Histostain Kit, Zymed, South San Francisco, CA).

### Inmunohistoquímica

Los cortes por congelación, fijados en alcohol al 100% se bloquearon con suero no inmune al 2% en solución tampón TRIS salina (TBS) para evitar tinciones inespecíficas y se incubaron durante 60 minutos a 37 grados con los anticuerpos monoclonales mencionados.

Como control positivo se emplearon cortes de timo de conejo y como control negativo se utilizó anticuerpo ratón IgG 1 e IgG 2, laboratorio Zymed, en lugar del primer anticuerpo.

### Histoquímica

La detección de mastocitos se realizó en el material fijado en Carnoy. Previo a la coloración, los cortes se sumergieron en una solución de ácido clorhídrico 1 M (HCl 1M) de pH<1, se colorearon con Alcian Blue al 1% en ácido clorhídrico lográndose un pH <1 y se lavaron con la solución precitada antes de su deshidratación y montaje (34).

Las CEE se detectaron sobre material fijado en formol tamponado mediante la técnica de sales de plata de Pascual, que utiliza nitrato de plata acuoso al 0,5%, hiposulfito de sodio al 5% e hidroquinona al 1% en agua destilada (35).

### Cuantificación de células

La cuantificación de células positivas CD5 y CD25 se realizó de acuerdo al método descrito por Urau M. y colaboradores (36). Las células positivas fueron analizadas en 20 campos de 400x en cada muestra y expresados como células positivas cada 100 núcleos de enterocitos.

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

En la cuantificación de las CEE se evaluó epitelio superficial y cripta. Se consideraron 20 campos de 400x por cada muestra y las CEE se expresaron en relación a 100 enterocitos.

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante prueba de comparación de medias.

## RESULTADOS

La positividad del test de PCA en diluciones de 1/160, en los animales sensibilizados intraperitonealmente, indica una respuesta inmune con altos niveles de IgE específica anti OVA.

La prueba de PCA fue negativa en los grupos que no recibieron OVA por vía intraperitoneal.

El desafío por vía oral con OVA produjo cambios en la mucosa del ciego con una reacción inflamatoria local de alergia a los alimentos.

En los animales desafiados por vía oral el estudio histopatológico mostró desestructuración de la histoarquitectura mucosa, intenso edema parcheado con

ensanchamiento de la lámina propia, dilatación de los capilares linfáticos e infiltrado de polimorfonucleares eosinófilos en cúmulos próximos al epitelio. Figuras 1 y 2.

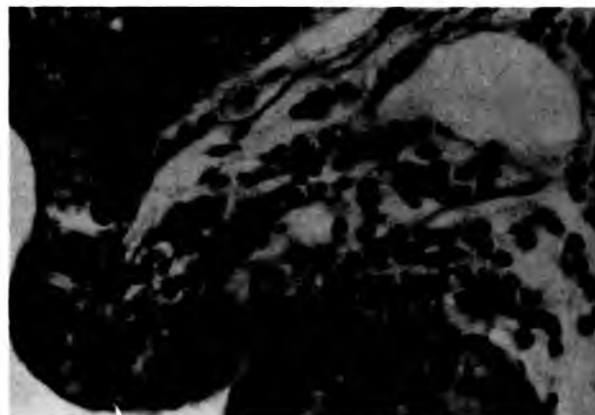
FIGURA 1

Ciego de conejo. Histología normal. HE. 100 x.



FIGURA 2

Animales sensibilizados y desafiados por vía oral con OVA. Edema mucoso y linfangiectasias. HE. 400 x.



Los linfocitos T CD 25+ (linfocitos T activados) aumentaron significativamente en los animales desafiados en relación con los del grupo control y a los sensibilizados. Tabla 1, Figura 3.

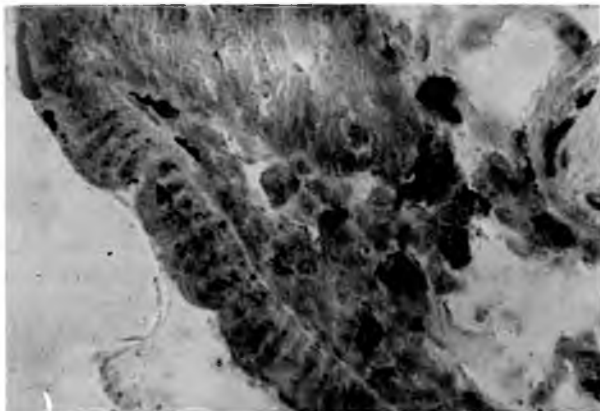
TABLA 1  
Células linfáticas positivas. Linfocitos T por 100 enterocitos

Linfocitos T	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 5
CD 5+	24,21	22,12	23,97
CD 25+	12,10*	14,30*	21,68*

\* Grupo 5 vs Grupo 1 y 2 p <0.05

FIGURA 3

Linfocitos T CD25 (+): Marcador de activación linfocitaria. Células intraepiteliales ubicadas a nivel del corion. 400 x



Los linfocitos CD 5+ ( linfocitos T totales) no se modificaron en los distintos grupos en referencia al control.

Los mastocitos aumentaron significativamente en los sensibilizados localizándose en cercanía de los vasos y del epitelio y descendieron levemente (diferencia no significativa) como consecuencia del desafío. Tabla 2, Figuras 4 y 5.

TABLA 2

Mastocitos mucosos AB +. Media por campo de 400x

Mastocitos	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 5
AB+ pH<1	1,33*	12,80*	10,20*

\* Grupo 2 y 5 vs Grupo 1 p < 0,05

FIGURA 4

Grupo 1: mastocito mucoso AB (+). Alcian blue pH <1. 400 x.

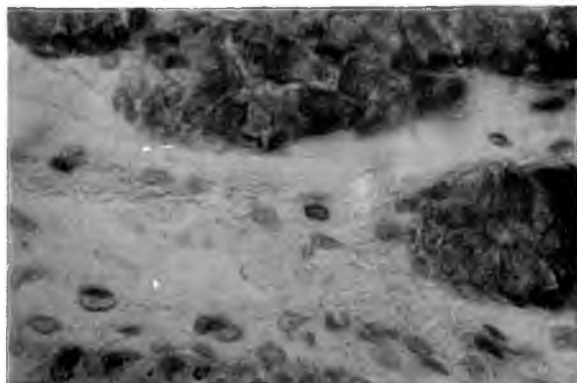
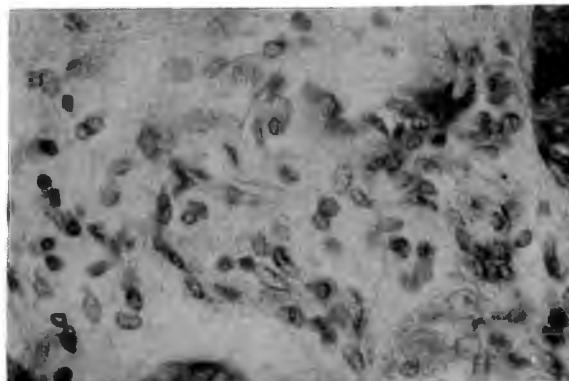


FIGURA 5

Animales sensibilizados y desafiados. Aumento de los mastocitos mucosos AB(+). 400 x.



Las células enteroendócrinas aumentaron significativamente, tanto en el epitelio superficial como en el criptal en los animales sensibilizados en relación al control y decrecieron significativamente en los animales desafiados en comparación con los sensibilizados. Tabla 3, Figuras 6, 7 y 8.

Los resultados obtenidos en los animales del grupo 3 fueron similares a los del grupo 1. Y los del grupo 4 parecidos a los del grupo 2.

TABLA 3

Células enteroendócrinas. Técnica de Pascual. Células positivas por 100 enterocitos

Células enteroendócrinas	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 5
Epitelio superficial	1,6	6,0*	4,2*
Epitelio criptal	3,0	12,0**	7,3**

\* Grupo 5 vs Grupo 2 p < 0,05 \*\* Grupo 5 vs Grupo 2 p < 0,05

FIGURA 6

Grupo control: células enteroendócrinas(CEE) en cripta de ciego. Técnica de Pascual. 600 x.

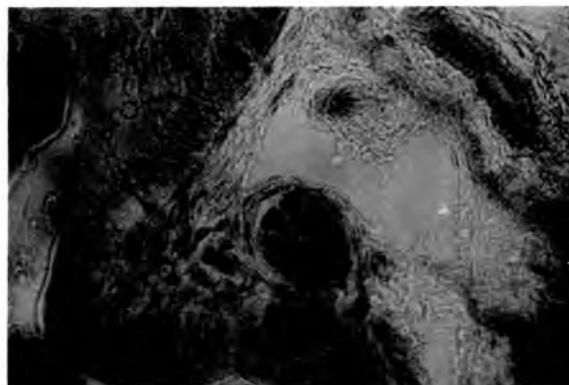


FIGURA 7

Conejos sensibilizados. Aumento de las CEE a nivel de cripta cecal. Técnica de Pascual. 400 x.

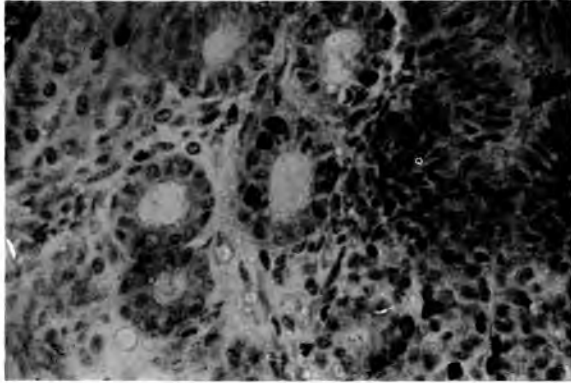


FIGURA 8

Animales desafiados con OVA. Disminución de las CEE. Técnica de Pascual. 250 x



## DISCUSION

Últimamente se han desarrollado distintos modelos animales, especialmente en murinos, para el estudio de la respuesta inmune mucosa de hipersensibilidad local en el tubo digestivo.

El modelo propuesto por nosotros utiliza el conejo, que por pertenecer a los mamíferos lagomorfos, poseen como ventaja sobre los modelos murinos, una mayor similitud genética con los primates (9). Esta semejanza, desde la perspectiva mencionada anteriormente, permite una extrapolación de resultados de una especie a otra con menor posibilidad de error.

La particularidad de la fisiología digestiva del conejo, denominada cecotrofia, representa una ventaja adicional en este modelo. El hecho que el ciego se comporte como una

cuba de fermentación, similar al rumen de los poligástricos, hace que los alimentos permanezcan en él un tiempo prolongado. La digestión bacteriana-enzimática de los alimentos realizada en el ciego y la recirculación de los mismos, favorece la penetración de antígenos por la barrera mucosa, con la producción de una reacción de hipersensibilidad local a los alimentos en los animales previamente sensibilizados.

Los altos títulos de la PCA demuestran la capacidad de respuesta inmunológica del conejo y la posibilidad de contar con animales sensibilizados a antígenos específicos. Esto nos permite sensibilizar al animal con distintos antígenos alimentarios purificados que se venden comercialmente o hacerlo con antígenos preparados especialmente.

La respuesta inflamatoria local y las modificaciones en el número de células luego del desafío oral (37), indican que el antígeno es capaz de penetrar por la barrera mucosa. Ingresado el mismo, va a interactuar con los mastocitos que tienen adheridas moléculas de IgE en sus membranas e inducirá la liberación de histamina, serotonina y leucotrienos que producen los cambios histopatológicos descriptos.

En todos los grupos los linfocitos CD 5+ (linfocitos T totales) se detectaron en la mucosa y dentro del epitelio, no modificándose su distribución ni número en relación con la sensibilización y el desafío. Los linfocitos CD 25+ que representan los linfocitos T activados no modificaron su número en los animales sensibilizados en relación al control, pero sí se incrementaron significativamente en los animales sensibilizados y desafiados, indicando su respuesta al contacto con el antígeno incorporado mediante el desafío.

El aumento de los mastocitos en los animales sensibilizados se debería fundamentalmente a la producción de IgE como respuesta a la sensibilización. La IgE actúa sobre el receptor Fc épsilon 1 del mastocito estimulando en forma directa su proliferación. También lo hacen las interleuquinas 3, 4, 9 y 10, la primera en forma directa y las restantes como cofactores para la proliferación mastocitaria.

En los animales sensibilizados y desafiados, la disminución en el número de los mastocitos no alcanza valores significativos, sin embargo podemos considerar su degranulación, y consecuente liberación de factores vasoactivos, traducidos en el edema mucoso y la dilatación vascular linfática

El aumento de las células enteroendócrinas visualizadas en los animales sensibilizados se debería al incremento de gránulos dentro de las células o a diferenciación o replicación de éstas a partir de stem cells. Resultados similares fueron descriptos por Bousbaa et al en bronquios de cobayo (31), por Nogueira y Barbosa en intestino de ratones libres de gérmenes (38) y por Bassan et al en apéndice de conejo (39).

La disminución de las células enteroendócrinas después del desafío se debería a la degranulación de estas células.

Las mismas liberan sustancia P que aumentaría la permeabilidad del epitelio intestinal y actuaría sobre los linfocitos T que expresan en sus membranas el receptor NK-1R y estimularían macrófagos y células presentadoras de antígenos. Además sintetizan una sustancia similar a la bombesina que atrae eosinófilos, productores de histaminasa y arilsulfatasa, de efectos inhibitorios sobre la reacción anafiláctica local.

Las posibilidades de obtener un alto grado de sensibilización específica en el conejo, como el logrado con la albúmina de huevo, permiten explorar mediante el desafío, la presencia de albúmina en alimentos que no declaren dicho componente o en los que éste se encuentre como residuo contaminante.

En forma similar, es posible sensibilizar con antígenos de leche de vaca y analizar las reacciones cruzadas con la leche de cabra o alimentos que la contengan. Utilizando para la sensibilización antígenos de soja podemos investigar su presencia en gran cantidad de alimentos que la contienen y habitualmente no la declaran; o sensibilizando con antígenos de nuez detectar soja transgénica con gen de nuez.

Si bien se dispone de métodos bioquímicos *in-vitro* para el estudio de los componentes antigénicos de los diferentes alimentos, éstos son complejos y de costo elevado, no pudiendo sustituir a los modelos biológicos *in-vivo*, que presentan ventajas en cuanto a la posibilidad de extrapolación al humano (5,6).

**CONCLUSION**

Lo descripto como parámetros normales y las modificaciones cuali-cuantitativas histoinmunopatológicas, referidas en los animales sensibilizados y desafiados, nos permiten considerar al conejo sensibilizado como un modelo biológico de gran utilidad y confiabilidad para la detección de antígenos alimentarios.

**REFERENCIAS**

1. Food allergy: Definition, diagnosis, epidemiology, clinical aspects. *Schweiz Med Wochensh* 1996;126 (18):770-776.
2. Gislason S. Immunology Hypersensitivity Diseases –Food Allergy–Delayed Hypersensitivity Immunology and Mechanism. [www.nutramed.com/index.html](http://www.nutramed.com/index.html)
3. Sabbah A, Drouet M, Luret MG, Giffard G, Minkhar M. Cross reactivity between cow’s milk and goat’s milk. *Allerg Immunol Paris* 1997;29(7):203-214.
4. Ahmed T, Fuchs G. Gastrointestinal Allergy to food: A review. *J Diarrhoeal Dis Res* 1997;15(4): 211-23.
5. Sampson HA. Food allergy. Part I: Immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 5:717-729.
6. Taylor SL, Hefle SL. Food science perspective on food allergy. *Allergy* 1998; 53(Suppl 46): 5-7.

7. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Report of the FAO Technical Consultation on Food Allergys. Rome. Italy, 13-14 November 1995.
8. Rance F, Juchet A, Bremont F, Dutau G. Correlations between skin prick tests using commercial extracts and fresh foods, specific IgE and food challenges. *Allergy* 1997; 52(19): 1031-5.
9. Mage RG. Immunology of lagomorphs. 1998. In *Handbook of Vertebrate Immunology*, P Pastoret, P Griebel, H Bazin and A Govaerts, eds. Academic Press, San Diego, pp 223-260.
10. Costa-Batlloiri P, Marzo I. Influencia de la nutrición en la patología cunfcula. XVI Symposium Nacional de Cunicultura. 41-53 Castellón. España. 1991.
11. Fekete S, Bonori J. The effect of the fiber and protein level of the ration upon the cecotrophy of rabbit. *J Appl Rabbit Res* 1985; 8: 68-71.
12. Hollyster A. G. Effects of water administrated probiotics and acidifiers on growth feed conversion and enteritis mortality of weaning rabbit. *J Appl Rabbit Res* 1989; 12: 143-147.
13. Fekete S. Recent finding and future perspectives of rabbit’s digestive physiology. *Cuni-Sciences* 1987; 4(3): 1-9.
14. Wiedermann U, Jahn-Schmid B, Bohle B, Repa A, Renz H, Kraft D, Ebner C. Suppression of antigen-specific T and B cell responses by intranasal or oral administration of recombinant Bet v 1, the major birch pollen allergen, in a murine model of type I allergy. *J All Clin Immunol* 1999; 103 (6): 1202-1210.
15. Ermak T, Baghat H, Pappo J. Lymphocyte compartments in antigen-sampling regions of rabbit mucosa lymphoid organs. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50:14-28.
16. Mc Ghee J, Mestecky J, Elson C, Kiyono H. Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. *J Clin Immunol* 1989; 9:175-199.
17. Xu-Amano J, Kiyono H, Jackson R, Staats H, Fujohashi K, Burrows P, elson C, Pillai S, McGhee R. Helper T cell subsets for IgA response: Oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in MALT. *J Exp Med* 1993; 178:1308-1320.
18. Mc Kay D, Perdue M. Intestinal epithelial function: The case for immunophysiological regulation. *Cells and mediators. (First of two parts). Dig Dis Sciences* 1993; 38:1377-1387.
19. Vinuesa, M. Tanaka, Y. Hakugawa, J. Jae Bac, S. Katayama, I. In-situ epression of interleukin-4, 5 and 6 in Peyer’s Patch from Ovalbumin (OVA)-sensitized BALB/c mice after oral challenge. *International Allergology* 1997;46 (4).
20. Ogra P. Mucosal immunology: Past, present and future. *Vaccinia, Vaccination and Vaccinology: Jenner, Pasteur and their successors*, pp 33-41; 1996.
21. Kitamura Y, Kasugai T, Arizono N, Matsuda H. Development of mast cells and basophils: processes and regulation mechanisms. *Am J Med Sciences* 1993; 306(3):185-191.
22. Kitamura Y, Yamamoto S, Galli S, Greaves M. Biological and molecular aspects of mast cell and basophil differentiation and function. New York. Raven Press, 1995.
23. Wagelie-Steffen A, Metcalfe D. Molecular mechanisms that regulate mast cell differentiation and survival. *Proceedings of the XVI International Congress of Allergology and Clinical Immunology*, Cancún, October 19-24, 1997.

24. de Crescenzo G, Marino I, Genovese A, Gleich G. Functional interactions between human mast cells and eosinophils. Proceedings of the XVI International Congress of Allergology and Clinical Immunology, Cancún, October 19-24, 1997.
25. Feyrter F. *Über diffuse endokrine epitheliale Organe*. Leipzig: Barth 1938; 6-17.
26. Grimelius L, Wilander E. Silver stains in the study of endocrine cells of gut and pancreas. *Invest Cell Pathol* 1980; 3: 3-12.
27. Titlbach M, Falt K, Falkmer S. Post natal maturation of the islets of Langerhans in sheep. Light microscopic, immunohistochemical, morphometric and ultrastructural investigations with particular reference to the transient appearance of argyrophil insulin immuno-reactive cells. *Diab Res* 1985; 2:5-15.
28. Titlbach M, Falt K, Falkmer S. Ontogeny fo the pancreatic islet parenchymal cells in rabbits. An immunohistochemical and ultrastructural study with particular regard to the earliest appearance of argyrophil insulin, immunoreactive cells. *Diab Res* 1987; 5:105-117.
29. Stead R, Bienenstock J, Stanisz A. Neuropeptide regulation of mucosa immunity. *Immunol Rev* 1987; 100:333-359.
30. Pascual D, Kiyono H, Mc Ghee J. Neuroimmune modulation of lymphocyte function: Substance P enhances immunoglobulin synthesis in LPS activated murine splenic B cells. *Int Immunol* 1991; 3:1223-1229.
31. Bousbaa H, Fleury-Feith, J. Effects of a long-standing challenge on pulmonary neuroendocrine cells of actively sensitized guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 714-717.
32. Tomoe, S. Iwamoto. I. Yoshida. S. Tomioka. H. The in vivo depletion of CD4+ T cells prevents antigen-induced eosinophil infiltration into mouse skin. *Jpn J Allergol* 1992; 3:572-578.
33. Kotani M. Generation and characterization of monoclonal antibodies against rabbit CD4, CD5 and CD11a antigens. *J Imm Meths* 1993; 157: 241-52.
34. Bassan N, Vinuesa M, Pérez F, Roma S, Bernardi S, Lagrutta M. Mastocitos Azul Alciano positivos en la mucosa del ciego de conejos normales y esplenectomizados, sensibilizados y desafiados con ovoalbúmina. *Analecta Veterinaria* 1998; 18: 15-20.
35. Pascual J. APUD cells and neuroepithelial bodies in hamster lung. *Thorax* 1980; 35: 371-4.
36. Urao M, Teitelbaum D, Drongowski R, Coran A. The association of gut-associated lymphoid and bacterial translocation in the newborn rabbit. *J Ped Surgery* 1996; 31: 1482-87.
37. Bassan N, Roma S, Vinuesa M, Pérez F, Bernardi S, Araujo A. Ciego de conejos sensibilizados con ovoalbúmina y desafiados por vía oral: histoinmunopatología. *Patología. Revista Latinoamericana* 1999; 37:87-92.
38. Nogueira A, Barbosa S. Immunohistochemical study of intestinal endocrine cells in germ-free mice. *Eur J Histochem* 1994; 38: 213-218.
39. Bassan N, Vinuesa M, Pérez F, Roma S, Bernardi S. Células enteroendócrinas intraepiteliales en ciego y apéndice de conejos sensibilizados con ovoalbúmina. *Acta Gastroenterol Latinoam* 1999; 29 (5): 313-317.

Recibido: 16-11-2000

Aceptado:26-04-2002