

Modelos experimentales para la evaluación de sustancias farmacológicas activas sobre la dermatitis atópica

Experimental models for the evaluation of active drug substances on atopic dermatitis

Yanaysis Stable- García^a, Zullyt Zamora- Rodríguez^b.

^a **Autora principal** (0000-0002-5441-6795). Unidad de Productos Ozonizados, Departamento de Estudios Biológicos. Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), La Habana, Cuba

^b **Revisión del trabajo** (0000-0002-9387-3761). Unidad de Productos Naturales, Departamento de Farmacología Experimental. Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), La Habana, Cuba

Recibido: 19 de octubre de 2021

Aceptado: 23 de diciembre de 2021;

RESUMEN

La dermatitis atópica es una enfermedad inflamatoria multifactorial de la piel que se desencadena como resultado de la interacción de factores ambientales y de la susceptibilidad genética. En los últimos años se ha evidenciado que existen diferentes modelos experimentales capaces de reproducir esta enfermedad, los cuales contribuyen al conocimiento de aspectos fisiopatológicos de la enfermedad y permiten dilucidar los mecanismos de acción de nuevos tratamientos a evaluar. Por tanto, el objetivo de este trabajo de revisión es describir algunos de los modelos experimentales empleados para el estudio de la dermatitis atópica. Para ello se recopiló toda la información publicada que se encontró disponible en la base de datos de PubMed. Esta revisión, brinda un adelanto del progreso científico que vincula la especie de animal de laboratorio utilizado, el tipo de agente inductor y las posibles respuestas obtenidas que reflejan o mimetizan las manifestaciones clínicas de la enfermedad. El empleo de los modelos animales, sin duda, constituyen una herramienta fundamental para la búsqueda científica y el conocimiento de la dermatitis atópica. Se concluye que este documento aporta información actualizada respecto a los diversos modelos animales más utilizados en la dermatitis atópica, lo cual constituye una herramienta de consulta para la investigación científica en esta temática

Palabras claves: dermatitis atópica, estrés oxidativo, modelos experimentales.

ABSTRACT

Atopic dermatitis is a skin multifactorial inflammatory disease, which triggered as result of, environmental factors and genetic susceptibility interaction. In recent years, it has been shown that there are different experimental models capable of reproducing this disease and using the knowledge of pathophysiological aspects of the pathology and elucidating the action mechanisms of new treatments to evaluate. Therefore, the objective of this review work is to describe some of the experimental models used for the study of atopic dermatitis. For this, all the published information that was available in the PubMed data base was collected. This review provides a preview of scientific progress that links the species of laboratory animal used, the type of inducing agent and the possible responses obtained that reflect the clinical manifestations of the disease. The use fullness of animal models undoubtedly constitutes a fundamental tool for the scientific search and knowledge of atopic dermatitis. It is concluded that this document provides updated information regarding the various animal models most used in atopic dermatitis, which constitutes a consult tool for scientific research on this subject.

Keywords: atopic dermatitis, oxidative stress, experimental models.

INTRODUCCION

La dermatitis atópica (DA) fue descrita por primera vez en el año 1933 por Wise y Sulzberger (Wise & Sulzberger, 1933). El Comité Nacional de Dermatología (Scacchi *et al*, 2013) define la DA como una enfermedad de la piel en la que está involucrado el sistema inmunitario. Se trata de una enfermedad crónica compleja, multifactorial, de base genética, caracterizada por mutaciones en diferentes proteínas, que provocan alteraciones en la barrera cutánea y trastornos inmunológicos asociados a elevados niveles de inmunoglobulina E (IgE) (Scacchi *et al*, 2013)

De hecho, los pacientes con DA son frecuentemente sensibilizados por alérgenos microbianos provenientes de la levadura *Malassezia* y bacterias como el *S. aureus* y la *E. coli* (Reginald *et al*, 2011a; Reginald *et al*, 2011b; Mitterman *et al*, 2016). Por otra parte, estos pacientes también son sensibilizados con frecuencia por autoalergenos (Valenta *et al*, 2009; Navarrete *et al*, 2016; Lucae *et al*, 2016).

Esta enfermedad, se caracteriza por la presencia de prurito, xerosis y lesiones cutáneas eritematosas con curso crónico recidivante. Las erupciones cutáneas que se presentan en la DA, se caracterizan por uno o más de estos síntomas, principalmente la picazón y el rascado dan lugar a la presencia de enrojecimiento, hinchazón, agrietamiento, exudación (líquido claro) "lloroso" y finalmente, formación de costras y descamación, que se excoria y liquenifica (Weidinger & Novak, 2016).

Considerando que la alteración más común que propicia el desarrollo de la DA, es la disfunción del sistema inmune, esto se vincula a una mayor expresión de receptores microbianos, que propicia la colonización microbiana y la inflamación crónica de la piel (Palmer *et al*, 2006). O sea, la presencia de esta dermatopatía provoca que pacientes, esencialmente niños, sean susceptibles a infecciones estafilocócicas, infecciones víricas (verrugas, moluscos contagiosos, eccemas herpéticos) y micosis (Maintz & Novak, 2007; Huang *et al*, 2009).

Una estimación conservadora de los costos anuales de la DA en España es de 927,12 € para acceder a los cuidados médicos que necesitan. Esto supone una media mensual de 77,26 euros, cifra que España supera con un gasto en el mes de 81,53 euros por paciente; y solo por debajo se encuentran Dinamarca y Reino Unido (EFA, 2018). Por tales razones, el objetivo de este trabajo de revisión es describir algunos de los modelos experimentales empleados para el estudio de la dermatitis atópica.

Mecanismos fisiopatológicos involucrados en la Dermatitis Atópica

La patogénesis de la dermatitis atópica (DA) es compleja y aún es enigmática. Sin embargo, se considera que la DA está asociada a la inflamación dada por la presencia de factores predisponentes. Esta fase inflamatoria se caracteriza por la infiltración de células T CD4, producción de citocinas Th2, incremento de inmunoglobulina IgE y proliferación de eosinófilos (Hamid *et al*, 1994).

La exposición epicutánea a un alérgeno patógeno provoca el incremento de las respuestas alérgicas y sirve como factor predisponente para una marcha alérgica más severa. Ello condiciona el inicio de las respuestas inflamatorias relacionadas con la sobreexpresión de varios tipos de células dendríticas (CD) que expresan FcεRI (receptor IgE de alta afinidad) (Dubrac *et al*, 2010; Novak *et al*, 2010). Éstas migran a los ganglios linfáticos de drenaje donde procesan y presentan los péptidos a los linfocitos T vírgenes CD4+. La presentación de antígenos (péptidos) a los linfocitos T específicos es mediante el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II de las células T CD4. Los linfocitos T, se diferencian

entonces en linfocitos Th2. La activación de linfocitos T cooperadores (Th2) propicia la producción de interleucina (IL)-4, IL-5 e IL-13, el incremento de la inmunoglobulina E (IgE), la unión del anticuerpo a receptores por la región Fc de los mastocitos y la activación de los mastocitos por la reexposición al antígeno, dando lugar a la liberación de mediadores de mastocitos (aminas y enzimas preformadas) Figura 1. Las citocinas liberadas por las células T activadas y los mastocitos atraen a los granulocitos, especialmente eosinófilos en la piel que contribuyen al daño celular. El contacto constante con alérgenos a través de la piel (contacto epicutáneo) puede inducir la activación sistémica de las células T específicas de alérgenos. A su vez, estos mecanismos inmunológicos de fase aguda mediados por la respuesta Th2, pueden persistir debido a la liberación de mediadores inflamatorios, que, al mismo tiempo, activan el endotelio vascular para inducir la expresión de moléculas de adhesión e incrementar la permeabilidad vascular. Por otro lado, en fase de cronicidad de la enfermedad se activa la respuesta Th1 que genera interleucina 1 beta (IL-1 β) y factor de necrosis tumoral alfa (siglas en inglés, TNF- α), lo cual magnifica la respuesta inmunitaria y la inflamación cutánea (Leung *et al*, 2003; Campana *et al*, 2017) Figura 1.

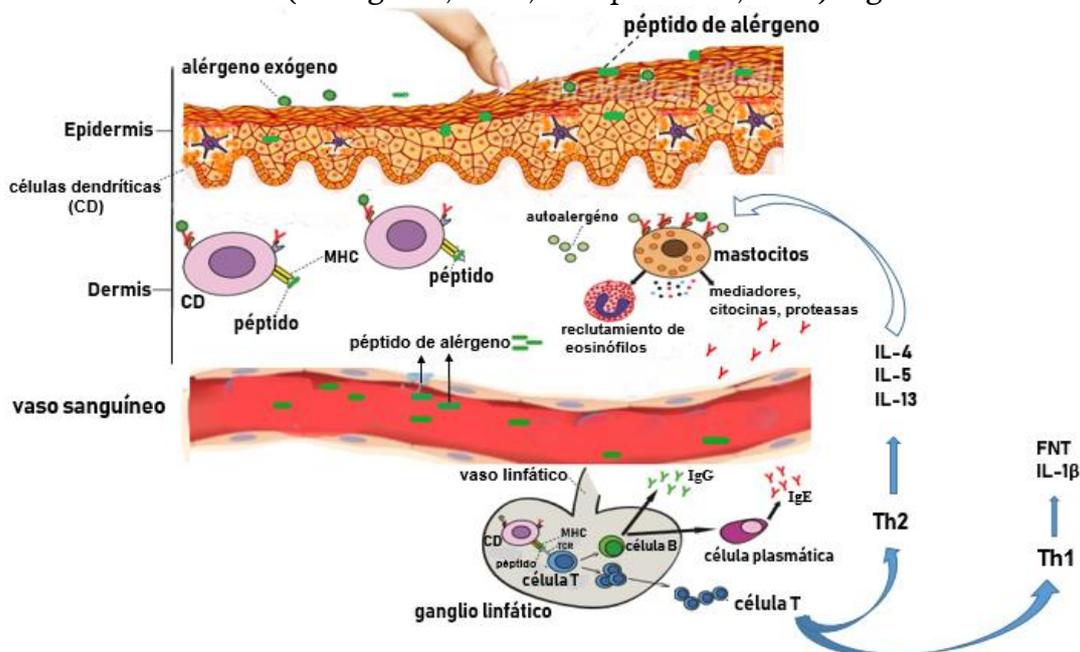


Fig.1. Mecanismos fisiopatológicos involucrados en la dermatitis atópica.

Tradicionalmente, la principal patogenia de la DA se ha interpretado como una desregulación inmune de las citocinas Th2 como IL-4, IL-5 e IL-13. Precisamente, una de las respuestas claves de la actividad inflamatoria en la DA, es la secreción de citocinas Th2. Dichas citocinas promueven diferentes reacciones inmunológicas que sostienen la marcha atópica (Brandt & Sivaprasad, 2011).

El prurito intenso y el rascado resultante causan una lesión cutánea mecánica continua que provoca la liberación de citocinas y quimiocinas, dando lugar al incremento adicional de la permeabilidad de la piel que promueve aún más la entrada de alérgenos en la piel (Homey *et al*, 2006).

Las citocinas Th2, IL-4 e IL-13 como parte de la inmunidad innata, facilitan la ruptura de la barrera epidérmica y la invasión microbiana ya que inhiben la producción de péptidos antimicrobianos (AMP), reducen la producción de lípidos en el estrato córneo e inducen la espongiosis (Chang *et al*, 2001). Esto se debe a que estas citocinas favorecen la disminución en la expresión de los principales genes del complejo de diferenciación epidérmica y suprimen la diferenciación de queratinocitos mediante la vía STAT3 (Kim *et al*, 2017; Brandt & Sivaprasa, 2011; Chan *et al*, 2001).

En este sentido, la disfunción de la barrera de la piel constituye el factor más patogénico en la DA. En este contexto existe una fuerte asociación entre los defectos de la barrera epidérmica y mutaciones en dos complejos de genes. Estos involucran los genes que codifican para proteínas epidérmicas, muchos de los cuales se localizan dentro del complejo de diferenciación epidérmica en el cromosoma 1q21, el cual contiene los genes de filagrina (FLG), la loricrina, la involucrina y la tricohialina; y además el otro conjunto de candidatos a genes incluye las numerosas estructuras relacionadas con los mecanismos inmunológicos de la DA que involucra el sitio del cromosoma 5q31-33 que contiene genes para las citocinas de Th2, o sea, IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 y factor de colonias estimuladoras de macrófago granulocito (GM-CSF) (Hijnen *et al*, 2005).

Según el curso de la enfermedad se concentran en mayor medida diferentes poblaciones celulares en el tejido dañado. Las lesiones de fase aguda se basan en las respuestas Th2 y Th22, mientras que las de fase crónica son impulsadas por una respuesta Th1 (Spergel *et al*, 1999) Figura 1.

Por otro lado, la desregulación de la célula Th17 contribuye al inicio de la DA aguda (Koga *et al*, 2008). La célula Th17 produce IL-17 e IL-22, ambas inducen la producción de proteínas S100, péptidos antimicrobianos en queratinocitos y de varias citoquinas pro-inflamatorias. El número de célula Th17 e IL-17 expresadas en lesiones y suero de DA se correlaciona con la gravedad de la enfermedad (He *et al*, 2009). De hecho, el nivel de IL-17 disminuye gradualmente en las lesiones crónicas con DA ya que las citoquinas Th2 inhiben la producción de IL-17. La ausencia relativa de IL-17 en las lesiones de DA puede estar relacionada con la reducción de los niveles de péptidos antimicrobianos y puede explicar el aumento de la susceptibilidad a la infección de la piel en pacientes con DA (Toda *et al*, 2003; Makoto, 2020).

Modelos experimentales

En las investigaciones farmacológicas, el empleo de animales de experimentación es fundamental, para el estudio y conocimiento de los procesos fisiopatológicos de la DA dado que permite el acceso a modelos relevantes de la enfermedad y brinda e incluso, información consistente acerca de la actividad de nuevas moléculas, para el control y tratamiento de la DA. Además, la inserción de modelos animales en las investigaciones brinda una respuesta fiable y reproducible.

Los modelos experimentales de inflamación crónica en la DA representan una herramienta poderosa para la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antiinflamatoria y proporcionan información sugestiva en cuanto a su potencia y posible interés terapéutico.

Modelos de DA inducida por sensibilización epicutánea y ovoalbúmina

Los principales modelos experimentales de DA, utilizan diferentes inductores, tal es el caso de la albúmina de huevo (ovalbumin (OVA, siglas en inglés)), modelos que inducen una respuesta basada en la sensibilización inicial de los animales por vía sistémica, con el objetivo de que exista una respuesta del sistema inmune frente a esta proteína, mediante el incremento en niveles de IgE específica y posteriormente enfrentar al organismo nuevamente a la exposición percutánea de una disolución de OVA, con el objetivo de obtener una respuesta de estos anticuerpos específicos frente al alérgeno proteico (Masato *et al*, 2018; Kim *et al*, 2012; Kim *et al*, 2017). Los diferentes modelos descritos, varían específicamente en los tiempos de exposición de los inductores y por tanto la duración de la evolución de la DA.

Un primer modelo experimental utiliza ratones Balb/c hembras de 6 semanas de edad. Primeramente, los animales se someten a un proceso de sensibilización sistémica, que se realiza mediante la inoculación intraperitoneal de una disolución de 10 µg OVA (grado V; Sigma, MO, EE. UU) preparado en una disolución 4 mg de hidróxido de aluminio (Imject Alum; Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU) en un volumen de 200 µl, a intervalos de tres días consecutivos a la semana, durante tres semanas (es decir, 0-3, 7-10, 14-17 días). El día 14, previa anestesia con isoflurano (Ifran; HANA Pharm, Seúl, Corea) y la zona dorso lateral de los animales es rasurada. Posteriormente, se realiza la sensibilización percutánea, mediante parches que contengan disolución de OVA, durante siete días consecutivos (es decir, desde el día 14 hasta el día 20). El mismo día 14, se comienzan a aplicar los parches de OVA, se preparan con una gasa estéril de 1cm², humedecida con 100 µg de OVA en solución salina tamponada con fosfato (PBS). El día 28, los animales se sensibilizan nuevamente con parches de OVA durante una semana y posteriormente se les practica la eutanasia a los animales, coincidiendo con el día 36 de iniciado el estudio (Kim *et al*, 2017).

Sensibilizaciones intraperitoneales con 20 µg de OVA, igualmente una vez a la semana por tres semanas es otro de los modelos ensayados. Posteriormente, previo rasurado de la zona dorso lateral, se procede a la sensibilización epicutánea con 100 µg de OVA en parches, en este caso durante 5 semanas, siendo repuestos tres veces a la semana, con el objetivo de mantener la zona en contacto con el antígeno. Al término del estudio, al igual al modelo anterior, se les practica la eutanasia a los animales al día 43 (Kim *et al*, 2012).

En otro esquema de inducción de DA por OVA, se emplean ratones hembras Balb/c de edad 1,3,8 y 24 semanas de edad. De forma similar al ensayo anterior, previo rasurado de la zona dorso lateral con máquina eléctrica empleando crema depiladora (Veet®; Reckitt Benckiser, Slough, Berkshire, UK) y cinta adhesiva como material de depilación (Cellotape; Nichiban, Tokio, Japón). A diferencia de los modelos anteriores, los parches de gasa estéril, se colocan el mismo día de rasurado los animales. De forma similar, a los parches se les aplica 20 µg de OVA preparado en 20mg de OVA en PBS. Los parches se mantienen colocados en la zona dorso lateral del animal durante tres días consecutivos a la semana, durante tres semanas (es decir, 0-3, 7-10, 14-17 días). El día 20, se realiza la extracción de sangre a cada animal. Posteriormente, el día 21 se administra por vía intravenosa 10 µg/g de OVA en una disolución de 1 mg/ml de OVA en solución salina. Se mide la temperatura rectal de los animales en los tiempos 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min después de la sensibilización intravenosa, mediante un termómetro digital (TD-300®; Shibaura, Saitama, Japan) y posteriormente se realizó la eutanasia (Masato *et al*, 2018).

Estos modelos de inducción de DA por OVA, se caracterizan fisiopatológicamente, por el incremento en suero de los animales de citocinas Th2 e IgE, así como otras citocinas como la

IL-1 β y el factor de necrosis tumoral (FNT). Histopatológicamente, se evidencia el engrosamiento de la epidermis y dermis, acompañado de infiltrado de células inflamatorias (Kim *et al*, 2012; Na *et al*, 2014). La proliferación de células T, se asocia al incremento de la expresión de citosinas IL-4 e IFN-g, así como elevados niveles de óxido nítrico e IgE (Masato *et al*, 2018; Na *et al*, 2014). Las células inflamatorias infiltradas fundamentalmente, son neutrófilos, eosinófilos, monocitos, linfocitos y células con gránulos metacromicos, probablemente mastocitos. Esta respuesta está asociada con el incremento en los niveles de IgE séricos y la expresión de las citocinas IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ IL-17, claves en la respuesta atópica (Kim *et al*, 2012). Por otro lado, se demuestra que el título de IgE específica de OVA y las citocinas Th2 dependiente de OVA, aumentan con la edad de los animales; y por otro lado existe una disminución de la temperatura corporal dependiente de la edad de los animales después de la exposición a OVA (Masato *et al*, 2018).

Además, vale resaltar que los ratones sensibilizados epicutáneamente, desarrollan un comportamiento de rascado incrementado acompañado de lesiones caracterizadas por engrosamiento epidérmico y dérmico, infiltración de células T CD4 + y eosinófilos, expresión de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13). Además, este modelo permite identificar una expresión mejorada de eotaxina y las quimiocinas que atraen respectivamente los eosinófilos CCR3 + y las células T CCR4 + CD4 + en la piel. A su vez, este modelo muestra una mayor deposición de colágeno a nivel sistémico, niveles elevados de las IgG1, IgE e IgG2a séricas específicas de OVA (Spergel *et al*, 1998).

Modelos de DA inducida por haptenos

Existen modelos experimentales que emplean haptenos como el dinitroclorobenceno (DTNB), la oxazolona (Ox) el trinitroclorobenceno (TNCB) para inducir la dermatitis alérgica de contacto y se considera que evocan principalmente una respuesta dominada por Th1. Los haptenos son sustancias de bajo peso molecular (menos de 10.000 daltones) que no inducen por sí misma la formación de anticuerpos, pero al unirse a una proteína transportadora como la albúmina sérica, se estimula la respuesta inmunitaria.

Inducción con dinitroclorobenceno

La mayoría de los modelos experimentales para inducir la DA emplea el DNCB. En este modelo generalmente se utilizan ratones machos de la línea NC/Nga de seis semanas de edad. A los animales, bajo ligera anestesia, se les rasura la zona dorso lateral de aproximadamente 8 cm². Pasadas 24 h, se les aplican 200 μ l de solución DNCB al 1% (disuelta en una mezcla 3: 1 de acetona y aceite de oliva), en la zona dorso lateral y en las orejas de cada animal, durante tres días consecutivos, para lograr la sensibilización epicutánea. Transcurridos, cuatro días se aplican igualmente 200 μ l de solución de DNCB al 0,2% en las mismas zonas anteriormente señaladas, como segunda sensibilización, tres veces por semana, durante ocho semanas. La eutanasia se les practica a los animales a los 64 días de iniciado el estudio (Choi *et al*, 2012).

En otro esquema de inducción de DA por DNTB, se emplean ratones machos Balb/c de seis semanas de edad. Similar al estudio anterior, la sensibilización epicutánea, se realiza con 200 μ l de DNTB 1% con parches de 1x 1. Pasadas dos semanas se continúa aplicando la misma forma de sensibilización, pero con 200 μ l de DNTB al 0,2% dos veces a la semana, durante siete semanas, completando las ocho semanas del estudio, se les practica la eutanasia a los animales y se toman las muestras de tejido correspondientes para su análisis. (Kim *et al*, 2012)

Otra variante de modelo de DA es mediante la inducción por ácaros de polvo combinado con el hapteno DNTB. Para el desarrollo de este modelo se emplea una de las especies de ácaros del polvo (extracto de *Dermatopagoidefarine*; (DFE)) y el DNCB como inductores de la DA. En este modelo la superficie de ambas orejas de los ratones Balb/c se rasuran mediante el deslizamiento de cinta adhesiva (Nichiban, Tokio, Japón) por cinco repeticiones. Posteriormente, se aplican 20 µl de DNCB (1%) en cada oreja y pasados 4 días se aplica en la superficie de la oreja, 20 µl de DFE (10 mg/ml). La sensibilización con DFE / DNCB se repite una vez a la semana durante cuatro semanas (coincidiendo con los días 1 y 5 de cada semana). Posterior a las dos semanas de la primera inducción se realiza el sangrado de la cola para comprobar la inmunización mediante los niveles de IgE en suero. Culminado el tiempo de cuatro semanas de sensibilización, las zonas lesionadas, son evaluadas (Choi *et al*, 2011).

Inducción con oxazolona y trinitroclorobenceno

Por otro lado, existen modelos experimentales que emplean la Ox para provocar la marcha atópica. En este caso, previo rasurado de la zona dorso lateral de los ratones hembras SKH-1 de cinco semanas de edad, y sensibilización epicutáneamente con 50µl de Ox al 5% (Sigma-Aldrich) disuelta en acetona y aceite de oliva (4:1), los días 1 y 2. El día 8 del estudio se sensibilizan los animales con 60 µl de Ox al 0,5%, cada dos días hasta el día 24. El día 25 del estudio se sacrifican los animales (Kang *et al*, 2017).

De igual manera, otro modelo procede a la inducción de la DA mediante la sensibilización epicutánea de la zona dorso lateral con 100 µl de TNCB 1% disuelto en acetona. Pasados siete días, se realiza el mismo procedimiento hasta el día 36, pero realizando las aplicaciones cada 48 h (Matsumoto *et al*, 2004).

Estos modelos de DA, de inducción por haptenos (DNTB, OX y TNCB), provocan una dermatitis severa con síntomas de eritema, hemorragia, edema, cicatrización, erosión y engrosamiento de las orejas. En el análisis histológico, se evidencian lesiones hiperqueratosas, engrosamiento de la epidermis y la dermis (Choi *et al*, 2012), acompañado de infiltrado de células inflamatorias, fundamentalmente mastocitos tal como fue demostrado por (Ramírez *et al* 2020), en la piel de ratones dañados por DNCB. A su vez, en este modelo se evidencia un incremento en la expresión de citocinas Th1 y Th2, asociado al incremento en los niveles de IgE (Choi *et al*, 2012). En correspondencia con la respuesta Th2, se encontraron en el suero de los animales, elevados niveles de IgE y citocinas Th2 (Choi *et al*, 2011). Por otro lado, los múltiples desafíos con Ox o TNCB en la piel rasurada de los ratones hacen que la inflamación de la piel cambie de una respuesta típica de hipersensibilidad de tipo retardado dominada por Th1 a una respuesta inflamatoria crónica dominada por Th2 que es similar a la DA humana (Matsumoto *et al*, 2004; Man *et al*, 2008). De hecho, los desafíos con Ox a ratones desnudos producen una inflamación crónica de la piel tipo Th2. Esta inflamación se caracteriza por infiltración dérmica de linfocitos Th2 que expresan el receptor CRTH de PGD2, mastocitos y eosinófilos, mayor expresión de IL-4 en la dermis y niveles de IgE muy elevados. La exposición repetida con Ox conduce al aumento de la hiperplasia epidérmica y a la disminución de la expresión de las proteínas de diferenciación de la piel filagrina, loricrina e involucrina. Se hizo evidente una anomalía en la barrera cutánea y se asoció con una disminución del contenido de ceramida del estrato córneo, la disminución de la hidratación del estrato córneo, pérdida de agua transepidérmica y secreción del cuerpo laminar alterada, lo que resultó en una reducción de las membranas lamelares, tal como se observa en los pacientes con DA (Kang *et al*, 2017; Man *et al*, 2008).

Además, como en la DA humana, la actividad de la serina proteasa epidérmica en el estrato córneo aumentó y la expresión de dos péptidos antimicrobianos derivados del cuerpo laminar, CRAMP y mBD3, disminuyó después de los desafíos con Ox, en paralelo con la disminución de sus homólogos humanos en las lesiones cutáneas con DA. Vale resaltar que este método de inducción fue efectivo en cuanto a la inducción de DA ya que, estos cambios no se observaron después de un único desafío con hapteno, la forma clásica de provocar una reacción de hipersensibilidad retardada al hapteno (Jin, *et al*, 2009).

Aunque el modelo de sensibilización repetida por haptenos no es un modelo genético, muchos de sus aspectos pueden ser aplicables como modelo de DA, ya que brinda una noción acerca de los mecanismos moleculares involucrados ante la presencia de alérgenos extrínsecos. De hecho, en este modelo se ilustra particularmente que una vez que se introduce el alérgeno a través de una brecha en la barrera epitelial, la respuesta inflamatoria resultante, daña aún más la piel provocando la permeabilidad de la misma. Esta fase juega un papel importante en la perpetuación y exacerbación de la DA. Este modelo puede ser comparable con respecto a su respuesta con el modelo de sensibilización de dosis repetida de proteínas como la OVA. (Jin *et al*, 2009).

Modelo de DA inducido por la aplicación del ácaro alérgeno del polvo doméstico (HDM)

En este modelo los ratones Balb/ c de cuatro a seis semanas de edad son sometidos a la aplicación del alérgeno recombinante de ácaros dermatofagoide p8 (Der p8). A los animales, previo rasurado de la zona dorso lateral, se les aplica 50 µl de Der p8 preparados en 100 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS), mediante una gasa colocada en forma de apósito y asegurada con una banda elástica. El parche se coloca durante 4 días y luego se retira. El día 17, se coloca nuevamente un parche idéntico en el mismo sitio de la piel. Este procedimiento se repite dos veces durante un período de 50 días. Un grupo de ratones recibe dos parches de PBS y posteriormente se exponen al Der p 8 en el último parche. Los resultados evidenciaron, que los animales que recibieron los parches con la solución de Der p8, tenían características de dermatitis con hiperplasia epidérmica y espongiosis, infiltración cutánea con células CD4 + y CD8 + y una respuesta Th2 sesgada local y sistémicamente (Huang *et al.*, 2003). Estos hallazgos fueron similares a los observados en los modelos de sensibilización epicutánea con OVA (Jin *et al*, 2009). La inmunohistoquímica reveló la expresión de neuropéptidos solo en la piel tratada con Der p8. Se observaron fibras nerviosas muy próximas a los mastocitos en la dermis. Estos hallazgos pueden sugerir una interacción entre los sistemas nervioso e inmunológico en la lesión cutánea de la DA (Kimura *et al*, 1998).

Modelo de DA inducida por superantígeno

La colonización o infección por *S. aureus*, es la causa más común que agrava la DA. De todas las cepas de *S. aureus* aisladas de la piel lesionada, hasta un 65% producen exotoxinas con propiedades superantigénicas y la piel del 100% de los pacientes con DA esta colonizada con *S. aureus*. (Breuer *et al*, 2002). Por tales motivos, el estudio de la DA, inducida por exotoxinas de bacterias *S. aureus*, es de gran importancia. La línea de ratones seleccionados para este modelo, es la Balb/c, libre de gérmenes patógenos. Se realiza el rasurado de los animales mediante el deslizamiento de una cinta adhesiva en la zona dorso lateral, seis veces seguidas para la sensibilización de la zona. Se colocan 10 µg Enterotoxina B estafilocócica (SEB, siglas en inglés) (Toxin Technology, Inc, Sarasota, Fla) en 100 µL de solución salina en un parche de gasa estéril (1 × 1 cm), que se fija a la piel con un apósito bio-oclusivo

transparente. El esquema de sensibilización, se realiza, aplicando los parches embebidos en la solución conteniendo SEB, tres veces por semana, separadas entre sí por intervalos de 2 semanas. El día 30, se sacrifican los animales (Laouini *et al.*, 2003). En este estudio se demuestra que la aplicación de SEB en lugar de OVA mediante la sensibilización repetida en la piel, previa realización de microlesiones con la cinta adhesiva, fue capaz de provocar una inflamación cutánea alérgica dominada por Th2 acompañada de una respuesta Th2 sistémica al superantígeno (Laouini *et al.*, 2003).

Modelo de DA inducida por hipersensibilidad alimentaria

En este modelo experimental se emplean hidrolizados de proteína de suero, dado que son productos hidrolizados de formulaciones infantiles.

En un modelo experimental de DA inducida por hipersensibilidad frente a los alimentos se emplean ratones machos Balb/c de siete semanas de edad. Los animales, previo rasurado de la zona dorso lateral, son expuestos epicutáneamente a un concentrado de proteínas de suero o hidrolizados de proteína de suero (PWH, siglas en inglés). Se prepara una disolución que contenga 3 mg de cada material de prueba (PWH1, PWH2, respectivamente) en 200 µl de solución salina, esta se adiciona a una gasa estéril (1 x 1cm) y se fijan en forma de apósito, 3 veces a la semana durante dos semanas. (Iwamoto *et al.*, 2020).

Por otra parte, otra de las formas de inducir la DA, asociada a la hipersensibilidad alimentaria, es a partir de la sensibilización a los animales, mediante la inoculación intragástrica del alérgeno. La línea de ratones, utilizados en este modelo experimental, es la C3H / HeJ de tres a dos semanas de edad. La sensibilización es por vía oral con leche de vaca (1 mg/ml) a cada animal durante cinco veces. La sensibilización con maní (1mg por animal) conjuntamente con la toxina del cólera como adyuvante (10 mg por animal) durante cuatro veces a la semana durante 2 o 3 semanas. Culminadas las tres semanas, se sacrifican los animales. El modelo experimental de inducción de DA causó pérdida de cabello, rascado y lesiones cutáneas crónicas recurrentes similares a las que se presentan en un 35%, en la DA desarrollada por ratones. A su vez se evidencia un incremento de IgE acompañado de infiltrado inflamatorio, sin embargo, la expresión de ARNm de IL-5 e IL-13 se elevó solo en la piel de ratones con erupción eccematosa (Li *et al.*, 2001).

El estudio que emplea la proteína de suero provoca una sensibilización sustancial acompañado de una reacción de anafilaxia inducida por la b-lactoglobulina en ratones expuestos a WPC. También se muestra un incremento del recuento de basófilos y eosinófilos. (Iwamoto *et al.*, 2020). Resultados similares se obtienen en el estudio de sensibilización intragástrica, ya que la inducción de DA en este modelo, se acompañó de un nivel elevado de IgE sérico específico e incremento de eosinófilos en sangre (Li *et al.*, 2001; Takuya *et al.*, 2020). Oyoshi y col 2009 (Observaciones no publicadas) muestran que los ratones sensibilizados por vía oral con OVA en presencia de la toxina del cólera adyuvante desarrollan inflamación cutánea alérgica en los sitios de la piel expuestos a OVA (Jin *et al.*, 2009). Estos resultados plantean la posibilidad de que se produzcan brotes de DA en los animales sensibilizados por vía oral después de la introducción de alérgenos alimentarios.

Tabla 2. Cuadro resumen de las principales características y eventos desarrollados en los modelos experimentales descritos para la evaluación de la dermatitis atópica.

Inducción de daño	Modelo animal	Línea animal	Principales eventos
Agente químico	Inducción de DA por OVA	Ratones Balb/c (6 semanas de edad)	Incremento de IgE, citocinas Th2, IL-1 β , y FNT Incremento del infiltrado inflamatorio
	Inducción con DNTB	Ratones NC/Nga de seis semanas de edad	Dermatitis severa con eritema, hemorragia, edema erosión y engrosamiento del tejido dañado Hiperqueratosis, engrosamiento de la epidermis y la dermis Incremento de IgE y citocinas Th2 Incremento de la actividad de la serina proteasa epidérmica en el estrato córneo y la expresión de péptidos antimicrobianos (CRAMP y mBD3)
	hidrolizados de proteína de suero	Ratones Balb/c	Incremento de IgE y eosinófilos Pérdida de cabello, rascado y lesiones cutáneas crónicas recurrentes
Agente biológico	Acaro del polvo (dermatofagoide p8)	Ratones Balb/c	Dermatitis con hiperplasia epidérmica y espongiosis Infiltración cutánea con células CD4 + y CD8 + (respuesta Th2 sesgada local Presencia de fibras nerviosas muy próximas a los mastocitos en la dermis sistémicamente)
	<i>S. aureus</i>	Ratones Balb/c	Inflamación cutánea alérgica dominada por Th2 acompañada de una respuesta Th2 sistémica al superantígeno

CONCLUSIONES

Los diversos modelos experimentales de DA brindan conocimiento acerca de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la enfermedad y aportan información consistente sobre la actividad de candidatos farmacológicos.

El estudio de los modelos experimentales de DA en ratones de diferentes especies ha arrojado a la luz, la importancia de la inflamación en la patogenia alérgica de la piel. Permite considerar el papel de la lesión mecánica y de la ruptura de la barrera cutánea en la sensibilización alérgica a alérgenos introducidos por vía epicutánea. Más importante aún, están permitiendo una disección profunda acerca de los mediadores y las células inmunitarias, que son fundamentales para el desarrollo de la respuesta alérgica. Estos modelos hacen posible una mejor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en las diferentes etapas de la enfermedad y, en última instancia, conducirán a una gama más amplia de intervenciones terapéuticas en esta enfermedad común y potencialmente debilitante.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Brandt, E.B. & Sivaprasa, U. (2011). Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis. *J Clin Cell Immunol*; 2(3).
- Breuer, K., Haussler, S., Kapp, A. & Werfel, T. (2002). *Staphylococcus aureus*: colonizing features and influence of an antibacterial treatment in adults with atopic dermatitis. *Br J Dermatol*;147:55-61.
- Campana, R., Dzoroa, S., Mittermanna, I., Fedenkob, E., Elisyutinab, O., Khaitovb, M., Karaulovc, A. et al. (2017). Molecular aspects of allergens in atopic dermatitis. Wolters Kluwer Health, Inc; 1528-4050
- Chan, L.S., Robinson, N., Xu, L (2001). Expression of interleukin-4 in the epidermis of transgenic mice results in a pruritic inflammatory skin disease: an experimental animal model to study atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*; 117:977–983
- Choi, E.J., Leek, S., Kim, H.H., Singh, T., Choi, J.K., Choi, H.G. & Suh, W.M. (2011). Suppression of dust mite extract and 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis by the water extract of *Lindera obtusilob*. *Journal of Ethnopharmacology*; 137, 802–807.
- Choi, J.H., Park B.H., Hyung, H.G., Wang, Y.P., Hana, E.H., Woo, S. & Jong, J. (2012). Inhibitory effect of Psidium guajava water extract in the development of 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Ngamice. *Food and Chemical Toxicology*; 50, 2923–2929.
- Dubrac, S., Schmuth, M. & Ebner, S. (2010). Atopic dermatitis: the role of Langerhans cells in disease pathogenesis. *Immunol Cell Biol*; 88:400–409.
- EFA. (2018). Itching for life Quality of life and costs for people with severe atopic eczema in europe [Internet] [citado 10 oct. 2018]. disponible en: http://www.efanet.org/images/2018/en_-_Itching_for_life_Quality_of_life_and_costs_for_people_with_severe_atopic_eczema_in_europe.pdf
- Hamid, Q., Boguniewicz, M., Leung, D.Y. (1994). Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *J Clin Invest*; 94: 870–876.
- He, R., Kim, H.Y., Yoon, J., Oyoshi, M.K. & MacGinnitie, A. (2009). Exaggerated IL-17 response to epicutaneous sensitization mediates airway inflammation in the absence of IL-4 and IL-13. *J Allergy Clin Immunol*; 124:761–770.e1.

- Hijnen, D., Nijhuis, E., Bruin-Weller, M., Holstege, F. & Koerkamp, M.G. (2005). Differential expression of genes involved in skin homing, proliferation, and apoptosis in CD4+ T cells of patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*; 125:1149–1155.
- Huang, Ch.H., Kuo, I.Ch., Xu, H., Lee, Y.S. & Chua, K.Y. (2003). Mite Allergen Induces Allergic Dermatitis with Concomitant Neurogenic Inflammation in Mouse. *J Invest Dermatol* 121:289-293,
- Huang, J.T., Abrams, M., Tloutan, B., Rademaker, A. & Paller, A.S. (2009). Treatment of Staphylococcus aureus colonization in atopic dermatitis decreases disease severity. *Pediatrics*; 123: e808–e814
- Homey, B., Steinhoff, M., Ruzicka, T. & Leung, D.Y. (2006) Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 118:178–189.
- Iwamoto, H., Matsubara, T., Okamoto, T. & Yoshikawa, M. (2020). Epicutaneous immunogenicity of partially hydrolyzed whey protein evaluated using tape-stripped mouse model. *Pediatr Allergy Immunol*; 00:1–8.
- Jin, H., He, R., Oyoshi, M. & Geha, R.S. (2009). Animal Models of Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*; 129, 31–40.
- Kang, S.Y., Jung, H.W., Nam, J.H., Kim, W.Y., Kang, J.S., Kim, Y.H. & Cho, C.W. (2017). Effects of the Fruit Extract of *Tribulus terrestris* on Skin Inflammation in Mice with Oxazolone-Induced Atopic Dermatitis through Regulation of Calcium Channels, Orai-1 and TRPV3, and Mast Cell Activation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 8312946, 12 pages
- Kim, S.R., Choi, H.S, Seo, H.S., Choi, Y.K., Shin, Y.Ch. & Ko, S.G. (2012). Topical Application of Herbal Mixture Extract Inhibits Ovalbumin-or 2,4-Dinitrochlorobenzene-Induced Atopic Dermatitis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 9
- Kim, W.H., An, H.J., Kim, M.G., Gwon, M.G., Gu, H., Jeon, M. & Sung, W.J. (2017). Beneficial effects of melittin on ovalbumin-induced atopic dermatitis in mouse. *Scientific Reports*; 7 (17679).
- Kimura, M., Tsuruta, S. & Yoshida, T. (1998) Correla-tion of house dust mite-specific lymphocyte proliferationwith IL-5 production, eosino-philic, and the severity of symptomsin infants with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*; 101:84–9.
- Koga, C., Kabashima, K., Shiraishi, N., Kobayashi, M. & Tokura, Y. (2008) “Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis,” *Journal of Investigative Dermatology*, 128 (11), 2625–2630.
- Laouini, D., Kawamoto, S., Yalcindag, A., Bryce, P., Mizoguchi, E. & Oettgen, H. (2003). Epicutaneous sensitization with superantigeninduces allergic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol*;112:981–7
- Leung, D.Y., Jain, N. & León, H.L. (2003). New concept in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Current Opinion Immunology* 15, 634-638.
- Li, X.M., Kleiner, G., Huang, C.K., Lee, S.Y., Schofield, B. & Soter, N.A. (2001) Murine model of atopic dermatitis associated with food hypersensitivity. *J Allergy ClinImmunol*; 107: 693–702
- Lucae, S., Schmid, G.P. & Wuthrich, B. (2016). IgE response to exogenous and endogenous allergerens in atopic dermatitis patients under long-term systemic cyclosporine. *A treatment Allergy*; 71: 115-118.
- Maintz, L. & Novak, N. (2007). Getting more and more complex: the pathophysiology of atopic eczema. *Eur J Dermatol*;17:267– 283.
- Makoto Sugaya (2020). The Role of Th17-Related Cytokines in Atopic Dermatitis. *Int J MolSci*; 21(4): 1314.

- Man, Q.M., Yutaka, H., Seung, H.L., Mona, M., Chang, S., Kenneth, R.F., Leung, D.Y.M. (2008). Characterization of a Hapten-Induced, Murine Model with Multiple Features of Atopic Dermatitis: Structural, Immunologic, and Biochemical Changes following Single Versus Multiple Oxazolone Challenges. *Journal of Investigative Dermatology*; 128, 79–86.
- Masato, T., Keisuke, O., Kenichiro, M., Ken, A., Akio, M., Susumu, N., Hirohisa, S. et al. (2018). The optimal age for epicutaneous sensitization following tape-stripping in BALB/c mice. *Allergology International*; xxx 1e8.
- Matsumoto, K., Mizukoshi, Koji., Oyobikawa, M., Ohshima, H. & Hachiro, T. (2004). Establishment of an atopic dermatitis-like skin model in a hairless mouse by repeated elicitation of contact hypersensitivity that enables to conduct functional analyses of the stratum corneum with various non-invasive biophysical instruments. *Skin Research and Technology*; 10: 122–129
- Mittermann, I., Wikberg, G. & Johansson, C., (2016). IgE sensitization profiles differ between adult patients with severe and moderate atopic dermatitis. *PLoS One*; 11: e0156077.
- Na, K., Yoo, H.S., Zhang, Y.X., Choi, M.S., Lee, K., Yi, T.G., Song, S.U., et al. (). Bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cells inhibit ovalbumin-induced atopic dermatitis. *Cell Death Dis*; 5(7): e1345
- Navarrete, D.C., Pérez, M.G. & Silva, V.S. (2016). Humoral and cellular autoreactivity to epidermal proteins in atopic dermatitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*; 64: 435–442.
- Novak, N., Koch, S., Allam, J.P. & Bieber, T. (2010). Dendritic cells: bridging innate and adaptive immunity in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*; 125:50–59.
- Palmer, C.N., Irvine, A.D. & Terron, K.A. (2006). Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet*; 38:441–6.
- Ramírez Z, González, L., Rodríguez, S., Medina, J.A, Zamora, Z., Fernández, L.D., Ledea, O.L (2020). Microsc. Effect of Ozonized Sunflower Oil on Mast Cell Density in a Model of Atopic Dermatitis in Mice. *Microanal. (Suppl 1)*. doi:10.1017/S1431927620000525.
- Reginald, K., Westritschnig, K. & Werfel, T. (2011a). Immunoglobulin E antibody reactivity to bacterial antigens in atopic dermatitis patients. *Clin Exp Allergy*; 41:357–369.
- Reginald, K., Westritschnig, K. & Linhart, B.(2011b). Staphylococcus aureus fibronectin binding protein specifically binds IgE from patients with atopic dermatitis and requires antigen presentation for cellular immune responses. *J Allergy Clin Immunol*; 128:82–91.e8.
- Scacchi, M.F., Flores, R.M. & Castro, C. (2013). Consenso Nacional de Dermatitis Atópica. Sociedad Argentina de Dermatología 2004. Disponible en <http://www.sad.org.ar>, publicaciones, consensos.
- Spergel, J., Mizoguchi, E., Brewer, J., Martin, T., Bhan, A. & Geha, R. (1998). Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and hyperresponsiveness to metacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice. *J Clin Invest*; 101: 1614–22
- Spergel, J.M., Mizoguchi, E., Oettgen, H., Bhan, A.K. & Geha, R.S. (1999). Roles of TH1 and TH2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis. *J Clin Invest*; 103:1103–1111.
- Toda, M., Leung, D.Y., Molet, S., Boguniewicz, M. & Taha, R. (2003). Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions. *J Allergy Clin Immunol*; 111:875–881.
- Takuya, M., Gaku, K. & Yasuhiro, T. (2020). Epicutaneous immunogenicity of partially hydrolyzed whey protein evaluated using tape-stripped mouse model. *Pediatr Allergy Immunol*. 2020;00:1–8.

- Valenta, R., Mittermann, I. & Werfel, T. (2009). Linking allergy to autoimmune disease. *Trends Immunol*; 30:109–116
- Weidinger, S. & Novak, N. (2016). Atopic dermatitis. *Lancet*; 387, 1109–1122.
- Wise, F & Sulzberger, M.B. (1933). *The 1933 Year Book of Dermatology and Syphilology*. Chicago: Year Book Publishers Inc.