



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

TESIS

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL GLICOMACROPÉPTIDO SOBRE LA
RESPUESTA INMUNE Y LOS SIGNOS CLÍNICOS Y PATOLÓGICOS
DE LA DERMATITIS ATÓPICA EN UN MODELO EN RATA.**

PRESENTA

Fabiola Carolina Muñoz De La Cruz

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTORA

Dra. Eva María Salinas Miralles

COMITÉ TUTORAL

Dr. Javier Ventura Juárez

Dr. Bruno Rivas Santiago

Aguascalientes, Ags., Junio 2017.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Aguascalientes, Ags., 18 de Mayo de 2017.

M en C José de Jesús Ruiz Gallegos
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS
PRESENTE

Por medio del presente como Tutores designados de la estudiante **FABIOLA CAROLINA MUÑOZ DE LA CRUZ** con ID 17475 quien realizó la tesis titulada: **ESTUDIO DEL EFECTO DEL GLICOMACROPÉPTIDO SOBRE LA RESPUESTA INMUNE Y LOS SIGNOS CLÍNICOS Y PATOLÓGICOS DE LA DERMATITIS ATÓPICA EN UN MODELO EN RATA**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, así como, continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, nos permitimos enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., 18 de mayo de 2017.

Dra. Eva María Salinas Miralles
Tutora de Tesis

Dr. Javier Ventura Juárez
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Bruno Rivas Santiago
Miembro del Comité Tutorial

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Consejo Académico
c.c.p.- Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

FABIOLA CAROLINA MUÑOZ DE LA CRUZ
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E.

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"ESTUDIO DEL EFECTO DEL GLICOMACROPÉPTIDO SOBRE LA RESPUESTA INMUNE Y LOS SIGNOS CLÍNICOS Y PATOLÓGICOS DE LA DERMATITIS ATÓPICA EN UN MODELO DE RATA"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 29 de mayo de 2017

"Se lumen proferre"

EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS

AGRADECIMIENTOS.

A Dios por ésta aventura llamada Vida.

A mis Padres: por ser y estar, a pesar de todo. Gracias a ustedes, hoy soy quien soy.

A mi amigo, cómplice y compañero de vida, Pablo: por tu apoyo y cariño.

A mis hijos Fernando y Alejandro: por darme el regalo de amor más puro y sincero; por mostrarme que no importa que no sea suficiente para éste mundo, siempre seré perfecta para ustedes.

A la Doctora Eva: por decir sí, aún sin conocerme; por enseñarme con paciencia y prudencia.

A los Doctores Javier y Dr. Bruno, por compartir su experiencia y sus consejos.

A mis compañeros: Bere, Renata, Mariela, Oscar, Daniel, Maritza, Pamela, Marlene, Leslie, Alicia, Diana y Armida; por el trabajo en equipo, por las pláticas, por los memes y sobre todo, por hacer del laboratorio un pedacito de hogar.

A Julieta, Adriana, Alma, Karina y Maricarmen: por tanto cariño, por la motivación y el apoyo, por su amistad.

A mis amigas Sandra, Liz, July y Circe: por creer en mí, a pesar de mí, por estar en las buenas y en esos momentos que pensaba en desistir de mi camino.

A Rosario: por mostrarme que darse por vencido no es opción.

A Tere: por la palabra precisa, en el momento exacto; por hacer la diferencia en mi vida. "Si yo puedo, tu puedes".

GRACIAS

DEDICATORIA

A los hombres de mi vida, a mi razón de ser: Fernando y Alejandro, por ustedes y para ustedes, hoy concluyo éste proyecto. Pues aunque para muchos, éste fue tiempo robado a su infancia, ustedes me enseñaron que fue tiempo invertido en aprendizaje y enseñanza.

Vivir los sueños cuesta, pero es un lujo que pocos pueden darse. Hoy, sólo puedo decirles que si yo puedo, ustedes pueden.

Con Amor

Mamá.



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	4
INDICE DE FIGURAS	5
ACRÓNIMOS	7
RESUMEN	10
ABSTRACT	12
1. MARCO TEÓRICO	14
1.1. Sistema Inmune	14
1.1.1. Elementos de la respuesta inmune innata.	15
1.1.2. Elementos de la respuesta inmune adaptativa	15
1.2. La Piel	18
1.2.1. Estrato córneo y proteínas estructurales.	21
1.2.2. Péptidos antimicrobianos (AMPs)	23
1.2.3. Ceramidas	27
1.2.4. Factores humectantes naturales.	27
1.3. Reacciones de Hipersensibilidad	28
1.3.1. Hipersensibilidad tipo I o Alergias	30
1.4. Dermatitis Atópica (DA).....	31
1.4.1. Epidemiología.	32
1.4.2. Etiología.	32
1.4.4. Prurito.	42
1.4.5. Tratamiento de la DA	43
1.5. Modelos experimentales de DA	47
1.6. Glicomacropéptido (GMP)	48
1.6.1. Estructura, propiedades nutricionales, farmacodinamia y funciones biológicas	49
2. JUSTIFICACIÓN.....	56
3. HIPÓTESIS.....	57
4. OBJETIVO GENERAL.....	57
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	58

5.1. Animales	58
5.2. Caracterización del modelo experimental de DA en rata.	58
5.2.1. Protocolo 1.	58
5.2.2. Protocolo 2.	58
5.2.3. Protocolo 3.	59
5.3. Grupos experimentales	59
5.4. Para la detección de GMP en tejido de la oreja	61
5.5. Análisis de la reacción inflamatoria cutánea.	62
5.6. Evaluación de eventos de rascado.....	62
5.7. Análisis histológico (histoquímico e inmunohistoquímico) de las lesiones cutáneas.	62
5.7.1. Tinción de hemotoxilina/eosina.	64
5.7.2. Tinción con Azul de Toluidina	64
5.7.3. <i>Inmunohistoquímica.</i>	64
5.8. Concentración sérica de IgE.	66
5.9. Extracción de la fracción proteica de tejido de la oreja.	68
5.9.1. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.	68
5.10. Análisis de la expresión de proteínas por electroforesis e inmunotinción.....	69
5.10.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).	69
5.10.2. Inmunotinción de las membranas.	71
5.11. Análisis por PCR de expresión de citocinas en tejido.	73
5.11.1. Extracción de RNA.	73
5.11.2. Análisis y cuantificación de RNA total.	74
5.11.3. Transcripción inversa.	75
5.11.4. PCR en tiempo real.	76
5.12. Tipo de Análisis e Interpretación de la Información Obtenida.	78
6. RESULTADOS	79
6.1. Caracterización del modelo experimental de DA en rata.	79
6.1.1. Reacción inflamatoria cutánea	79
6.1.2. Análisis de los eventos de rascado en los animales.	83
6.1.3. Histopatología de las lesiones cutáneas	85

6.2. Efecto del GMP sobre los signos clínicos asociados a la dermatitis atópica.	87
6.2.1. Efecto del GMP administrado vía oral sobre el proceso inflamatorio en la DA.	87
6.2.2. Efecto del GMP sobre los eventos de rascado en animales con DA.....	92
6.2.3. Efecto de la administración de GMP sobre la histopatología de las lesiones cutáneas asociadas a la dermatitis atópica.	94
6.2.4. Efecto del tratamiento con GMP sobre los niveles séricos de IgE total.....	96
6.2.5. Efecto del tratamiento con GMP sobre la expresión de proteínas estructurales de la piel.....	97
6.2.6. Efecto del tratamiento con GMP sobre la expresión de péptidos antimicrobianos (AMPs).....	100
6.2.7. Efecto del tratamiento con GMP sobre la expresión de citocinas involucradas en la DA.	101
6.2.8. Detección de GMP en tejido lesionado.....	107
7. DISCUSIÓN.....	109
8. CONCLUSIONES.....	120

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación de las reacciones de hipersensibilidad.....	29
Tabla 2	Principales elementos de la Respuesta Inmune involucrados en la DA.....	41
Tabla 3	Tratamiento de la DA.....	46
Tabla 4	Secuencia de aminoácidos y oligosacáridos presentes en el GMP.....	50
Tabla 5	Gel separador al 10%	69
Tabla 6	Gel separador al 13.5%	70
Tabla 7	Gel concentrador	70
Tabla 8	Solución para muestras	70
Tabla 9	Condiciones de la mezcla de reacción para la síntesis de cDNA	75
Tabla 10	Protocolo del Termociclador para la síntesis de cDNA.....	76
Tabla 11	Condiciones de la mezcla de reacción de PCR en tiempo real	76
Tabla 12	Secuencia de oligonucleótidos para la determinación de la expresión de cada gen.....	77
Tabla 13	Condiciones de PCR en tiempo real.....	77

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Componentes de la epidermis.....	20
Figura 2	Proteínas estructurales de la barrera epidermal.....	23
Figura 3	Respuesta inmune en la DA.....	38
Figura 4	Esquema del protocolo de inducción de la DA experimental y administración de GMP.....	61
Figura 5	Esquema de días de análisis.	61
Figura 6	Curva de calibración de IgE total.	67
Figura 7	Curva de calibración de albúmina sérica bovina (BSA).....	69
Figura 8	Intensidad del proceso inflamatorio en orejas de ratas sensibilizadas y re-sensibilizadas tópicamente (oreja) con DNCB (protocolo 1).....	80
Figura 9	Efecto del DNCB en el proceso inflamatorio de la oreja de ratas sensibilizadas i.m. con DNP-BSA y re-sensibilizadas tópicamente con DNCB en oreja (protocolo 2).....	81
Figura 10	Efecto del DNCB en el proceso inflamatorio de la oreja de ratas sensibilizadas tópicamente en abdomen y re-sensibilizadas tópicamente en oreja (protocolo 3).....	82
Figura 11	Efecto del DNCB en el peso de las orejas de las ratas sensibilizadas.	83
Figura 12	Eventos de rascado en oreja derecha de ratas sensibilizadas.	84
Figura 13	Conteo de eosinófilos en dermis y grosor de epidermis de tejido cutáneo (oreja) de animales con DA.....	86
Figura 14	Mastocitos en dermis de tejido cutáneo (oreja) de animales con DA.	87
Figura 15	Efecto del GMP vía oral sobre el grosor de las orejas de las ratas en el día cero (D0).	88
Figura 16	Efecto del GMP vía oral sobre el grosor de las orejas de ratas sensibilizadas con DNCB, y tratadas o no con GMP, analizado el día 16 del protocolo.	89
Figura 17	Efecto del GMP vía oral sobre el grosor de las orejas de ratas sensibilizadas con DNCB, y tratadas o no con GMP, analizado el día 22 del protocolo.	90
Figura 18	Efecto del GMP vía oral sobre el grosor de las orejas de ratas sensibilizadas con DNCB, y tratadas o no con GMP, analizado el día 36 del protocolo.	91
Figura 19	Efecto de la administración de GMP sobre el peso de las orejas de ratas sensibilizadas con DNCB, y tratadas o no con GMP.	92

Figura 20	Efecto de la administración de GMP sobre los eventos de rascado en oreja derecha de ratas sensibilizadas con DNCB, y tratadas o no con GMP.	93
Figura 21	Número de eosinófilos en dermis y grosor de epidermis de tejido cutáneo (oreja) de animales con DA, tratados o no con GMP.	95
Figura 22	Mastocitos en dermis de tejido cutáneo (oreja) de animales sensibilizados con DNCB, tratados o no con GMP.....	96
Figura 23	Efecto de la administración de GMP sobre los niveles séricos de IgE total en ratas sensibilizadas con DNCB y tratadas o no con GMP.	97
Figura 24	Efecto de la administración de GMP sobre la expresión de involucrina en ratas sensibilizadas con DNCB y tratadas o no con GMP.	98
Figura 25	Efecto de la administración de GMP sobre la expresión de filagrina en ratas sensibilizadas con DNCB y tratadas o no con GMP.	99
Figura 26	Efecto de la administración de GMP sobre la expresión de rBD-2 y rCRAMP en ratas sensibilizadas con DNCB, y tratadas o no con GMP.	101
Figura 27	Efecto de la administración del GMP sobre la expresión de IL-4 en tejido lesionado en la DA.	102
Figura 28	Efecto de la administración del GMP sobre la expresión de IL-5 en tejido lesionado en la DA.	103
Figura 29	Efecto de la administración del GMP sobre la expresión de IL-13 en tejido lesionado en la DA.	104
Figura 30	Efecto de la administración del GMP sobre la expresión de IFN-γ en tejido lesionado en la DA.	105
Figura 31	Efecto de la administración del GMP sobre la expresión de IL-10 en la DA.	106
Figura 32	Efecto de la administración del GMP sobre la expresión de TGF-β en la DA.	107
Figura 33	Identificación de GMP en oreja de rata sana y rata con DA...	108

ACRÓNIMOS

A:AO: Mezcla de acetona y aceite de oliva

Ac: Anticuerpo

Ag: Antígeno

Al(OH)₃: Hidróxido de aluminio

AMP: Péptido antimicrobiano

c.b.p: Con base para

CD: Célula dendrítica

CD4: grupo de diferenciación 4

CD8: grupo de diferenciación 8

C_H: Región constante de la cadena pesada de los anticuerpos

CL: Células de Langerhans

C_L: Región constante de la cadena ligera de los anticuerpos

CLA: Antígeno cutáneo asociado a linfocitos

CLI: Célula linfoide innata

CPA: Célula presentadora de antígeno

CRAMP: Péptido antimicrobiano relacionado con la catelicidina

DA: Dermatitis atópica

DNCB: 2,4-dinitroclorobenceno

DNP-BSA: Dinitrofenol asociado a albúmina sérica bovina

DPT: Vacuna celular contra difteria, *Bordetella pertussis* y tétanos

E: Edema

ELISA: ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

FcεRI: Receptor de alta afinidad para la fracción cristalizable de inmunoglobulina E

Gal: Galactosa (17%)

GalNAc = N – acetilgalactosamina (21%)

GC: Glucocorticoides

GlcNAc = N- acetilglucosamina (7%)

GMC-SF: Factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos

GMP: Glicomacropéptido

H: Cadena polipeptídica pesada de la molécula de anticuerpo
hBD: β -defensina humana
HCl: Ácido clorhídrico
HD: Defensina humana
HNC: Sal de 2-[4-(2-hidroxiethyl) piperazin-1-il] ácido etanesulfónico, cloruro de sodio, cloruro de calcio
HyE: Hematoxilina/Eosina
IFN- γ : Interferón gamma
Ig: Inmunoglobulina
IL: Interleucina
kDa: Kilo Dalton
L: Cadena polipeptídica ligera de la molécula de anticuerpo
LL-37: catelicidina humana
LPS: Lipopolisacárido
MHC: Complejo principal de histocompatibilidad
NeuAc: Ácido Siálico (54%)
NFAT: Factor de activación nuclear de las células T
NF κ B: Factor nuclear potenciador de la cadena ligera κ de células B
OD: Oreja derecha
OI: Oreja izquierda
PBP: Proteína básica principal
PCE: Proteína catiónica eosinofílica
PCS: Plastic cover slip (por sus siglas en inglés)
PM: Peso molecular
PRR: Receptor de reconocimiento de patrones
PVDF: polivinildieno fluorado
rBD: β -defensina de rata
rCRAMP: Péptido antimicrobiano relacionado con la catelicidina de rata
RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio
SEM: Media del error estándar

SH: suero humano

TCRV β : Región variable de la cadena beta del receptor linfocito T

TGF- β : factor transformante del crecimiento beta

Th 0: Linfocito T virgen

Th: Linfocito T cooperador

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina

TSLP: Linfopoyetina estromal tímica

V_H: Región variable de la cadena H de la molécula de anticuerpo

V_L: Región variable de la cadena ligera de la molécula de anticuerpo



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

RESUMEN

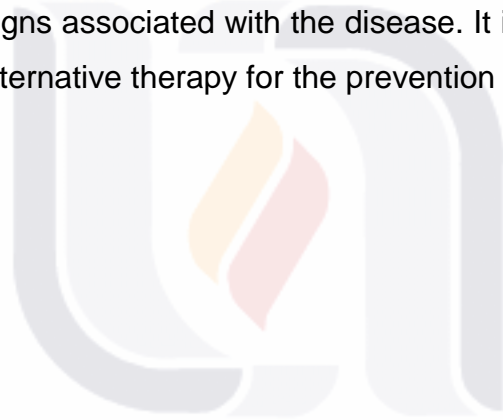
La piel es el primer mecanismo de barrera del individuo. La dermatitis atópica (DA) es una de las enfermedades cutáneas más comunes, de origen alérgico y cuya incidencia está en aumento en países industrializados. Con una causa multietiológica y sin la existencia de un tratamiento que cambie la evolución de la enfermedad, la investigación de tratamientos alternativos para la DA es necesaria. Uno de los primeros acercamientos en el desarrollo de nuevos tratamientos es analizar el efecto benéfico del mismo en modelos experimentales de DA, entre los que destaca el desarrollo de lesiones tipo-DA mediante la aplicación epicutánea repetida de un hapteno, tal como el 2,4-dinitroclorobenceno (DNCB). El glicomacropéptido (GMP) es un péptido bioactivo lácteo derivado de la hidrólisis de la κ -caseína por acción de la quimosina o pepsina. Al GMP se le han descrito efectos antiinflamatorios, prebióticos e inmunomoduladores. Trabajos recientes demuestran que el GMP disminuye la respuesta inmune asociada a la sensibilización alérgica y la intensidad de la respuesta inflamatoria relacionada con la anafilaxia, urticaria y asma alérgicas. El objetivo del presente estudio fue investigar el efecto del tratamiento profiláctico y terapéutico con GMP sobre la DA inducida por DNCB en ratas. Para ello se evaluó la intensidad del proceso inflamatorio, el prurito, la expresión de citocinas inflamatorias y reguladoras, así como de péptidos antimicrobianos y proteínas estructurales de la epidermis en la piel lesionada de ratas a las que se les aplicó DNCB. Además se evaluaron las características histopatológicas relacionadas con la enfermedad y el contenido total de inmunoglobulina E (IgE) en suero de los animales. Los resultados muestran que el GMP administrado previo a la inducción de la DA redujo la intensidad del proceso inflamatorio en la piel lesionada en un 85.89% y del edema en un 97.03%; mientras que cuando se administró una vez establecida la patología la disminución de la inflamación cutánea fue del 34.06% y del edema del 39.87%. El tratamiento profiláctico con GMP disminuyó un 46.47% el grosor de la epidermis, un 94.47% el reclutamiento de eosinófilos y un 61.51% la hiperplasia de

los mastocitos en dermis; mientras que el tratamiento terapéutico redujo un 28.93%, 78.71% y 39.59%, respectivamente, estas variables histopatológicas características de las lesiones de DA. Además, el tratamiento con GMP previo al desarrollo de la DA suprimió en un 86.53% los niveles séricos de IgE total en los animales; cuando el tratamiento se administró una vez establecida la patología la reducción en los niveles de IgE fue del 63.68%. Por otra parte, el suministro de GMP antes de la inducción de la DA disminuyó entre un 83 y 96% la expresión de interleucina (IL)-4, IL-5, IL-13 e interferón (IFN)- γ en la piel lesionada de los animales, incrementando 4.68 y 1.19 veces los niveles de IL-10 y factor transformante de crecimiento (TGF)- β . Cuando el tratamiento con el GMP se realizó posterior al desarrollo de la enfermedad también reguló negativamente la expresión de las citocinas inflamatorias y positivamente las reguladoras, aunque de una manera menos intensa. Así, la disminución en los niveles de IL-4, IL-5, IL-13 e IFN- γ fue en el rango del 57 al 68%, con un incremento de 2.44 y 1.32 veces en la expresión de IL-10 y TGF- β . Además, el GMP reguló positivamente los bajos niveles de expresión de filagrina, β -defensina 2 y péptido antimicrobiano relacionado con la catelicidina en la piel lesionada de los animales, aumentando su expresión 3.34, 2.28 y 2.77 veces al administrarse como tratamiento profiláctico y 1.84, 2.03 y 2.49 veces cuando se administró terapéuticamente. Finalmente, la administración profiláctica del GMP abolió casi en su totalidad el prurito en las ratas con DA. Estos resultados indican que el GMP tienen un efecto inmunomodulador sobre la DA al disminuir la respuesta dominante inflamatoria Th2 y con ello los signos clínicos e histopatológicos asociados a la enfermedad. Se propone que el GMP es una terapia alternativa potencialmente eficaz para la prevención y tratamiento de la DA.

ABSTRACT

The skin is the first barrier mechanism of the subject. Atopic dermatitis (AD) is one of the most common skin diseases of allergic origin and increasing incidence. With a multiethiological cause and without the existence of a treatment that changes the evolution of the disease, the investigation of alternative treatments is necessary. One of the first approaches in the development of new treatments is to analyze their beneficial effect in AD experimental models. Among the most used is the development of AD-like lesions by the repeated epicutaneous application of a hapten, such as 2,4- dinitrochlorobenzene (DNCB). The glycomacropeptide (GMP) is a dairy bioactive peptide derived from the hydrolysis of κ -casein by the action of chymosin or pepsin. GMP has shown anti-inflammatory, prebiotic and immunomodulatory effects. Recent studies show that GMP decreases the immune response associated with allergic sensitization and the intensity of the inflammatory response related to allergic anaphylaxis, urticaria and asthma. The aim of the present study was to investigate the effect of prophylactic and therapeutic treatment with GMP on DNBCB-induced AD in rats. The intensity of inflammatory process, pruritus, inflammatory and regulatory cytokines expression, as well as of antimicrobial peptides and epidermal structural proteins in DNBCB-induced lesions were evaluated. In addition, histopathological characteristics related to the disease and total immunoglobulin E (IgE) level in sera were evaluated. The results show that GMP administered prior AD induction reduced 85.89% the intensity of the inflammatory process and 97.03% the edema. When GMP was administered once the pathology was established skin inflammation was decreased 34.06% and edema 39.87%. Prophylactic treatment with GMP reduced 46.47% epidermis thickness, 94.47% eosinophil recruitment and 61.51% mast cell hyperplasia; while the therapeutic treatment reduced AD histopathological variables by 28.93%, 78.71% and 39.59%, respectively. In addition, GMP treatment prior AD development suppressed total IgE levels in animal sera by 86.53%; when treatment was given once the pathology was established the reduction in IgE levels was 63.68%. On the other hand, GMP supply before AD induction decreased between 83 and 96% the expression of IL-4, IL-5, IL-13 and IFN- γ in injured skin,

increasing 4.68 and 1.19-fold IL-10 and TGF- β levels. When GMP treatment was performed after AD development, the expression of inflammatory cytokines was also negatively regulated and regulatory cytokines were also increased, but in a less intense way. Thus, the decrease of IL-4, IL-5, IL-13 and IFN- γ was in the range of 57-68%, and IL-10 and TGF - β expression increase 2.44 and 1.32 fold. In addition, GMP positively regulated low expression levels of filaggrin, β -defensin 2 and catelicidin-related antimicrobial peptide in injured skin of AD animals, increasing its expression 3.34, 2.28 and 2.77 times when GMP was administered as a prophylactic treatment, and 1.84, 2.03 and 2.49 times when it was given therapeutically. Finally, prophylactic GMP administration almost abolished pruritus in rats with AD. These results indicate that GMP has an immunomodulatory effect on AD by decreasing the dominant Th2 response and as a consequence the clinical and histopathological signs associated with the disease. It is proposed that GMP is a potentially effective alternative therapy for the prevention and treatment of AD.



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Sistema Inmune

El sistema inmune funciona a través del reconocimiento de señales emitidas en sitios específicos del organismo y dirigidos a la activación de los mecanismos necesarios para hacer frente a la agresión, la cual puede ser representada por agentes biológicos (virus, bacterias, hongos), químicos o físicos, células neoplásicas o cualquier sustancia capaz de producir daño al organismo (Matzinger, 2007). Así, la respuesta inmune comprende una serie de mecanismos sucesivos y dependientes unos de otros que se inician luego de la agresión de un agente (Aikira y cols., 2006), y se ha dividido en dos ramas principales: respuesta inmune innata y respuesta inmune adaptativa, las cuales actúan de manera consecutiva y conjunta para ejercer una función protectora efectiva y sin causar daño (o el menos posible) a células y tejidos circundantes (Turvey y Brodie, 2011).

La respuesta innata es la primera línea de defensa frente a las infecciones y está mediada principalmente por mecanismos rápidos e inespecíficos, mientras que la respuesta adquirida se encarga de la eliminación de patógenos en la fase tardía de la infección y es un mecanismo altamente específico (Aikira y cols., 2006). Las principales diferencias entre ambas respuestas son el tiempo, los mecanismos y tipos de receptores usados para el reconocimiento antigénico (Macpherson y Austyn, 2012).

El sistema inmune innato es de respuesta inmediata y emplea un limitado número de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) asociados a patógenos o a daño, que sirven como primera línea de defensa; mientras que el sistema inmune adaptativo depende de la generación de una amplia diversidad de receptores de antígenos en los linfocitos T y B y su posterior activación y expansión clonal que permite una defensa más específica con memoria inmunológica. Sin embargo, la respuesta inmune adaptativa no depende

solamente del reconocimiento del antígeno, sino también de la cascada de señales liberada por el sistema inmune innato (Schenten y Medzhitov, 2011).

1.1.1. Elementos de la respuesta inmune innata.

La respuesta inmune innata está compuesta por elementos humorales y celulares (Shishido y cols., 2012). El componente humoral incluye proteínas del complemento, proteína de unión a lipopolisacárido (LPS), pentraxinas, colectinas, ficolinas y péptidos antimicrobianos (AMPs). Por otro lado, el componente celular está integrado por células hematopoyéticas y no hematopoyéticas. Entre las células hematopoyéticas destacan los macrófagos, células dendríticas (CD), mastocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, algunos tipos de linfocitos como los linfocitos NK-T y $T\gamma\delta$, y las células linfoides innatas (CLIs) (Turvey y Broide., 2010); todos ellos participan en respuesta a estructuras microbianas genéricas o a las citocinas generadas en el lugar de la agresión (Medzhitov, 2001). Entre las no hematopoyéticas se encuentran los queratinocitos, las células epiteliales y las que forman los endotelios vasculares (Chaplin., 2010).

1.1.2. Elementos de la respuesta inmune adaptativa

En contraste con la respuesta inmune innata, la respuesta inmune adaptativa cuenta dentro de sus componentes celulares con los linfocitos T y B, los cuales son capaces de mediar respuestas altamente específicas a través de receptores altamente diversificados gracias a recombinaciones somáticas (Cooper y Alder, 2006). Dentro de los elementos humorales son las inmunoglobulinas (Ig) o anticuerpos (Ac) secretadas por las células B. La respuesta inmune adaptativa se caracteriza por tener receptores de especificidad única y una respuesta retardada (horas a días) y de memoria. Lo anterior le confiere un alto riesgo de reactividad, por lo que requiere de múltiples mecanismos de tolerancia o regulación (Turvey y Broide, 2010).

Mientras que los linfocitos B pueden reconocer de forma directa a los antígenos (Ag), los linfocitos T requieren de la ayuda de las células presentadoras de antígeno (CPA). Estas son células que pueden procesar a proteínas antigénicas en péptidos y presentarlos en la superficie celular en asociación con las moléculas de complejo principal de histocompatibilidad (MHC) para que puedan ser reconocidas por las células T. Algunos ejemplos de CPA son los macrófagos, CD4 y células B. Las moléculas del MHC son proteínas de la superficie celular responsables de presentar los péptidos a las células T. Existen dos tipos: MHC clase I que se expresa en células nucleadas y MHC clase II, expresado constitutivamente en macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y células del endotelio vascular (Fragoso y cols., 2002).

La mayoría de las células T maduras expresan en su superficie ya sea la molécula CD4 ó CD8, pero no ambas. Son co-receptores de superficie que se unen de forma simultánea al MHC para activar a la célula T. CD4 se une a la molécula del MHC de clase II y CD8 se une a la molécula del MHC de clase I. Las células que son solo positivas para CD4 (Linfocitos T CD4+) generalmente producen citocinas y se les denomina células T cooperadoras (Th) porque ayudan a células especializadas (como neutrófilos, células B y macrófagos) a llevar a cabo sus funciones; mientras que las células T que son solo CD8+ se activan para destruir células anormales o infectadas y se denominan células T citotóxicas (T_C) (Fragoso y cols., 2002).

Las Igs son un grupo de glucoproteínas séricas de movilidad electroforética variable producidas por los linfocitos B. Son capaces de reconocer antígenos a través de dominios de unión que puede ser de baja o alta afinidad. Están compuestas por dos cadenas polipeptídicas ligeras (L) y dos pesadas (H). Cada cadena ligera está unida covalentemente a una pesada y las pesadas están unidas entre sí por puentes disulfuro y fuerzas no covalentes. Las cadenas

pesadas son las responsables de las características estructurales y funcionales de cada inmunoglobulina (Batista y cols., 2001).

Existen cinco clases de inmunoglobulinas en el humano: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM que se diferencian en la estructura molecular y en el tipo de cadena pesada (α , δ , ϵ , γ , μ). Cada cadena puede dividirse en dominios de Ig o regiones de homología de aproximadamente 110 aminoácidos. En su forma nativa (globular), cada dominio de Ig forma una estructura plegada en dos estratos a la que confiere estabilidad un puente disulfuro intracatenario. Las cadenas pesadas constan de 4 ó 5 dominios de Ig, uno aminoterminal que configura para la región variable (V_H) y los otros dominios forman la región constante (C_H): tres para IgD, IgG e IgA, y cuatro para IgM e IgE. Las cadenas ligeras pueden ser de dos tipos: kappa (κ) y lambda (λ), las cuales están conformadas por dos dominios de Ig: uno aminoterminal o variable (V_L) y otro carboxiloterminal o constante (C_L), el cual se une por enlace disulfuro al dominio de la región constante (C_H) de la cadena pesada (Williams y Barclay, 1988).

1.1.3. Citocinas

Todos los mecanismos de la respuesta inmune innata y adquirida son desencadenados a través de señales intercelulares que permiten la comunicación. Dichas señales son realizadas por las citocinas, que son proteínas solubles de bajo peso molecular mediadoras de crecimiento celular, inflamación, inmunidad, diferenciación y reparación. Además de las células del sistema inmune, las citocinas son producidas por diferentes tipos celulares durante la activación de la inmunidad innata y adquirida. Son el principal medio de comunicación intra e intercelular ante una invasión microbiana y sirven para iniciar la respuesta inflamatoria y definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune específica. Debido a que son producidas por diferentes tipos celulares del sistema inmune, las citocinas se agrupan en: interleucinas (IL), quimiocinas, interferones (IFN),

factores estimuladores, factores de crecimiento y factores de necrosis tumoral (TNF) (Oberholzer y cols., 2000).

Para que la defensa contra el patógeno se inicie de manera eficaz es necesaria la participación de citocinas con función fundamentalmente pro-inflamatoria (TNF- α , IL-1 β , IL-12, IFN- γ , IL-6). La respuesta pro-inflamatoria inicial está controlada por moléculas antiinflamatorias (el antagonista del receptor de la IL-1, el factor transformante del crecimiento beta [TGF- β], la IL-10). En condiciones fisiológicas, todas estas moléculas sirven como inmunomoduladoras y, por lo tanto, limitan el efecto potencialmente dañino de la reacción inflamatoria. Sin embargo, en condiciones patológicas, la respuesta anti-inflamatoria puede ser insuficiente para contrarrestar la actividad inflamatoria o, por el contrario, ser sobrecompensadora e inhibir el sistema inmune y dejar al huésped a merced de la infección (De Pablo, 2014).

1.2. La Piel

La piel es un componente del sistema inmune. Es la primera barrera de defensa del huésped y el órgano más extenso del cuerpo. En el adulto, el espesor varía entre 0.5 a 4 mm, siendo la superficie 1.6 -1.9 m² y un peso aproximado de 14 kg. Su función primaria es actuar como barrera anatómica y fisiológica ante agentes ambientales, minimizar la pérdida de agua y evitar la entrada de agentes patógenos (Ramírez y cols., 2010; De Benedetto y cols., 2009). Éste mecanismo de defensa se debe a la anatomía, estructura celular y composición de la piel, particularmente la red de células inmunes presentes, tal como CPA, mastocitos, linfocitos T y CLIs (Tay y cols., 2014).

La piel está compuesta por tres capas, que del exterior al interior se denominan epidermis, dermis e hipodermis. La epidermis es la capa más externa de la piel. Está compuesta por queratinocitos (90%), melanocitos (5%), células de Langerhans (CL) (3-5%) y células de Merkel (<1%). Éstas últimas están asociadas

a la sensación táctil (Misery, 2014). Los melanocitos son células que participan en la protección contra las radiaciones ultravioletas. Las CL se derivan de precursores de la médula ósea y son CD pertenecientes a la familia de CPA. Son las encargadas de la captación, procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos en los ganglios linfáticos locales. Están definidas por la presencia de gránulos de Birbeck y además de en la epidermis se encuentran confinadas en el epitelio plano estratificado de las mucosas (McKenna y Beignosn, 2005). Los queratinocitos proliferan dentro de la capa basal y se diferencian del interior al exterior para formar las capas de la epidermis: basal, espinosa, granular y córnea (Figura 1). Cada etapa de diferenciación se caracteriza por la expresión de proteínas específicas (De Benedetto y cols., 2009; Sandilands y cols., 2009).

La **capa basal** está constituida por una hilera de células cilíndricas, que asienta sobre la membrana basal o unión dermoepidérmica, y cuya división o mitosis da origen a las células suprayacentes. La **capa espinosa** está compuesta por varias hileras de células poliédricas (5 a 10 según las regiones), que a medida que ascienden se van aplanando; están unidas entre sí por desmosomas (puentes intercelulares), que le dan el aspecto espinoso. La **capa granular** está compuesta por células productoras de profilagrina (precursora de la filagrina) y gránulos de queratohialina y aparece las estructuras típicas de unión intercelular conocidas como uniones estrechas. Aunque las proteínas que establecen las uniones estrechas, como los miembros de la familia de claudinas, ocludina, JAM-A y ZO-1, se expresan en diferentes capas de la piel, las estructuras típicas de uniones estrechas son exclusivas del estrato granuloso, jugando un papel muy importante en la función de barrera de la piel, en especial en sentido interior-exterior (Brandner, 2009; Bäsler y Brandner, 2017) La **capa córnea** está formada por capas apiladas de células aplanadas, anucleadas, y sin organelos citoplasmáticos, muertas, íntimamente unidas entre sí. Éstas se desplazan hasta desprenderse en su superficie; lo que constituye la descamación permanente e inaparente de la piel. La capa cornea es la capa protectora por excelencia, ofrece a la vez rigidez y cierta flexibilidad para no fisurarse con los movimientos; es impermeable a los

fluidos internos y externos y se opone a la penetración de moléculas exógenas (Sandilands y cols., 2009). El **estrato lúcido** está ubicado por debajo de la capa córnea y se le identifica en los sitios donde la piel requiere ser más gruesa, como lo son las palmas y plantas (Navarrete-Franco., 2003). Estas capas representan distintos aspectos del queratinocito, el cual, en su proceso madurativo ascendente (evolucionando hacia una muerte celular programada) se va diferenciando, de manera tal que adquiere morfología y funciones particulares, hasta llegar a la capa córnea (Sandilands y cols., 2009).

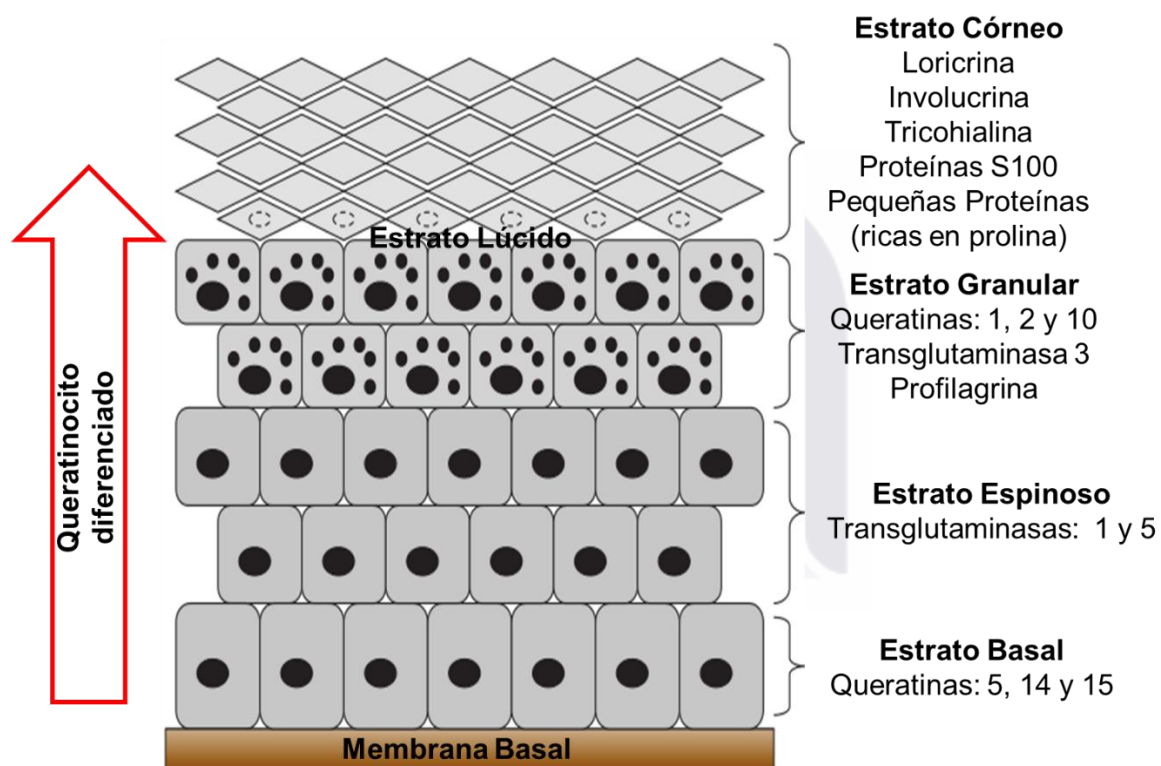


Figura 1: Componentes de la epidermis. La epidermis es la cubierta externa de la piel y está separada de la dermis por la membrana basal. Los queratinocitos que conforman la epidermis proliferan en la membrana basal y se diferencian conformando las diferentes capas de la epidermis. Cada estrato se caracteriza por la expresión de proteínas específicas (Adaptado de: Sandilands y cols., 2009).

La dermis constituye la capa intermedia de la piel, constituida por fibras elásticas (elastina), matriz extrafibrilar y colágeno, que proporciona estabilidad y elasticidad a la piel. La principal población celular de la dermis son los fibroblastos

que producen y depositan el colágeno junto con otros componentes dermales. Además, también residen células inmunes como mastocitos, macrófagos, y un número reducido de linfocitos. También están presentes vasos sanguíneos y linfáticos, mecano y termo-receptores, junto con los folículos pilosos y las glándulas dermales (Chang y cols., 2017).

Finalmente, la capa más interna de la piel o hipodermis es el tejido subcutáneo en el que la grasa subcutánea (almacenada en adipocitos) actúa como un material acolchado y reservorio de energía que también proporciona termorregulación (Gonzaga da Cunha y cols., 2017).

1.2.1. Estrato córneo y proteínas estructurales.

El estrato corneo es la región más superficial de la epidermis, y es el que confiere la función de barrera a la piel. Está compuesto por una estructura aplanada de proteínas y corneocitos conectados entre sí por lípidos intercelulares (Figura 2), lo que le permite a la piel evitar la pérdida de agua y solutos esenciales para la homeostasis y fisiología del individuo; además del factor de protección que provee contra agentes físicos, químicos y biológicos (Elias, 1983), manteniendo así, la permeabilidad y la función de barrera.

El gradiente de calcio que existe en la epidermis, es crucial para la diferenciación del queratinocito. Existe una baja concentración de Ca^{+2} en los estratos basal, espinoso y córneo, y una alta en el granuloso (Sandilands y cols., 2009). El aumento de la concentración de calcio en el estrato granuloso permite que la **profilagrina**, una proteína altamente fosforilada, rica en histidina y conformada por monómeros de filagrina unidos mediante sus carbonos N-terminales se libere de los gránulos de queratohialina, se desfosforile y una vez expuesta en la frontera entre el estrato granular y el córneo sea procesada y fragmentada en monómeros activos de **filagrina** (Sandilands y cols., 2009;

Kawasaki y cols., 2011). La **queratina**, una proteína de estructura fibrosa sintetizada también por los queratinocitos, se une a los monómeros de filagrina para formar filamentos intermedios y con ello el citoesqueleto del estrato córneo, (Fitch y cols., 2003), por lo que la filagrina aparenta ser la responsable de obstaculizar la entrada de alérgenos a través del estrato córneo (Kubo y cols., 2009). Finalmente, cuando los monómeros de filagrina se degradan, éstos forman los factores de humectación de la piel (Sandilands y cols., 2009).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Además, el corneocito expresa involucrina, loricrina, periplaquina, envoplaquina y pequeñas proteínas ricas en prolina, las cuales, mediante la acción catalítica de la transglutaminasa forman redcillas que conforman la envoltura celular córnea (Egberts y cols., 2004). Esta es una capa de 15 nm de grosor localizada en la superficie interior del queratinocito (Proksch, 2008). El ensamble de la envoltura córnea es crucial para mantener la integridad estructural y mecánica del corneocito (Sevilla y cols., 2007), por lo que para mantener dicha integridad, se tiene, además de las proteínas antes mencionadas, a los corneodesmosomas que son las estructuras adhesivas del estrato córneo que se incorporan a la envoltura celular córnea, y está formado principalmente por corneodesmosina y dos cadherinas desmosomales, desmogleina y desmocolina (Serre y cols., 1991; Ishida-Yamamoto y Igawa, 2017). Durante la descamación, los corneodesmosomas son degradados por ciertas proteasas de serina, tales como las calicreínas (Chapman y Walsh, 1990).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

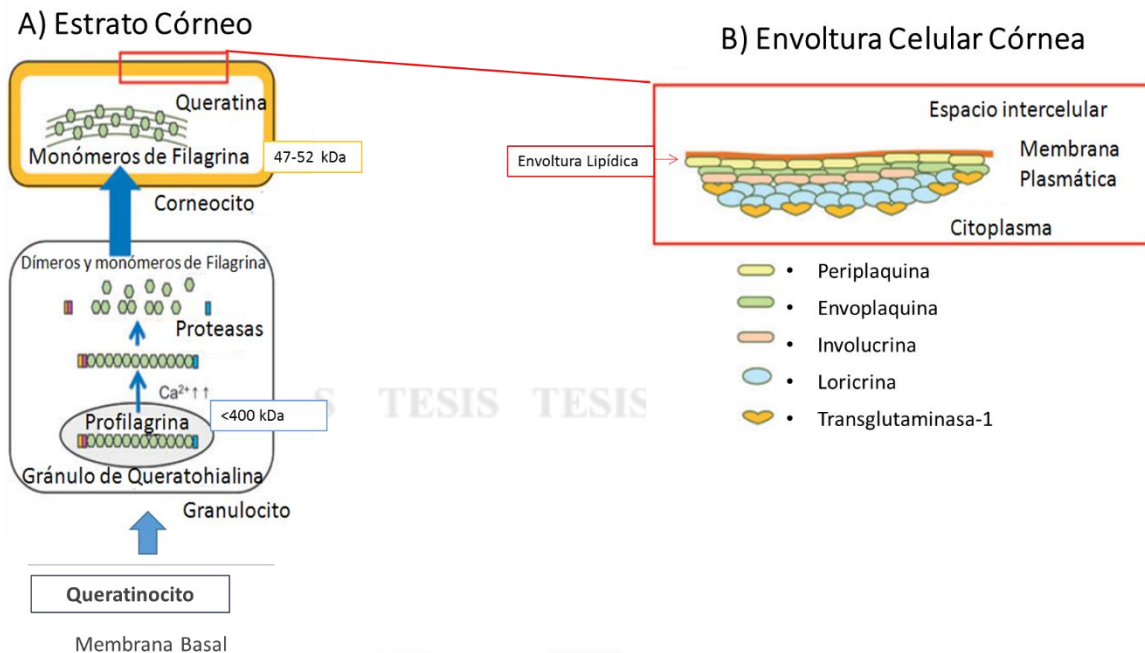


Figura 2: Proteínas estructurales de la barrera epidermal. a) Durante la diferenciación del queratinocito, los gránulos de queratohialina se desgranulan en respuesta al incremento de Ca^{+2} , liberando profilagrina, la cual es degradada por las proteasas en el citoplasma. Los monómeros de filagrina en conjunto con los filamentos intermediarios de queratina forman uniones estrechas en el corneocito. b) La envoltura celular córnea está localizada en la superficie de la membrana citoplasmática del corneocito. Está conformada por involucrina, lorocrina, envoplaquina y periplaquina, las cuales se unen entre sí por acción de la transglutaminasa-1 (Adaptado de: Nishifuji y Yoon, 2013).

1.2.2. Péptidos antimicrobianos (AMPs)

Como la barrera más expuesta y extensa del sistema inmune, la piel requiere de sustancias que le permitan ejercer su función (Zang y cols., 2016), por lo que la presencia de los AMPs en el epitelio busca proteger a éste de la exposición ambiental a microorganismos oportunistas, así como, mantener la microbiota del huésped (Gallo y Hooper., 2012).

Los AMPs, recientemente denominados péptidos de defensa del hospedero, son moléculas efectoras claves en la inmunidad innata (Rivas-Santiago, 2006; Niyonsaba y cols., 2017). Son pequeños péptidos anfipáticos generados principalmente por queratinocitos (Zang y cols., 2016) y otras células expuestas a microbios (Wiesner y cols., 2010), que se encargan del

reconocimiento de patógenos, inducción de moléculas activadoras con la finalidad de activar a las células del huésped para la eliminación de dichos patógenos y la liberación de moléculas que tienen un efecto directo sobre los patógenos (Kenshi y Gallo, 2008).

La secuencia de aminoácidos de los AMPs es variable, lo que les permite tener un espectro antimicrobiano muy amplio contra bacterias (gram + y -), virus y hongos (Bastian and Schafer., 2001; Sun y cols., 2005). Su carga catiónica les permite unirse a la membrana de las bacterias por medio de sus lipopolisacáridos (Kristian y cols., 2005), pero también los AMPs actúan sobre las células del huésped estimulando la producción de citocinas, la migración celular, así como la proliferación, maduración y síntesis de matriz celular. Los AMPs más comunes son: defensinas, catelicidinas y dermicidinas (Kenshi y Gallo, 2008).

Las **defensinas** tienen un peso molecular de 3 - 4.5 kDa. Son péptidos catiónicos ricos en arginina, seis residuos de cisteína y unidos entre sí por tres puentes disulfuro, cuya posición le da la clasificación de α -, β - y θ - defensinas (Rivas-Santiago y cols., 2006).

Son 6 las α -defensinas que se han identificado en los humanos. Las α -defensinas de la 1 a la 4 también se han denominado péptidos de los neutrófilos humanos-1 a -4, debido a su abundancia en los gránulos de los neutrófilos (Ganz y cols., 1985). Las otras dos defensinas son la defensina humana (HD)-5 y -6 y se encuentran principalmente en las células de Paneth en el intestino (Salzman y cols., 2003; Selsted y Oullete, 2005). Las θ -defensinas se expresan exclusivamente en los neutrófilos de los primates no humanos (Nguyen y cols., 2003).

Las β -defensinas tienen de 36 a 42 residuos de aminoácidos. En humanos se han identificado 6. La β -defensina (hBD) -1 a la hBD-4, se detectan principalmente en los epitelios de la piel, el tracto respiratorio y urogenital y son

esenciales en el mecanismo de defensa de la piel (Rivas-Santiago y cols., 2006; Fritz y cols., 2012). Su expresión es inducible por estímulos infecciosos o citocinas, excepto la hBD-1 que se expresa de forma constitutiva (Guaní-Guerra y cols., 2009), y su función inmunológica se presenta tanto en la respuesta innata como adaptativa (Kenshi and Gallo., 2008). Las hBD-5 y -6 se han encontrado en el epidídimo (Niyonsaba y cols., 2009; Niyonsaba y cols., 2006). En la piel se expresan principalmente hBD-1, hBD-2 y hBD-3 (Guaní-Guerra y cols., 2009), ya que la hBD-4 es detectada solo a nivel de RNAm en los queratinocitos (Schibli y cols., 2002). En general, las hBD modifican el proceso de migración y maduración de las CD y linfocitos T mediante la activación del receptor CCR6 (Yang y cols., 2002). Además, muestran acciones pro-inflamatorias al incrementar la producción de citocinas/quimiocinas que participan en la patogénesis de varias enfermedades cutáneas (Niyonsaba y cols., 2009; Niyonsaba y cols., 2006; Ganz y cols., 1985; Nguyen y cols., 2012), aceleran la angiogénesis y la cicatrización de las heridas (Niyonsaba y cols., 2009; Niyonsaba y cols., 2006) y participan en la homeostasis de la barrera cutánea al mejorar las uniones estrechas entre los queratinocitos (principalmente la hBD-3) (Kiatsurayanon y cols., 2014).

Mientras que la α -defensina humana (producida principalmente por los neutrófilos), exhibe una potente actividad antiviral mediante la ruptura de la envoltura viral (Klotman y Chang., 2006), las hBD son efectivas contra bacterias, hongos y virus. hBD-2 tiene su principal acción antimicrobiana contra *Pseudomona aeruginosa* y *E. coli*; sin mostrar un efecto significativo, por sí sola, sobre *S. aureus* por lo que requiere de una acción sinérgica con otras hBDs. En cuanto a su acción fungicida, hBD-2 tiene un importante efecto sobre *C. albicans*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* (Chen y cols., 2005; Aerts y cols., 2008). Además de sus propiedades microbicidas, las hBD también poseen propiedades quimioattractantes sobre diferentes tipos celulares como los monocitos, linfocitos T y CD (Lai y Gallo., 2009) e inducen la producción de citocinas como la IL-10 (Niyonsaba y cols., 2007).

En roedores, la β -defensina 29 induce el reclutamiento y maduración de CD por medio de CCR6 (Conejo-García y cols, 2004) mientras que β -defensina 2. En contraste, la α -defensinas de los neutrófilos inhiben la migración celular hacia el endotelio al impedir la unión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ a la fibronectina (Chavakis y cols., 2004).

La **catelicidina** humana (LL-37) se origina de un precursor proteico de 18KDa denominado hCAP-18 (proteína antibacterial catiónica humana de 18 kDa), el cual es transcrito a partir del gen CAMP (Vandamme y cols., 2012). Para ser activado a LL-37, hCAP-18 es escindido por las serín proteasas (proteínasa 3 en neutrófilos y calicreína 5 y 7 en queratinocitos) (Goo y cols., 2010; Zhang y Gallo., 2016). Una vez en su forma activa, LL-37 ha mostrado ser un inmunomodulador multifuncional, quimioattractante con acción microbicida (Ninyosaba y cols., 2002).

Producido principalmente por células epiteliales, LL-37 también se encuentra en otras poblaciones celulares en las cuales desarrolla funciones específicas. LL-37 se expresa de manera constitutiva en neutrófilos, mastocitos, macrófagos y monocitos. Además se puede incrementar su expresión en queratinocitos y células epiteliales de las vías aéreas e intestinales tras la infección, daño o inflamación (Niyonsaba y cols., 2009; Niyonsaba y cols., 2006). Mientras tienen una función anti-apoptótica en neutrófilos y queratinocitos, favorecen la apoptosis en células epiteliales aéreas. En CD, linfocitos y queratinocitos induce la expresión de quimiocinas y citocinas y en mastocitos y eosinófilos, induce la quimiotaxis de los mismos (Hancock y cols., 2016; Nijnik y cols., 2009; Koczulla y cols., 2003; Zang y Gallo., 2016).

Si bien se han descrito diferentes catelicidinas en caballo, cerdo, pollo y pescado, sólo se ha identificado a LL-37 en humanos (Zang y Gallo., 2016), siendo su homólogo en ratones CRAMP (péptido antimicrobiano relacionado con la catelicidina) y rCRAMP en ratas (Zanetti, 2004).

1.2.3. Ceramidas

Los queratinocitos del estrato granular contienen un gran número de capas conocidas como cuerpos laminales, en los cuales se encuentran almacenadas las glucoceramidas, esfingomielinas, fosfolípidos y colesterol; todos ellos precursores de los lípidos que conforman la envoltura córnea (Feingols y cols., 2011). Durante el proceso de diferenciación celular de los queratinocitos, los gránulos laminales se mueven a la punta de las células granulares y se fusionan con la membrana plasmática y secretan su contenido (mediante exocitosis) dentro del espacio extracelular en la frontera de las capas granular y córnea. Es el aumento del gradiente de calcio en el estrato granular, lo que provoca la liberación del contenido de los cuerpos laminares que van a constituir la porción lipídica de la envoltura celular córnea y la matriz extracelular del estrato córneo (Proksch y cols., 2008). Los lípidos secretados son procesados y acomodados para formar la laminilla extracelular lipídica, la cual se une de forma covalente a las proteínas de la envoltura celular córnea, particularmente a los residuos de glutamato de la involucrina (Bowstra y cols., 2006).

1.2.4. Factores humectantes naturales.

Los filamentos intermedios de queratina con agregados de monómeros de filagrina son degradados por diversas proteasas para la formación de compuestos hidratantes (Kawasaki y cols., 2011). Esta proteólisis produce la liberación de aminoácidos libres, de carácter higroscópico, tal como el ácido urocánico y el ácido carboxílico pirrolidona, que constituyen los factores de humectación natural, responsables de retener el agua en el estrato córneo (Rawlings y Harding, 2004; Sandilands y cols., 2009), así como de mantener el pH ácido de la piel, el cual es fundamental en el metabolismo y organización de los lípidos de la matriz extracelular, tiene acción antimicrobiana, y regula la actividad enzimática y el proceso de descamación (Brown y McLean, 2012; Ali y Yosipovitch, 2013).

1.3. Reacciones de Hipersensibilidad

El sistema inmune tiene como función el reconocimiento y la respuesta específica ante invasores extraños para su eliminación, mediante la movilización de una batería de moléculas efectoras. Sin embargo, en determinadas circunstancias y dependiendo del Ag ambiental y del terreno genético, el organismo reacciona en forma excesiva o inadecuada, dando lugar a las reacciones de hipersensibilidad. Estas reacciones son procesos patológicos resultantes de las interacciones específicas entre Ag y Ac o linfocitos sensibilizados que causan inflamación tisular y/o malfuncionamiento orgánico. Dependiendo de los mecanismos y moléculas efectoras que participan en la evolución del fenómeno, se pueden distinguir diferentes tipos de inmunoreacciones (Romero-Valdés y cols., 2007), las cuales se clasifican de acuerdo a Gell y Coombs en cuatro reacciones de hipersensibilidad. Éstas se describen en la **tabla 1**.

Tabla 1: Clasificación de las reacciones de hipersensibilidad

Hipersensibilidad	Mecanismo inmune	Ejemplo
Tipo I	IgE	Anafilaxia
		Asma mediada por IgE
		Rinitis mediada por IgE
		Dermatitis Atópica
		Urticaria
Tipo II	IgG /IgM	Anemia hemolítica autoinmune
		Eritroblastosis fetal
		Enfermedad de Graves
		Miastenia gravis
Tipo III	Inmunocomplejos circulantes constituidos por IgG ó IgM	Enfermedad del suero
		Lupus eritematoso sistémico
		Glomerulonefritis post-estreptocócica
Tipo IV	Linfocitos T CD4+ / CD8+	Dermatitis de contacto
		Artritis Reumatoide
		Enfermedad inflamatoria intestinal
		Esclerosis múltiple
Mecanismos inmunes no identificados	Hipersensibilidad tipo I no mediada por IgE	
	Pérdida de tolerancia	
	Otros	

Ig, Inmunoglobulinas; Linfocitos T CD4+ (cooperadores); linfocitos T CD8+ (citotóxicos). Adaptado de: Gell – Coombs, 1963. En Cuevas –Castillejos y Cuevas-Castillejos, 2012.

Mientras que los Ac IgG e IgM inducen reacciones de hipersensibilidad al activar el complemento, los Ac de isotipo IgE promueven la desgranulación del mastocito con liberación de histamina y otras moléculas efectoras. Ésta última se le conoce como hipersensibilidad tipo I o alergias (Kindt y cols., 2007), clasificación en la cual se encuentra la dermatitis atópica (DA).

1.3.1. Hipersensibilidad tipo I o Alergias

La hipersensibilidad tipo I ocurre después del contacto con partículas o estímulos que desencadenan señales de peligro que activan de forma inapropiada o excesiva los mecanismos inmunológicos mediados por IgE y estos a su vez a células desgranulantes como mastocitos, eosinófilos y basófilos, dando lugar a las manifestaciones clínicas de la alergia o atopía (Macpherson, 2012). Por lo tanto, las alergias son una respuesta exacerbada del sistema inmune contra sustancias no propias llamadas alérgenos. La cascada alérgica inicia cuando el alérgeno es reconocido por la CD, quien lo procesa y presenta a la célula T, iniciando así la respuesta adaptativa. La célula T se diferencia a un linfocito Th2, el cual secreta IL-4 e induce a los linfocitos B a la producción de IgE (Blink y Fu., 2010; Salazar y Ghaemmaghami, 2013).

La IgE se une al mastocito mediante receptores FcεRI y el individuo queda sensibilizado al alérgeno correspondiente (fase de sensibilización). Los receptores FcεRI tiene una alta afinidad ($k_a=10^{10}M^{-1}$) y una baja constante de disociación ($k_{off}=10^{-5}s^{-1}$), lo que contribuye a la persistencia de la sensibilización y a la saturación de los receptores (Holdom y cols., 2011). De manera tal que, en una exposición posterior, el alérgeno es reconocido por las moléculas de IgE unidas a la superficie del mastocito y éste se activa, resultando en la desgranulación y liberación de mediadores almacenados tales como histamina y proteasas, junto con la producción y secreción de citocinas inflamatorias y compuestos derivados del metabolismo del ácido araquidónico (Weller y cols., 2011). Los mediadores almacenados y los derivados del ácido araquidónico causan los signos y síntomas asociados con la fase temprana de la alergia, tales como: vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, edema, incremento en la secreción de moco y en la motilidad intestinal y bronco-constricción (Galli y cols, 2008). La reacción inmediata se presenta desde segundos hasta una hora después del contacto con el alérgeno, y depende fundamentalmente de la secreción de sustancias vasoactivas y brococonstrictoras. Posteriormente, en algunos tipos de alergias y

dependiendo de la cantidad del alérgeno, se puede continuar con una fase tardía (3-8 horas después de la exposición al alérgeno).

Las fases tardía y crónica alérgicas se caracterizan por cambios funcionales en los órganos afectados (Akdis, 2006). En la fase tardía, las células T efectoras atraídas al lugar de la reacción alérgica y células estructurales de los tejidos afectados como las células epiteliales, secretan citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13, principalmente) y quimiocinas (CCL1, CCL17, CCL18 y CCL22) que conjuntamente con las liberadas por los mastocitos activados en la fase aguda, permiten el reclutamiento al sitio de inflamación de basófilos, monocitos, macrófagos y mayoritariamente eosinófilos. Los mediadores liberados por este infiltrado celular generan un estado de inflamación persistente que avanza según se hace crónica la estimulación con el alérgeno participando en el desarrollo de la fisiopatología característica de las fases aguda y crónica en cada proceso alérgico (Galli y Tsai, 2012).

1.4. Dermatitis Atópica (DA)

La dermatitis atópica (DA) es una enfermedad crónico-inflamatoria, alérgica de la piel (Bieber, 2010), en la cual se presentan lesiones eccematosas y prurito (Auriemma y cols., 2013), ocasionada por la sensibilización a alérgenos ambientales mediada por IgE. Se caracteriza por la inflamación de la piel y la alteración de la barrera epidérmica que se traduce en piel seca y escamosa, esto debido a que, a nivel subcutáneo se forman placas de líquido (espongiosis) y al engrosamiento de la epidermis (liquenificación), así como la hipertrofia de la capa superior de la misma (Bieber, 2008), lo que da como resultado prurito intenso, huellas de rascado, lesiones cutáneas e infecciones secundarias (Civelek, 2011).

La DA se puede clasificar en extrínseca e intrínseca, donde la extrínseca se caracteriza por elevados títulos de IgE total y la presencia de IgE alérgeno

específica, mientras la intrínseca presenta títulos normales de IgE y carece de IgE alérgeno específica. Así mismo, la DA extrínseca muestra una barrera alterada y presencia de prurito, así como mutaciones en la filagrina y la expresión de citocinas del perfil Th2 (Tokura, 2010).

1.4.1. Epidemiología.

A nivel mundial, se estima que la DA afecta del 10 al 20% de los niños y del 2 – 9% de los adultos (Shaw y cols., 2011). En Latinoamérica, la prevalencia en niños, varía del 3.2 al 25% (D´ Solé, 2010), mientras que en México, se estima del 3.9 al 4.9% (Bedolla – Barajas y cols., 2010). En la infancia, el comienzo de la DA ocurre en el 45% de la población durante los primeros seis meses de vida, el 60% durante el primer año y el 85% antes de los 5 años (Bieber, 2010).

De acuerdo a Bieber (2010), la incidencia de la DA se ha incrementado considerablemente en las pasadas 3 décadas en países industrializados, siendo los más afectados aquellos pertenecientes al norte de Europa. La prevalencia en zonas rurales o países no desarrollados es significativamente menor, por lo que hay que enfatizar en el estilo de vida y el ambiente como variables para el desarrollo de la enfermedad.

1.4.2. Etiología.

La etiología de la DA no está claramente definida, (Staines – Boones y cols., 2013). Ésta involucra diferentes factores tales como: la predisposición genética, alteraciones en la barrera cutánea (específicamente en las proteínas que conforman la envoltura celular córnea y ceramidas), y agentes ambientales (Auriemma y cols., 2013).

El **factor genético** es uno de los principales responsables de la DA. La región cromosomal 1q21 es uno de los componentes reguladores de la homeostasis epidermal, así como la diferenciación del complejo epidérmico (Vasilopoulos y cols., 2004). Además, existen otras condiciones que pueden aumentar la probabilidad y gravedad de una DA, tal como la predisposición genética a la producción de anticuerpos IgE específicos a alérgenos y la tendencia a diferenciación de los linfocitos T colaboradores hacia el perfil Th2 (Mark y Slavin, 2006).

Las mutaciones en los genes que codifican profilagrina/filagrina (FLI/FLG) son un elemento clave en la diferenciación de la epidermis, por lo que una variación en ellos es considerado como un factor importante para el desarrollo de la DA (Marenholz y cols., 2006). Así mismo, se ha reportado que el **déficit de filagrina** produce una alteración en la organización de los filamentos de queratina del citoesqueleto y en la estructura de la envoltura córnea debido a que la filagrina se asocia a la densidad de corneodesmosomas y de uniones estrechas intercelulares. También, una disminución en la producción de filagrina altera la maduración y exocitosis de los cuerpos lamelares, provocando una distribución no homogénea de los lípidos y una alteración en la función enzimática que junto a la disminución de los factores de humectación natural, conlleva a una alcalinización del pH (Gruber y cols., 2011; McAler e Irvine, 2013; Bieber, 2010). Éste último, también favorece a la liberación de mediadores proinflamatorios por parte de los queratinocitos, que inducen una respuesta inflamatoria con predominio de linfocitos Th2, mediada incluso en ausencia de los alérgenos (Irvine y cols, 2011), lo que permite la penetración de estímulos externos, como alérgenos, bacterias y virus (Proksch y cols., 2006; Smith y cols., 2006) debido a la disminución de la respuesta protectora de la piel y la deficiencia de péptidos antimicrobianos, (Bieber, 2010).

Otras proteínas estructurales relacionadas con la diferenciación epidermal y la integridad del estrato córneo y por lo tanto elementos claves en la integridad de

la barrera cutánea que se encuentran **alteradas** son **involucrina, loricrina, envoplaquina, periplaquina y proteínas pequeñas ricas en prolina** (Nishifuji y cols., 2013). Cuando una de ellas se encuentra afectada existe un mecanismo compensatorio para mantener la función de barrera (Koch y cols., 2000; Dijan y cols., 2000), sin embargo, un triple knockout de involucrina, envoplaquina y periplaquina desarrolla defectos en el ensamble de la envoltura celular córnea que resulta en una hiperqueratosis y alteraciones en la barrera cutánea, (Sevilla y cols., 2007). TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

En cuanto a las **ceramidas**, niveles bajos de las mismas en el estrato córneo están asociados a cambios en la organización de la laminilla lipídica extracelular, lo que trae consigo una mayor pérdida de agua transepidermal, lo que conlleva a una piel seca (Janssens y cols., 2011).

Dentro de los **agentes** etiológicos **ambientales**, hay que considerar aquellos estresores que comprometen la barrera dérmica, por ejemplo, las condiciones climáticas como baja humedad, bajas temperatura y poca exposición solar (Silverberg y cols., 2013), la frecuencia de contacto con agua (Wang y Tsai., 2014), la dureza del agua de uso común (Engebretsen y cols., 2017) y el contacto ocupacional de algunos productos químicos (Mark y Slavin, 2006; Caroe y cols., 2016).

1.4.3. Desarrollo de la respuesta inmune asociada a la DA

Al ser un órgano activo del sistema inmune, la piel influye en el comportamiento del mismo cuando está afectada por la DA (Egawa y Kabashima, 2011). Los pacientes con DA tienen una barrera dérmica comprometida, ya sea por factores ambientales o alteraciones genéticas (Bieber, 2010).

Dentro de la etiología genética, la alteración en la filagrina no solo afecta la estructura de la capa córnea y granular (Thyssen y cols., 2013), además se altera la producción de factores humectantes naturales, produciendo resequedad y cambios de pH en la piel (Thyssen y cols., 2013), incrementado la actividad de las serín proteasas (por ejemplo, calicreína 7), produciendo la degradación de los corneodesmosomas, disminuyendo la adherencia intercelular y síntesis de ceramidas, lo que causa un estímulo en el queratinocito y alteraciones en la barrera cutánea que permiten el proceso inflamatorio y el paso de alérgenos (Briot y cols., 2009; Kawasaki y cols., 2012).

En respuesta a la agresión que implica la DA, el queratinocito y las CLI2 incrementan la expresión de linfopoyetina estromal tímica (TSLP), IL-25 e IL-33 (Thyssen y cols., 2013; Salimi y cols., 2013). Éste ambiente de citocinas favorece la diferenciación del linfocito Th0 a un perfil Th2, una vez que las CPA capturan al alérgeno, lo procesa y presenta a las células Th0 (Figura 3).

Todavía no se ha definido qué clase de subtipo de CD inicia la sensibilización epicutánea a los alérgenos proteicos: CL de la epidermis o CD de la dermis (Honda y cols., 2013). Lo que si se ha demostrado es que las CLs son esenciales en la inducción de la IgE en la sensibilización epicutánea con antígenos proteicos y que la expresión de los receptores para la TSLP en las CLs se ve incrementada después de la exposición al antígeno proteico en la piel, por lo que se propone que el papel que las CL juegan en el desarrollo de la DA es mediado por la interacción de TSLP con sus receptores (Nakajima y cols., 2012). Además, en la DA las CL producen CCL1, una quimiocina producida por DC, mastocitos y células endoteliales, y que es ligando de CCR8 (Gombert y Dieu – Nosjean, 2005).

Los linfocitos Th2 secretan citocinas inflamatorias como IL-4, IL-5 e IL-13 (Novak, 2012; Xue y cols., 2014; Kim BS et al., 2013; Kabashima, 2013), de las cuales IL-4 e IL-13, estimulan a los linfocitos B para la producción de IgE (Furue y cols., 2016), y favorecen el infiltrado, proliferación y supervivencia de mastocitos

(Brandt y Sivaprasad., 2011). Por otro lado, la citocina IL-5 permite el infiltrado, proliferación y sobrevivencia de los eosinófilos (Kondo y cols., 2001).

La IgE es el principal anticuerpo involucrado en la iniciación inmediata de la hipersensibilidad debido a su papel en la liberación de citocinas y desgranulación de mastocitos (Xiu-Min y cols., 2009). La IgE producida se une al receptor FcεRI del mastocito sensibilizándolo. Debido a la sobreproducción de IgE y a la exposición crónica a alérgenos, el mastocito se desgranula y con ello la liberación de histamina y mediadores de inflamación como prostaglandinas (Novak, 2012; Bieber., 2010). Así también, los mastocitos activados y los eosinófilos se observan en piel lesionada y juegan un papel importante en el desarrollo de la DA (Leung, 1995). En el caso de los mastocitos, éstos contribuyen a la picazón y eritema debido a la liberación de mediadores y citocinas vía IgE-dependiente. Los eosinófilos contribuyen a la inflamación de la piel, debido a la secreción de citocinas y mediadores que inducen el daño en el tejido por la liberación de especies reactivas de oxígeno (Fujii y cols., 2009).

La DA es bifásica; es decir, mientras que la DA en su fase aguda es considerada como una enfermedad alérgica mediada por el perfil Th2, caracterizada por una producción anormal de IgE, eosinofilia periférica, activación de mastocitos y la inducción de la diferenciación de los linfocitos Th2, así como de la expresión de IL-4 e IL-13 (Bieber, 2008); en su fase crónica la respuesta inflamatoria de la DA es una combinación de perfiles Th1/Th2 ya que se observa un incremento de INF-γ, IL-12 así como de GM-CSF, característicos del perfil Th1 (Bieber, 2010). El mantenimiento de la fase crónica involucra la producción de IL-12 e IL-18, mientras que la remodelación del tejido está asociado a IL-11 y TGF-β. Estos mediadores favorecen el engrosamiento de la epidermis característico de las lesiones de DA (Bieber, 2010).

Aunque todavía no se sabe con exactitud el mecanismo inmunológico que favorece la polarización Th2 a Th1, la evidencia muestra que se debe a la

activación de los inflammasomas en los queratinocitos, provocada por los alérgenos (Dai y cols., 2010) o por la presencia de *S. Aureus* (Roth y cols., 2014). Esto último debido a que el ambiente Th2 inhibe la producción de AMPs, se favorece el proceso infeccioso por *S. Aureus* y como consecuencia la producción de IFN- γ , IL-12, IL-11, IL-18, TGF- β y factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos, citocinas del perfil Th1 (Kabashima., 2013; Bieber, 2010).

En relación a los AMPs, se sabe que incrementan en presencia de infección, daño o inflamación de la piel, como un elemento de defensa de la respuesta inmune innata (Kenshi y Gallo, 2008). Sin embargo, en pacientes con DA se ha observado una disminución en la expresión de AMPs. Específicamente, la disminución de la expresión de las defensinas, se debe al aumento de citocinas Th2. IL-4 e IL-13 suprimen al mRNA de las hBD-2 y 3 en los queratinocitos (Ong y cols., 2002). Esta disminución de AMPs puede explicar la susceptibilidad bacteriana en pacientes con DA (Bieber, 2010). Estudios recientes muestran que los AMPs tienen una función similar a la de las quimiocinas, proteínas inhibidoras o neuropéptidos, pues están involucradas en la respuesta proinflamatoria y el proceso de diferenciación celular, en la vascularización y cicatrización en el caso de heridas en la piel. Por lo tanto es posible que el desbalance en la regulación de los AMPs que ocurre en la DA, favorezca al proceso inflamatorio de la piel, con el acúmulo de citocinas proinflamatorias y proliferación de queratinocitos (Büchau y Gallo, 2007).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

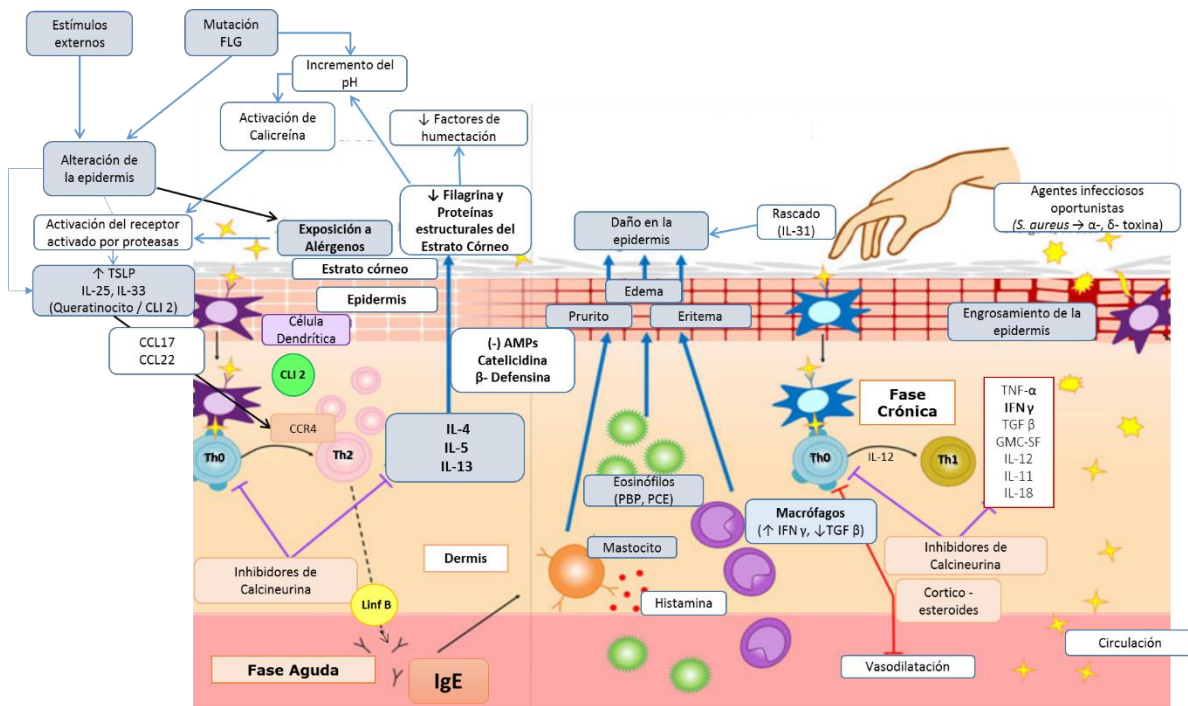


Figura 3: Respuesta inmune en la DA. Factores genéticos o ambientales comprometen la barrera epidérmica, en consecuencia, se incrementa el riesgo de penetración de alérgenos. El proceso de sensibilización inicia cuando la célula dendrítica procesa y presenta el antígeno al linfocito virgen (Th0) y éste se diferencia a subtipo Th2, secretando interleucina (IL)-4, IL-5 e IL-13 (fase aguda) y activando a los linfocitos B quienes secretan inmunoglobulina (Ig)E alérgeno específica que se unirá al mastocito por su receptor. La subsecuente fase crónica se caracteriza por una respuesta Th1, secretora de interferón (IFN)- γ , IL-12, IL-11, IL-18, factor transformante del crecimiento (TGF)- β y factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GMC-SF). CLI, células linfoides innatas; AMPs, péptidos antimicrobianos; TSLP, linfopoyetina estromal tímica; PBP, proteína básica principal; PCE, proteína catiónica eosinofílica (Adaptado de: Peng y Novak, 2015; Kabashima, 2013; Carr 2013).

Se ha descrito la participación de otros fenotipos de linfocitos T CD4 durante la respuesta inmune en la DA. Entre ellas las células T reguladoras (Treg), Th17 y Th9. Se sabe que las células Treg pueden suprimir la respuesta inflamatoria del sistema inmune a través de la señalización célula-célula y por la secreción del TGF- β y la IL-10 (Umetsu y cols., 2003). Aunque los pacientes con DA tienen las células Treg incrementadas, éstas pierden su actividad inmunosupresora (Ou y cols., 2004) y cuando la lesión de la DA ha sido colonizada por *Staphylococcus aureus*, ésta bacteria secreta varios factores de virulencia, como α -toxina o la enterotoxina β , que pueden penetrar la barrera cutánea y afectar regiones específicas de los linfocitos T (TCRV β), contribuyendo

así a la persistencia y exacerbación de la DA por la producción de IL-5 (Lin YT y cols., 2007; Brauweiler y cols., 2014; Lin YT y cols., 2011). Las células Th17 son responsables de la regulación de la respuesta inmune innata mediante el reclutamiento de neutrófilos. Su participación en la DA es controversial debido a que sus niveles se han encontrado aumentados o disminuidos con respecto al control, pues dependen del estadio de la enfermedad (Hayashida y cols., 2011). Así pues, los linfocitos Th17 se incrementan en la fase aguda y decrecientan en la fase crónica (Koga y cols., 2008), lo que se relaciona con el aumento de eosinófilos e IgE en plasma en la fase aguda y un decremento de los mismos en la fase crónica (Hayashida y cols., 2011). La IL-17, generada por las células Th17, es crucial para la defensa del huésped contra infecciones, pues en los queratinocitos ésta ha mostrado tener un papel importante en la regulación de los AMPs (Zhu y cols., 2012). Por otro lado, las células Th9, son características de un perfil inflamatorio y favorecen el reclutamiento de mastocitos (Dardalhon y cols., 2008). La IL-9 funciona como regulador hematopoyético y se encuentra elevada en pacientes con DA, teniendo un papel crucial en la generación del prurito (Namkung y cols., 2011). Otras células T elevadas en pacientes con DA son las que expresan el antígeno cutáneo asociado a linfocitos (CLA). Estas células pueden ser CD8+ o CD4+, sin embargo, sólo CD8+ contribuyen al proceso de inflamación y sensibilización en la DA (Akdis., 2010).

Además de las citocinas antes mencionadas, la IL-17 e IL-31 se han relacionado recientemente con la DA. La IL-17 parece conducir la inflamación hacia la vía aérea después de la exposición cutánea a los antígenos, y la IL-31 participa principalmente en el asentamiento cutáneo de linfocitos Th2 (Incorvaia, 2008). En condiciones normales la IL-31 se expresa en baja concentración en la piel, sin embargo, en la DA se eleva de manera tal que favorece el perfil Th2, lesiones en la piel y prurito severo (Niyonsaba y cols., 2010). Además, se ha establecido que los niveles de la IL-21 son inversamente proporcionales a los de INF- γ y a la severidad de la DA (Lin y cols., 2011). Esta citocina es expresada por células CD4+ y es un potente inmuno-regulador, pues promueve la diferenciación

de linfocitos Th17 e inhibe la producción de IgE. La IL-25 ó IL-17F es un inductor de la respuesta Th2 producido por DCs, eosinófilos y basófilos y está sobre-expresada en la DA, especialmente en piel lesionada. La sobreexpresión de IL-25 induce la producción de citocinas Th2 (Wang y cols., 2009). Finalmente, la IL-33 se sobre-expresa en la DA participando en diferentes mecanismos inmunológicos, mecánicos y microbiológicos que aumentan la respuesta pro-inflamatoria de la DA (Savinko y cols., 2012), incrementando la presencia de inmunoglobulinas y eosinófilos en plasma.



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Tabla 2: Principales elementos de la Respuesta Inmune involucrados en la DA.

Célula	Produce	Efecto	Referencia
Queratinocito dañado / CLI 2	TSLP	Diferenciación a perfil Th2 e inflamación	Thyssen y cols., 2013; Salimi y cols., 2013
	IL-25		
	IL-33		
Linfocito Th2	IL-4	Activación de linfocitos B, producción de IgE e hiperplasia de mastocitos	Furue y cols., 2016; Brandt y Sivaprasad., 2011
	IL-13		
	IL-5	Proliferación y supervivencia de eosinófilos	Kondo y cols., 2001
	Reducción en la expresión de AMPs y proteínas estructurales de la piel.		Kabashima., 2013; Ong y cols., 2002
	IL-31	Prurito	Dillon y cols., 2004
Linfocito Th1	IFN- γ	Engrosamiento de la epidermis	Bieber, 2010
	IL-12	Mantenimiento del perfil Th1	
Linfocito Th17	IL-17	Regulación de los AMPs	Zhu y cols., 2012
	IL-25 (IL-17F)	Inductor del perfil Th2	Wang y cols., 2009
Mastocitos	Histamina	Prurito	Kabashima, 2013
	Prostaglandinas Leucotrienos	Mediadores de inflamación	Misery, 2013
Eosinófilos	Proteína catiónica eosinofílica	Mediadores de inflamación y citotoxicidad	Fujii y cols., 2009
	Proteína básica principal		

CLI, Células linfoides innatas; IL, interleucina; TSLP, Linfopoyetina estromal tímica; AMPs, Péptidos antimicrobianos

1.4.4. Prurito.

El prurito es una manifestación clínica crítica de la dermatitis atópica que causa un gran deterioro en la calidad de vida del paciente (Metz y cols., 2011; Kim, 2012; Buske-Kirschbaum y cols., 2001), pues es una sensación desagradable que genera la necesidad urgente de rascar (Liu y cols., 2009). Se origina a través de dos vías: una directa, donde los queratinocitos liberan mediadores que se unen con pruritoseptores (receptores opioide μ), y otra indirecta, donde los queratinocitos activan a otras células para que liberen sustancias pruriginosas (Cassano y cols., 2010).

Las fibras conductoras del prurito son terminales nerviosas libres (fibras C no mielinizadas), cuya velocidad de conducción es lenta con territorios de inervación extensos. Generalmente terminan en la unión dermoepidérmica, pero en algunas ocasiones pueden proyectarse a las capas inferiores del estrato córneo (Soto-Ortiz y cols., 2012).

Las fibras aferentes primarias prurito-receptivas activan las neuronas espinales de la lámina I del cuerno dorsal y se proyectan a la parte lateral del tálamo y continúan a la corteza singularada anterior, a la corteza insular y a las cortezas sensorio-motoras primaria y secundaria. El prurito y el dolor muestran afectación de las mismas áreas corticales, pero con diferente patrón de activación (Hon y cols., 2007).

En la interacción entre los nervios periféricos y el sistema inmunitario participan diferentes tipos de fibras nerviosas cutáneas que liberan neuromedidores y activan receptores específicos sobre células diana en la piel, como son queratinocitos, mastocitos, CLs, células endoteliales microvasculares, fibroblastos e infiltrado de células inmunitarias (Simental-Lara y Ponce – Olivera, 2006).

La producción de IL-9 (Auriemma y cols., 2013) e IL-31 (Kim, 2012) estimulan la desgranulación de mastocitos y con ello la liberación de mediadores del prurito como histamina (Kabashima, 2013). La histamina no es el único mediador implicado en el prurito, puesto que se ha observado que éste puede seguir incluso aun cuando se administran antihistamínicos. La sustancia P, la serotonina y las prostaglandinas (principalmente prostaglandina E2) también son mediadores importantes (Misery, 2013). Otros, tales como acetilcolina, péptido relacionado con el gen de calcitonina, neuropéptido Y y neurotrofina-4, median diferentes mecanismos de acción en la DA como el prurito, además de inducir vasodilatación, edema, secreción de sudor y en menor participación la activación de las células T (Peters y cols., 2007). Las neurotropinas se encuentran elevadas en sangre en pacientes con DA, lo que sugieren que son un el vínculo entre el sistema inmune y nervioso en la DA (Raap y cols., 2006).

El prurito promueve el rascado del individuo que lo padece lo que ocasiona alteraciones en la barrera e induce la infiltración de eosinófilos (Kabashima, 2013), linfocitos CD3+/CD4+ (Novak y Leung, 2011) y la expresión de TSLP. Lo anterior favorece el desarrollo de la inflamación con perfil Th2 en la DA (Kabasima, 2013).

1.4.5. Tratamiento de la DA

No existe cura para la DA, por lo que el manejo de la enfermedad está enfocado a evitar y aliviar los síntomas, recobrar la función de barrera de la piel, evitar o tratar los procesos infecciosos de la piel y suprimir el proceso inflamatorio y el prurito (Carr., 2013; Sendagorta-Cudós y De Lucas – Laguna, 2009).

El tratamiento siempre tendrá que adaptarse a la severidad de la patología y a las necesidades del paciente. La terapia básica incluye el uso de tratamiento no farmacológico como emolientes, humectantes y oclusivos; antisépticos como triclosán o chlorhexidina para inhibir la colonización bacteriana, o bien antibiótico

vía sistémica y finalmente el uso de glucocorticoesteroides (GC) e inhibidores de la calcineurina como terapia anti-inflamatoria y anti-pruriginosa (Bieber, 2010).

La función de los humectantes es similar a la de los factores de humectación natural, atraer y retener el agua de la epidermis profunda al estrato córneo y los más usados son la glicerina, α -hidroxi-ácidos, ácido hialurónico, sorbitol y urea. Los oclusivos forman una película hidrofóbica que evita la pérdida de agua del estrato córneo, como de forma natural lo hacen las ceramidas, el colesterol y los ácidos grasos libres y los más usados son la lanolina, el aceite mineral, el petrolato y la silicona. Los emolientes como colágeno, elastina, isopropil palmitato y ácido esteárico, suavizan la piel llenando los espacios entre los corneocitos en descamación, como el sebo producido por la piel actúa de manera natural (Giam y cols., 2016).

Aunque el riesgo de infecciones cutáneas es elevado en pacientes atópicos, no existe evidencia que apoye el tratamiento profiláctico con antibióticos. Sólo en casos de infección en lesiones eccematosas, se prescribe el tratamiento tópico con antibióticos como gentamicina, mupirocina o retapamulina (Sendagorta-Cudós y De Lucas – Laguna, 2009). Sin embargo, la aplicación de emolientes con antiséptico ha mostrado ser una solución eficaz en la exacerbación de la DA (Simon y Bieber, 2014).

El tratamiento con GC, tópico o sistémico, es considerado como una opción eficaz en el tratamiento de la DA (Bieber, 2010). La estructura de los GC le permiten una penetración profunda en la piel, por lo que la potencia clínica y los efectos secundarios de los GC tópicos están determinados por su solubilidad en el estrato córneo (Ramírez-Hernández., 2014), además, por su estructura lipofílica, el paso a través de la membrana celular es por difusión facilitada (Iwasaki y cols., 1997).

Los GC inhiben la vasodilatación y el incremento de la permeabilidad vascular subsecuentes al proceso inflamatorio (Parretti y Ahluwalia., 2000) y disminuyen la migración y sobrevivencia leucocitaria, pues reprimen el proceso de transcripción de diversos genes que codifican citocinas y quimiocinas inflamatorias (Smoak y Cidlowski., 2004). El efecto anti-inflamatorio de los GC se debe a la habilidad su receptor (RG) de inhibir a los factores de transcripción de genes pro-inflamatorios como NF- κ B mediante un mecanismo denominado trans-represión (Clark., 2007). Además, El GC se une a su receptor citosólico, se dimeriza y trasloca al núcleo donde se une al elemento de respuesta de GC de los genes que regula, entre ellos genes anti-inflamatorios, produciendo la trans-activación transcripcional (Barnes, 2001). Mientras que los efectos anti-inflamatorios se deben a mecanismos de trans-represión y trans-activación, la mayoría de los efectos adversos están mediados por la trans-activación (Coutinho y Chapman, 2011). La mayor parte de las acciones de los GC se basa en este mecanismo y sus efectos son sobre el metabolismo del ácido araquidónico, vía lipooxigenasa y ciclooxigenasa; sobre proteasa secretoria leucocitaria y proteínas cuyos genes sean estimulados por los GC (Jares y Pignataro, 2002; Coutinho y Chapman, 2011).

La terapia tópica con GC ha sido asociada con numerosos efectos adversos, tanto a nivel local como sistémico. Se ha relacionado con atrofia de la piel, dermatitis de rebote y despigmentación; a nivel sistémico, alteraciones en el eje hipotalámico-pituitario-adrenal, retraso en el crecimiento y síndrome de Cushing. El riesgo de los efectos adversos depende de la duración del tratamiento, la potencia de los corticoesteroides utilizados, la edad del paciente, la susceptibilidad del mismo y el sitio de aplicación (Hengge y cols., 2006)

Tacrólimus y pimecrólimus, son lactonas de macrólidos que inhiben la actividad de la calcineurina, una fosfatasa que interviene en la activación de los linfocitos T. Para la activación de los linfocitos, el antígeno se une a receptores específicos de la membrana, lo que resulta en el incremento intracelular de Ca^{+2} ,

permitiendo que la calmodulina forme un complejo que activa a la calcineurina-fosfatasa. La calcineurina activa desfosforila al factor de activación nuclear de las células T (NFAT), facilitando su entrada al núcleo para ligarse a la región promotora del linfocito. Ésta misma actividad ocurre en los mastocitos, lo que se deriva en la liberación de histamina y de mediadores de inflamación (Carr., 2013; Ballona – Chambergo., 2003; Lin AN, 2010). Por lo tanto el uso tópico de los inhibidores de la calcineurina inhibe la secreción de citocinas y otros mediadores pro-inflamatorios por estas poblaciones celulares.

Los inhibidores de la calcineurina han demostrado ser más efectivos que los corticoesteroides tópicos en el control de la DA, sin tener los efectos adversos de estos por su baja permeabilidad percutánea (siempre y cuando sean tópicos, porque de forma sistémica son potentes inmunosupresores). Aunque los inhibidores de calcineurina ocasionan ardor y eritema local transitorio, no tienen efecto en las DCs de la piel y no reducen las Th en piel sana (Lin AN, 2010).

Tabla 3: Tratamiento de la DA

Gravedad de la DA	Tratamiento
DA leve	Hidratantes, emolientes y ocluyentes
DA moderada	GC e inhibidores de calcineurina tópicos
DA severa	GC e inhibidores de calcineurina sistémicos

DA, Dermatitis atópica; GC, glucocorticoides.

(Adaptado de: Bieber 2010)

Los costos relevantes para el tratamiento de la DA varían dependiendo de la severidad de la misma, teniendo un estimado de entre 800 – 4500 dólares anuales de acuerdo a datos obtenidos por Beikert y colaboradores (2014). Además, a esto hay que añadirle los costos derivados del deterioro en la calidad de vida del paciente y la morbilidad sustancial relacionada con la DA.

1.5. Modelos experimentales de DA

El uso de modelos experimentales de DA permite analizar nuevos tratamientos para la enfermedad, así como sus posibles efectos adversos, siendo el puente hacia los estudios clínicos. Los modelos de DA en ratones han sido utilizados ampliamente en el laboratorio, pues es un modelo de sensibilización sencillo y a corto plazo para el desarrollo de dermatitis (Shiorota y cols., 2004).

Los haptenos son antígenos que penetran fácilmente a la dermis, ocasionando una hipersensibilidad retardada mediada por la respuesta Th1, denominada dermatitis por contacto (Honda y cols., 2013). La respuesta inmune contra el hapteno es dependiente de las células T y, por lo tanto, requiere de la captación, procesamiento y presentación por parte de las CPA unidos a MHC de clase II; para lo cual el hapteno se conjuga con las aminos libres disponibles en la superficie de las proteínas transportadoras (Gefen y cols., 2015). Sin embargo se ha demostrado que la exposición repetida a estos haptenos, como el dinitroclorobenceno (DNCB) o dinitrofluorobenceno (DNFB), induce un cambio en la respuesta inmunológica hacia una respuesta Th2 (McFadden y cols., 2011). La razón del cambio de fenotipo sigue en discusión. Así, aplicaciones repetidas de un hapteno en la piel de un ratón sensibilizado induce una dermatitis alérgica crónica que representa a la DA sintomática e histopatológicamente (Kitagaki, 1997). Inagaki y colaboradores (2006) demostraron que aplicaciones repetidas con 2,4-dinitrofluorobenceno (DNFB) indujeron cambios en la piel, infiltración de eosinófilos e hipertrofia de la epidermis así como incremento en los eventos de rascado ocasionados por el prurito, todo esto característico de la DA. Otro modelo experimental de DA realizado en ratón, fue establecido por Inagaki y colaboradores (2009), en el cual se realizó una sensibilización sistémica con dinitrofenil-albúmina de suero bovino (DNP-BSA) y aplicaciones repetidas de DNFB, mostrando los signos clínicos y características inmunofisiopatológicas de la DA en humanos.

La piel del ratón ha mostrado tener una mayor permeabilidad química que la humana pues el espesor de la capa córnea es menor (Arfsten y cols., 2006); mientras que la piel de la rata presenta una mayor similitud en grosor y permeabilidad a la humana (Godin y Touitou, 2007; Arfsten y cols., 2006), lo que hace que sea un modelo experimental más adecuado al generar lesiones tipo DA menos severas que el ratón y más semejantes a las del humano (Arfsten y cols., 2006; Fujii y cols., 2009; Sato y cols., 1991). Dado lo anterior, Fujii y colaboradores (2009) establecieron un modelo de DA en ratas Brown Norway al aplicar sobre la piel de la oreja derecha, DNCB 3 veces por semana durante 3 semanas. Observaron que al día 7 del protocolo, el pico máximo del grosor de las orejas (indicativo de la intensidad del proceso inflamatorio) se mostró 24h tras la aplicación del DNCB, mientras que a los días 14 y 21, éste se observó 6h después de la misma. Dichos resultados sugirieron que el modelo reproducía el desarrollo de inflamación aguda y tardía tras aplicar el DNCB y la coexistencia de células Th1 y Th2, característico de las lesiones con DA. Además, el estudio histopatológico, mostró que en el día 21 se incrementaba el número de eosinófilos y mastocitos infiltrados en dermis, así como la desgranulación de éstos últimos. De igual manera, la frecuencia de rascado (ocasionado por el prurito) en las ratas aumentó significativamente durante el desarrollo de la DA. Sin embargo, hasta el momento no se ha establecido ningún modelo experimental de DA con rata Wistar, la cual ha mostrado un nivel sérico de IgE más alto que otras cepas, como Sprague Dawley o Donryu, en modelos alérgicos (Hirano y cols., 2001).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

1.6. Glicomacropéptido (GMP)

El glicomacropéptido (GMP) es un compuesto biológicamente activo de 64 aminoácidos, altamente glicosilado (Brody, 2000). En los mamíferos jóvenes y en el humano adulto es liberado en el tracto gastrointestinal después de la ingestión de leche, debido a la proteólisis mediada por la quimosina y pepsina, respectivamente (Chabance y cols., 1998).

El GMP comercial es un derivado de la hidrólisis de la leche, el cual se obtiene cuando la κ -caseína es tratada con quimosina durante el proceso de elaboración de quesos. La proteína es hidrolizada en para - κ - caseína que queda en la cuajada y el GMP en el suero, representando del 20 – 25% de las proteínas totales del mismo (Farías y cols., 2010; Farrell, 2004; Thöma-Worringer et al., 2006; Meisel y FitzGerald, 2003).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

1.6.1. Estructura, propiedades nutricionales, farmacodinamia y funciones biológicas

La composición del GMP varía dependiendo de la fuente del suero, así como de la técnica de aislamiento (Martín- Diana y cols., 2006). De acuerdo a la secuencia de aminoácidos presentes se han descrito 8 variedades genéticas, aunque las dos más abundantes en la leche bovina (variantes A y B; Tabla 4), se diferencian solo en la sustitución de dos aminoácidos. Análisis realizados al GMP indican que posee cinco variedades de polisacáridos (Tabla 4) entre los cuales se encuentra el ácido siálico, el cual se ha observado que es en parte responsable de su efecto inmunomodulador (Salcedo y cols., 2011; Fernando and Wooton, 2010) .

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Tabla 4. Secuencia de aminoácidos y oligosacáridos presentes en el GMP.

Secuencia de Aminoácidos del GMP variedad A
H ¹⁰⁶ . Met – Ala – Ile – Pro ¹¹⁰ – Pro – Lys – Lys – Asn – Gln – Asp ¹⁰ – Lys – Thr – Glu – Ile – Pro ¹²⁰ – Thr – Ile – Asn – Thr – Ile ²⁰ – Ala – Ser – Gly – Glu – Pro ¹³⁰ – Thr – Ser – Thr – Pro – Thr – Thr (Ile) – Glu – Ala – Val – Glu – Ser – Thr – Val – Ala – Thr – Leu – Glu – Asp (Ala) – Ser – Pro ¹⁵⁰ – Glu – Val – Ile – Glu – Ser ⁵⁰ – Pro – Pro – glu – Ile – Asn ¹⁶⁰ – Thr – Val – Gln – Val – Thr ⁶⁰ – Ser – Thr – Ala – Val⁶⁴ . OH
Los aminoácidos que se encuentran entre paréntesis pertenecen a la variedad B del GMP. Los subíndices refieren a la secuencia de residuos de aminoácidos basados en la numeración de κ – caseína. En negritas se encuentran los sitios de fosforilación y glicosilación.
Oligosacáridos Presentes
<ol style="list-style-type: none"> 1. Monosacáridos: GalNAc. – O – R 2. Disacárido: Gal β1 » 3 GalNAc-O-R 3. Trisacárido: NeuAc α2 » 3 Gal β1 » 3 GalNAc-O-R 4. Trisacárido: Gal β1 » 3 (NeuAc α2 » 6) Gal-NAc – O – R 5. Tetrasacárido: NeuAc α2 » 3 Gal β1 » 3 (NeuAc α2 » 6) GalNAc – O – R
Donde: Gal = Galactosa (17%) GalNAc = N – acetilgalactosamina (21%) NeuAc = Ácido Siálico (54%) GlcNAc = N- acetilglucosamina (7%)

(Adaptado de: Brody, 2000; Nakajima y cols., 2005).

Dentro de sus propiedades químicas, el GMP posee un punto isoeléctrico alrededor de 4 y es altamente soluble en agua, con carga neta negativa incluso a valores de pHs bajos y es muy estable al calor (Thomä y cols., 2006). Posee una masa molecular aproximada de entre 7.5 a 9.6 KDa, dependiendo de la proporción de variedades presentes en la muestra, así como del grado de glicosilación (Mollé y Léonil, 2005).

Existen diferentes técnicas de aislamiento del GMP, tales como: la precipitación mediada por ácido tricloroacético (Lieske y Konrad, 1994), precipitación en etanol (Saito y cols., 1991), ultrafiltración (Kawasaki y cols., 1991), cromatografía en gel (Nakano y Ozimek, 2000), cromatografía por afinidad (Saito,

1991), cromatografía por interacción hidrofóbica (Silva-Hernández y cols., 2002) y cromatografía de intercambio iónico (Tanimoto y cols., 1992), siendo la ultrafiltración la técnica que ofrece un mejor rendimiento (34%) con un GMP glicosilado del 80% (Li y Mine, 2007).

El GMP tiene un excelente historial como alimento seguro (Etzel, 2004) y no es inmunogénico (Mikkelsen y cols., 2006). Es una fuente de proteína de alto valor biológico libre de aminoácidos aromáticos, por lo que es usado como complemento alimenticio en pacientes fenilcetonúricos. Además, puede ser utilizado en la dieta para pacientes que sufren de daño hepático por su bajo contenido en metionina y su alto contenido en aminoácidos de cadena ramificada, los cuales pueden ser utilizados como fuente de energía (Van Calcar y cols., 2009; Ney, 2012). Por su alto valor nutrimental, se ha estudiado su efecto en preparados para lactantes (Keleher y cols., 2003; Szymlek – Gay y cols., 2012; Timby et al., 2014; Lönnerdal, 2014) y desde el punto de vista de su farmacodinamia, el GMP puede ser detectado en la plasma de ratas después de la ingestión de caseína humana (Chabance y cols., 1995). Por otro lado, los máximos niveles de GMP encontrados en plasma de adultos tras la ingestión de leche y yogurt fueron de 0.5 a 2.0 y 1.05 a 10 µg/ml respectivamente, además de poder detectarse el GMP en plasma humano de 1 a 8 horas después de la ingesta de los mismos alimentos (Chabance y cols., 1998).

Al GMP se le han atribuido varias funciones biológicas. Se ha propuesto la capacidad del GMP para combatir infecciones debido a su capacidad de inhibir la adhesión viral y bacteriana por acción del ácido siálico (Nakajima y cols., 2005; Kawasaki y cols., 1992; Kawasaki y cols., 1993). Por sus propiedades anti-cariogénicas es incluido en pastas dentales, ya que inhibe la adhesión de bacterias como *Streptococcus mutans*, *S. sanguis* y *S. sobrinus* a la cavidad oral, además de reducir la disolución de la hidroxiapatita en el esmalte de los dientes y promocionar la remineralización (Aimutis, 2004; Neeser y cols., 1994). Otra característica funcional del GMP es que posee capacidad antihipertensiva y

reduce los marcadores de riesgo de enfermedad cardiovascular (Keogh y Clifton, 2008).

1.6.2. Propiedades antiinflamatorias, prebióticas, antioxidantes e inmuno-reguladoras

Requena y colaboradores (2008) estudiaron la actividad antiinflamatoria del GMP en un modelo experimental de ileitis en ratas inducido por ácido trinitrobenzensulfónico, donde obtuvieron una reducción en la lesión, una menor extensión de la necrosis y de expresión de citocinas inflamatorias IL-1 β , IL-17 y TNF. En un modelo de colitis inducida por ácido trinitrobenzenosulfónico, Daddaoua y colaboradores (2005), demostraron que el GMP tenía un efecto dosis – dependiente en ratas pretratadas con GMP, reduciendo el daño colónico en un 65%, mediante la reducción de IL-1 β y especies reactivas de nitrógeno. También en el modelo de López – Posadas y colaboradores (2010), donde la colitis se indujo con sulfato dextrano, se observó la disminución del daño colónico en un 44% en ratas tratadas. El efecto producido se asoció a la disminución de los niveles de IL-1 β , IL-17 y TNF α . Recientemente Hvas y colaboradores (2016) evaluaron el efecto de GMP en colitis ulcerativa humana y reportaron una disminución de la superficie afectada, así como de la severidad en la misma en sujetos que tomaron GMP (30 g/día) como tratamiento suplementario a una dosis baja de mesalamina (tratamiento farmacológico habitual), obteniendo resultados semejantes a aquellos pacientes que tomaron la máxima dosis permitida de mesalamina. Por otra parte, Chen y colaboradores (2014) observaron, en un modelo en ratas de daño colónico inducido por dimetilhidrazina, que el GMP evitó un daño extensivo mediante la disminución de las citocinas del perfil Th2.

Existen diferentes estudios sobre el efecto prebiótico del GMP. Al GMP se le habían descrito efectos inductores del crecimiento *in vitro* de ciertas cepas de

Bifidobacterium y *Lactobacillus* desde hace muchos años y recientemente estos resultados fueron corroborados con nuevas tecnologías por el grupo de Robitaille (2013). Chen y colaboradores (2012) reportaron que la administración de GMP en ratones incrementaba significativamente la cantidad de *Lactobacillus* y *Bifidobacteria* encontrada en heces. Recientemente, Jiménez y colaboradores (2017) investigaron el efecto del GMP sobre la microbiota de ratas sensibilizadas con alérgenos, mostrando que se incrementa significativamente la cantidad de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Bacteroides* intestinales. Además, en un estudio realizado en cuyos (*Cavia porcellus*) que recibieron una dieta suplementada con GMP durante 15 días mostraron un número incrementado de *Lactobacillus* en el íleon y colon proximal (Hermes et al., 2013), mientras que ratones alimentados crónicamente con una dieta enriquecida en GMP incrementaron los *Bacteroides* en heces (Sawin y cols., 2015).

Respecto a su actividad antioxidante, tanto el GMP como productos de su hidrólisis tienen capacidad neutralizadora sobre algunas sustancias con actividad oxidativa, reducen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la línea de macrófagos RAW 264.7 protegiendo a la célula de su efecto citotóxico y además aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes en las células dañadas (Cheng y cols., 2015). Además, el GMP administrado vía oral a ratas obesas estimula la actividad de enzimas anti-oxidantes y disminuye la cantidad de productos derivados de la peroxidación lipídica (Xu y cols., 2013). Productos derivados de la hidrólisis del GMP por acción de la papaína bloquean la generación de ROS intracelulares por peróxido de hidrógenos en células HepG2 (carcinoma hepático humano), a través de la activación del factor de nuclear Nrf2 y la expresión de hemoxygenasa-1 (Li y cols., 2017).

Estudios *in vitro* han mostrado una acción moduladora directa del GMP sobre la actividad de algunas células del sistema inmune. El GMP inhibe la proliferación inducida por LPS o fitohemaglutinina de esplenocitos de ratón y

células de placas de Peyer obtenidas de conejo (Otani y cols., 1995), regula positivamente la expresión del componente semejante al antagonista del R de la IL-1 y suprime la expresión del R para IL-2 en linfocitos T de ratón (Monai y Otani, 1997; Otani y cols., 1996). Los resultados sobre el efecto del GMP sobre la actividad de los macrófagos muestran que aumenta la proliferación y actividad fagocítica de la línea de macrófagos humanos U937 y regula positivamente la secreción de TNF, IL-1 β y IL-18 en la línea THP-1 de monocitos humanos (Li y Mine, 2004; Requena y cols., 2009). Sin embargo, cuando la línea de macrófagos RAW 264.7 es activada por LPS, el GMP y algunos péptidos derivados de su hidrólisis enzimática, disminuyen la producción de óxido nítrico, así como los niveles de expresión de TNF- α , IL-1, la enzima óxido nítrico sintetasa inducible, el TLR4 y la proteína MyD88 (Cheng y cols., 2015). Trabajos realizados con mastocitos han descrito que el GMP disminuye *in vitro* e *in vivo* la activación de los mastocitos por el alérgeno e inhibe la secreción de histamina por parte de estas células (Jiménez y cols., 2016).

El efecto inmunomodulador del GMP en alergias fue estudiado por Jiménez y colaboradores (2012), trabajando con un modelo de sensibilización sistémica a ovoalbúmina (OVA) en rata. Estos autores describieron un efecto preventivo del GMP administrado vía oral sobre el desarrollo de la respuesta inmune asociada a la etapa de sensibilización de la alergia. Observaron que la administración oral de GMP en ratas sensibilizadas con OVA disminuye la concentración sérica de IgE alérgeno – específica, inhibe la respuesta proliferativa de los esplenocitos y disminuye la producción de IL-13 por estas células en respuesta al alérgeno, sin afectar la secreción de IL-10 pero incrementando la de TGF- β (Jiménez et al., 2016). Así también, se mostró una disminución en las manifestaciones clínicas asociadas a la hipersensibilidad cutánea, reduciendo la respuesta inflamatoria local generada en la urticaria alérgica. Adicionalmente, el pretratamiento con GMP protegió a las ratas sensibilizadas del choque anafiláctico sistémico severo. Más tarde, Roldán y colaboradores (2016) en un modelo experimental de asma

alérgico, inducido con ovoalbúmina y desarrollado en ratas, demostraron que la administración vía oral de GMP reduce los títulos séricos de IgE alérgeno – específico, así como suprime sustancialmente el reclutamiento de células inflamatorias en el compartimento broncoalveolar. Así mismo, los estudios histológicos en pulmón, mostraron una disminución significativa de eosinófilos, células caliciformes, depósitos de colágeno y expresión de TGF- β . Dicho efecto se relacionó con la disminución sustancial de citocinas IL-5 e IL-13 y el aumento de IL-10.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

2. JUSTIFICACIÓN

El GMP es un biopéptido lácteo, no inmunogénico y seguro para consumo humano, que por su valor nutricional es utilizado en complementos alimenticios para paciente fenilcetonúrico y se ha valorado su uso en la formulación de sucedáneos lácteos. Como alimento funcional, ha mostrado tener propiedades antiinflamatorias e inmunoregulatoras en varios modelos experimentales de inflamación intestinal y en humanos con ésta patología. También se sabe que posee actividad prebiótica sobre cierta población de bacterias benéficas para la salud del hospedero. Recientemente se le ha descrito un efecto profiláctico en el desarrollo de la respuesta inmune temprana asociada a la urticaria y la anafilaxia sistémica y de la respuesta tardía asociada al asma alérgica. Este efecto se refleja con una disminución importante en la intensidad de la respuesta inflamatoria, así como de los signos clínicos asociados a dichas patología alérgicas.

Debido a que los tratamientos actuales para la DA son muy costosos y algunos de ellos además no pueden aplicarse de forma crónica por sus efectos adversos, el presente trabajo se realizó con la finalidad de estudiar el efecto terapéutico del GMP en un modelo de DA en rata, para proponer el uso de este péptido bioactivo como una alternativa a bajo costo para el tratamiento de la dermatitis atópica.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

3. HIPÓTESIS

La administración de GMP disminuye la respuesta inmunológica Th2 y los signos clínicos y patológicos relacionados con la DA en la rata.

4. OBJETIVO GENERAL

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Evaluar los efectos de la administración oral de GMP sobre la respuesta inmune, la fisiopatología y los signos clínicos asociados a la DA.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar un modelo de DA en rata.
2. En ratas con DA, con o sin tratamiento con GMP:
 - Analizar la inflamación cutánea y los eventos de rascado, como signos clínicos de la enfermedad.
 - Analizar el infiltrado de eosinófilos y la hiperplasia de mastocitos en las lesiones cutáneas.
 - Determinar el engrosamiento de la epidermis en las lesiones cutáneas.
 - Determinar los niveles séricos de IgE.
 - Evaluar determinadas proteínas epidérmicas estructurales y péptidos antimicrobianos en las lesiones por DA.
 - Evaluar determinadas citocinas inflamatorias y reguladoras vinculadas al establecimiento de la patología.
 - Detectar el GMP en el sitio de la lesión.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Animales. Se trabajó con ratas Wistar macho (150-180g; 40 días) obtenidas del Bioterio General de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Las ratas se mantuvieron a temperatura controlada (22 – 24°C) e iluminación (Ciclos de 12 h de luz), alimentadas con Rodent Laboratory Chow 5001 (Purina, Ciudad de México, México) y agua *ad libitum* en el bioterio del edificio 202 de la Universidad. Previo a la experimentación, todos los animales se desparasitaron durante 3 días diluyendo en su agua de consumo, 1 mL de Mebendazol (20 mg/mL) por cada 100mL de agua y se trataron con antibiótico los siguientes 3 días, diluyendo en su agua de consumo 50 µL de Enrofloxacin (150 mg/mL) por cada 100mL de agua. Posteriormente, se dejó descansar a los animales en condiciones normales, antes de comenzar con el experimento.

5.2. Caracterización del modelo experimental de DA en rata. Con la finalidad de establecer un modelo experimental de DA en ratas, se sensibilizaron a los animales de acuerdo a tres protocolos, en los cuales, cinco ratas fueron asignadas de forma aleatoria en dos diferentes grupos para cada protocolo: control (C) y sensibilizadas con 2,4-dinitroclorobenceno (DNCCB; Sigma, St. Louis, MO, USA). La oreja izquierda de cada rata fue usada como control negativo.

5.2.1. Protocolo 1. La sensibilización del animal se hizo mediante la aplicación de 60µL de DNCCB 1.5% p/v preparado en un vehículo de acetona: aceite de oliva (A:AO), 4:1 en la piel de la oreja derecha (30µL en cada cara), 3 veces por semana, durante 3 semanas. A la oreja derecha de las ratas control se les aplicó sólo el vehículo (A:AO) (Fujii y cols. 2009). Se evaluó la intensidad del edema de las orejas al tiempo cero, 1, 6 y 24h después de la aplicación de DNCCB en los días 0, 7, 14 y 21. En los mismos días se analizaron los eventos de rascado.

5.2.2. Protocolo 2. La sensibilización se realizó el día 0, con una inyección intramuscular de 1 mg de dinitrofenil-albúmina de suero bovino (DNP-BSA)

preparado en un vehículo de 7.8 mg de hidróxido de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$; Thermoscientific, Rockford, IL, USA) disuelto en 1mL de solución salina. Simultáneamente, como adjuvante, se aplicó vía subcutánea 0.5mL de la vacuna DPT (Toxoide diftérico, 30UI; toxoide tetánico, 60UI; *Bordetella pertusis*, 4UI; vehículo, c.b.p.0.5mL; Zurivac, Ciudad de México, México, México). Posteriormente se re-sensibilizó a las ratas aplicando en la piel de la oreja derecha 60 μL de DNCB al 1.5% (30 μl para cada cara de la oreja) preparado en un vehículo de A:AO 4:1, en los días 14, 16, 18, 20, 22 y 36 (Inagaki y cols., 2009; Yamashita y cols., 2010). Se evaluó la intensidad del edema de las orejas al tiempo 0, 1, 6 y 24h después de la aplicación de DNCB en los días 0, 16, 22 y 36. En los mismos días se analizaron los eventos de rascado.

5.2.3. Protocolo 3. La sensibilización se realizó en la piel abdominal con 50 μL de DNCB 1.5% preparado en un vehículo de A:AO 4:1 y posteriormente se re-sensibilizó con 40 μL de DNCB 1.5% preparado de igual manera, 20 μL en cada lado de la oreja. La aplicación se realizó 4 veces: cada 3 días por 2 semanas, empezando el día 5 después de la sensibilización inicial (días: 5, 8, 11 y 14) (Heo y cols., 2012). Se evaluó la intensidad del edema de las orejas al tiempo cero, 1, 6 y 24h después de la aplicación de DNCB en los días 0, 8 y 14. En los mismos días se analizaron los eventos de rascado.

Al término del cada protocolo se sacrificaron los animales y se extrajeron cantidades iguales de tejido de las orejas para su peso, así como una fracción de tejido para su análisis histológico.

5.3. Grupos experimentales. Para el análisis del efecto del GMP sobre la DA experimental se llevaron a cabo tres ensayos experimentales independientes, utilizando 40 ratas en cada uno de ellos, divididas aleatoriamente en 5 diferentes grupos (8 ratas por grupo):

- Control (C).

- Sensibilizado con DNCB y previamente tratado con agua vía esofágica desde tres días antes de la sensibilización, hasta el día 36 (DNCB-P).
- Sensibilizado con DNCB y previamente tratado con GMP (Lacprodan® cGMP-10; donado por Arla Foods Amba, Viby, Denmark) desde tres días antes de la sensibilización, hasta el día 36 (GMP-P).
- Sensibilizado con DNCB y tratado con agua a partir del día 23 y hasta el día 36 (DNCB-T).
- Sensibilizado con DNCB y tratado con GMP desde el día 23 y hasta el día 36 (GMP-T).

Para el desarrollo de la DA experimental, los animales de los grupos DNCB-P, GMP-P, DNCB-T, GMP-T se sensibilizaron de acuerdo al protocolo establecido por Inagaki y cols., 2009 y Yamashita y cols., 2010 (protocolo 2 anteriormente descrito). Brevemente, la sensibilización se realizó vía intramuscular aplicando 10µL de DNP-BSA + 7.8 mg Al(OH)₃ y por vía subcutánea una dosis de la vacuna DPT. Posteriormente se re-sensibilizó a las ratas aplicando en la piel de la oreja derecha 60µl de DNCB al 1.5%, colocándose 30µl para cada cara de la oreja en los días 14, 16, 18, 20, 22 y 36 (Figura 4). A los animales del grupo C sólo se les aplicó los adyuvantes y vehículos en los mismos tiempos y volúmenes indicados para los animales sensibilizados.

Se evaluó la intensidad del proceso inflamatorio de las orejas al tiempo 0, 1, 6 y 24h después de la aplicación de DNCB en los días 0, 16, 22 y 36. En los mismos días se analizaron los eventos de rascado (Figura 4). Al término del protocolo se anestesiaron los animales, se tomó una muestra de sangre, se sacrificaron con sobredosis de anestesia y posteriormente se extrajeron cantidades iguales de tejido de las orejas para su peso, así como fracciones de tejido para su análisis histológico (Figura 4).

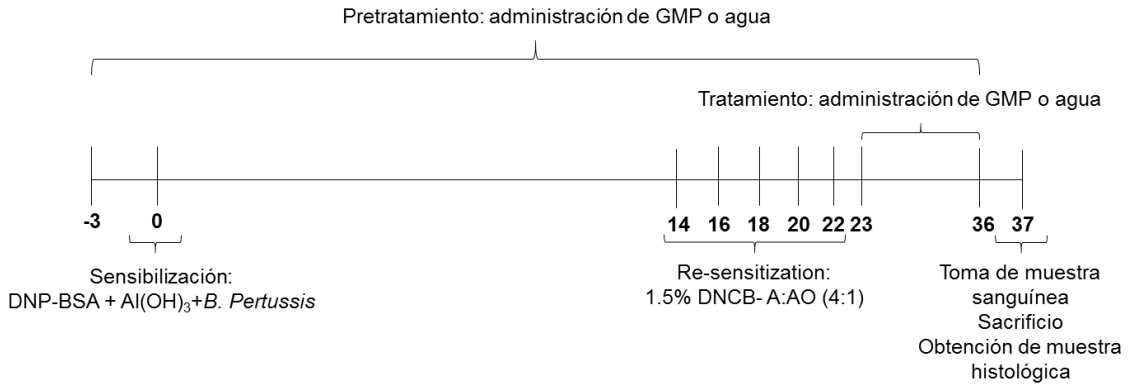


Figura 4: Esquema del protocolo de inducción de la DA experimental y administración de GMP. Las ratas fueron sensibilizadas el día 0 con una inyección i.m. de DNP-BSA en un vehículo de $Al(OH)_3$, simultáneamente se inyectó vía s.c. *B. pertussis*. Los animales se re-sensibilizaron con una aplicación tópica en la oreja derecha de DNCB en A-AO los días 14, 16, 18, 20, 22 y 36. Al grupo control sólo se aplicaron los vehículos y adyuvantes. El GMP o el agua fue administrado diariamente desde tres días antes de la inducción de la DA o desde el día 23 de la sensibilización, y hasta el día 36, para el análisis del efecto profiláctico (pretratamiento) o terapéutico (tratamiento), respectivamente.

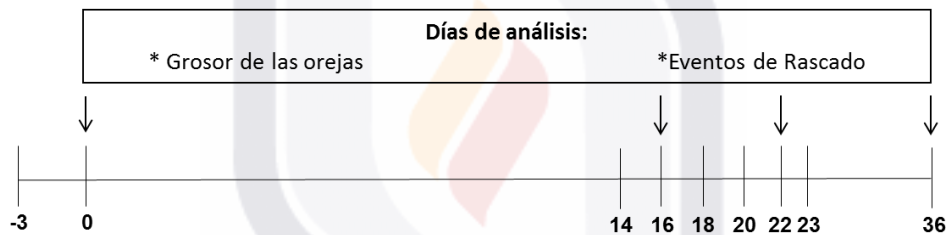


Figura 5: Esquema de días de análisis. La evaluación de los signos clínicos de la DA se realizaron los días 0, 16, 22 y 36 a partir de la inducción de la DA.

5.4. Para la detección de GMP en tejido de la oreja se desarrolló un protocolo adicional en el cual tres ratas fueron asignadas de forma aleatoria en tres grupos: control, GMP1 y GMP24. A los dos últimos grupos se les administró GMP (500 mg/kg/día) vía esofágica cada 24 horas por 39 días (mismo período en el que se administra el pre-tratamiento con GMP a las ratas con DA); mientras que al grupo control se administró sólo el volumen correspondiente de agua a los mismos tiempos. Los animales del grupo control y GMP1 se sacrificaron por sobredosis de anestesia a la hora de la última administración, mientras que las ratas GMP24 se sacrificaron 24 horas después.

5.5. Análisis de la reacción inflamatoria cutánea. Para analizar el edema generado en las orejas por la aplicación del DNCB, se midió el grosor de las dos orejas de cada rata con un vernier digital (Milomex., Ltd., Bedfordshire, UK) al tiempo 0, 1, 6 y 24 h después de la aplicación del DNCB, los días 16, 22 y 36. El edema de la oreja (E) se expresó como la diferencia de grosor de la oreja derecha (OD) menos el de la oreja izquierda (OI) (Takeshita, 2004).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

$$E=OD-OI$$

Al término del tratamiento se sacrificaron los animales con sobredosis de anestesia y se extrajeron porciones idénticas de las dos orejas de cada rata con ayuda de un sacabocados. Los fragmentos de la oreja derecha e izquierda se pesaron en balanza analítica (Precisa XT220A, Dietikon, Switzerland) y se determinó la intensidad del proceso inflamatorio (PI) por la diferencia de peso entre la oreja derecha (OD) y la oreja izquierda (OI) (Chibli y cols., 2014).

$$PI= OD-OI$$

5.6. Evaluación de eventos de rascado. Los mismos días de medición del grosor de la oreja, las ratas se colocaron en cámaras plásticas (20x30x20 cm), inmediatamente después de la aplicación de DNCB. El comportamiento de las ratas fue grabado durante 10 minutos (SamsungHMX-W350, New Jersey, USA). Los videos fueron analizados por dos individuos quienes contabilizaron los eventos de rascado. Se definió como evento de rascado la serie de 1 o más rascados realizados por la pata trasera dirigida hacia el sitio de aplicación y finalizaban cuando la rata lamía la pata trasera o la regresaba al suelo (Nojima y Carstens, 2003; Back 2012).

5.7. Análisis histológico (histoquímico e inmunohistoquímico) de las lesiones cutáneas. Las orejas derechas de cada rata fueron extirpadas 24h

después de la última aplicación de DNCB, y un fragmento de 5mm de grosor obtenido de la parte superior de cada uno de ellas fue fijado en formalina neutra [Formaldehído (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Cat No 252549) al 10% (v/v) en PBS (NaCl 1.37M, KCl 26.8mM, NaH₂PO₄ 120mM, KH₂PO₄ 170mM)] por 48h.

Posteriormente, los tejidos fueron deshidratados en alcohol etílico, diafanizados en xilol e incluidos en parafina utilizando un equipo procesador de tejidos (Leica TP 1020), siguiendo las pautas y tiempos de incubación que se muestran a continuación:

- Alcohol Etílico 70% 1h
- Alcohol Etílico 80% 1h
- Alcohol Etílico 96% 1h
- Alcohol Etílico 96% 1h
- Alcohol Etílico 100% 1h
- Alcohol Etílico 100% 1h
- Alcohol Etílico 100% 1h
- Alcohol Etílico 100%: Xilol (1:1) 1h
- Xilol I 1h
- Xilol II 1h
- Xilol III 1h
- Parafina I 2h
- Parafina II 2h

Finalmente, se hicieron cortes transversales de 3µm (para inmunohistoquímica) y 5 µm (para histoquímica) de grosor con ayuda de un microtomo (Leica, Nussloch, Alemania; Mod. RM 2125) y se desarrollaron las tinciones histoquímicas o inmunohistoquímicas correspondientes y posteriormente mencionadas. Para ello, los tejidos fueron previamente desparafinizados e hidratados, para lo cual, las laminillas se introdujeron a la estufa a 58°C durante 8 horas y posteriormente fueron sometidos a distintos baños de xilol y etanol como se muestra a continuación:

- Xilol I 5 minutos
- Xilol II 5 minutos
- Xilol III 5 minutos
- Xilol IV 5 minutos

- Alcohol Etílico I 100% 5 minutos
- Alcohol Etílico II 100% 5 minutos
- Alcohol Etílico I 95% 5 minutos
- Alcohol Etílico II 95% 5 minutos
- Agua corriente 5 minutos
- Agua destilada 5 minutos

5.7.1. Tinción de hematoxilina/eosina. Para la cuantificación de eosinófilos y la determinación del grosor de la epidermis, los cortes fueron desparafinizados e hidratados para ser teñidos con Hematoxilina/Eosina (HyE) con el kit Hycel 64298 (Estado de México, México), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para ello, el tejido se introdujo en Hematoxilina de Harris por un minuto, se enjuagó con agua destilada, se pasó a un baño de alcohol ácido (HCl) 1%, se lavó con agua destilada caliente y posteriormente, agua destilada fría. Luego se colocó en Eosina durante 30 segundos, se lavó con agua corriente por 5 minutos y se procedió a deshidratar y montar como se muestra más adelante.

5.7.2. Tinción con Azul de Toluidina. Para identificar los mastocitos, los tejidos previamente desparafinizados e hidratados, se trataron durante 10 minutos con Azul de Toluidina (Sigma, T3260) 0.006M, preparado previamente en una solución de ácido cítrico (Sigma, C0759) 0.1M en etanol absoluto: agua (1:1). Posteriormente se lavó con agua corriente por 5 minutos y se procedió a deshidratar y montar como se muestra más adelante.

5.7.3. Inmunohistoquímica. Para determinar la expresión de AMPs y filagrina en los cortes de tejido obtenido de las orejas, primeramente se procedió al bloqueo de la actividad de las peroxidases endógenas del tejido incubando los cortes por 45 minutos con 200 µL de peróxido de hidrógeno - metanol (5%v/v) y cubriéndolos con “plastic cover slip” (PCS) para evitar la desecación. Posteriormente se realizaron 12 enjuagues con una solución de lavado, denominada por las siglas de sus componentes, como HNC-Tween 0.1% (2-[4-(2-hidroxi-etil) piperazin-1-il] ácido etanesulfónico, 9.15mM; cloruro de sodio, 150mM; cloruro de calcio, 2mM) y

12 enjuagues con PBS y se procedió con el bloqueo de sitios inespecíficos. Para ello se incubaron los cortes con 200 μ L de HNC – suero humano (SH) al 10% durante 90 minutos a temperatura ambiente y con PCS. Pasado el tiempo, se escurrió el exceso de líquido de la laminilla y se incubó el tejido con el anticuerpo IgG de conejo anti-filagrina con reactividad en rata (Biorbyt Cat No. orb10662; California, USA), o IgG de conejo anti-catelecidina con reactividad en rata (Abcam Cat No. Ab74946; Cambridge, UK), o IgG de conejo anti – β – defensina 2 con reactividad en rata (Biorbyt Cat No. Orb10531; California, USA) diluidos 1:400, 1:800 y 1:150 respectivamente, en HNC – SH 2% y se dejó incubar en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche. Posteriormente se realizaron 12 lavados con HNC y 12 con PBS. Las laminillas se sumergieron en PBS durante 5 minutos y a continuación, el tejido se incubó con el anticuerpo secundario, IgG de burro anti-IgG de conejo biotinilado (Santacruz, CAT No. SC-2089, USA) diluido 1:500 en HNC-SH 2% por 90 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se lavó 12 veces con HNC y 12 con PBS, se cubrió el tejido con estreptavidina (Biocare Medical, CAT No. HP604) y se dejó incubar 10 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se lavó 12 veces con HNC y 12 con PBS 1 y se colocaron 200 μ L de diaminobencidina (DAB; Invitrogen, CAT No. 750118) por un minuto sobre cada uno de los tejidos. La reacción se detuvo sumergiendo la laminilla en agua corriente. A continuación se realizó una contratinción, sumergiendo el tejido en Hematoxilina de Harris (kit Hycel 64298) por 30 segundos, se enjuagó el tejido en agua, se sumergió en alcohol ácido, se enjuagó en agua y posteriormente se introdujo en una solución saturada de carbonato de litio por 5 segundos. Finalmente se sumergió en agua y se procedió con la deshidratación y montaje sometiendo las laminillas a los baños de etanol y xilol que se muestran a continuación:

- Etanol 50% 5 minutos
- Etanol 70% 5 minutos
- Etanol 96% 5 minutos
- Etanol 100% 5 minutos

- Xilol – Etanol (1:1) 5 minutos
- Xilol I 5 minutos
- Xilol II 5 minutos

Los tejidos se montaron con Entellan (1.07961.0500; Merck) y las laminillas se dejaron secar por 24h para su posterior análisis.

5.7.4. Análisis morfométrico. Para la cuantificación de los eosinófilos o mastocitos, los campos microscópicos fueron fotografiados, y el número de células teñidas contadas en áreas de igual tamaño asignadas al azar. El resultado fue expresado como la media de 3 áreas contabilizadas por corte, analizando tres cortes por animal. La observación se realizó a un objetivo de 40x. Las áreas analizadas fueron de 40,000 μm^2 (Back y cols., 2012; Jang y cols., 2011; Kim y cols., 2012). Para medir el grosor de la epidermis, se realizaron diez mediciones al azar del grosor de la epidermis teñida con HyE en cada corte, analizando tres cortes seriados por rata (Shen y cols., 2014; Glatzer y cols., 2014).

Para el análisis de la expresión de AMPs y de filagrina se tomaron fotografías con un área de 69,000 μm^2 de tres campos aleatorios y se determinó el porcentaje del área inmunoreactiva en epidermis en relación al área total de epidermis analizada (Rivas-Santiago y col., 2008), utilizando el software AxioVision Rel. 4.8 acoplado al microscopio AxioPlan Carl Zeiss.

5.8. Concentración sérica de IgE. Con la finalidad de determinar la concentración sérica de IgE total, previo al sacrificio de los animales, éstos se anestesiaron con éter para extraer 1mL de sangre vía intracardiaca. Posteriormente, las muestras fueron procesadas para la obtención del suero centrifugándolas por 8 minutos a 2040.35 x g (Centrífuga Eppendorf Mod. 5415C). El suero se alicuotó en volúmenes de 60 μL y se almacenó a -20°C para su posterior análisis. Para la cuantificación de IgE sérica, se utilizó un estuche de ELISA tipo sándwich para IgE total de rata (Abcam, ab157736) de acuerdo a las

instrucciones del fabricante. Se trabajó con microplacas que tenían adherido un anticuerpo anti-IgE de rata. Se colocó en cada pocillo de la placa 100 μ L de suero previamente diluido (1:150) o 100 μ L de los estándares de IgE de rata (1, 2, 4, 8, 16 ng/mL). Se dejó incubar a temperatura ambiente por 60 minutos y se aspiraron y lavaron los pozos con la solución de lavado proporcionada por el fabricante. Pasado el tiempo se adicionaron a cada pocillo 100 μ L de anti-IgE marcada con peroxidasa diluida previamente (1:100). Se dejó incubar a temperatura ambiente y en oscuridad por 60 minutos. Se aspiraron y lavaron los pozos para eliminar el conjugado libre y en seguida se agregó el cromógeno 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB, solución proporcionada por el fabricante). Se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, se adicionó la solución de parada de la reacción (solución proporcionada por el fabricante) y se leyó la absorbancia de la placa a 450nm en un lector de ELISA (Microplate Reader, iMark, BioRad). Los valores de absorbancia de las muestras de suero se interpolaron en la curva (Figura 6) obtenida en el laboratorio con los estándares de IgE de rata proporcionados por el fabricante del estuche de ELISA.

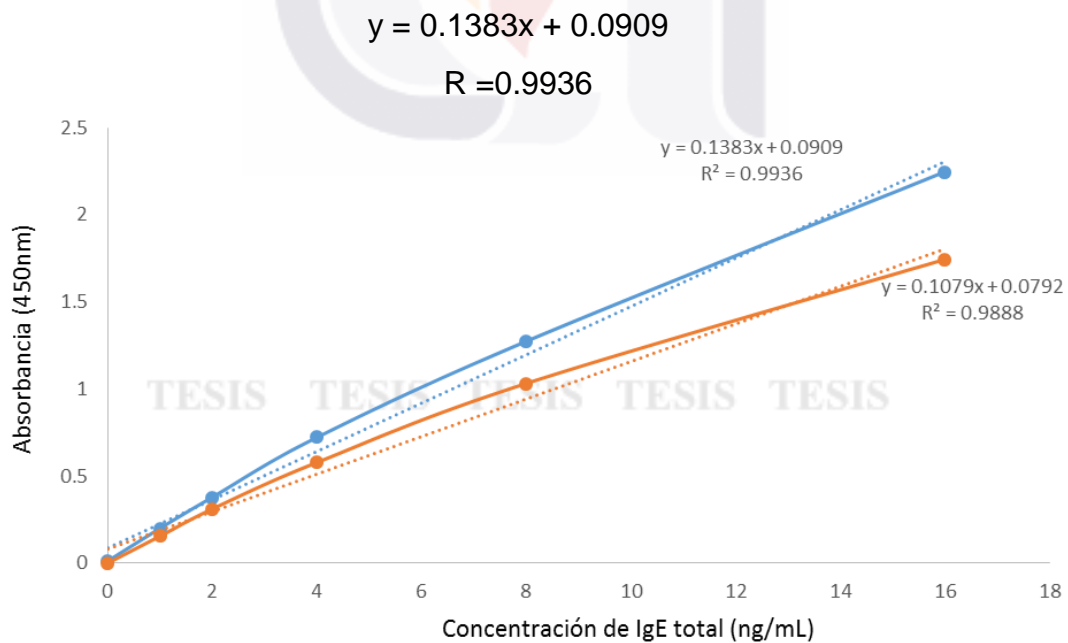


Figura 6. Curva de calibración de IgE total. En azul se muestra la curva de calibración realizada, en rojo la curva de calibración proporcionada por el fabricante.

5.9. Extracción de la fracción proteica de tejido de la oreja. Las orejas derechas de cada rata fueron extirpadas 24h después de la última aplicación de DNCB, y conservadas a -80°C hasta su procesamiento. El fragmento de tejido extraído con el sacabocados fue sumergido en nitrógeno líquido y posteriormente triturado en mortero. Se resuspendió con 500 μL de PBS y se colocó en un tubo eppendorf para centrifugarse a $417 \times g$ por 5 minutos a 4°C (HERMLE Z 383 K). Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 50 μL de solución de lisis RIPA (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, EGTA 1 mM, SDS 0.1%, Tritón X – 100 1%, Fluoruro de fenilmetasulfonil (PMSF) 1 mM, aprotinina 0.6 μM , leupeptina 2 μM , pH 8) y se dejó en agitación orbital (200 rpm) durante 30 minutos a 4°C . Se centrifugaron las muestras a $16,435 \times g$ por 20 minutos. El sobrenadante se llevó a alícuotas de 20 μL y se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

5.9.1. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford. Con la finalidad de cuantificar la proteína contenida en los extractos se realizó un ensayo de Bradford en microplaca, colocando 1, 2 y 4 μL de cada muestra o 10 μL de los estándares de albúmina sérica bovina (BSA; 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.16, 0,20 mg/mL) en cada pocillo y posteriormente se añadió a cada uno 200 μL de reactivo de Bradford (Azul Comassie G250 0.117mM, Etanol 50mL, Ácido Fosfórico 100mL, Agua c.b.p. 1000mL). Se leyó la absorbancia de la placa a 595 nm en un lector de ELISA (Microplate Reader iMark, BioRad). Los valores de absorbancia de las muestras se interpolaron en la curva obtenida con los estándares de BSA.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

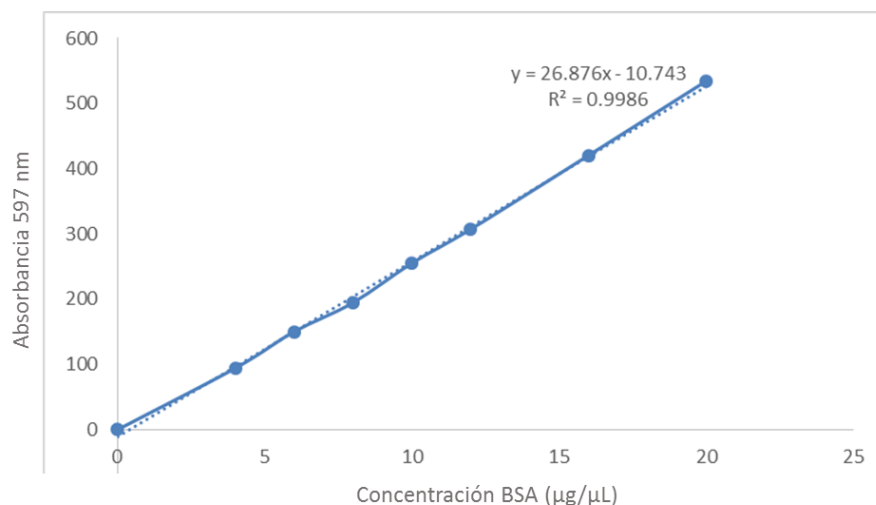


Figura 7. Curva de calibración de albúmina sérica bovina (BSA). Se muestra la curva de calibración realizada, usando albúmina sérica bovina como proteína de referencia.

5.10. Análisis de la expresión de proteínas por electroforesis e inmunotinción.

5.10.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Para la separación y caracterización de proteínas, se desarrolló la metodología propuesta por Laemmli (1970); donde se utilizó el sistema de electroforesis MiniProtean 3 de Bio-Rad, empleando geles de 8 x 7.3 cm y 0.75 cm de espesor a una concentración de 10% o 13.5% de SDS-poliacrilamida con capacidad para 10 muestras. La composición de los geles se muestra a continuación:

Tabla 5: Gel separador al 10%

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS	
Agua destilada	4.02 mL
Tris HCl pH 8.8 (1.5 M Trizma® Base, 0.014 M SDS)	2.5 mL
Acrilamida (30% acrialmida / 0.8% bisacrilamida)	3.33 mL
Persulfato de amonio (APS) 0.44 M	50 µL
N, N, N',N'-Tetrametilenetilendiamina (TEMED)	10 µL
Total	10 mL

Tabla 6: Gel separador al 13.5%

Agua destilada	2.85 mL
Tris HCl pH 8.8 (1.5 M Trizma® Base, 0.014 M SDS)	2.5 mL
Acrilamida (30% acrialmida / 0.8% bisacrilamida)	4.5 mL
Persulfato de amonio (APS) 0.44 M	50 µL
N, N, N',N'-Tetrametilenetilendiamina (TEMED)	10 µL
Total	10 mL

Tabla 7: Gel concentrador

Agua destilada	3.5 mL
Tris HCl pH 6.8 (0.5 M Trizma® Base, 0.014 M SDS)	5.0 mL
Acrilamida (30% acrialmida / 0.8% bisacrilamida)	1.3 mL
Persulfato de amonio (APS) 0.44 M	50 µL
N, N, N',N'-Tetrametilenetilendiamina (TEMED)	10 µL
Total	10 mL

Tabla 8: Solución para muestras

Tris HCl pH 6.8 (0.5 M Trizma® Base, 0.014 M SDS)	2.5 mL
SDS 0.35 M	4.0 mL
Glicerol	2.0 mL
Azul de bromofenol 0.0058 M	400 µL
β – mercaptoetanol	1.0 mL

Para la solución de corrida se utilizó 0.025 M Trizma® Base, 0.25 M glicina, 3.5 mM SDS, pH 8.3.

Las muestras analizadas se disolvieron de manera tal que no excedieran los 20 µg de proteína total en 20 µL de RIPA de acuerdo a las necesidades de cada ensayo. Posteriormente, el volumen se ajustó a 30 µL con la solución para muestras y se llevó a baño María en ebullición durante 5 minutos.

Para la electroforesis de involucrina, se cargaron las diferentes muestras en un gel al 10% en acrilamida junto a un marcador coloreado de peso molecular de amplio espectro, Amersham Full-Range Rainbow (GE Healthcare; pesos moleculares: 12kDa, rojo; 17kDa, azul; 24kDa, verde; 31kDa, naranja; 38kDa, azul; 52kDa, morado; 76kDa, amarillo; 102kDa, verde; 150kDa, rojo y 225kDa, azul). Para la detección del GMP se cargaron las diferentes muestras en un gel al 13% en acrilamida junto a un marcador coloreado BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen; pesos moleculares: 6, 15, 19, 26, 37, 49, 82, 115 y 180 kDa coloreados en azul y de 64 kDa coloreado en rojo). Finalmente la electroforesis se corrió a 80 V durante aproximadamente 90 minutos.

Una vez terminada la electroforesis, las fracciones proteicas se transfirieron a una membrana de polivinildieno fluorado (PVDF) (Millipore Corporation, Bedford, EUA) por dos horas a 200 mA con una solución de transferencia (0.024 M Trizma® Base, 0.186 M glicina, 4.1 M metanol). Posteriormente, se lavó la membrana en solución de transferencia y se dejó secar.

5.10.2. Inmunotinción de las membranas

Se sumergió la membrana en metanol absoluto para hidratarla y se bloquearon los sitios inespecíficos con leche en polvo al 5% en solución TBS (NaCl 0.5 M, Tris-HCl 0.02 M) por una hora en agitación orbital a temperatura ambiente.

Para la detección de involucrina se incubó la parte de membrana que contenía las proteínas con rango de PM de 52 a 76 kDa con el anticuerpo IgG1 de ratón anti-involucrina con reactividad en rata (PM 68 kDa; Abcam CAT No. Ab14504; Cambridge, UK) y para detectar la β - actina como proteína de referencia, se incubó la parte de la membrana que contenía las proteínas con rango de PM de 38 a 52 kDa con IgG de ratón anti – β - actina con reactividad en rata (PM 42 kDa; Sigma – Aldrich CAT No. A1978; St. Louis, MO, USA), diluidos 1:1000 en TBS con leche en polvo al 5% durante toda la noche a 4°C en agitación constante. En seguida se lavó la membrana una vez con agua destilada por 5 minutos, 2 con TBS a 0.2% -Tween 20 (TTBS) durante 10 minutos y 1 vez por 5 minutos con TBS. Después se incubó con el anticuerpo secundario: IgG de cabra anti-IgG de ratón unido a fosfatasa alcalina (Zymed CAT No. 81-6522, San Francisco, CA, EUA; dilución 1:5000), por dos horas a temperatura ambiente, agitación constante, y preparado en TBS con 5% de leche en polvo. Se hicieron dos lavados con TTBS de 15 minutos cada uno y cinco de 5 minutos, además uno con TBS de 5 minutos. El revelado de las membranas se realizó con una pastilla de sustrato de PA BCIP®/NBT (SIGMAFAST™; BCIP®/NBT Alkaline Phosphatase Substrate Código del producto: 1001106326; St. Louis, USA), disuelta en 10 mL de agua destilada. La reacción se detuvo después de 37 segundos, con agua destilada y la membrana se dejó secar para su posterior análisis. La cuantificación de las bandas proteicas se realizó por densitometría usando un sistema digital de análisis de imágenes (Bio Rad Quantity One 4.6.3 Basic).

Para la detección del GMP, se incubó la parte de la membrana que contenía las proteínas con rango de PM de 6 a 19 kDa con el anticuerpo IgG de conejo anti-GMP bovino [PM 7 y 14 KDa; anticuerpo producido en el laboratorio (Chávez y cols., 2008)] y para detectar la β - actina como control del ensayo, se incubó la parte de la membrana que contenía las proteínas con rango de PM de 26 a 49 kDa con una IgG de ratón anti – β - actina con reactividad en rata (PM 42 KDa; Sigma – Aldrich CAT No. A1978; St. Louis, MO, USA), diluidos 1:1000 en TBS con leche en polvo al 5% durante toda la noche a 4°C en agitación constante.

Los lavados se realizaron como se mencionó anteriormente y se incubó el anticuerpo secundario, IgG de conejo unido a peroxidasa de rábano picante (HRP; Sigma-Aldrich, CAT No. A0545; St. Louis, MO. USA; dilución 1:1000) o IgG de cabra anti IgG de ratón unido a peroxidasa (HRP) (Zymed CAT No. 81-6522, San Francisco, CA, EUA; dilución 1:1000) por dos horas a temperatura ambiente, agitación constante, en leche en polvo en TBS al 5%. Se lavaron las membranas y el revelado se realizó utilizando sustrato quimioluminiscente Clarity Western ECL (BioRad; California, EUA) y para la detección de señal se utilizó Micro Chemi 4.2 (DNR Bio Imaging Systems).

5.11. Análisis por PCR de expresión de citocinas en tejido.

5.11.1. Extracción de RNA.

La oreja derecha de cada rata fue extirpada 24 h después de la última aplicación de DNCB y un fragmento de tejido de 100 mg de la base de cada oreja fue procesadas con el kit SV Total RNA Isolation System (Promega; No Cat Z3100; Madison WI, USA) de acuerdo al protocolo del fabricante. Brevemente, a un tubo estéril de 2 mL se agregaron 175 μ L de solución de lisis de RNA (RLA: 4 M isotiocianato de guanidina, 0.01 M de tris pH 7.5) y el tejido de interés. Posteriormente se homogeneizo el tejido con ayuda del Tissue Tearor™ (Modelo 398, Biospec Products Inc.) en un baño de hielo. Se adicionaron 350 μ L de solución de dilución de RNA (sin dato de composición), se mezcló por inversión y se calentó a 70°C durante 3 min. Después se centrifugó a 16,000 x g por 10 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y le se agregaron 200 μ L de etanol al 95% para luego ser mezclado por inversión. La mezcla anterior se transfirió a una columna que contiene la membrana de silica donde se une el RNA, se centrifugó por un minuto y el eluido fue descartado. Se agregaron 600 μ L de solución de lavado de RNA (RWA: 60 mM de acetato de potasio, 10 mM de Tris-HCL pH 7.5, 60 % etanol) a la columna, se centrifugó por 1 min y se eliminó el

eluido. Se adicionaron 50 μL de una mezcla de reacción con DNAsa que contiene 40 μL de buffer central amarillo (yellow core buffer: 0.0225 M Tris pH 7.5, 1.125 M NaCl, 0.0025 % w/v colorante amarillo), 5 μL de cloruro de manganeso (0.09 M MnCl_2) y 5 μL de enzima DNasa I (sin dato de concentración) y se dejó incubar 30 min a temperatura ambiente. Después se agregaron 200 μL de solución de paro de DNasa (DNase stop solution: 5 M isotiocianato de guanidina, 10 mM de Tris-HCl pH 7.5), se centrifugó un minuto y se hicieron dos lavado con 600 y 250 μL de solución de lavado. Finalmente la columna se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 100 μL de agua libre de nucleasas, se dejó reposar verticalmente a temperatura ambiente durante 2 min y se centrifugó a 16,000 x g durante 2 min. El eluido se alicuotó y almacenó a -70°C para su uso posterior.

5.11.2. *Análisis y cuantificación de RNA total.*

Del RNA extraído se hizo una dilución 1:30 en agua libre de nucleasas y se midió la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Spectro UV (Velab, México). Se determinó la concentración de la muestra con la siguiente fórmula:

$$[\text{ng}/\mu\text{L}] = A_{260} \times \text{FD} \times 40$$

Donde: A_{260} = absorbancia de la muestra determinada a 260 nm

FD = factor de dilución (1:30)

40 = coeficiente de extinción molar del RNA (1 unidad A_{260} de RNA de cadena sencilla corresponde a $40\mu\text{g}/\text{mL}$).

La pureza del RNA se determinó mediante la relación A_{260}/A_{280} , considerándose como valor deseable aquellas muestras con relaciones mayores a 1.8, mientras que la integridad fue mediante electroforesis en agarosa al 3% (Promega, No. Cat. V3125; Madison WI, USA) en buffer TBE (89 mM Tris, 89 mM

ácido bórico, 2 mM EDTA pH 8) al 0.5x a 120 V durante 30 minutos, utilizando una cámara de electroforesis horizontal (Owl Easycast™ B2, Thermo Scientific). Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega; No Cat G210A; Madison WI, USA) y se tiñó con bromuro de etidio 0.5 µg/mL hasta que el marcador de peso molecular fue visible bajo transiluminador con luz ultravioleta.

5.11.3. *Transcripción inversa.*

Una vez cuantificado el RNA, para cada muestra se montó la siguiente reacción de retrotranscripción con el kit RETROscript® (Ambion; No. Cat AM1710; Texas, USA):

Tabla 9. Condiciones de la mezcla de reacción para la síntesis de cDNA

Componente	Cantidad
RNA total	1 µg
Oligo dT (50 µM)	1 µL
Buffer RT 10×	1 µL
dNTPs (2.5 mM cada uno)	2 µL
Inhibidor de RNAsa (10 U/µL)	0.5 µL
MMLV-RT (100 U/µL)	0.5 µL
Agua libre de nucleasas	cpb 10 µL

Las reacciones fueron sometidas al siguiente programa de un termociclador Eppendorf® Mastercycler Personal (Eppendorf):

Tabla 10. Protocolo del Termociclador para la síntesis de cDNA.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	44°C	1 h
2	92°C	10 min
3	4°C	∞

5.11.4. PCR en tiempo real.

El cDNA se diluyó 1:2 con agua libre de nucleasas y se estableció una PCR con las siguientes condiciones:

Tabla 11. Condiciones de la mezcla de reacción de PCR en tiempo real.

Componente	Cantidad
Solución Go Taq qPCR 2x	5 µL
Oligo - Fw (5 µM)	0.5 µL
Oligo - RV (5 µM)	0.5 µL
cDNA	50 ng
Agua libre de nucleasas	cpb 10 µL

Se establecieron las reacciones necesarias para la determinación de cada gen a analizar (Tabla 12) utilizando un termociclador Eco Illumina (Illumina, San Diego, CA, USA), con las condiciones mostradas en la tabla 13.

Tabla 12. Secuencia de oligonucleótidos para la determinación de la expresión de cada gen.

Citocina	Oligonucleótido Fw	Oligonucleótido Rv	Número de Acceso
<i>IL-4</i>	CACCTTGCTGTCACCCTGTT	ACATCTCGGTGCATGGAGTC	NM_201270.1
<i>IL-5</i>	CAGTGGTCAAAGAGACCTTG	GTATGTCTAGCCCCTGAAAG	NM_021834.1
<i>IL-13</i>	ATCGAGGAGCTGAGCAACAT	ATCCGAGGCCTTTTGGTTAC	NM_053828.1
<i>IFN-γ</i>	GCCTAGAAAGTCTGAAGAAC	GAGATAATCTGGCTCTCAAG	NM_138880.2
<i>IL-10</i>	CACCTTGCTGTCACCCTGTT	ACATCTCGGTGCATGGAGTC	NM_012854.2
<i>TGF-β</i>	CAGTGGTCAAAGAGACCTTG	GTATGTCTAGCCCCTGAAAG	NM_021578.2
<i>β-actina</i>	GTCGTACCACTGGCATTGTG	GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA	NM_031144.3

Tabla 13. Condiciones de PCR en tiempo real.

Paso	Temperatura, tiempo
1. Desnaturalización inicial	95°C, 3:00 min
2. Desnaturalización	95°C, 30 seg
3. Hibridación	50°C, 30 seg
4. Elongación	72°C, 15 seg
Repetición de pasos 2, 3, 4 por 40 ciclos	
5. Elongación final	72°C, 5:00 min

La cuantificación relativa se determinó con el método $\Delta\Delta Ct$, usando β -actina como gen de referencia para la normalización:

$$\text{Expresión Relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{tratamiento}} - \Delta Ct_{\text{control}}$$

$$\Delta Ct_{\text{tratamiento}} = Cq_{\text{gen de interés del tratamiento}} - Cq_{\text{gen constitutivo del tratamiento}}$$

$$\Delta Ct_{\text{control}} = Cq_{\text{gen de interés del control}} - Cq_{\text{gen constitutivo del control}}$$

5.12. Tipo de Análisis e Interpretación de la Información Obtenida. Los datos se presentaron como la media \pm error estándar de la media. A los datos obtenidos se les aplicó pruebas de ANOVA (t de Student no pareada de dos colas para comparaciones entre pares, Bonferroni para comparar pares seleccionados de columnas en un estudio de comparación múltiple, Dunnett para comparaciones múltiples de datos pareados respecto a un mismo control), utilizando el programa estadístico GraphPad Prism (versión 5.0). Se considerarán diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

6. RESULTADOS

6.1. Caracterización del modelo experimental de DA en rata.

6.1.1. Reacción inflamatoria cutánea

Uno de los signos clínicos que definen la DA es la inflamación del tejido afectado. Esto se debe a que a nivel subcutáneo se forman placas de líquido (edema), hay un infiltrado de células inflamatorias en dermis y un engrosamiento de la epidermis e hipertrofia de la capa superior de la misma (Bieber, 2008).

Previamente a la sensibilización con DNCB se midieron las orejas de los animales para determinar el grosor normal de las orejas de las ratas, no encontrándose diferencias entre los valores obtenidos en los animales control y sensibilizados con DNCB en el día 0, para ninguno de los tres protocolos desarrollados. El grosor de la oreja de una rata oscila entre 0.33 a 0.37 mm, por lo que al restar al grosor de la oreja derecha el de la izquierda, tal y como se muestra en las figuras 8, 9 y 10, se registraron valores de edema en el día 0 cercanos al 0. Esto nos indica que para la variable a evaluar no hay diferencias en un inicio entre los dos grupos de estudio (C y DNCB).

En el primer protocolo se observó que en los animales del grupo DNCB, durante las aplicaciones del hapteno los días 7, 14 y 21, el grosor de las orejas fue incrementando con el tiempo y el número de retos, siendo significativamente mayor en todos los tiempos analizados que el de los animales del grupo control. En los animales controles no se registraron cambios en el grosor de las orejas a lo largo del tiempo. En el grupo DNCB, tras el reto del D7 se observó que el edema máximo de la oreja se presentó a las 6h ($p < 0.001$) después de aplicado el hapteno, manteniéndose hasta las 24h. En el día 14, el pico máximo de inflamación se dio a 1h ($p < 0.05$), al igual que en el día 21 ($p < 0.001$), observándose que la inflamación cede a partir de las 6h (0h vs 6h y 24h; ns). Los

resultados de este primer protocolo mostraron que en el día 7 la respuesta inflamatoria se inició a la hora pero se mantuvo hasta 24h después del reto, lo que indica que se desarrolló una respuesta de hipersensibilidad inmediata seguida de una retardada involucrando por lo tanto una respuesta celular, en la que se sabe que juegan un papel muy importante los linfocitos T principalmente del perfil Th1. En este día 7 la respuesta inflamatoria fue bifásica Th2/Th1, tal y como se presenta en la DA. Posteriormente, en los días 14 y 21, la inflamación fue únicamente aguda sin una respuesta retardada, manifestándose las características temporales de la hipersensibilidad inmediata y con ausencia de respuesta Th1.

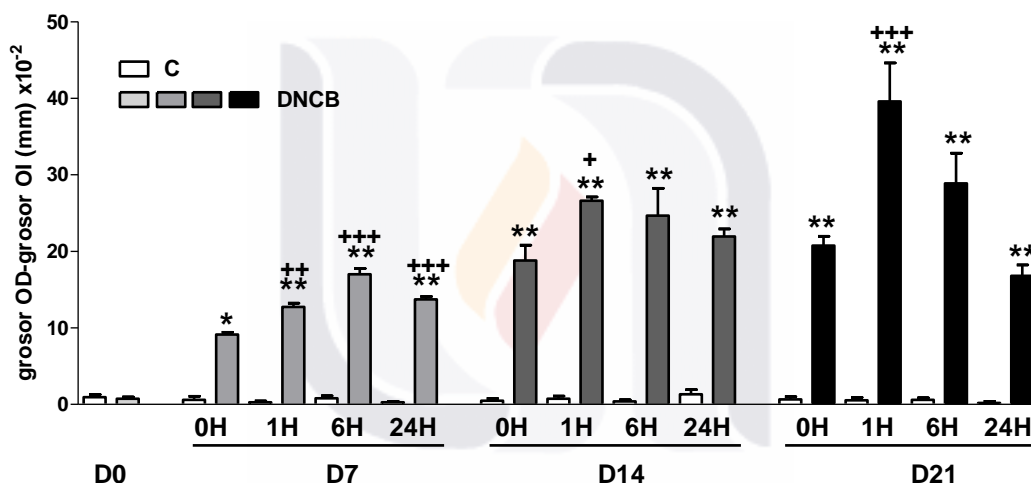


Figura 8: Intensidad del proceso inflamatorio en orejas de ratas sensibilizadas y re-sensibilizadas tópicamente (oreja) con DNCB (protocolo 1). El DNCB se aplicó en ambos lados de la oreja 3 veces por semana durante 3 semanas (grupo DNCB). Al grupo control (C) se le aplicó a los mismos tiempos únicamente el vehículo en que se preparó el DNCB. Los datos muestran la media \pm SEM; DNCB (n=5) y C (n=5). * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$ vs su respectivo C (Bonferroni multicomparativa). + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$; +++ $p < 0.001$ vs 0h cada día (Dunnet). OD, oreja derecha; OI, oreja izquierda.

En el caso del protocolo 2, tras el reto con el DNCB el día 16, el pico máximo de inflamación se observó a partir de la hora tras la aplicación, manteniéndose constante y sin cambios significativos hasta las 24 horas (DNCB 1h vs 6h y 24h, ns). En el día 22 el valor máximo de inflamación se registró a las 6h tras la aplicación del DNCB y se volvió a mantener constante hasta las 24h

(DNCB 6h vs 24h, ns). En el día 36 de aplicación, los animales del grupo DNCB incrementaron hasta 15 veces el grosor de sus orejas respecto al de los animales controles a la hora y se mantuvo constante hasta las 6h ($p < 0.001$). Veinticuatro horas tras el reto, las orejas de los animales mostraron un edema 24.21 veces mayor que antes del mismo, sin embargo esta diferencia ya no fue significativa (D36 0h vs 24h, ns).

Estos resultados muestran una respuesta aguda seguida de una retardada o de hipersensibilidad celular durante los reto con el DNCB en el desarrollo del protocolo 2, reproduciéndose la respuesta inflamatoria bifásica Th2/Th1 característica de la DA. En el D36 hubo un predominio de la respuesta aguda respecto a la retardada.

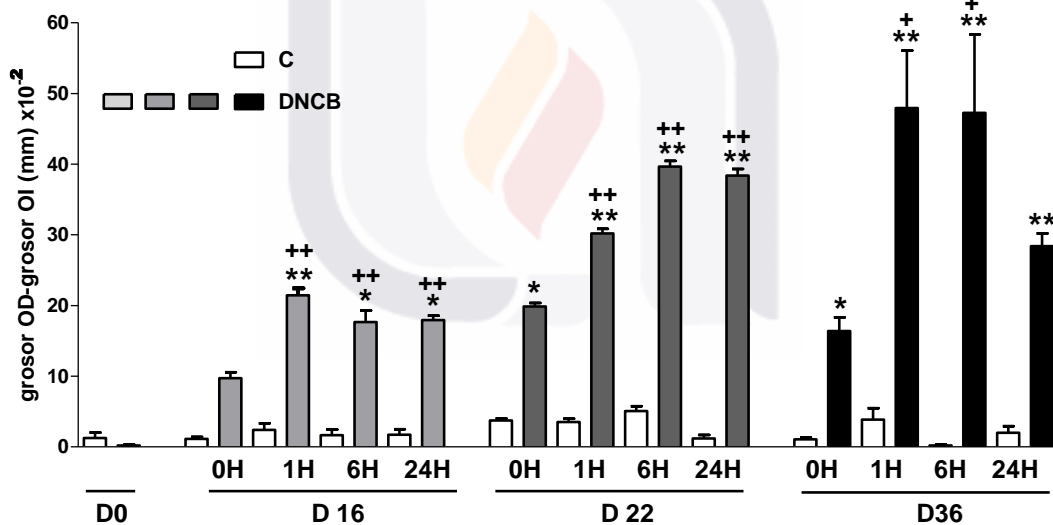


Figura 9: Efecto del DNCB en el proceso inflamatorio de la oreja de ratas sensibilizadas i.m. con DNP-BSA y re-sensibilizadas tópicamente con DNCB en oreja (protocolo 2). El DNCB se aplicó en ambos lados de la oreja los días 14, 16, 18, 20, 22 y 36 (grupo DNCB). Al grupo control (C) se le aplicó a los mismos tiempos únicamente el vehículo en que se preparó el DNCB. Los datos muestran la media \pm SEM; DNCB (n=5) y C (n=5). * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$ vs su respectivo C (Bonferroni multicomparativa). + $p < 0.01$; ++ $p < 0.001$ vs 0h cada día (Dunnet). OD, oreja derecha; OI, oreja izquierda.

Por otra parte, en el proceso inflamatorio del protocolo 3, tras el reto del D8 únicamente a las 6h hubo un ligero incremento en el grosor de las orejas de los animales a los que se les aplicó el DNCB con respecto a su control ($p < 0.05$). Sin

embargo, no hubo diferencia significativa entre el grosor de las orejas de los animales del grupo DNCB a los diferentes tiempos analizados respecto al tiempo 0. Esto indica que la aplicación del DNCB en el día 8 tras la sensibilización no induce una respuesta inflamatoria entre la hora y las 24h posteriores al reto. En el día 14, a todos los tiempos analizados, los animales del grupo DNCB presentaron un grosor significativamente mayor al de los animales del grupo control. El pico máximo de inflamación se observó a la hora posterior al reto ($p < 0.001$), disminuyendo a las 6h ($p < 0.01$) y cediendo a las 24h con respecto a la hora 0. Estos resultados muestran que es hasta el día 14 tras la sensibilización que en este protocolo se inicia una respuesta inflamatoria en las orejas de los animales tras el reto con el DNCB, y la temporalidad de aparición del edema demuestra que es una respuesta aguda de hipersensibilidad inmediata. Sin embargo, no se muestra una respuesta de hipersensibilidad retardada en ninguno de los días de reto con el DNCB.

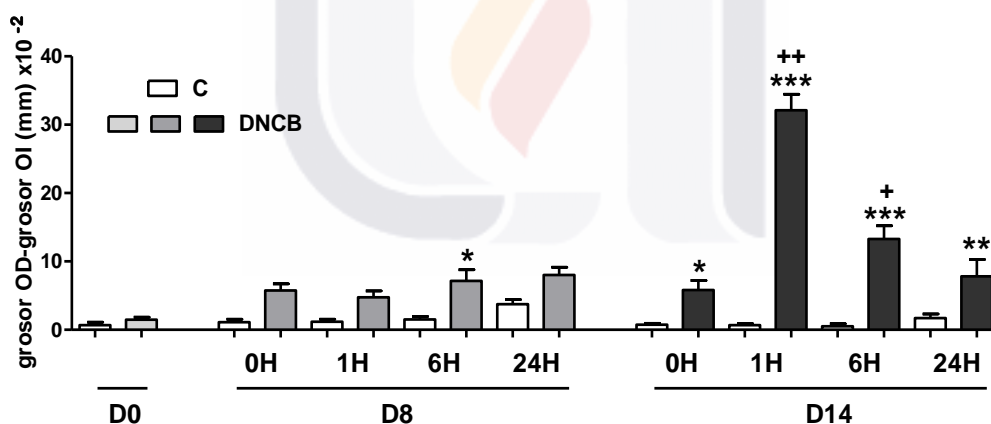


Figura 10: Efecto del DNCB en el proceso inflamatorio de la oreja de ratas sensibilizadas tópicamente en abdomen y re-sensibilizadas tópicamente en oreja (protocolo 3). El DNCB se aplicó en ambos lados de la oreja los días 5, 8, 11 y 14 (grupo DNCB). Al grupo control (C) se le aplicó a los mismos tiempos únicamente el vehículo en que se preparó el DNCB. Los datos muestran la media \pm SEM; DNCB (n=5) y C (n=5). * $p < 0.01$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs su respectivo C (Bonferroni multicomparativa). + $p < 0.01$; ++ $p < 0.001$ vs 0h cada día (Dunnet). OD, oreja derecha; OI, oreja izquierda.

Con la finalidad de determinar si hubo un cambio en el peso de las orejas de las ratas como consecuencia de la intensidad del proceso inflamatorio

generado, al término del tratamiento se sacrificaron los animales con sobredosis de anestesia y se extrajeron porciones idénticas de las orejas con ayuda de un sacabocados. Se observó que el peso de las orejas de los animales del grupo DNCB fue significativamente mayor que el de los controles ($p < 0.001$), tanto en el protocolo 1 como en el 2; no así en el protocolo 3, donde no hubo diferencia significativa entre grupos (figura 11). En el protocolo 2, la intensidad del proceso inflamatorio que generó la aplicación repetida del hapteno en los animales fue el doble de la que se desarrolló en el protocolo 1.

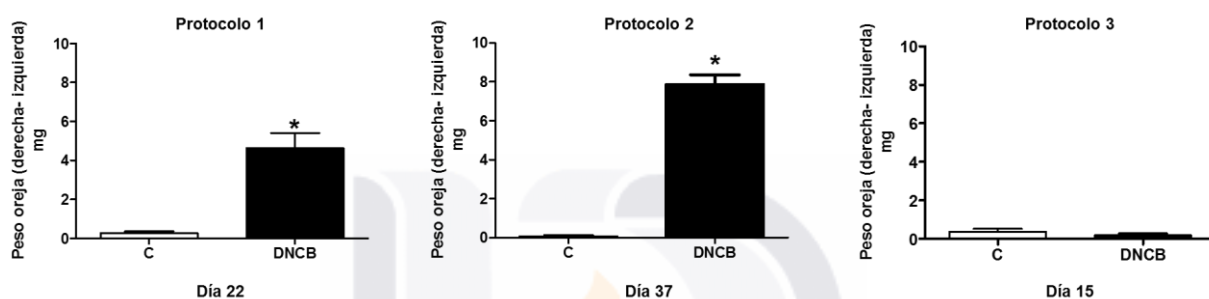


Figura 11: Efecto del DNCB en el peso de las orejas de las ratas sensibilizadas. Al término del protocolo se sacrificaron los animales y se extrajo el tejido de ambas orejas en proporciones iguales con un sacabocados. Los datos muestran la media \pm SEM; DNCB (n=5) y C (n=5). * $p < 0.001$; DNCB vs su respectivo C (*t*-student).

6.1.2. Análisis de los eventos de rascado en los animales.

El prurito es una marca distintiva de la DA y se genera como resultado del engrosamiento de la epidermis y de la acción de mediadores liberados como histamina, citocinas y neuropéptidos (Kim y cols., 2012; Civelek, 2011; Kabashima, 2013). Una forma de evaluar la intensidad del prurito en animales de experimentación es analizar eventos de rascado.

Para ello se contabilizaron los eventos de rascado en los animales de ambos grupos en los tres protocolos de DA experimental (figura 12). En el protocolo 1, se observó que hubo un aumento significativo en los eventos de rascado de los animales del grupo DNCB desde el primer día de aplicación del

hapteno (D0, etapa de sensibilización) y hasta el día 21, comparando con respecto al grupo control, siendo éste incremento de 23.2, 35.2, 26.25 y 17 veces, para los días 0, 7, 14 y 21 respectivamente. En el caso del protocolo 2, el aumento en los eventos de rascado en los animales del grupo DNCB se dio a partir del segundo día reto (D16) ($p < 0.001$), con 85.2 veces más que el control, manteniéndose el día 22 con 82.8 veces y disminuyendo el día 36 con 64 veces. De igual manera, el aumento de los eventos de rascado en el protocolo 3 se dio a partir de la segunda exposición al DNCB (D8; $p < 0.001$), con un incremento de 51 veces, aumentando el día 14 con 71 veces más frecuencia de rascado. Que el incremento de los eventos de rascado en los protocolos 2 y 3 se diera a partir del segundo día de análisis se debe a que la sensibilización se hizo en zonas diferentes a la oreja (protocolo 2, vía i.m.; protocolo 3 vía cutánea abdominal) y los eventos de rascado se definieron como la serie de uno o más rascados realizados por la pata trasera dirigida hacia el sitio de aplicación, considerado en este trabajo como la oreja (Nojima y Carstens, 2003; Back 2012). De los tres protocolos el que generó un prurito de mayor intensidad en los animales fue el 2.

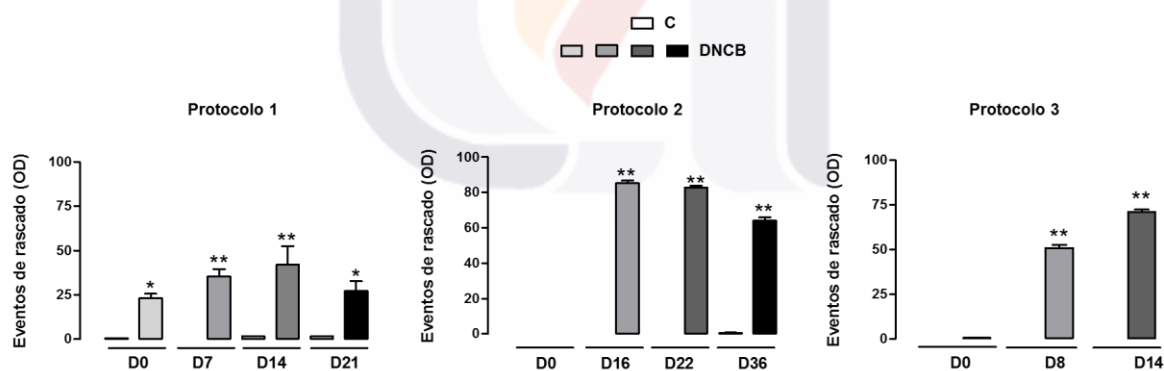


Figura 12: Eventos de rascado en oreja derecha de ratas sensibilizadas. Durante los días reto de cada protocolo, se grabó el comportamiento de las ratas durante los 10 minutos posteriores a la aplicación del alérgeno y se contabilizaron los eventos de rascado de los grupos DNCB y sus respectivos C. Los datos muestran la media \pm SEM; DNCB (n=5) y C (n=5). * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$ vs su respectivo C (Bonferroni multicomparativa). OD, oreja derecha.

6.1.3. Histopatología de las lesiones cutáneas

Los cambios celulares en la piel con DA incluyen una marcada infiltración de eosinófilos, una hiperplasia de mastocitos y una hipertrofia en la epidermis (Inagaki y cols., 2006). Con la finalidad de determinar estos cambios celulares en la zona de aplicación del DNCB, las orejas fueron extirpadas 24h después de la última aplicación, se fijaron en formalina y se embebieron en parafina.

En las figuras 13A se muestran imágenes representativas de las tinciones de H&E realizadas en cortes de tejido de oreja de animales controles y tratados con DNCB. Mediante esta tinción los eosinófilos se identificaron en la dermis por su morfología clásica con núcleos bilobulados o en forma de dona y los gránulos teñidos de color anaranjado (Wegmann, 2008). En relación al conteo de eosinófilos (Figura 13B), en las lesiones con DA de los grupos DNCB de los tres protocolos se observó un infiltrado de eosinófilos significativamente mayor, que en los grupos controles. Sin embargo, este aumento en el número de eosinófilos fue mayor en el protocolo 2 (19.4 veces) respecto a los protocolos 1 (9.2 veces) y 3 (5.5 veces).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

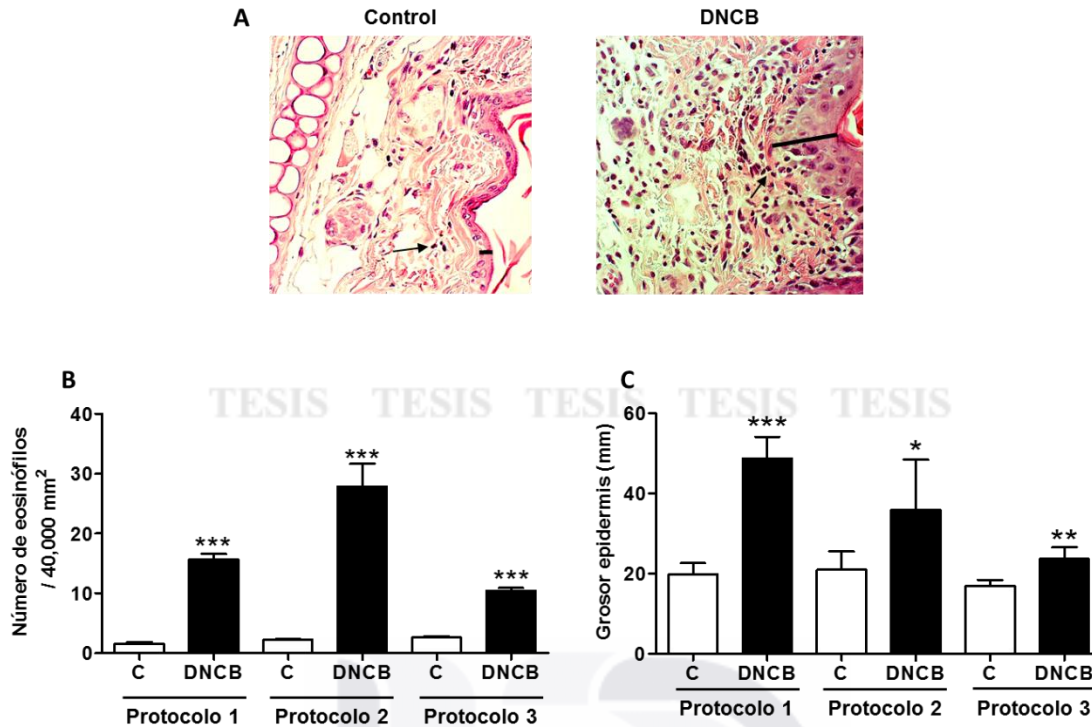


Figura 13: Conteo de eosinófilos en dermis y grosor de epidermis de tejido cutáneo (oreja) de animales con DA. A, Imágenes de tejido cutáneo (oreja) teñidas con HyE de un animal del grupo control y un animal del grupo DNCB del protocolo 2. Las líneas marcan el grosor de la epidermis. Las flechas marcan a los eosinófilos. Imágenes a 400x. B, Análisis del número de eosinófilos por unidad de área. C, Análisis del grosor de la epidermis. Los datos muestran la media \pm SEM; DNCB (n=5) y C (n=5). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$ vs su respectivo C; (*t*-Student).**

Utilizando esta misma tinción de HyE se pudo medir el grosor de la epidermis, región más externa de la piel, en la que se observó con una coloración más intensa por estar constituida por varias capas compactadas de queratinocitos (Tang y Bhushan, 2010). Como se puede observar en la figura 13 C, los animales de los grupos DNCB en los tres protocolos mostraron valores de grosor de epidermis significativamente mayores a los de los animales del grupo control. Así, los animales del grupo DNCB del protocolo 2 tuvieron un grosor de epidermis 17 veces mayor al de su grupo control, en comparación del grupo DNCB del protocolo 1 que fue 2.45 veces mayor a su control y del grupo DNCB del protocolo 3, que fue 1.4 veces mayor respecto a su control.

Con respecto a los mastocitos, la figura 14A muestra imágenes de las tinciones de azul de toluidina realizadas en cortes de tejido de oreja de animales controles y tratados con DNCB. Los mastocitos se identificaron en la dermis como las células azul toluidina positivas. Al contabilizarlos, se observó un incremento significativo en el número de los mismos en los animales con DA, respecto a los controles, siendo este incremento mayor para el protocolo 2 (2.36 veces) en comparación con los protocolos 1 (1.9 veces) y 3 (1.3 veces).

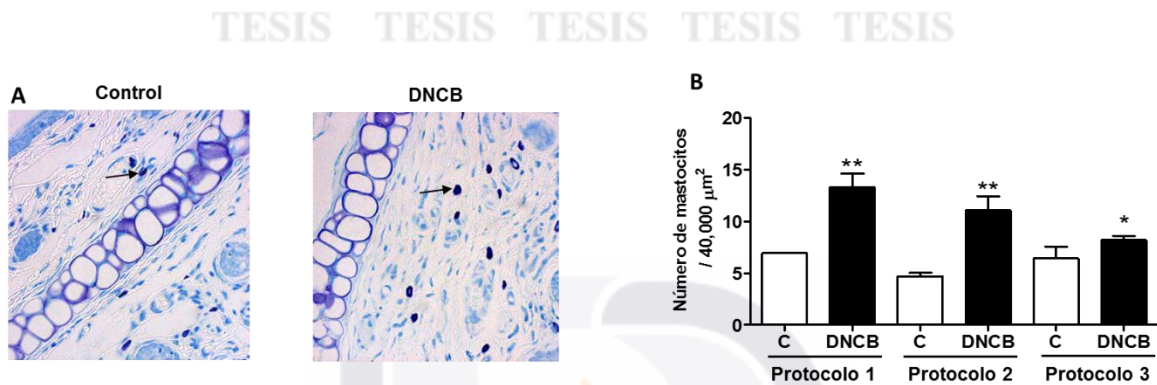


Figura 14: Mastocitos en dermis de tejido cutáneo (oreja) de animales con DA. A, Imágenes de tejido cutáneo (oreja) teñidas con azul de toluidina de un animal control y un animal del grupo DNCB del protocolo 2. Las flechas marcan los mastocitos. Imágenes a 400x. B, Análisis del número de mastocitos por unidad de área. Los datos muestran la media \pm SEM; DNCB (n=5) y C (n=5). *p<0.01; **p<0.001 vs su respectivo C (t-Student).

6.2. Efecto del GMP sobre los signos clínicos asociados a la dermatitis atópica.

6.2.1. Efecto del GMP administrado vía oral sobre el proceso inflamatorio en la DA.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Previamente a la sensibilización, se midieron las orejas de los animales para determinar si el grosor de las orejas de las ratas entraba dentro del rango obtenido en los protocolos de caracterización, obteniéndose valores semejantes que oscilaron entre 0.33 a 0.37 mm. De nuevo al restar al grosor de la oreja

derecha el de la izquierda, se registraron valores de edema en el día 0 cercanos al 0 para todos los grupos, tal y como se muestra en la figura 15.

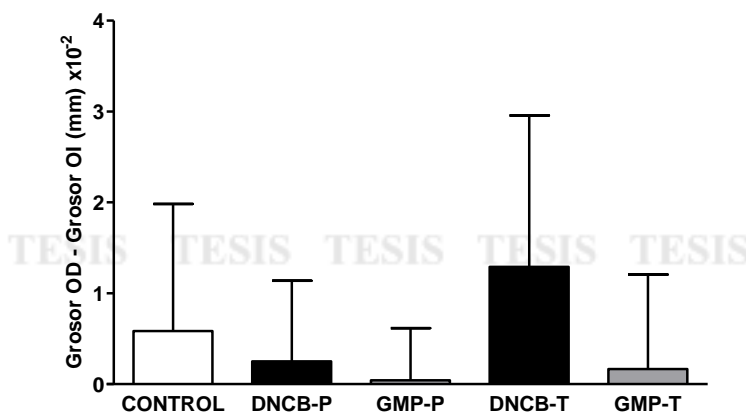


Figura 15. Efecto del GMP vía oral sobre el grosor de las orejas de las ratas en el día cero (D0). Los valores se representan como la diferencia entre el grosor de la oreja derecha (OD) y la oreja izquierda (OI). Grupos: Control (n=8), sensibilizado con DNCB pre-tratado con agua (DNCB-P, n=7), sensibilizado con DNCB pre-tratado con GMP (GMP-P, n=8), sensibilizado con DNCB tratado con agua (DA-T, n=8) y sensibilizado con DNCB tratado con GMP (GMP-T, n=8). Los datos muestran la media \pm SEM. Diferencias no significativas entre los grupos (Bonferroni multicomparativa).

En el día 16 (Figura 16), antes de reto con el DNCB, solamente los grupos GMP-P y DNCB-T mostraron un grosor de la oreja significativamente superior al de los controles, sin embargo, ésta diferencia fue de 0.03 y 0.04 mm respecto al control. A 1, 6 y 24 horas tras la aplicación del DNCB, el proceso inflamatorio en las orejas de los animales sensibilizados con DNCB y que recibieron agua (DNCB-P y DNCB-T) fue significativamente mayor al de los animales controles, aumentando entre 0.15 y 0.10 mm el grosor de sus orejas. El pre-tratamiento con GMP (GMP-P) no modificó la intensidad del proceso inflamatorio respecto al observado en las orejas de los animales sensibilizados sin pre-tratamiento (DNCB-P). A este tiempo todavía no se iniciaba con la administración del GMP al grupo tratado (GMP-T).

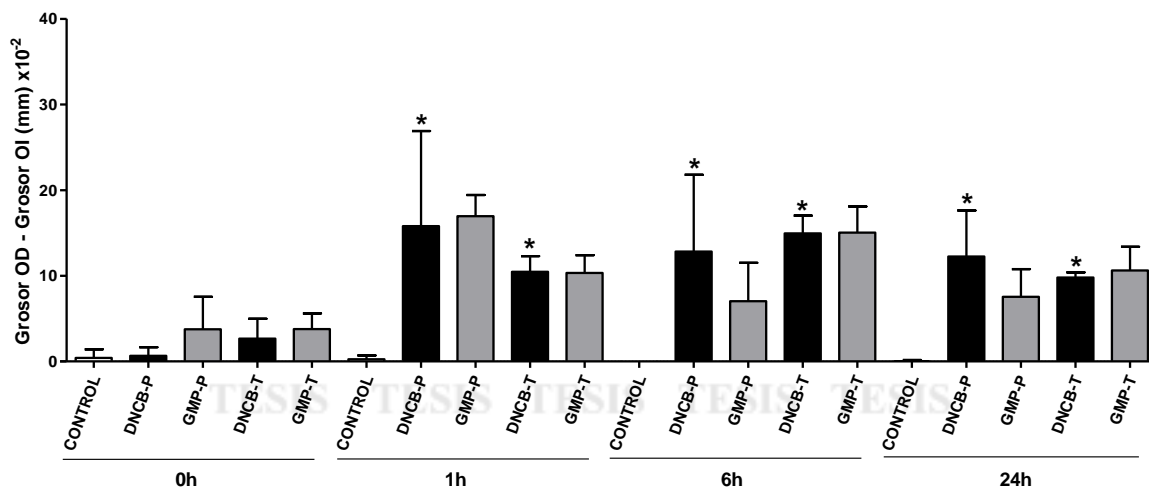


Figura 16: Efecto del GMP vía oral sobre el grosor de las orejas de ratas sensibilizadas con DNCB, y tratadas o no con GMP, analizado el día 16 del protocolo. Los valores se representan como la diferencia entre oreja derecha (OD) y oreja izquierda (OI). Grupos: Control (n=8), sensibilizado con DNCB pre-tratado con agua (DNCB-P, n=7), sensibilizado con DNCB pre-tratado con GMP (GMP-P, n=8), sensibilizado con DNCB tratado con agua (DNCB-T, n=8) y sensibilizado con DNCB tratado con GMP (GMP-T, n=8). *p<0.001 vs C en cada tiempo. Los datos muestran la media ± SEM (Bonferroni multicomparativa).

En el día 22 (Figura 17), desde antes de aplicar el DNCB (0h) los animales sensibilizados con DNCB y que recibieron agua (DNCB-P, DNCB-T) mostraron sus orejas inflamadas, reportando 0.41 y 0.34 mm más de grosor que los animales controles. A 1, 6 y 24 horas tras la aplicación del alérgeno se observó el mismo efecto, siendo el proceso inflamatorio mayor a la hora, con incrementos de 0.70 y 0.56 mm en las orejas de los grupos DNCB-P y DNCB-T respectivamente, en relación al control. Por otro lado, desde antes de aplicar el DNCB los animales pre-tratados con GMP mostraron una disminución del 82.93% en el proceso inflamatorio en la oreja, mismo que se siguió observando a 1, 6 y 24 horas, con reducciones de un 85.17, 61.15 y 84.9% respectivamente. Para los animales del grupo GMP-T, en el día 22 todavía no se iniciaba con el tratamiento con GMP, por lo que los procesos inflamatorios de sus orejas no muestran disminuciones respecto al del grupo tratado con agua (DNCB-T).

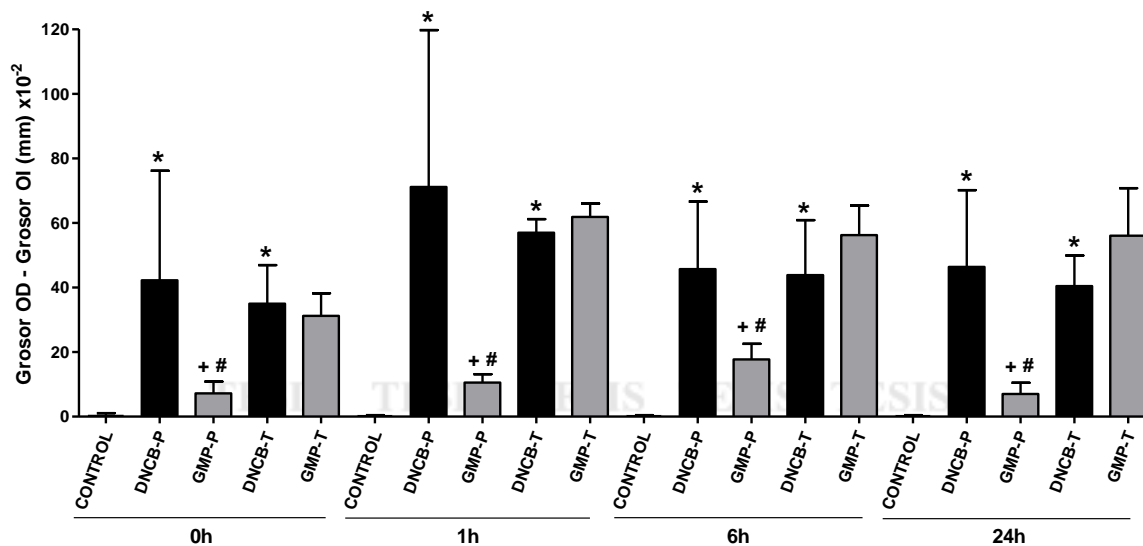


Figura 17: Efecto del GMP vía oral sobre el grosor de las orejas de ratas sensibilizadas con DNCB, y tratadas o no con GMP, analizado el día 22 del protocolo. Los valores se representan como la diferencia entre oreja derecha (OD) y oreja izquierda (OI). Grupos: Control (n=8), sensibilizado con DNCB pre-tratado con agua (DNCB-P, n=7), sensibilizado con DNCB pre-tratado con GMP (GMP-P, n=8), sensibilizado con DNCB tratado con agua (DNCB-T, n=8) y sensibilizado con DNCB tratado con GMP (GMP-T, n=8). *p<0.001 vs C; +p<0.001 vs DNCB-P en cada tiempo; GMP-T vs DNCB-T ns; #p<0.001 vs respectivo GMP-T en cada tiempo. Los datos muestran la media ± SEM (Bonferroni multicomparativa).

En el día 36 (Figura 18), desde antes de aplicar el DNCB (0h) los animales sensibilizados que recibieron agua (DNCB-P, DNCB-T) mostraron sus orejas inflamadas, reportando 0.15 y 0.23 mm más de grosor que los animales controles. Se observa que dicho efecto se mantiene a lo largo de 1, 6 y 24 horas tras la aplicación del DNCB, siendo mayor a la hora, con incremento de 0.41 y 0.48 mm en las orejas de los grupos DNCB-P y DNCB-T respectivamente, en relación al control. Por otra parte, desde antes de aplicar el DNCB los animales sensibilizados pre-tratados con GMP (GMP-P) mostraron una disminución del 95.6% en el proceso inflamatorio en la oreja, mismo que se siguió observando a 1, 6 y 24 horas, con reducciones de un 99.4, 93.98 y 85.89% respectivamente. Para los animales del grupo GMP-T, respecto al grupo DNCB-T, se observó una disminución del 54.55% en el proceso inflamatorio desde las 0h, manteniéndose a 1, 6 y 24 horas, con una disminución de 47.16, 49.41 y 34.06%, respectivamente.

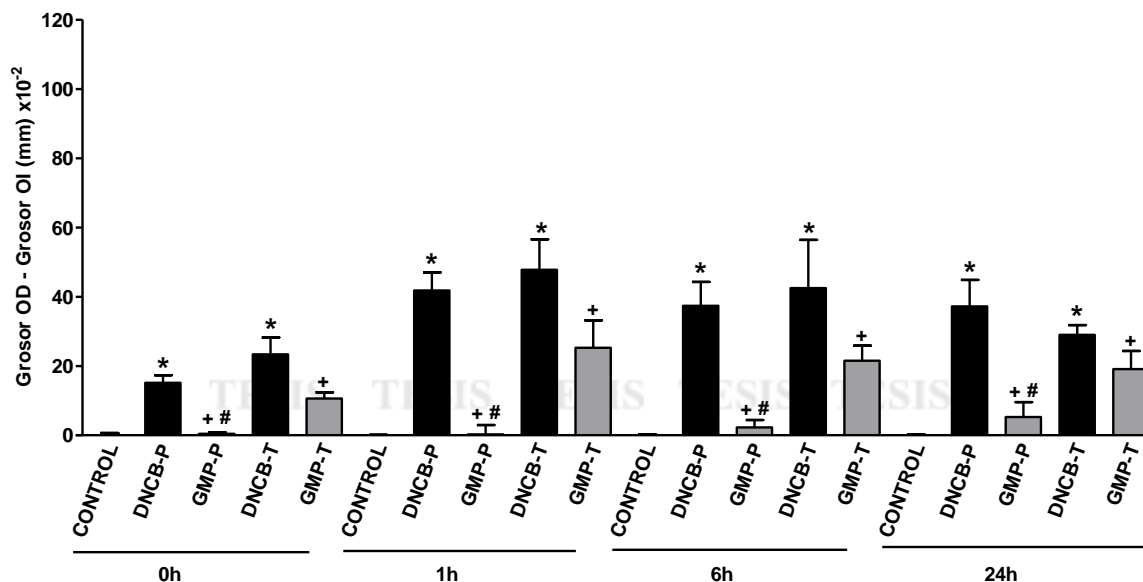


Figura 18: Efecto del GMP vía oral sobre el grosor de las orejas de ratas sensibilizadas con DNCB, y tratadas o no con GMP, analizado el día 36 del protocolo. Los valores se representan como la diferencia entre oreja derecha (OD) y oreja izquierda (OI). Grupos: Control (n=8), sensibilizado con DNCB pre-tratado con agua (DNCB-P, n=7), sensibilizado con DNCB pre-tratado con GMP (GMP-P, n=8), sensibilizado con DNCB tratado con agua (DNCB-T, n=8) y sensibilizado con DNCB tratado con GMP (GMP-T, n=8). *p<0.001 vs C; +p<0.001 vs respectivo DNCB en cada tiempo; #p<0.001 vs respectivo GMP-T en cada tiempo. Los datos muestran la media ± SEM (Bonferroni multicomparativa).

Como ya se demostró en la caracterización del modelo de DA experimental, otra manera de evaluar cambios en el proceso inflamatorio asociado a la patología es analizar variaciones en el peso de las orejas de las ratas con DA, tratadas o no con GMP. Para ello, en el día 37 se sacrificaron los animales con sobredosis de anestesia y se extrajeron porciones idénticas de las orejas con ayuda de un sacabocados. Se observó que el peso de las orejas de los animales del grupo DNCB-P y DNCB-T fue 6.64 y 8.05 veces mayor que el de los controles, respectivamente (Figura 19). Sin embargo, cuando los animales fueron previamente tratados con GMP (GMP-P), hubo una disminución del edema del 97.03%, mostrando valores de peso semejantes a los del grupo control. De igual forma, los animales tratados con GMP después de inducir la DA (GMP-T) mostraron una disminución del 39.87% en el edema de sus orejas respecto al grupo sin tratamiento (DNCB-T).

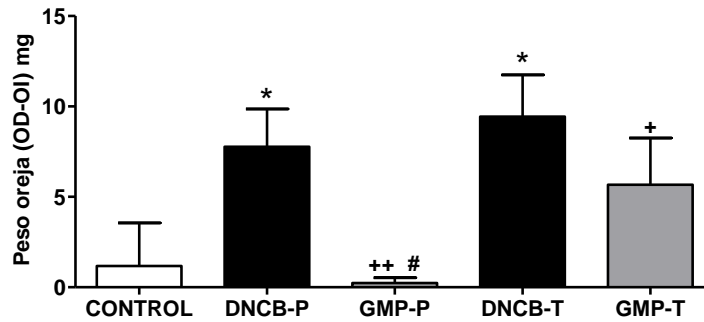


Figura 19: Efecto de la administración de GMP sobre el peso de las orejas de ratas sensibilizadas con DNCB, y tratadas o no con GMP. OD, oreja derecha; OI, oreja izquierda. Los valores se representan como la diferencia del peso entre oreja derecha (OD) y oreja izquierda (OI). Grupos: Control (n=8), sensibilizado con DNCB pre-tratado con agua (DNCB-P, n=7), sensibilizado con DNCB pre-tratado con GMP (GMP-P, n=8), sensibilizado con DNCB tratado con agua (DNCB-T, n=8) y sensibilizado con DNCB tratado con GMP (GMP-T, n=8). * $p < 0.0001$ vs C. + $p < 0.01$; ++ $p < 0.0001$ vs respectivo DNCB; # $p < 0.0001$ vs GMP-T. Los datos muestran la media \pm SEM (Bonferroni multicomparativa).

Estos resultados muestran un efecto anti-inflamatorio del GMP sobre las lesiones tipo DA generadas por la aplicación del DNCB. Este efecto fue mayor cuando el GMP se administró como tratamiento preventivo, es decir antes del desarrollo de la DA, que al administrarse como tratamiento terapéutico.

6.2.2. Efecto del GMP sobre los eventos de rascado en los animales con DA.

Debido a que el prurito es uno de los síntomas clínicos que más afecta la calidad de vida de los pacientes con DA, quisimos analizar el efecto de la administración de GMP sobre el prurito, evaluando el número de eventos de rascado en los animales de experimentación que se sensibilizaron con DNCB y tratados o no con GMP.

En el caso de nuestro protocolo experimental, el aumento en los eventos de rascado se presentó en los animales sensibilizados que recibieron agua (DNCB-P, DNCB-T) a partir del segundo día reto en oreja (D16), manteniéndose elevados en

los días 22 y 36. El grupo DNCB-P mostró 39.87, 37.5 y 33.25 veces más eventos de rascado que el grupo control en los días 16, 22 y 36, respectivamente. Para el grupo DNCB-T sucedió el mismo comportamiento, contabilizándose 43.13, 42.13 y 39.88 más eventos de rascado que los animales controles en los días 16, 22 y 36, respectivamente. Sin embargo, en el grupo previamente tratado con GMP (GMP-P), se observó una disminución promedio del 99% en los eventos de rascado respecto a los animales sin tratar en los tres tiempos analizados (DNCB-P); no así en el grupo tratado con GMP después de la inducción de la DA (GMP-T) donde no hubo diferencias significativas en la cantidad de eventos de rascado de los animales con respecto a los animales sin tratar (DNCB-T) en ningún tiempo (Figura 20).

En resumen, los resultados indican que mientras que la administración del GMP antes del desarrollo de la DA disminuye de una forma significativa el prurito que genera la DA en los animales, cuando el GMP se administra como tratamiento una vez desarrollada la DA este no tiene efecto reductor sobre la sensación de prurito.

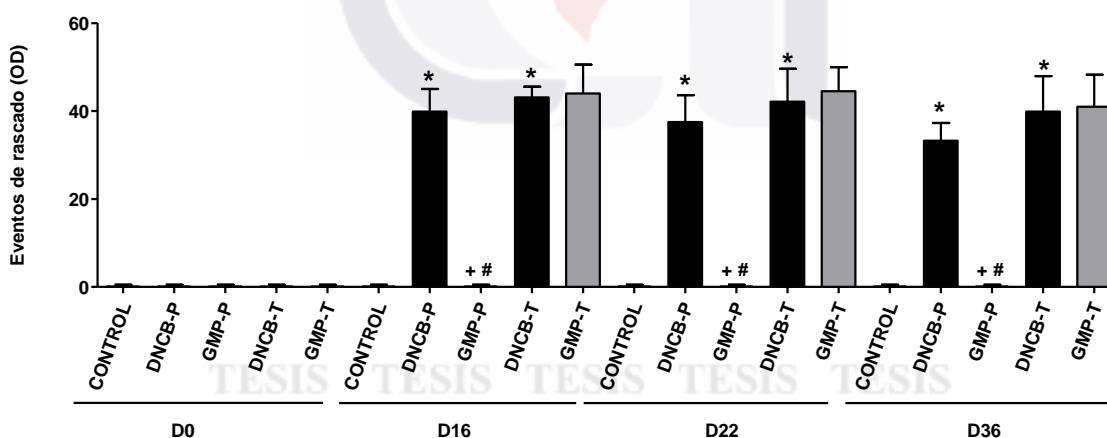


Figura 20: Efecto de la administración de GMP sobre los eventos de rascado en oreja derecha de ratas sensibilizadas con DNCB, y tratadas o no con GMP. Grupos: Control (n=8), sensibilizado con DNCB pre-tratado con agua (DNCB-P, n=7), sensibilizado con DNCB pre-tratado con GMP (GMP-P, n=8), sensibilizado con DNCB tratado con agua (DNCB-T, n=8) y sensibilizado con DNCB tratado con GMP (GMP-T, n=8). *p<0.0001 vs Control; +p<0.0001 vs DNCB-P; GMP-T vs DNCB-T ns; #p<0.0001 vs GMP-T. Los datos muestran la media ± SEM (Bonferroni multicomparativa).

6.2.3. Efecto de la administración de GMP sobre la histopatología de las lesiones cutáneas asociadas a la dermatitis atópica.

Con la finalidad de determinar el efecto de la administración del GMP sobre el infiltrado de células del sistema inmune y el engrosamiento de la epidermis en las lesiones de DA, se realizaron diferentes tinciones histoquímicas en los cortes de tejido de las orejas de las ratas. Para ello las orejas fueron extirpadas 24h después de la última aplicación de DNCB.

Los eosinófilos se identificaron mediante las tinciones realizadas con HyE en los cortes de tejido de oreja de los 5 grupos de animales de estudio (Figura 21 A). Los eosinófilos se visualizaron en la dermis de los animales por su morfología clásica. En las imágenes se observó un mayor número de eosinófilos infiltrados en la dermis de los animales sensibilizados con DNCB y tratados con agua que en la de los animales controles y los tratados con GMP. El análisis cuantitativo mostró un aumento significativo en la cantidad de eosinófilos en la dermis de los animales sensibilizados con DNCB y que recibieron agua (13.12 veces y 12.89 veces, DNCB-P y DNCB-T respectivamente) en comparación al grupo control; alteración histológica característica de la DA. Sin embargo, los animales tratados con GMP previo a la sensibilización (GMP-P) disminuyeron en un 94.47% el número de eosinófilos infiltrados en dermis con respecto al grupo DNCB-P; mientras que en los animales que recibieron el GMP como tratamiento terapéutico (GMP-T) la cantidad de estas células se redujo en un 78.71% (Figura 21 B).

En relación a los cambios en la epidermis, en las mismas imágenes de la figura 21 A, correspondientes a las tinciones con HyE en cortes de tejido de oreja de los animales de los 5 grupos de estudios, se apreció el aumento en el grosor de la epidermis de los animales sensibilizados con DNCB y que recibieron agua, y la disminución de este grosor en los animales sensibilizados con DNCB y que recibieron GMP. El análisis morfométrico reveló que este aumento fue 2.3 veces mayor para el grupo DNCB-P y 2.7 veces para DNCB-T respecto al grosor de la epidermis del grupo control. Así mismo, el tratamiento con GMP en los animales

sensibilizados con DNCB, antes y después de desarrollar la DA, redujo en un 46.7 y 29.4% respectivamente el aumento en el grosor de la epidermis generado durante el desarrollo de la DA (Figura 21 C).

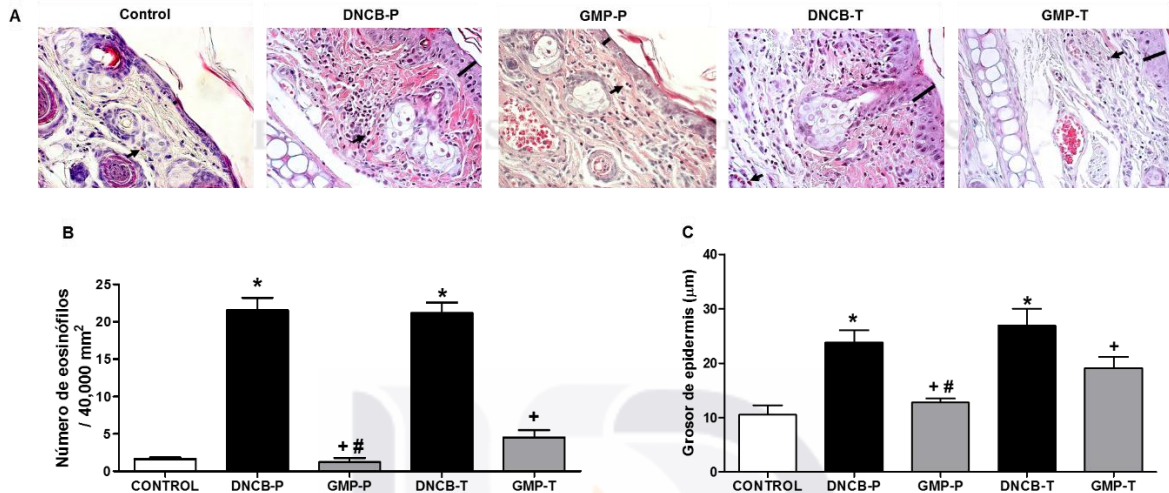


Figura 21: Número de eosinófilos en dermis y grosor de epidermis de tejido cutáneo (oreja) de animales con DA, tratados o no con GMP. (A) Imágenes de tejido cutáneo (oreja) teñidas con HyE. Las líneas marcan el grosor de la epidermis. Las flechas marcan a los eosinófilos. Imágenes a 400x. B, Análisis del número de eosinófilos por unidad de área. C, Análisis del grosor de la epidermis. Control (n=8), sensibilizado con DNCB pre-tratado con agua (DNCB-P, n=7), sensibilizado con DNCB pre-tratado con GMP (GMP-P, n=8), sensibilizado con DNCB tratado con agua (DNCB-T, n=8) y sensibilizado con DNCB tratado con GMP (GMP-T, n=8). * $p < 0.0001$ vs C; + $p < 0.0001$ vs respectivo DNCB; # $p < 0.0001$ vs GMP-T. Los datos muestran la media \pm SEM (Bonferroni multicomparativa).

En la figura 22 se muestran imágenes representativas de las tinciones con azul de toluidina realizadas en cortes de tejido de oreja de animales de los 5 grupos de estudios. Las imágenes mostraron un mayor número de células azul de toluidina positivas, que corresponden a los mastocitos, en la dermis de las orejas de animales con DA y que recibieron agua en relación a los animales controles y animales tratados con GMP (Figura 22 A). Una vez realizado el análisis morfométrico, los datos corroboraron que en las lesiones con DA de los grupos DNCB-P y DNCB-T hubo una hiperplasia de mastocitos en la dermis, ya que el

número de estas células fue doble respecto al de los animales control. Sin embargo, los grupos tratados con GMP mostraron una disminución significativa en dicha hiperplasia, con respecto al grupo sensibilizado con DNCB y que recibieron agua. Así, los animales del grupo pre-tratado (GMP-P) mostraron una disminución del 61.51% en la cantidad de mastocitos en dermis respecto al grupo DNCB-P; mientras que los animales que recibieron el GMP como tratamiento terapéutico (GMP-T) disminuyeron en un 39.59% el número de mastocitos en sus lesiones respecto al grupo DNCB-T (Figura 22 B).

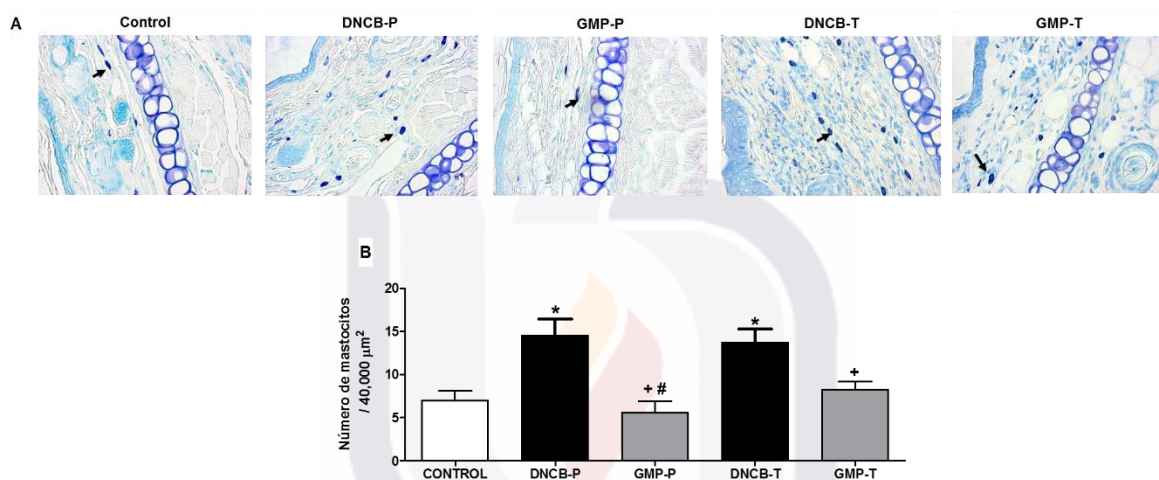


Figura 22: Mastocitos en dermis de tejido cutáneo (oreja) de animales sensibilizados con DNCB, tratados o no con GMP. A, Imágenes de tejido cutáneo (oreja) teñidas con azul de toluidina. Las flechas marcan a los mastocitos. Imágenes a 400x. B, Análisis del número de mastocitos por unidad de área. Grupos: Control (n=8), sensibilizado con DNCB pre-tratado con agua (DNCB-P, n=7), sensibilizado con DNCB pre-tratado con GMP (GMP-P, n=8), sensibilizado con DNCB tratado con agua (DNCB-T, n=8) y sensibilizado con DNCB tratado con GMP (GMP-T, n=8). *p<0.0001 vs C; +p<0.0001 vs respectivo DNCB; #p<0.0001 vs GMP-T. Los datos muestran la media ± SEM (Bonferroni multicomparativa).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

6.2.4. Efecto del tratamiento con GMP sobre los niveles séricos de IgE total.

Los valores basales de IgE total reportados en rata en la literatura son muy variados. En nuestro modelo experimental, los animales controles tuvieron valores promedios de IgE total de 622.4 ± 88.5 ng/mL. Se sabe que la DA es una enfermedad alérgica de la piel caracterizada por unos niveles elevados de IgE total en suero (Brandt y Sivaprasad, 2011). En este sentido, los animales con DA

(DNCB-P y DNCB-T) mostraron niveles de IgE total 3.7 veces mayores a los del grupo control (2352.14 ± 360 y 2344.33 ± 269 ng/mL). En los animales que fueron previamente tratados con GMP (GMP-P) se observó una disminución del 86.53% en la concentración de IgE sérica total (316.81 ± 59 ng/mL) respecto a la del grupo DNCB-P; mientras que en el grupo que recibió el tratamiento con GMP después de haber desarrollado la DA (GMP-T), esta disminución fue del 63.68% (851.24 ± 196 ng/mL) respecto a los valores encontrados en el grupo sin tratamiento (DNCB-T) (Figura 23).

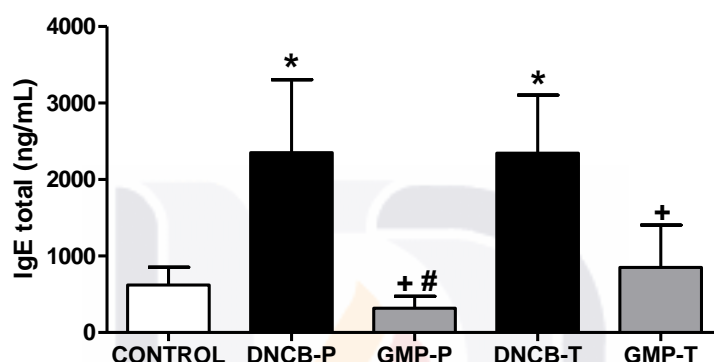


Figura 23: Efecto de la administración de GMP sobre los niveles séricos de IgE total en ratas sensibilizadas con DNCB y tratadas o no con GMP. Grupos: Control (n=8), sensibilizado con DNCB pre-tratado con agua (DNCB-P, n=7), sensibilizado con DNCB pre-tratado con GMP (GMP-P, n=8), sensibilizado con DNCB tratado con agua (DNCB-T, n=8) y sensibilizado con DNCB tratado con GMP (GMP-T, n=8). * $p < 0.0001$ vs C; + $p < 0.0001$ vs respectivo DNCB; # $p < 0.0001$ vs GMP-T. Los datos muestran la media \pm SEM (Bonferroni multicomparativa).

6.2.5. Efecto del tratamiento con GMP sobre la expresión de proteínas estructurales de la piel.

La DA involucra alteraciones en la barrera cutánea (Kabashima, 2013), siendo involucrina una de las proteínas cuya expresión se puede encontrar reducida en las lesiones de la piel (Bao y cols., 2016; Kim BE y cols, 2008)

En relación a los niveles de expresión de esta proteína del estrato córneo, en la figura 24 se muestra la imagen representativa de la detección de involucrina en una fracción proteica de piel lesionada, analizada mediante electroforesis e

inmunotinción de membrana. En ella se puede apreciar la detección de una única banda de peso molecular de 67 kDa para involucrina, tal y como está reportado para esta proteína. El análisis densitométrico de las bandas mostró como el desarrollo de la DA (DNCB-P y DNCB-T) indujo una disminución del 23% ($p < 0.005$) en la expresión de la involucrina en comparación con los animales Control; mientras que los tratamientos profiláctico y terapéutico no produjeron cambios significativos en la expresión de involucrina.

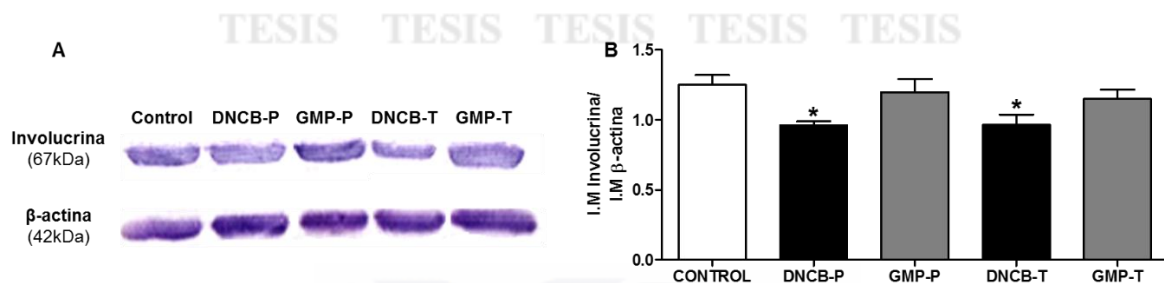


Figura 24: Efecto de la administración de GMP sobre la expresión de involucrina en ratas sensibilizadas con DNCB y tratadas o no con GMP. A, Imagen de las bandas proteicas correspondientes a involucrina y β -actina, analizadas por electroforesis e inmunotinción. B, Análisis densitométrico de la expresión de Involucrina, donde I.M representa la intensidad media de cada banda proteica obtenida. Grupos: Control (n=8), sensibilizado con DNCB pre-tratado con agua (DNCB-P, n=7), sensibilizado con DNCB pre-tratado con GMP (GMP-P, n=8), sensibilizado con DNCB tratado con agua (DNCB-T, n=8) y sensibilizado con DNCB tratado con GMP (GMP-T, n=8). * $p < 0.05$ vs C; GMP vs respectivo DNCB, ns; GMP-P vs GMP-T, ns. Los datos muestran la media \pm SEM (Bonferroni multicomparativa).

La filagrina es otra proteína estructural de la piel, cuya expresión se ve alterada en el desarrollo de la DA (Thyssen y cols., 2014). En la figura 25 A se muestran imágenes comparativas de las inmunohistoquímicas desarrolladas en cortes de tejidos de los diferentes grupos experimentales para la detección de esta proteína. Tal y como se observa en la imagen de los animales controles, la filagrina se detectó (coloración café) en la epidermis y el desarrollo de la enfermedad redujo de una manera muy evidente su expresión. Sin embargo, en los tejidos lesionados de los animales tratados con GMP se volvió a detectar inmunorreactividad positiva para la filagrina en la epidermis. Al cuantificar el área inmunorreactiva para filagrina en epidermis en los diferentes grupos experimentales, se observó una reducción significativa del 70.37 y 67.91%, en la

expresión de filagrina en los grupos DNCB-P y DNCB-T, respectivamente, al comprar con el grupo control. Sin embargo, la administración oral de GMP previo a la sensibilización (GMP-P) evitó la disminución de la expresión de filagrina, mostrando valores semejantes a los del grupo control; mientras que la administración de GMP una vez establecida la patología (GMP-T) reguló positivamente su expresión, aumentándola 1.84 veces más que en el grupo sensibilizado (DNCB-T).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

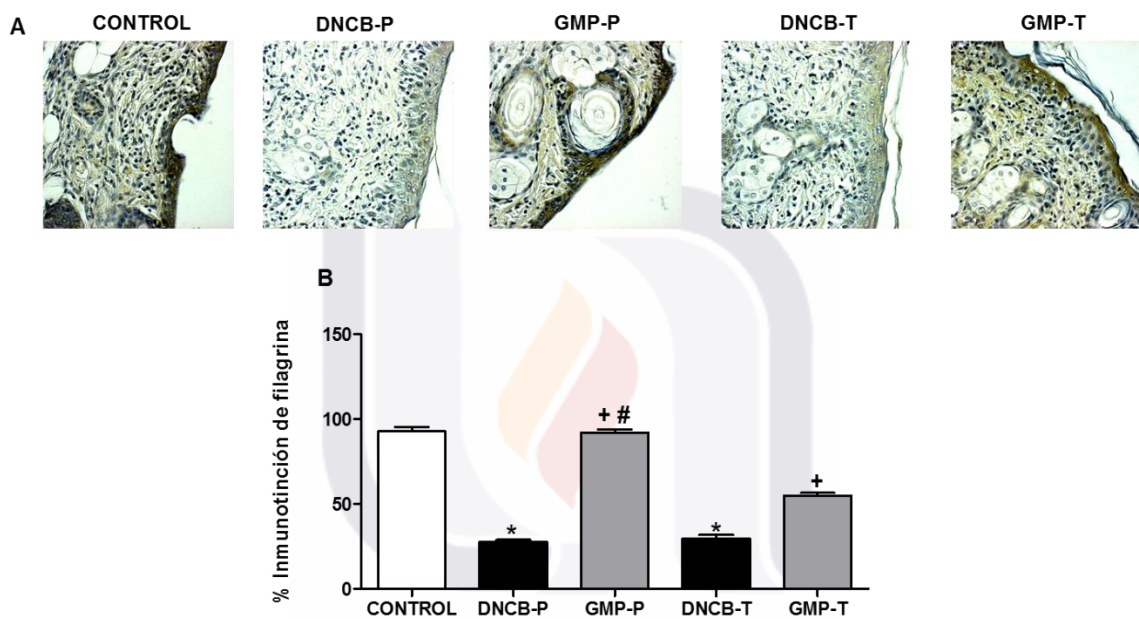


Figura 25: Efecto de la administración de GMP sobre la expresión de filagrina en ratas sensibilizadas con DNCB y tratadas o no con GMP. A, Imágenes de tejido cutáneo analizado por inmunohistoquímica para la expresión de filagrina. B, Análisis del porcentaje de área con inmunoreactividad positiva para filagrina. Grupos: Control (n=3), sensibilizado con DNCB pre-tratado con agua (DNCB-P, n=3), sensibilizado con DNCB pre-tratado con GMP (GMP-P, n=3), sensibilizado con DNCB tratado con agua (DNCB-T, n=3) y sensibilizado con DNCB tratado con GMP (GMP-T, n=3). * $p < 0.0001$ vs C; + $p < 0.0001$ vs respectivo DNCB; # $p < 0.0001$ vs GMP-T. Los datos muestran la media \pm SEM (Bonferroni multicomparativa).

6.2.6. Efecto del tratamiento con GMP sobre la expresión de péptidos antimicrobianos (AMPs).

Los AMPs son producidos por las células epiteliales con la finalidad de proveer a la piel de una respuesta inmune innata (Harder and Schroder, 2005). Durante la DA, la expresión de AMPs es disminuida por la acción de las citocinas del perfil Th2 (Clausen y cols., 2016). La producción de β -defensina-2 de rata (rBD-2; figura 26 A) y catelicidina de rata (rCRAMP; figura 26 B) fue detectada por inmunohistoquímica. Para ambos AMPs la inmunoreactividad positiva más intensa se detectó en los animales controles a nivel de la epidermis, aunque algunas células inmunes de la dermis, como los mastocitos, también fueron positivos para rCRAMP. El análisis inmunohistológico se realizó analizando el porcentaje de inmunoreactividad para cada uno de los AMPs en la epidermis (26 C-D) y mostró una reducción del 60.68% y 62.37% en la reactividad positiva para rBD-2 en los grupos sensibilizados y tratados con agua (DNCB-P y DNBCB-T, respectivamente) respecto al control, mientras que para rCRAMP la reducción del marcaje positivo en la epidermis fue de 65.97% para DNBCB-P y 65.29% para DNBCB-T en relación al grupo control. Sin embargo, los animales previamente tratados con GMP mostraron una recuperación de 2.28 veces en los niveles de expresión para rBD-2 y 2.77 veces para rCRAMP. Por otra parte, los animales que recibieron GMP a manera terapéutica incrementaron 2.03 veces los niveles de expresión para rBD-2 y 2.49 veces para rCRAMP.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

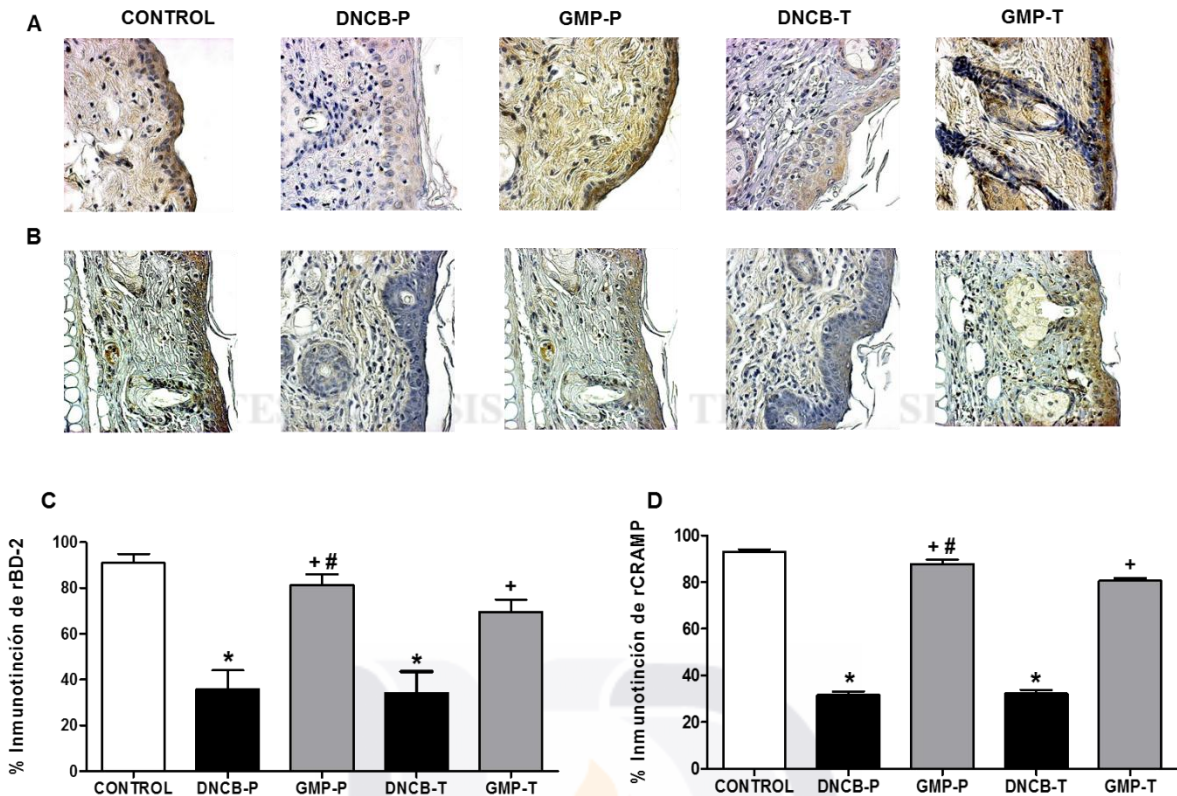


Figura 26: Efecto de la administración de GMP sobre la expresión de rBD-2 y rCRAMP en rata sensibilizadas con DNCB, y tratadas o no con GMP. A, Imágenes de tejido cutáneo probado por inmunohistoquímica para la expresión de rBD-2. B, Imágenes de tejido cutáneo probado por inmunohistoquímica para la expresión de rCRAMP. C, Análisis de la expresión de rBD-2. D, Análisis de la expresión de rCRAMP. Grupos: Control (n=3), sensibilizado con DNCB pre-tratado con agua (DNCB-P, n=3), sensibilizado con DNCB pre-tratado con GMP (GMP-P, n=3), sensibilizado con DNCB tratado con agua (DNCB-T, n=3) y sensibilizado con DNCB tratado con GMP (GMP-T, n=3). * $p < 0.0001$ vs C; + $p < 0.0001$ vs su respectivo DNCB; # $p < 0.001$ vs GMP-T. Los datos muestran la media \pm SEM (Bonferroni multicomparativa).

6.2.7. Efecto del tratamiento con GMP sobre la expresión de citocinas involucradas en la DA.

La fase aguda de la DA se caracteriza por una intensa activación de linfocitosTh2, ILC2, mastocitos y eosinófilos y el aumento por tanto en el tejido lesionado de citocinas tales como IL-4, IL-5 e IL-13; mientras que en la fase crónica también se activan linfocitos Th1, detectándose niveles altos de IFN- γ (Kabashima, 2013; Carr, 2013).

Para determinar el efecto del GMP en la modulación de la respuesta tipo Th2, se examinaron los cambios en los niveles del mRNA de las principales citocinas de este perfil involucradas en el desarrollo de la DA. En cuanto a IL-4, en los grupos sensibilizados con DNCB (DNCB-P y DNCB-T) los nivel de expresión aumentaron 11.69 y 10.79 veces más que el grupo control, mientras que en el grupo previamente tratado con GMP (GMP-P), hubo una disminución promedio del 83.56% respecto a los animales DNCB-P. Por otro lado, en los animales que recibieron el tratamiento con GMP después de la inducción de la DA (GMP-T), la reducción del nivel de expresión del IL-4 fue de 57.05% (Figura 27).

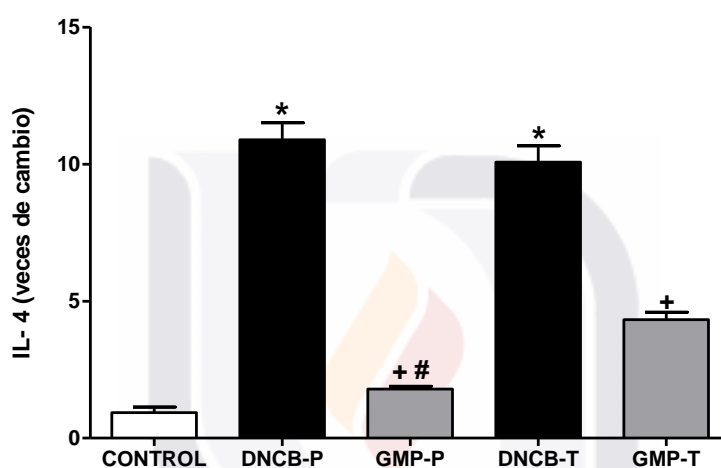


Figura 27: Efecto de la administración del GMP sobre la expresión de IL-4 en tejido lesionado en la DA. Las veces de cambio hacen referencia al aumento o disminución del nivel de expresión relativo a β -actina. Grupos: Control (n=4), sensibilizado con DNCB pre-tratado con agua (DNCB-P, n=4), sensibilizado con DNCB pre-tratado con GMP (GMP-P, n=4), sensibilizado con DNCB tratado con agua (DNCB-T, n=4) y sensibilizado con DNCB tratado con GMP (GMP-T, n=4). * $p < 0.0001$ vs Control; + $p < 0.0001$ vs respectivo DNCB; # $p < 0.001$ vs GMP-T. Los datos muestran la media \pm SEM (Bonferroni multicomparativa).

Por su parte, el nivel de expresión de IL-5 en el tejido lesionados de los animales aumentó 4 y 3.87 veces respecto al control, en los grupos DNCB-P y DNCB-T, respectivamente. Sin embargo, el grupo previamente tratado con GMP (GMP-P) mostró una disminución del 96.5% en el nivel de expresión de esta citocina respecto al grupo sensibilizado (DNCB-P); mientras que en los animales que recibieron el tratamiento con GMP después de la inducción de la DA (GMP-T), la reducción del nivel de expresión de IL-5 fue de 65.89% con respecto a su sensibilizado (DNCB-T) (Figura 28).

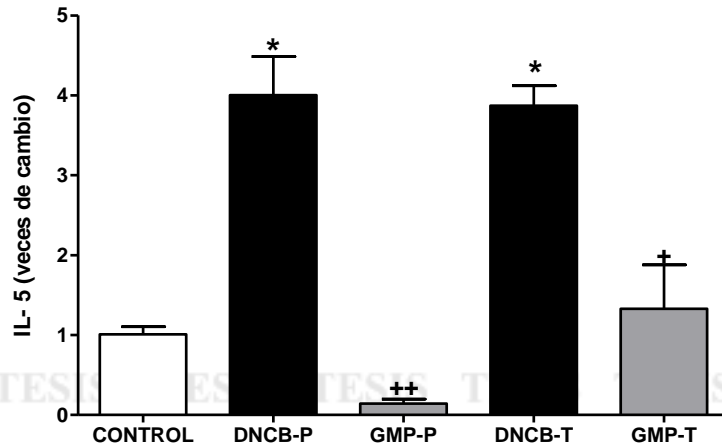


Figura 28: Efecto de la administración del GMP sobre la expresión de IL-5 en tejido lesionado en la DA. Las veces de cambio hacen referencia al aumento o disminución del nivel de expresión relativo a β -actina. Grupos: Control (n=4), sensibilizado con DNCB pre-tratado con agua (DNCB-P, n=4), sensibilizado con DNCB pre-tratado con GMP (GMP-P, n=4), sensibilizado con DNCB tratado con agua (DNCB-T, n=4) y sensibilizado con DNCB tratado con GMP (GMP-T, n=4). * $p < 0.0001$ vs Control; + $p < 0.001$, ++ $p < 0.0001$ vs respectivo DNCB; GMP-P vs GMP-T, ns. Los datos muestran la media \pm SEM (Bonferroni multicomparativa).

En cuanto a los niveles de expresión de IL-13, éstos se incrementaron 11 y 13.94 veces en animales sensibilizados con DNCB respecto al grupo control. Los animales previamente tratados con GMP (GMP-P), disminuyeron un 88.38% la expresión de la citocina respecto al grupo sensibilizado y que recibió agua (DNCB-P); mientras que los animales que recibieron el tratamiento con GMP después de la inducción de la DA (GMP-T), la reducción del nivel de expresión de IL-13 fue de 63.3% (Figura 29).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

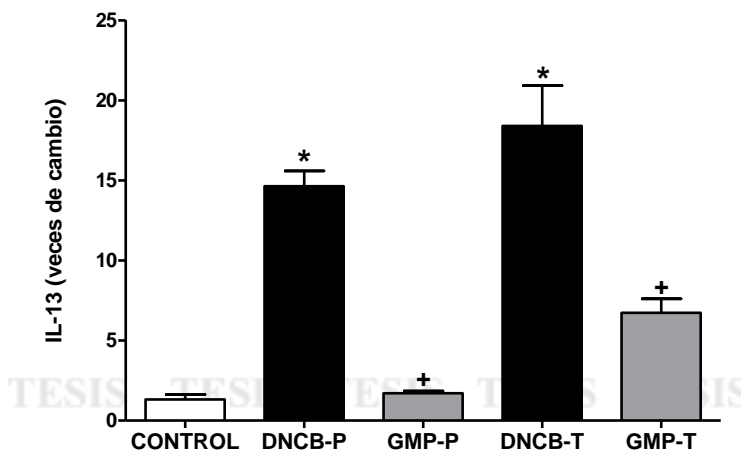


Figura 29: Efecto de la administración del GMP sobre la expresión de IL-13 en tejido lesionado en la DA. Las veces de cambio hacen referencia al aumento o disminución del nivel de expresión relativo a β -actina. Grupos: Control (n=4), sensibilizado con DNCB pre-tratado con agua (DNCB-P, n=4), sensibilizado con DNCB pre-tratado con GMP (GMP-P, n=4), sensibilizado con DNCB tratado con agua (DNCB-T, n=4) y sensibilizado con DNCB tratado con GMP (GMP-T, n=4). * $p < 0.0001$ vs Control; + $p < 0.0001$ vs respectivo DNCB; GMP-P vs GMP-T, ns. Los datos muestran la media \pm SEM (Bonferroni multicomparativa).

Como se indicó previamente, la fase crónica de la DA se caracteriza por una respuesta inmunológica bifásica, es decir, además de la presencia de citocinas del perfil Th2, también se puede observar la producción de citocinas pertenecientes a la respuesta Th1, tal como IFN- γ (Yuan et al., 2011). En la evaluación de la expresión de IFN- γ en el tejido lesionado, se observó un incremento de 7.9 y 9.19 veces en los animales sensibilizados que recibieron agua (DNCB-P y DNCB-T, respectivamente) respecto al grupo control. Así mismo, los resultados mostraron una disminución del 88.3% en la expresión de dicha citocina en los animales previamente tratados con GMP (GMP-P), mientras que en aquellos que recibieron el tratamiento una vez establecida la patología (GMP-T) la disminución en los niveles de INF- γ en el tejido fue de 68.9% (Figura 30).

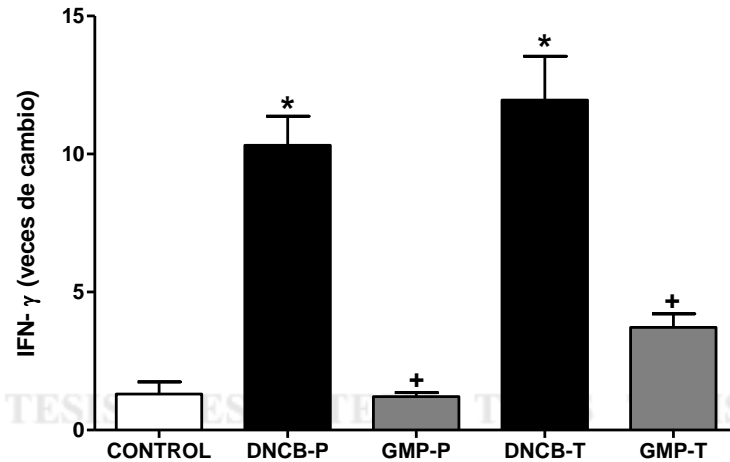


Figura 30: Efecto de la administración del GMP sobre la expresión de IFN- γ en tejido lesionado en la DA. Las veces de cambio hacen referencia al aumento o disminución del nivel de expresión relativo a β -actina. Grupos: Control (n=4), sensibilizado con DNCB pre-tratado con agua (DNCB-P, n=4), sensibilizado con DNCB pre-tratado con GMP (GMP-P, n=4), sensibilizado con DNCB tratado con agua (DNCB-T, n=4) y sensibilizado con DNCB tratado con GMP (GMP-T, n=4). * $p < 0.0001$ vs Control; + $p < 0.0001$ vs respectivo DNCB; GMP-P vs GMP-T, ns. Los datos muestran la media \pm SEM (Bonferroni multicomparativa).

Las células T reguladoras tienen un papel clave en el control de la respuesta inmune, permitiendo la tolerancia a los alérgenos. Su efecto protector o atenuador sobre la activación del sistema inmune se debe, en parte, a la producción tanto de IL-10 como de TGF- β (Tiemessen y cols., 2006; Ziegler, 2006). Para determinar la posible participación de estas citocinas reguladoras en el efecto protector del GMP sobre la respuesta inflamatoria en la DA, se evaluó el nivel de expresión de IL-10 y TGF- β en tejido cutáneo lesionado. En cuanto a IL-10, los resultados mostraron un aumento significativo en los niveles de esta citocina en los grupos sensibilizados con DNCB y que recibieron agua, siendo éste de 7.6 y 7.3 veces más que el grupo control. Sin embargo, los animales administrados con GMP previo a la sensibilización, tuvieron un aumento 4.68 veces más alto que el grupo DNCB-P; mientras que en los animales tratados con GMP tras desarrollar la DA dicho aumento fue de 2.44 veces (Figura 31).

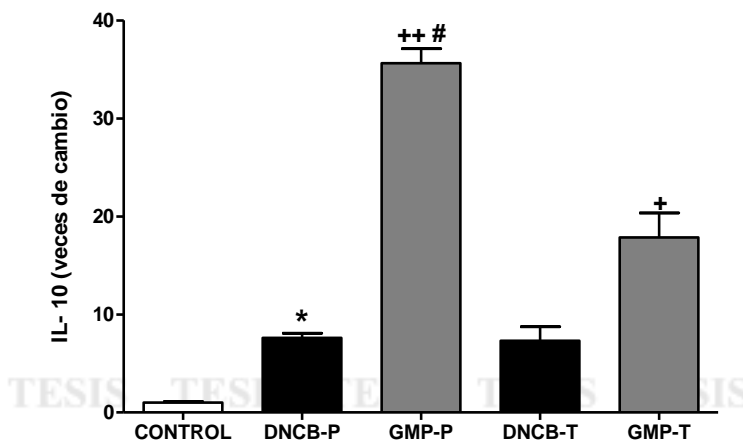


Figura 31: Efecto de la administración del GMP sobre la expresión de IL-10 en la DA. Las veces de cambio hacen referencia al aumento o disminución del nivel de expresión relativo a β -actina. Grupos: Control (n=4), sensibilizado con DNCB pre-tratado con agua (DNCB-P, n=4), sensibilizado con DNCB pre-tratado con GMP (GMP-P, n=4), sensibilizado con DNCB tratado con agua (DNCB-T, n=4) y sensibilizado con DNCB tratado con GMP (GMP-T, n=4). * $p < 0.05$ vs Control; + $p < 0.001$, ++ $p < 0.0001$ vs respectivo DNCB; # $p < 0.0001$ vs GMP-T, ns. Los datos muestran la media \pm SEM (Bonferroni multicomparativa).

Por otra parte, el nivel de expresión de TGF- β en los grupos sensibilizados con DNCB y administrados con agua fue de 6.98 y 7.83 veces más que el control. Los animales previamente tratados con GMP (GMP-P) mostraron un incremento del 19.77% en la expresión de TGF- β respecto a las ratas sensibilizadas con DNCB y administrados con agua (DNCB-P). En el caso de los animales que recibieron el GMP una vez establecida la DA (GMP-T), el aumento fue del 31.93% con respecto a los animales del grupo DNCB-T (Figura 32).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

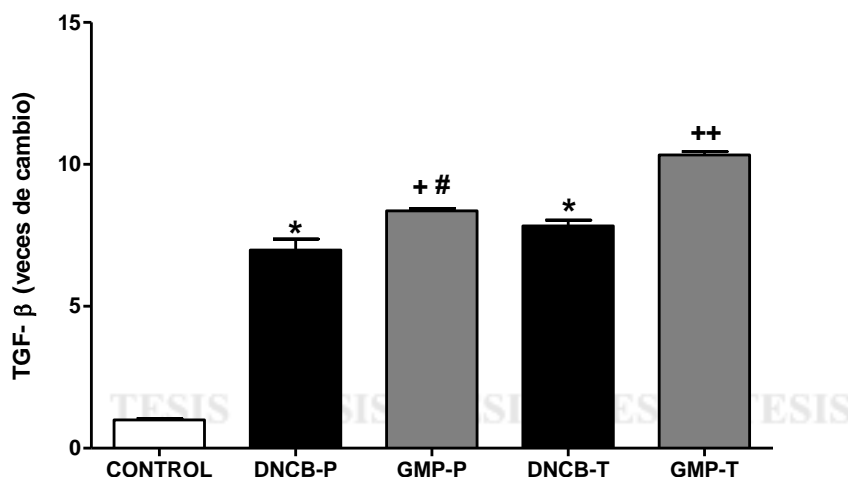


Figura 32: Efecto de la administración del GMP sobre la expresión de TGF- β en la DA. Las veces de cambio hacen referencia al aumento o disminución del nivel de expresión relativo a β -actina. Grupos: Control (n=4), sensibilizado con DNCB pre-tratado con agua (DNCB-P, n=4), sensibilizado con DNCB pre-tratado con GMP (GMP-P, n=4), sensibilizado con DNCB tratado con agua (DNCB-T, n=4) y sensibilizado con DNCB tratado con GMP (GMP-T, n=4). * $p < 0.0001$ vs Control; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.0005$ vs respectivo DNCB; # $p < 0.0001$ vs GMP-T, ns. Los datos muestran la media \pm SEM (Bonferroni multicomparativa).

6.2.8. Detección de GMP en tejido lesionado.

Con la finalidad de explicar si la acción del GMP fue a nivel local en las lesiones ocasionadas en la DA, se buscó identificarlo en el sitio de lesión. Para ello primeramente se administró el GMP vía oral, en ratas sanas por 39 días (mismo lapso de tiempo en que las ratas con DA son administradas), posteriormente se sacrificaron los animales y se obtuvieron las muestras para la detección de GMP por inmunotinción. Como control positivo se analizó una muestra de GMP, identificándose mediante inmunotinción dos bandas proteicas con un peso molecular de 7 y 14 kDa, que corresponde al descrito para el GMP en nuestras mismas condiciones de trabajo (Chávez y cols., 2008). De acuerdo a la prueba realizada, se puede observar que después de haber sido administrado el GMP oralmente por 39 días, a la hora (GMP1) y a las 24h (GMP24), el anticuerpo específico no detectó ninguna banda proteica en el tejido de las orejas de las ratas sanas (Figura 33 A).

Con la fin de trabajar con nuestras mismas condiciones experimentales, basándonos en que la inflamación en las lesiones cutáneas pudiera favorecer la llegada del GMP a la lesión, se reprodujo un nuevo ensayo experimental que incluyó los cinco grupos experimentales. Tal y como se muestra en la figura 33 B, el anticuerpo específico no detectó ninguna banda proteica correspondiente al peso molecular descrito para el GMP en el tejido de oreja lesionado de ratas con DA. La identificación de las bandas correspondientes a β -actina en ambos ensayos indicó que la muestra proteica no estaba degradada y la técnica se había desarrollado adecuadamente.

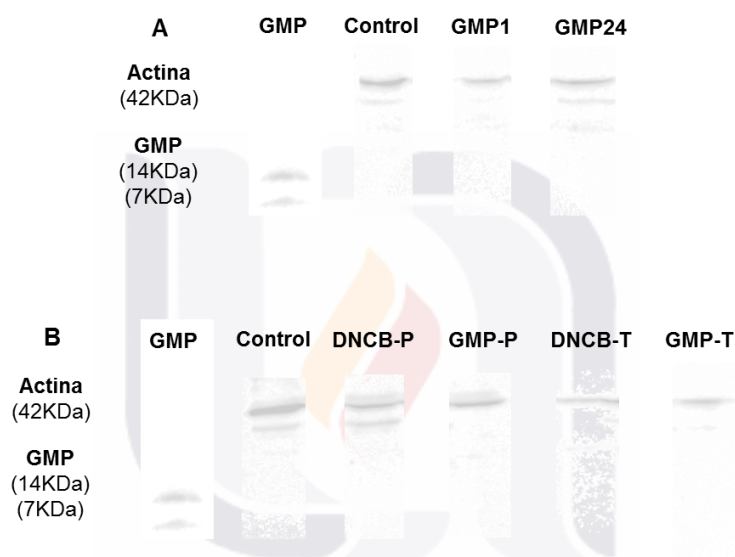


Figura 33: Identificación de GMP en oreja de rata sana y rata con DA. A. Inmunotinción de extracto proteico de tejido lesionado de ratas sanas administradas vía oral con GMP por 36 días cada 24h. GMP (Lacprodan® cGMP-10, 1 mg/mL), Control, animales administrados con agua (n=3); GMP1, animales sanos administrados con GMP cada 24h y sacrificados a la hora de la última administración (n=3); GMP24, animales sanos administrados con GMP cada 24h y sacrificados 24h después de la última administración. **B. Inmunotinción de extracto proteico de tejido lesionado de oreja de ratas con DA administradas vía oral con GMP por 36 días cada 24h.** GMP (Lacprodan® cGMP-10, 1 mg/mL); 1, Control (n=3); 2, sensibilizado con DNCB pre-tratado con agua (DNCB-P, n=3); 3, sensibilizado con DNCB pre-tratado con GMP (GMP-P, n=3); 4, sensibilizado con DNCB tratado con agua (DNCB-T, n=3); y 5, sensibilizado con DNCB tratado con GMP (GMP-T, n=4).

7. DISCUSIÓN

La DA una enfermedad crónico-inflamatoria, alérgica de la piel, que si bien no es una enfermedad mortal, si afecta considerablemente la calidad de vida del paciente (Bieber, 2010). Además, su aparición temprana durante la infancia a menudo desencadena la marcha atópica, con el subsecuente desarrollo de asma y de rinitis alérgica (Dharmage y cols., 2014).

Aunque actualmente existen diferentes tratamientos para la DA, ninguno de ellos ofrece una solución a largo plazo (Tollefson y Bruckner, 2014). La terapia antiinflamatoria de manejo consiste en el uso de corticosteroides e inhibidores de la calcineurina, como el tacrólimus o pimecrólimus. Sin embargo, la resolución del proceso inflamatorio es a menudo temporal y el uso de estos fármacos durante largos periodos de tiempo se ha asociado con efectos adversos (FERENCE y Last, 2009; Tollefson y Bruckner, 2014). Debido a los efectos negativos de la DA en la calidad de vida de los pacientes, y al fuerte impacto económico que tiene la enfermedad en los sistemas de salud, es importante el desarrollo de tratamientos alternos que prevengan o actúen sobre los mecanismos inmunológicos relacionados con la DA y que generen mínimos efectos secundarios.

A pesar de que los ratones son los animales más utilizados para el modelaje experimental de la DA, la rata posee una estructura y una permeabilidad dérmica más parecida a la del humano (Fujii y cols., 2009; Sato y cols., 1991; Arfsten y cols., 2006). Por ello elegimos trabajar con un modelo de DA en rata. Para establecer nuestro modelo nos basamos en tres protocolos experimentales de DA ya reportados: el primero se había desarrollado en rata Brown Norway y consistía en aplicaciones tópicas sucesivas de DNCB en oreja (Fujii y cols. 2009); el segundo se estableció en ratón BALB/c mediante una sensibilización sistémica inicial con DNP-conjugado con un extracto de *Ascaris suum* (nuestros trabajamos con DNP conjugado a BSA) y posteriores aplicaciones tópicas sucesivas de DNFB en oreja (Yamashita y cols., 2010); y el tercero en ratón C57BL/6 mediante una

primera sensibilización con DNFB en piel abdominal y posteriores aplicaciones tópicas sucesivas de DNFB en oreja (Heo y cols., 2012). Todos los modelos utilizaban haptenos, DNCB o DNFB, como alérgeno, ya que si bien está establecido que los haptenos producen inicialmente una dermatitis por contacto mediada por linfocitos Th1, se ha demostrado que una aplicación repetida de los mismos ocasiona un cambio hacia una respuesta de predominio Th2 y con ello se generan las lesiones tipo DA (Kitagaki y cols., 1997).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Por lo anterior, inicialmente, se estandarizó un modelo de DA experimental en oreja de rata Wistar para posteriormente poder evaluar el efecto del GMP administrado vía oral sobre los signos clínicos, lesiones y fisiopatología de la DA. En los tres protocolos desarrollados, la inflamación que se generó en las orejas de las ratas fue en incremento en función del tiempo y el número de aplicaciones del hapteno. Cuando los animales fueron sensibilizados y re-sensibilizados tópicamente en oreja o sensibilizados mediante inyección de DNP-BSA y posteriormente re-sensibilizados en oreja, los primeros retos con el hapteno tras la sensibilización generaron una respuesta inflamatoria en la que se combinó la temporalidad de la respuesta de hipersensibilidad inmediata con la de hipersensibilidad retardada. Este efecto fue más constante e intenso cuando los animales se inyectaron con DNP-BSA y posteriormente se re-sensibilizaron en oreja. Cuando las ratas se sensibilizaron en piel abdominal y re-sensibilizaron en oreja derecha solamente se observó una respuesta inflamatoria aguda característica de la hipersensibilidad inmediata, con ausencia de respuesta retardada. Por lo tanto este protocolo no reproduce la respuesta combinada Th2/Th1 característica de la DA (Bieber, 2010).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

En general, las ratas Wistar sensibilizadas con DNCB siguiendo los tres protocolos anteriormente indicados, mostraron los signos clínicos distintivos de la DA en humanos como prurito, edema e inflamación del tejido afectado; junto con alteraciones histológicas que incluyen infiltrado de eosinófilos, hiperplasia de mastocitos y engrosamiento de la epidermis (Kim, 2012; Bieber, 2010). Sin

embargo, la inyección de DNP-BSA y posteriores re-sensibilizaciones con DNCB en piel logró en rata Wistar desarrollar la totalidad de éstas características y en una mayor intensidad. Esto puede estar debido a que la inyección inicial del DNP unido a BSA esté generando una fuerte respuesta inmune adquirida frente al DNP por la necesidad que tienen los haptenos de requerir su unión a una proteína portadora para actuar como inmunógenos (Gefen y cols., 2014). El posterior contacto tópico con el DNCB, de estructura química muy similar al DNP, estaría despertando la respuesta memoria generada por el DNP en los animales. Así mismo, se ha demostrado la efectividad de la co-inyección de *B. pertussis* junto con antígenos en la producción de IgE a nivel experimental (Pauwels y cols., 1983). Se sabe que la presencia de *B. pertussis* induce el desarrollo de una fuerte respuesta Th2, específicamente por la producción de IL-4. Así mismo, *B. pertussis* favorece el incremento de la permeabilidad vascular que se manifiesta por un aumento concomitante en la sensibilidad a varios agentes, entre ellos la histamina (Sudweeks y cols., 1992). Por otra parte, el efecto adyuvante del $(Al(OH)_3)$ en el proceso de sensibilización se debe a que favorece el proceso de reconocimiento y presentación del antígeno por parte de las CPA debido a que prolonga el tiempo de aclaramiento de éste, y a que permite una mayor proliferación de linfocitos Th2, así como la quimioatracción de eosinófilos (Lindbland y cols., 2004).

Reportes previos han demostrado la capacidad del GMP para prevenir la sensibilización alérgica y atenuar la severidad de las reacciones asociadas a la urticaria y anafilaxia (Jiménez y col, 2012); así también, el GMP atenuó la inflamación y la remodelación en la vías aéreas en un modelo experimental de asma alérgico (Roldán y cols., 2016). Considerando lo anterior, el presente trabajo se desarrolló con la finalidad de demostrar que el tratamiento profiláctico y terapéutico de GMP vía oral reduce de manera significativa los signos clínicos y la fisiopatología de la DA, mediante la regulación de los mecanismos inmunológicos implicados durante la misma.

La epidermis de los pacientes con DA se caracteriza por una ruptura de la barrera epitelial, la cual activa a los queratinocitos para desarrollar un respuesta Th2 dominante que dirige y refuerza la producción de IgEs en el individuo (Boguniewicz y Leung., 2011). Así, los niveles de IgE en suero están asociados con la severidad de la DA (Liu FT y cols., 2011). En nuestro modelo experimental de DA, altos niveles de IgE total fueron detectados en el suero de los animales y la administración de GMP antes o después de la inducción de la DA redujo significativamente estos valores en suero. Cuando el GMP se administró antes del desarrollo de la DA, los niveles de IgE en los animales fueron menores que en los animales controles, lo que sugiere que en esta condición la administración de GMP puede suprimir la IgE total en suero. Se sabe que la IgE producida y liberada por los linfocitos B se une a los mastocitos. Posteriormente, los alérgenos inducen la desgranulación de estas células a través del complejo IgE-FcεRI y la liberación de algunos de los mediadores biológicos relacionados con la inflamación en la piel (Amin y cols., 2012). Por lo tanto, los niveles bajos de IgE están acordes con la reducción del edema y la inflamación cutánea observada en los animales que recibieron GMP. Además, estudios *in vitro*, demostraron que el GMP inhibe la activación de los mastocitos por el alérgeno (Jiménez y cols., 2016) y nosotros observamos un número reducido de mastocitos en la dermis de los animales tratados con GMP, por lo que la reducción en el edema y la inflamación de las lesiones cutáneas mediadas por el GMP también puede estar causada por alteraciones en el número y función de los mastocitos.

Una de las causas centrales de la DA es la desregulación de la respuesta Th1-Th2 que induce una inflamación alérgica cutánea con dominancia Th2 (Grewe y cols., 1998). En esta respuesta Th2, la participación de IL-4, IL-5 e IL-13 es crucial para el desarrollo de las lesiones de DA en el humano (Brandt y cols., 2011). En ratones transgénicos que sobre-expresan IL-4, IL-5 e IL-13, Lee GR y Flavell (2004) demostraron una posible asociación entre el inicio y la progresión de la DA y la expresión de estas citocinas Th2. En nuestro modelo experimental de DA la expresión de IL-4, IL-5 e IL-13 estaba incrementada en las lesiones

cutáneas. Se sabe que la IL-5 es esencial en la diferenciación, activación, proliferación y quimiotaxis de eosinófilos (Molfino y cols., 2012; Simon y cols., 2004;) y que tanto el número de eosinófilos como los niveles de IL-5 se encuentran elevados en los tejido lesionado por DA (Jeong y cols., 2003; Liu FT y cols., 2011). Nuestros resultados muestran que la administración de GMP pre o post – inducción de DA reduce significativamente los niveles de IL-5, lo que se asocia con la disminución de eosinófilos infiltrados en dermis. Otros estudios han demostrado que los ratones transgénicos que sobre-expresan de manera espontánea IL-4 ó IL-13 a nivel epidermal, desarrollan signos y síntomas asociados con la DA, incluyendo niveles elevados de IgE (Chan y cols., 2001; Zheng y cols., 2009). Por lo tanto los niveles bajos de IL-4 e IL-13 en la piel de los animales tratados con GMP a manera profiláctica o terapéutica concuerdan con la disminución en la IgE total.

La principal fuente de IFN- γ en la DA son las células T CD8+ (Hijnen et al., 2013) y se ha visto que esta citocina afecta la maduración y apoptosis de los queratinocitos (Peng y Novak, 2015), resultando en un remodelado del tejido y el engrosamiento de epidermis y dermis (Yuan y cols., 2011). El tratamiento terapéutico y profiláctico con GMP mostró una disminución en el engrosamiento de la epidermis, lo que se asocia con la reducción de la expresión de IFN- γ observada en las lesiones cutáneas de los animales tratados con GMP. Otros autores han reportado un efecto regulador negativo del GMP sobre la producción de IFN- γ en modelos de inflamación crónica experimental. López-Posada y colaboradores (2010) demostraron que la administración oral de GMP a ratones con colitis inducida por dextrano sulfato de sodio reduce significativamente la secreción de IFN- γ por las células de los nódulos linfáticos mesentéricos. De igual manera, en un modelo de colitis ulcerativa desarrollado en ratón, el GMP administrado oralmente redujo los niveles plasmáticos de IFN- γ (Ming y cols., 2015).

Se ha reportado que IL-10 inhibe tanto la proliferación como la síntesis de citocinas por los linfocitos Th2 (Del Prete y cols., 1993) y Th1 (Kwon y cols., 2010; Castillo y Kolls., 2016). Recientemente, la función de la IL-10 en el control del desarrollo y mantenimiento de la DA se ha ressaltado por el hecho de que polimorfismos en el gen de la IL-10 podría representar un marcador genético para la inducción de la DA en la infancia (Sohn y cols., 2007). La regulación negativa en la respuesta inflamatoria Th2 y Th1 cutánea en los animales tratados con GMP puede asociarse con el aumento en la expresión de IL-10, una importante citocina reguladora.

El prurito es un signo fehaciente de la DA (Kim, 2012) y éste ocasiona un gran deterioro en la calidad de vida del paciente (Buske-Kirschbaum y cols., 2001), además de incrementar las lesiones de la piel y agravar la fisiopatología de la DA (Wahlgren y cols., 1999). Por lo tanto, la resolución del prurito es una de las metas claves en el desarrollo de nuevos tratamientos para esta patología. Los animales sensibilizados mostraron un intenso prurito después de la aplicación del DNCB; sin embargo, el tratamiento profiláctico con GMP disminuyó significativamente los eventos de rascado de los animales. Dentro de los agentes causales del prurito en la DA, la histamina liberada por los mastocitos sensibilizados y desgranulados (Albrecht y cols., 2015) juega un papel importante, ya que las terapias combinadas de antagonistas de receptores H1 y H4 logran exitosamente su alivio (Albrecht y cols., 2015). El decremento de IgE y número de mastocitos observado en los animales tratados con GMP antes de la sensibilización, junto con el efecto inhibitorio reportado al GMP en la activación del mastocito mediada por el alérgeno (Jiménez y cols., 2016), pueden causar una disminución en los niveles de histamina en la piel, impactando favorablemente en la desaparición del prurito. Además, se ha reportado que los ratones transgénicos que expresan IL-13 en la piel, desarrollan un intenso prurito (Zheng y cols., 2009). Dupilumab, un anticuerpo monoclonal que se une a la cadena alpha del R de la IL-4 y bloquea tanto las vías de señalización de la IL-4 como de la IL-13, reduce la sensación de prurito en pacientes con DA de moderada a severa (Beck y cols., 2014; Thaçi y cols., 2016).

Por lo tanto, el efecto anti-prurinérgico del GMP también puede ser mediado por la reducción de la expresión de IL-4 e IL-13 en la piel. Sin embargo, debido al amplio rango de estímulos capaces de inducir prurito en la DA, no podemos excluir un posible efecto del GMP sobre otros elementos inductores.

Las proteínas estructurales de la piel y la producción de AMPs son esenciales para mantener la integridad y fuerza de la barrera dérmica, así como su acción de barrera de defensa (Irvine y cols., 2011; Takahashi y cols., 2017). En nuestro modelo experimental de DA, la cantidad de filagrina, involucrina, rBD-2 y rCRAMP que expresaban los animales en el tejido lesionado era inferior a la de los animales controles, tal y como se ha demostrado en otros modelos experimentales (Hönze y cols., 2016) y como se reporta en algunos pacientes con DA (Clausen y cols., 2015).

En el caso de las proteínas estructurales de la epidermis, se sabe que el ambiente de citocinas del perfil Th2 que se genera en la respuesta inflamatoria durante el desarrollo de la DA, en particular la IL-4 e IL-13, afectan negativamente la expresión de filagrina (Seltmann y cols., 2015) y el proceso de diferenciación de proteínas como la involucrina (Kim y cols., 2008). La administración profiláctica y terapéutica del GMP incrementó el nivel de expresión de filagrina en ratas con DA, siendo más evidente éste efecto en la terapia profiláctica. Sin embargo, no se observó efecto significativo sobre la expresión de involucrina. Se ha demostrado que tanto IL-4 como IL-13 inducen la forforilacion de STAT3 y STAT6 en queratinocitos, y que ambos factores afectan el proceso de diferenciación de los mismos (Amano et al., 2015). Sin embargo, mientras que el factor STAT3 (y no STAT6) participa en la regulación negativa de los niveles de expresión de filagrina (Amano et al., 2015) en respuesta a ambas citocinas, el efecto negativo de IL-4 sobre la expresión de involucrina implica a la ruta Jak-STAT6 que secuestra a p300/CBP, un componente fundamental del complejo transcripcional de involucrina (Bao y cols., 2016). Si bien en este trabajo quedó demostrado el efecto regulador negativo del GMP sobre la expresión de IL-4 e IL-13, la participación de

diferentes factores STAT en la regulación de la expresión de las proteínas estructurales, pudiera ser la causa de que el GMP tenga un efecto positivo sobre la recuperación de los niveles de filagrina en las lesiones con DA, pero no sobre los de involucrina. También, habría que considerar que la disminución de los niveles de IL-4 por el GMP podrían no ser suficiente para permitir la regulación positiva de la expresión de involucrina.

La sobreexpresión de IL-4 e IL-13 en la DA, también afecta de forma negativa la expresión de AMPs como BD-2 y catelicidina (Boguniewicz y Leung, 2010; Ong y cols., 2002). El tratamiento profiláctico y terapéutico con GMP permitió la recuperación de la expresión de rBD-2 y rCRAMP a niveles basales, en la piel lesionada de los animales. Un posible mecanismo mediante el cual se regula la expresión de filagrina, rBD-2 y rCRAMP en la DA experimental puede ser mediante la reducción de los niveles de expresión de IL-4 e IL-13 ocasionados por la administración con GMP. Así por ejemplo se ha demostrado que la administración de vitamina D a paciente con DA genera también un efecto reductor en los niveles de IL-4 sérica (DiFilippo y cols., 2015) y un aumento en los niveles de catelicidina en piel (Hate y col., 2008; Takahashi y Gallo, 2017).

El TGF- β es una citocina multifuncional que por un lado juega un papel importante en la diferenciación celular y biosíntesis de la matriz extracelular, así como en la producción de colágeno tipo I, por lo que es responsable del proceso de liquenificación y engrosamiento de la epidermis (Lan y cols, 2013; Herro y cols., 2015) y por el otro, en coordinación con IL-10 muestra un efecto modulador de la respuesta inmunológica en la DA (Han y cols., 2015). En nuestro modelo experimental, se puede observar el incremento de TGF- β en animales sensibilizados con DNCB, lo que se asocia con el engrosamiento de la epidermis en las lesiones cutáneas. Sin embargo, los niveles de TGF- β en las lesiones de los animales sensibilizados pero tratados con GMP fueron todavía superiores. Debido a que el tratamiento con GMP redujo significativamente el grosor de la epidermis y

el proceso inflamatorio, se propone que el incremento cutáneo de TGF- β esté relacionado con un efecto regulador de la respuesta inmune asociada a la DA.

Se sabe que algunos péptidos bioactivos realizan sus funciones en órganos periféricos una vez absorbidos (Wada y Lönnnerdal, 2013). El proceso digestivo y metabolismo del GMP no es del todo conocido. De manera general, se sabe que la digestión de las proteínas inicia en el estómago por acción de la pepsina, la cual es activada en condiciones ácidas producidas por el ácido clorhídrico. Después, el proceso digestivo sigue en el duodeno, ahora por acción de las enzimas pancreáticas (tripsina y quimiotripsina) de manera tal que se liberan péptidos de 2 a 20 aminoácidos de longitud (Korhonen, 2009). Los péptidos son posteriormente digeridos a aminoácidos por las peptidasas de los borde en cepillo de las células del epitelio intestinal, aunque algunos péptidos permanecen intactos (Phelan y cols., 2009). En relación al GMP se sabe que es liberado de la κ -caseína por la acción de la quimosina en el tracto gastrointestinal de los recién nacidos (Umbach y cols., 1985) y posteriormente por la pepsina en los humanos adultos (Thöma-Worringer y cols., 2006). Así, el grupo de Chabance (1998) detectó el GMP en el estómago de individuos tras la ingesta de leche o yogurt y en plasma de ratas y humanos, de 1 a 8 horas después de la ingestión de caseína humana (Chabance y cols., 1995), proponiendo la liberación del GMP de la κ -caseína y su absorción intacta a nivel duodenal. Sin embargo, la razón por la cual el GMP no fue detectado en la piel de los animales sin y con DA, pudo deberse a que es susceptible a la acción de enzimas digestivas como tripsina (Tian y cols., 2015), y a la acción proteolítica de la microbiota (Mohanty y cols., 2016) y como consecuencia la cantidad de GMP absorbido intacto pudo ser muy pequeña. Además, las proteasas sanguíneas y tisulares pudieron actuar degradando el GMP presente en sangre o en tejidos evitando así su detección.

Trabajos recientes han demostrado el efecto prebiótico del GMP en un modelo de sensibilización alérgica, donde se observó un incremento significativo en la cantidad de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Bacteroides* en el intestino de

los animales atópicos, cuando el GMP fue administrado previo a la sensibilización (Jiménez y cols., 2016). Este efecto prebiótico se asoció a un aumento en la secreción de TGF- β por los esplenocitos de los animales sensibilizados en respuesta al alérgeno y a una inhibición en la activación de los mastocitos cutáneos por el alérgeno, lo que manifiesta que la acción prebiótica del GMP a nivel intestinal se refleja en una regulación negativa de la respuesta alérgica sistémica. En este sentido, se propone que el GMP podría estar modulando la respuesta inmune asociada a la DA a través de su acción prebiótica sobre algunas especies bacterianas con efecto protector en el desarrollo de la patología. Los datos existentes sobre el efecto del uso de probióticos en la prevención de la DA han evidenciado que sus efectos dependen de factores como el tipo de cepa probiótica, método de la administración, tiempo de inicio, duración de la exposición y dosis (Rather y cols., 2016). Particularmente *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* han mostrado efectos promisorios como terapia preventiva en la DA pediátrica; aunque la acción de los probióticos una vez establecida la patología es menos convincente (Baquerizo-Nole y cols., 2014). Estos datos concuerdan con nuestros resultados en los que el efecto benéfico del tratamiento con GMP en la DA es mayor como terapia preventiva que como terapéutica, lo que viene a reforzar la propuesta de que es la actividad prebiótica del GMP a nivel intestinal la que está regulando a nivel sistémico o local en los tejidos la respuesta inmune pro-inflamatoria asociada a la DA. En esta línea, la administración del probiótico *Weissella cibaria* WIKIM28, bacteria ácido láctica aislada de una bebida vegetal fermentada coreana, suprimió las lesiones cutáneas, los niveles de IgE en suero y la producción de citocinas Th2 por las células de los nódulos linfáticos periféricos en un modelo experimental de DA inducida por DNCB (Lim y cols., 2017). Los autores reportaron un incremento en la proporción de células T reguladoras (CD4+ CD25+ Foxp3+) en los nódulos linfáticos y en la producción de IL-10. También se ha demostrado que la inducción de tolerancia oral al DNFB en un modelo experimental de dermatitis por contacto, depende de un componente de la microbiota y de la expresión de TLR-4 por las células hematopoyéticas, movilizando un tipo de células dendríticas tolerogénicas (CD103+ CD11b+) intestinales productoras de ácido retinoico a los nódulos

linfáticos mesentéricos que transportan el DNFB y promueven la diferenciación y activación de linfocitos Treg (Lim y cols., 2017).

El efecto protector del GMP en la DA es mayor cuando se administra a los animales previo a la inducción de la enfermedad, que una vez que ya está establecida la patología. Ésta es una observación común en los ensayos experimentales con el GMP, pues cuando se usa como terapia antiinflamatoria en la colitis experimental, su efecto es mayor como profiláctico (Daddaoua y cols., 2005). Es importante resaltar, que aun cuando el GMP se administre una vez que la DA esté establecida, la mayor parte de sus efectos benéficos se mantienen, a excepción de su efectos anti-pruriginosos. Eso puede deberse a que, con este forma de uso, hay una menor reducción en los niveles de IgE, número de mastocitos y expresión de IL-4 e IL-13 y los niveles remanentes de estas moléculas o células deben de ser suficientes para mantener el prurito en los animales. Aún así, los pacientes con DA pueden beneficiarse de las propiedades antiinflamatorias e inmuno-reguladoras del GMP con su uso terapéutico.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

8. CONCLUSIONES.

El presente estudio demuestra que el GMP posee efectos profilácticos y terapéuticos en el desarrollo de la DA experimental.

El GMP disminuye el proceso inflamatorio cutáneo, así como el infiltrado de eosinófilos, la hiperplasia de mastocitos y el engrosamiento de la epidermis. Además, reduce los niveles de IgE total en suero. El GMP también actúa aumentando la expresión de proteínas estructurales de la epidermis, como la filagrina, y de péptidos antimicrobianos esenciales en la respuesta innata de la piel.

El efecto benéfico del GMP se asocia con la regulación negativa de la expresión de citocinas inflamatorias como IL-4, IL-5, IL-13 e IFN- γ , y la regulación positiva de citocinas reguladoras como IL-10 y TGF- β .

Finalmente, la administración profiláctica de GMP inhibe el prurito en las lesiones cutáneas de la DA experimental.

En conjunto, los resultados de éste estudio muestran las primeras evidencias experimentales para el uso potencial del GMP en la prevención y tratamiento de la DA.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aerts AM, Françaos IEJA, Cammue BPA and Thevissen K. 2008. Review: The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cell Mol Life Sci.* 65: 2069–2079.
- Agrawal R and Woodfolk JA. 2014. Skin Barrier Defects in Atopic Dermatitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 14: 433-444.
- Aimutis WR. 2004. Bioactive Properties of Milk Proteins with Particular Focus on Anticariogenesis. *J. Nutr.* 134: 989S-995S.
- Akdis CA, Akdis M, Bieber T, Bindslev-Jensen C, Boguniewicz M, Eigenmann P, Hamid Q, Kapp A, Leung DYM, Lipozencic J, Luger TA, Muraro M, Novak N, Platts-Mills TAE, Rosenwasser L, Scheynius A, Simons ER, Spergel J, Turjanmaa J, Wahn U, Weidinger S, Werfel T and Zuberbier T. 2006. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report. *Allergy* 61: 969-987.
- Akdis M, 2010. The cellular orchestra in skin allergy: are differences to lung and nose relevant?. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 10: 443-451.
- Akira S, Uematsu S and Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783 – 801.
- Albanesi C, Fairchild HR, Madonna S, Scarponi C, DePita O, Leung DYM and Howell MD. 2007. IL-4 and IL-13 negatively regulate TNF- α and IFN- γ induced β -defensin expression through STAT-6, suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3. *J Immunol.* 179: 984-992.
- Albrecht M and Dittrich AM. 2015. Expression and function of histamine and its receptors in atopic dermatitis. *Mol Cell Ped.* 2(16): 1–8.

- Ali SM, Yosipovitch G. 2013. Skin pH: From basic science to basic skin care. *Acta Derm Venereol.* 93: 261-267.
- Amin K. 2012. The role of mast cells in allergic inflammation. *Resp Med.* 106(1): 9–14.
- Arfsten DP, Garrett CM, Jederberg WW, Wilfong ER, McDougal JN. 2006. Characterization of the skin penetration of a hydrocarbon-based weapons maintenance oil. *J Occup Environ Hyg.* 3(9): 457–464.
- Auriemma M, Vianale G, Amerio P, Reale M. 2013. Cytokines and T cells in atopic dermatitis. *Eur. Cytokine Netw.* 24(3): 37 – 44.
- Back SK, Jeong KY, Li C, Lee J, Lee SB and Na HS. 2012. Chronically relapsing pruritic dermatitis in the rats treated as neonate with capsaicin; a potential rat model of human atopic dermatitis. *J. Dermatol.* 67(2): 111-119.
- Ballona-Chambergo R. 2003. Inhibidores de la calcineurina: una alternativa en el tratamiento inmunosupresor. *Dermatol. Peru.* 13(2): 121–123.
- Bao L, Alexander JB, Zhang H, Shen K and Chan LS. 2016. Interleukin-4 downregulation of involucrin expression in human epidermal keratinocytes involves stat 6 sequestration of the coactivator CREEB-binding protein. *J. Int. Cyt. Res.* 26(6): 374-382.
- Baquerizo-Nole KL, Yim E and Keri JE. 2014. Probiotics and prebiotics in dermatology. *J. Am. Acad. Dermatol.* 71: 814-821.
- Barnes PJ. 2016. Glucocorticosteroids. <https://doi.org/10.1007/164>.
- Bäsler K and Brandner JM. 2017. Tight junctions in skin inflammation. *Eur J Physiol* 469: 3-14.
- Bastian A and Schafer H. 2001. Human α -defensin (HNP-1) inhibits adenoviral infection in vitro. *Reg. Pep.* 101: 157–161.

- Batista FD, Iber D and Neuberger MS. 2001. B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature* 411(5): 489-494.
- Beck LA, Thaçi D, Hamilton JD, Graham NM, Bieber T, Rocklin R, Ming JE, Ren H, Kao R, Simpson E, Ardeleanu M, Weinstein SP, Pirozzi G, Guttman-Yassky E, Suárez-Fariñas M, Hager MD, Stahl N, Yancopoulos GD and Radin A R. 2014. Dupilumab treatment in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis. *N Engl J Med* 371(2): 130–139.
- Bedolla – Barajas M, Barrera Zepeda AT, Morales – Romero J. 2010. Dermatitis atópica en niños escolares de Ciudad Guzmán, México: Prevalencia y factores asociados. *Rev. Alergia Mx.* 57(3): 71-78
- Beikert FC, Langenbrunch AK, Radtke MA, Kornek T, Purwins S and Augustin M. 2013. Willingness to pay and quality of life in patients with atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 1-8.
- Bieber T. 2008. Atopic Dermatitis. *N. Engl Med.* 358: 1483 – 1494.
- Bieber T. 2010. Atopic Dermatitis. *Ann Dermatol.* 22(2): 125-137.
- Birkle DD, Chang S, Crumrine D, Elalieh H, Man MQ, Dardenne O, Xie Z, Arnaud R, Feingold K and Elias PM. 2004. Mice lacking 25OHD 1 α -hydroxylase demonstrate decreased epidermal differentiation and barrier function. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 89-90: 347-353.
- Blink SE, Fu YX. 2010. IgE regulates T helper cell differentiation through Fc γ RIII mediated dendritic cell cytokine modulation. *Cell. Immunol.* 264(1): 54-60.
- Boguniewicz M and Leung DYM. 2011. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunol. Rev.* 242: 233–246.
- Bonfeld CM and Geisler C. 2016. The role of innate lymphoid cells in healthy and inflamed skin. *Immunol. Lett.* . doi.org/10.1016/j.imlet.2016.01.005.
- Boutrou R, Gaudichon C, Dupont D, Jardin J, Airinei, Marsset-Baglieri A, Benamouzig R, Tome D and Leonil J. 2013. Sequential release of milk

protein–derived bioactive peptides in the jejunum in healthy humans. *Am J Clin Nutr.* 97: 1314-1323.

Bouwstra JA and Ponc M. 2006. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim Biophys Acta.* 1758: 2080–2095.

Brandner JM. 2009. Tight junctions and tight junctions proteins in mammalian epidermis. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72: 289-294.

Brandt E, Sivaprasad U. 2011. Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis. *J Clin Cell Immunol.* doi:10.4172/2155-9899.1000110.

Brauweiler, A. M., Goleva, E., & Leung, D. Y. M. (2014). Th2 Cytokines Increase Staphylococcus aureus Alpha Toxin – Induced Keratinocyte Death through the Signal Transducer and Activator of Transcription 6 (STAT6). *J Invest Dermatol* 134(8): 2114–2121.

Briot A, Deraison C, Lacroix M, Bonnart C, Robin A, Besson C, Dubus P and Hovnanian A. 2009. Kallikrein 5 induces atopic dermatitis – like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. *J Exp Med.* 206(5): 1135-1147.

Brody EP. 2000. Biological activities of bovine glycomacropeptide. *Br J Nutr.* 84(1S): S39-S46.

Brown SJ and McLean WH. 2012. One remarkable molecule: Filaggrin. *J Invest Dermatol* 132(3): 751-762.

Brük WM, Redgrave M, Tuohy KM, Lönnerdal B, Graverholt G, Hernell O and Gibson GR. 2006. Effects of Bovine α -Lactalbumin and Casein Glycomacropeptide enriched Infant Formulae on Faecal Microbiota in Healthy Term Infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 43(11): 673–679.

Buchaü AS and Gallo RL. 2007. Innate Immunity and antimicrobial defense systems in psoriasis. *Clin Dermatol.* 25(6): 616–624.

- Buske-Kirschbaum A, Ebrecht M and Hellhammer DH. 2001. Brain, behavior and immunity blunted HPA axis responsiveness to stress in atopic patients is associated with the acuity and severeness of allergic inflammation. *Brain Behav. Immun. Brain Behavior and Immunity* 24(8): 1347–1353.
- Carøe TK, Ebbenhøj NE and Agner T. 2016. Occupational dermatitis in hairdressers –influence of individual and environmental factors. doi.org/10.1111/cod.12686.
- Carr W. 2013. Topical calcineurin inhibitors for atopic dermatitis: Review and treatment recommendations. *Pediatr Drugs* 15(4): 303-310.
- Cassano N, Tessari G, Vena GA and Girolomoni G. 2010. Chronic Pruritus in the absence of specific skin disease. *Am J Clin Dermatol.* 11(6): 399-411.
- Castillo P and Kolls JK. 2016. IL-10: a paradigm for counterregulatory cytokines. *J. Immunol.* 197: 1529-1530.
- Chabance B, Jolles P, Izquierdo C, Mazoyer E, Francoual C, Drouet L and Fiat AM. 1995. Characterization of an antithrombotic peptide from κ -casein in newborn plasma after milk ingestion. *Br J Nutr* 73: 583-590.
- Chabance B, Marteau P, Rambaud JC, Migliore-Samur D, Boynard M, Perrotin P, Guillet R, Jolles P and Fiat AM. 1998. Casein peptide release and passage to the blood in human during digestion of milk or yogurt. *Biochimie* 80: 155-165.
- Chan LS, Robinson N and 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(4): 977–983.
- Chang AC, Liu BH, Shao PL and Liao JD. 2017. Structure-dependent behaviours of skin layers studied by atomic force microscopy. *J Microsc.* 0: 1-7.

- Chaplin DD. 2010. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 125(2): S3–S23.
- Chapman SJ and Walsh A. 1990. An ultrastructural study of adult pig epidermis. *Arc Dermatol Res.* 282: 304–310.
- Chavakis T, Cines DB, Rhee JS, Liang OD, Schubert U, Mammes HP, Higazi AAR, Nawroth PP, Preissner KT and Bdeir K. 2004. Regulation of neovascularization by human neutrophil peptides (α -defensins): a link between inflammation and angiogenesis. *FASEB J* Doi: 10.1096/fj.03-1009fje.
- Chávez NA, Salinas E, Jauregui J, Palomares LA and Macías K. 2008. Food and Agricultural Immunology Detection of bovine milk adulterated with cheese whey by western blot immunoassay. *Food Agric Immunol.* 19(4): 265-272.
- Chen Q, Cao J, Jia Y, Liu X, Yan Y and Pang G. 2012. Modulation of mice fecal microbiota by administration of casein Glycomacropeptide. *MicrobRes.* 3 (e3): 8-12.
- Chen Y, Mant CT, Farmer SW, Hancock REW, Vasil ML and Hodges RS 2005. Rational Design of α -Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity/Therapeutic Index. *J Biol Chem.* 280(13): 12316–12329.
- Chen Q, Wang H, Zhu C and Yan Y. 2014. Anti-apoptotic effects of milk-derived casein glycomacropeptide on mice with ulcerative colitis. *Food Agric Immunol.* 25 (4): 453-466.
- Cheng X, Gao DX, Song JJ, Ren FZ and Mao XY. 2015. Casein glycomacropeptide hydrolysate exerts cytoprotection against H₂O₂-induced oxidative stress in RAW 264.7 macrophages via ROS-dependent heme oxygenase-1 expression. *RSC Adv* 5: 4511-4523.
- Cheng X, Gao D, Chen B and Mao XY. 2015. Endotoxin-Binding Peptides Derived from Casein Glycomacropeptide Inhibit Lipopolysaccharide-Stimulated

Inflammatory Responses via Blockade of NF- κ B activation in macrophages. *Nutrients*. 7: 3119-3137.

Chibli LA, Rodrigues KCM, Gasparetto CM, Pinto NCC, Fabri RL, Scio E, Alves MS, DelVechio-Viera G and Sousa OV. 2014. Anti-inflammatory effects of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken ethanol extract in acute and chronic cutaneous inflammation. *J Ethnopharmacol*. 154(2): 330–338.

Civelek E, Şahiner Ü, Yüksel H, Boz A, Orhan F, Üner A, and Şekerel BE. 2011. Prevalence, burden and risk factors of atopic eczema in school children aged 10 – 11 years: A national multicenter study. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 21(4): 270 – 277.

Clark AR. 2007. Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Mol Cell Endocrinol*. 275(4): 79–97.

Clausen M, Slotved H, Kroghfelt KA, Andersen PS and Agner T. 2016. In vivo expression of antimicrobial peptides in atopic dermatitis. *Exp Derm*. 25: 3–9.

Conejo-García JR., Benencia F, Courreges M, Kang E, Mohamed-Hadley A, Buckanovich RJ, Holtz DO, Jenkins A, Na H, Zhang L, Wagner D, Katsaros D, Carroll R and Coukos, G. 2004. Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a β -defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A. *Nature Med*.10(9): 950–958.

Cooper MD and Alder MN. 2006. Review The Evolution of Adaptive Immune Systems. *Cell* 124: 815–822.

Costa HF, Bezerra-Santos CR, Barbosa-Filho JM, Martins MA, Piuvezam MR. 2008. Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, decreases immediate allergic and thermal hyperalgesic reactions in sensitized animals. *Int Immunopharmacol*. 8:519–25

- Coutinho AE and Chapman KE. 2011. Molecular and Cellular Endocrinology The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol Cell Endocrinol.* 335 (1): 2–13.
- Crack LR, Jones L, Malavige GN Patel V and Ogg GS. 2012. Human antimicrobial peptides LL-37 and human β -defensin-2 reduce viral replication in keratinocytes infected with varicella zoster virus. *Clin Exp Dermatol.* 37: 534–543.
- Crosby MS, Blattner CM, Goedken M and Murase JE. 2016. Update: Do probiotics prevent or treat pediatric atopic dermatitis? Doi: 10.1111/pai.12539
- Cuevas – Castillejos H y Cuevas Castillejos JE. 2012. Alergia e hipersensibilidad: conceptos básicos para el pediatra. *Rev Mex Pediatr* 79 (4): 192 – 200.
- D Solé, Mallol J, Wandalsen GF, Aguirre V. 2010. Prevalence of Symptoms of Eczema in Latin America: Results of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase 3. *J Invest Allergol Clin Immunol.* 20(4): 311-323
- Daddaoua A, Puerta V, Zarzuelo A, Suárez MD, Sánchez de Medina F, Martínez – Agustín O. 2005. Bovine Glycomacropeptide Is Anti-Inflammatory in Rats with Hapten-Induced Colitis *J. Nutr.* 135(5): 1164–1170, 2005.
- Dai X, Sayama K, Tohyama M and Shirakata Y. 2010. Mite allergen is a danger signal for the skin via activation of inflammasome in keratinocytes. *J Allergy Clin Immunol.* 127(3): 806–814.
- Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, Mitsdoerffer M, Strom TB, Elyaman W, Ho IC, Khoury S, Oukka M, Kuchroo VK. 2008. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol.* 9: 1347.

- Darwish RM and Aburjai TA. 2010. Effect of ethnomedicinal plants used in folklore medicine in Jordan as antibiotic resistant inhibitors on *Escherichia coli*. *Complementary Altern Med*. 10:9-17.
- De Benedetto A, Agnihotri R, McGirt LY, Bankova LG and Beck LA. 2009. Atopic Dermatitis : A Disease Caused by Innate Immune Defects ? *J Invest Dermatol*. 129(1): 14–30.
- De Pablo R, Monserrat J, Prieto A and Álvarez – Mon M. 2014. Role of Circulating Lymphocytes in Patients with Sepsis. *Biomed Res Int*. doi.org/10.1155/2014/671087.
- Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R and Romagnani S. 1993. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 150: 353-360.
- Dharmage SC, Lowe AJ, Matheson MC, Burgess JA, Allen KJ and Abramson MJ. 2014. Atopic dermatitis and the atopic march revisited. *Allergy: Eur J Allergy Clin Immunol*. 69(1): 17–27.
- Di Filippo P, Scaparrotta A, Rapino D, Cingolani A, Attanasi M, Petrosino MI, Chuang K, Di Pilo S and Chiarelli F. 2015. *Int Arch Allergy Immunol* 166:91–96.
- Dillon SR, Sprecher C, Hammond A, Bilsborough J, Rosenfeld-Franklin M, Presnell SR, Haugen HS, Maurer M, Harder B, Johnston J, Bort S, Mudri S, Kuijper JL, Bukowski T, Shea P, Dong DL, Dasovich M, Grant FJ, Lockwood L, Levin S, LeCiel C, Waggle K, Day H, Topouzis S, Kramer J, Kuestner R, Chen Z, Foster D, Parrish-Novak J and Gross JA. 2004. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nature Immunology* 5 (7): 752-760.

- Djian P, Easley K and Green H. 2000. Targeted Ablation of the Murine Involucrin Gene. *J Cell Biol.* 151(2): 381–387 151.
- Dokmeci E and Herrick CA. 2008. The Immune System and Atopic Dermatitis. *Semin Cutan Med Surg.* 27:138-143.
- Dos Santos VG, Orfali RL, Titz TDO, Alberto J, Duarte S, Sato MN and Aok, V. 2017. Evidence of regulatory myeloid dendritic cells and circulating inflammatory epidermal dendritic cells-like modulated by Toll-like receptors 2 and 7 / 8 in adults with atopic dermatitis. *Int Society Dermatol.* doi.org/10.1111/ijd.13537.
- Egawa G and Kabashima K. 2011. Skin as a peripheral lymphoid organ: revisiting the concept of skin-associated lymphoid tissues. *J Invest Dermatol.* 131 (11): 2178–85.
- Egberts F, Heinrich M, Jensen JM, Winoto - Morbach S, Pfeiffer S, Wickel M, Schunck M, Steude J, Saftig P, Proksch E and Schütze, S. 2004. Cathepsin D is involved in the regulation of transglutaminase 1 and epidermal differentiation. *J Cell Sci.* 117: 2295-2307.
- Eigel WN, Butler JE, Ernstrom CA, Farrell HM, Harwalkar VR, Jenness R, Whitney RM. 1984. Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. *J Dairy Sci.* 67: 1599–631.
- Engebreetsen KA, Bager P, Wohlfahrt J, Skov L, Zachariae C, Nybo - Andersen AM, Melbye M and Thyssen JP. 2017. Prevalence of atopic dermatitis in infants by domestic water hardness and season of birth: Cohort study. *J Allergy Clin Immunol.* 139(5): 1568–1574.
- Etzel MR. 2004. Manufacture and Use of Dairy Protein Fractions. *J. Nutr.* 134: 996S–1002S.

- Fang YP, Yang SH, Lee CH, Aljuffali IA, Kao HC and Fang JY. 2016. What is the discrepancy between drug permeation into/across intact and diseased skins? Atopic dermatitis as a model. *Int J Pharm* 497 (1–2): 277–286.
- Fariás ME, Martínez MJ, Pílosof AMR. 2010. Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation. *Int Dairy J.* 20: 79–88.
- Farrell HM, Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK, Hicks CL, Hollar CM, Ng-Kwai-Hang KF and Swaisgood HE. 2004. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk — Sixth Revision. *JDairy Sci.* 87(6): 1641–1674.
- Feingold KR and Jiang YJ. 2011. The mechanisms by which lipids coordinately regulate the formation of the protein and lipid domains of the stratum corneum. *Dermato-Endocrinol.* 3 (2): 113-118.
- Ference JD and Last AR. 2009. Choosing topical corticosteroids. *American Family Physician.* 79(2): 135–140.
- Fernando SF and Woonton BW. 2010. Quantitation of N-acetylneuraminic (sialic) acid in bovine glycomacropeptide (GMP). *J Food Compos Anal.* 23(4):359–366.
- Fitch KR, MCGowan KA, Van-Raamsdonk CD, Fuchs H, Lee D, Puech A, Héroult Y, Threadgill DW, De Angelis MH and Barsh GS. 2003. Genetics of dark skin in mice. 214–228. *Genes & Develop.* 17:214–228.
- FitzGerald RJ and Meisel H. 2003. Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. *Ad Dairy Chem.* 1: 675-698.
- Fonacier LS and Aquino MR. 2010. The role of contact allergy in atopic dermatitis. *Immunol Allergy Clin N Am.* 30: 337–350.
- Fragoso RC, Wei – Chih Su M and Burakoff SJ. 2002. T cell and their effector functions. *Encyclopedia of Cancer.* Vol 4. 2^a. Elsevier Science. USA.

- Fujii Y, Takeuchi H, Sengoku T and Takakura S. 2009. Characterization of a 2, 4-Dinitro-chlorobenzene-Induced Chronic Dermatitis Model in Rats. *Skin Pharmacol Physiol.* 22 (5): 240-247.
- Galli SJ, Tsai M and Piliponsky AM. 2008. The development of allergic inflammation. *Nature.* 454: 445 – 54
- Galli SJ and Tsai M. 2012. IgE and mast cells in allergic disease. *Nature Medicine,* 18(5): 693–704.
- Gallo RL and Hooper LV. 2012. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nature.* 12(7): 503–516.
- Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SSL, Daher K, Bainton DF and Lehrer RI. 1985. Defensins: Natural Peptide Antibiotics of Human Neutrophils. *J. Clin. Invest.* 10: 1427–1435.
- Gefen T, Vaya J, Rapoport I, Lupo M, Barnea E, Heller ED and Aizenshtein E. 2014. The effect of haptens on protein-carrier immunogenicity. *Immunol.* 144: 116–126.
- Gittler, J. K., Krueger, J. G., & Guttman-Yassky, E. (2013). Atopic dermatitis results in intrinsic barrier and immune abnormalities: Implications for contact dermatitis. *JAllergy Clin Immunol.* 131(2), 300–313. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.06.048>
- Giam YC, Herbert AA, Dizon MV, VanBever H, Tiongco-Recto M, Kim KH, Soebono H, unasir Z, Diana IA and Luk DCK. 2016. A review on the role of moisturizers for atopic dermatitis. *Asian Pac Allergy.* 6:120-128.
- Gisoni P, Ellis CN and Girolomoni G. 2005. Pimecrolimus in dermatology: atopic dermatitis and beyond. *Int J Clin Pract.* 59 (8): 969–974.

- Gittler JK, Krueger JG and Guttman-Yassaky E. 2013. Atopic dermatitis results in intrinsic barrier and immune abnormalities: Implications for contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 131: 300-13.
- Glatzer F, Gschwandtner M, Ehling S, Rossbach K, Janik K, Klos A, Bäumer W, Kietzmann M, Werfel T and Wolfgang B. 2013. Histamine induces proliferation in keratinocytes from patients with atopic dermatitis through the histamine 4 receptor. *J Allergy Clin Immunol.* 132: 1358–1367.
- Godin B. and Touitou E. 2007. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Ad Drug Del Rev.* 59(11): 1152–1161.
- Gombert M and Dieu-Nosjean M. 2005. CCL1-CCR8 Interactions: An Axis Mediating the Recruitment of T Cells and Langerhans-Type Dendritic Cells to Sites of Atopic Skin Inflammation. *J Immunol.* 174: 5082-91.
- Gonzaga M, Rezende FC, Lucia A, Machado CA and Fonseca F. 2017. Anatomical, Histological and Metabolic Differences between Hypodermis and Subcutaneous Adipose Tissue. *Int Med Soc.* 10 (152): 1–6.
- Goo J, Ji JH, Jeon H, Kim MJ, Jeon SY, Cho MY, Lee SH and Choi EH. 2010. Expression of Antimicrobial Peptides Such as LL-37 and hBD-2 in Nonlesional Skin of Atopic Individuals. *Ped Dermatol* 27(4): 341–348.
- Grewe M, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Schöpf E, Thepen T, Langeveld-Wildschut AG, Ruzicka T and Krutmann J. 1998. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Today.* 19(8): 359-361.
- Gruber R, Elias PM, Crumrine D, Lin TK, Brandner JM, Hachem JP, Presland RB, Fleckman P, Janecke AR, Sandilands A, McLean WHI, Fritsch PO, Mildner M, Tschachler E and Schmuth M. 2011. Filaggrin genotype in ichthyosis vulgaris predicts abnormalities in epidermal structure and function. *Am J Pathol.* 178 (5): 2252 – 63.

- Guaní-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO and Terán LM. 2010. Antimicrobial peptides : General overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol.* 135 (1): 1–11.
- Han S, Koo D, Kang N, Yoon, W, Kang G, Kang H and Yoo E. 2015. Docosahexaenoic Acid Alleviates Atopic Dermatitis by Generating Tregs and IL-10 / TGF- β -Modified Macrophages via a TGF- β -Dependent Mechanism. *J Invest Dermatol* 135(6): 1556–1564.
- Hancock REW, Haney EF and Gill EE. 2016. The immunology of host defence peptides : beyond antimicrobial activity. *Nature.* 16(5): 321–334.
- Harder J and Schröder JM. 2005. Antimicrobial peptides in human skin. *Chem Immunol Allergy.* 86: 22–41.
- Hayashida S, Uchi H, Moroi Y and Furue M. 2011. Decrease in circulating Th17 cells correlates with increased levels of CCL17, IgE and eosinophils in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* 61(3): 180-186.
- Hengge UR, Ruzicka T, Schwartz RA, Cork M. 2006. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. *J. Am. Acad. Dermatol.* 54(1):1–15.
- Heo JC, Son HU, Kim SL and Lee SH. 2012. A derivative of L-Allo Threonine Alleviates 2,4-Dinitrofluorobenzene-Induced Atopic Dermatitis Indications. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76 (11): 2021 – 2025.
- Heo WI, Lee KE, Hong JY, Kim MN, Oh MS, Kim YS, Kim KW, Kim KE and Sohn MH. 2015. The role of interleukin-17 in mouse models of atopic dermatitis and contact dermatitis. *Clin Exp Dermatol:* 40: 665–671.
- Hernández-Ledesma B, Quirós A, Amigo L and Recio I. 2007. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *Int Dairy J.* 17: 42-49.

- Herro R, DaSilva R, Roman A, Tamada K and Croft M. 2015. The Tumor Necrosis Factor Superfamily Molecule LIGHT promotes Keratinocyte Activity and Skin Fibrosis. *J Invest Dermatol*. doi: 10.1038/jid.2015.110.
- Hijnen D, Knol EF, Gent YY, Giovannone B, Beijm SJP, Kupper TS, Bruijnzeel-Koomen CAFM and Clark RA. 2012. CD8+ T Cells in the Lesional Skin of Atopic Dermatitis and Psoriasis Patients Are an Important Source of IFN- γ , IL-13, IL-17 and IL-22. *J Invest Dermatol*. 133(4): 973–979.
- Hirano T, Kawasaki N, Miyataka H and Satoh T. 2001. Wistar strain rats as the model for IgE antibody experiments. *Biol. Pharm. Bull* 24(8): 962-963.
- Holdom MD, Davies AM, Nettleship JE, Bagby SC, Dhaliwal B, Girardi E, Hunt J, Gould HJ, Bevil AJ, McDonnell JM, Owens RJ and Sutton BJ. 2011. Conformational changes in IgE contribute to its uniquely slow dissociation rate from receptor Fc ϵ RI. *Nat. Struct. Mol. Biol*. 18(5): 571–576.
- Hon KLE, Leung TF, Ng PC, Lam MCA, Kam WYC, Wong KY, Lee KCK, Sung YT, Cheng KF, Fok TF, Fung KP and Leung PC. 2007. Efficacy and tolerability of a Chinese herbal medicine concoction for treatment of atopic dermatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Dermatol*. 157: 357–363.
- Honda T, Egawa G, Grabbe S and Kabashima K. 2013. Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol*. 133 (2): 303 -15.
- Hönzke S, Wallmeyer L, Ostrowski A, Radbruch M, Mundhenk L, Schäfer and Hedtrich S. 2016. Influence of Th2 Cytokines on the Cornified Envelope, Tight Junction Proteins, and b-Defensins in Filaggrin-Deficient Skin Equivalents. *J Invest Dermatol*. 136: 631-639.

- Hvas CL, Dige A, Bendix M, Wernlund PG, Christensen LA and Dahlerup JF. 2016. Casein glycomacropeptide for active distal ulcerative colitis: a randomized pilot study. *Eur J Clin Invest.* 46 (6): 555–563.
- Inagaki N and Nagai H. 2009. Analysis of the Mechanism for the Development of Allergic Skin Inflammation and the Application for Its Treatment: Mouse Models for the Development of Remedies for Human Allergic Dermatitis. *J. Pharmacol.* 110 (3): 251 – 259.
- Inagaki N, Shiraishi N, Igeta K, Itoh T, Chikumoto T, Nagao M, Kim JF and Nagai H. 2006. Inhibition of scratching behavior associated with allergic dermatitis in mice by tacrolimus, but not by dexamethasone. *Eur J Pharmacol.* 546: 189–196
- Inagaki N, Shiraishi N, Igeta K, Nagao M, Kim JF, Chikumoto T, Itoh T, Katoh H, Tanaka K and Nagai H. 2010. Depletion of substance P, a mechanism for inhibition of mouse scratching behavior. *Eur J Pharmacol.* 626: 283-289.
- Incorvaia C, Frati F, Verna N, D'Aló S, Motolese A. and Pucci S. 2008. Allergy and the skin. *Clin Exp Immunol.* 153 (1): 27-29.
- Irvine AD, McLean WHI and Leung DYM. 2011. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *N Engl J Med.* 365: 1315-1327.
- Ishida – Yamamoto A and Igawa S. 2015. The biology and regulation of corneodesmosomes. *Cell Tissue Res* 360:477–482.
- Iwasaki K, Mishima E, Miura M, Sakai N and Shimao S. 1995. Effect of RU 486 on the atrophogenic and anti-inflammatory effects of glucocorticoids in skin. *J Dermatol Sci.* 10: 151-158
- Jang AH, Kim TH, Kim GD, Kim JE, Kim HJ, Kim SS, Jin YH, Park YS, Park CS. 2011. Rosmarinic acid attenuates 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Int Immunopharm.* 11 (9): 1271–1277.

- Janssens M. 2011. Lamellar Lipid Organization and Ceramide Composition in the Stratum Corneum of Patients with Atopic Eczema. *J Invest Dermatol.* 131: 2136–2138.
- Jares E and Pignataro O. 2002. Mecanismos moleculares de acción de los corticoides. *Arch AlergInmunol Clín.* 33 (1): 1–11.
- Jeong CW, Ahnt KS, Rho NK, Park YD, Lee DY, Lee JH, Lee ES and Yang JM. 2003. Differential in vivo cytokine mRNA expression in lesional skin of intrinsic vs. extrinsic atopic dermatitis patients using semiquantitative RT-PCR. *Clin Exp Allergy.* 33(12): 1717–1724.
- Jiménez M, Chávez NA, Salinas E. 2012. Pretreatment with glycomacropeptide reduces allergen sensitization, alleviates immediate cutaneous hypersensitivity and protects from anaphylaxis. *Clin Exp Immunol.* 170: 18-27.
- Jiménez M, Cervantes-García D, Muñoz YH, García A, Haro LM and Salinas E. 2016. Novel Mechanisms Underlying the Therapeutic Effect of Glycomacropeptide on Allergy: Change in Gut Microbiota, Upregulation of TGF- β , and Inhibition of Mast Cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 171:217–226.
- Kabashima K. 2013. New concept of the pathogenesis of atopic dermatitis: Interplay among the barrier, allergy, and pruritus as a trinity. *J. Derm Sci.* 70: 3-11.
- Kawasaki Y, Isoda K, Shinmoto H, Tanimoto M, Dosako S, Idota T and Nakajima I. 1993. Inhibition by cappa-casein glycomacropeptide and lactoferrin of influenza virus hemagglutination. *Bioscience, Biotech Biochem.* 57: 1214 – 1215.
- Kawasaki H, Kubo A, Sasaki T and Amagai M. 2011. Loss- of- Function Mutations within the Filaggrin Gene and Atopic Dermatitis. *Curr Probl Dermatol.* 41: 35–46.

- Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Tsuyoshi H, Shimizu A, Mizuno H, Yamada T and Masayuki A. 2012. Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. *J Allergy Clin Immunol.* 129(6): 1538–1546.
- Kawasaki Y, Isoda H, Tanimoto M, Dosako S, Idota T and Ahiko K. (1992). Inhibition by Lactoferrin and κ -Casein Glycomacropeptide of Binding of Cholera Toxin to its Receptor. *Biosci Biotech Biochem.* 56 (2): 195-198.
- Kayser H and Meisel H. 1996. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactivepeptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Lett.* 383: 18-20.
- Kelleher SL, Chatterton D, Nielsen K and Lönnerdal B. 2003. Glycomacropeptide and α -lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. *Am J Clin Nutr.* 77:1261–1268.
- Kenshi Y and Gallo RL. 2008. Antimicrobial peptides in human skin disease. *Eur J Dermatol.* 18: 11-21.
- Keogh JB and Clifton P. 2008. The effect of meal replacements high in glycomacropeptide on weight loss and markers of cardiovascular disease risk. *Am J Clin Nutr.* 87:1602–1605.
- Kim BE and Leung DYM. 2012. Epidermal Barrier in Atopic Dermatitis. *Allergy Asthma Immunol Res.* 4(1): 12–16.
- Kim BE, Leung DYM, Boguniewicz M and Howell MD. 2008. Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6. *Clin Immunol.* 126: 332-337.
- Kim BS and Artis D. 2015. Group 2 Innate Lymphoid Cells in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* doi: 0.1101/cshperspect.a016337.

- Kim BS, Wojno EDT and Artis D. 2013. Innate lymphoid cells and allergic inflammation. *Curr Opin Immunol*. 25: 1–7.
- Kim CH, Choi YS, Cheong KA and Lee AY. 2013. Mechanism underlying the effect of combined therapy using glucosamine and low-dose cyclosporine A on the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Int. Immunopharmacol*. 15 (2): 424–432.
- Kim K. 2012. Neuroimmunological Mechanism of Pruritus in Atopic Dermatitis Focused on the Role of Serotonin. *Biomol Ther*. 20(6): 506-512.
- Kimura M, Tsuruta S and Yoshida T. 1998. Dermatologic diseases Unique profile of IL-4 and IFN- γ production by peripheral blood mononuclear cells in infants with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 102: 238 - 244.
- Kitagaki H, Fujisawa S, Watanabe K, Hayakawa K, Shiohara T. 1995. Immediate – type hypersensitivity response followed by a late reaction is induced by repeated epicutaneous application of contact sensitizing agents in mice. *J invest Dermatol*. 105: 749 – 755.
- Kitagaki H, Ono N, Hayakawa K, Kitazawa T, Watanabe K, Shiohara T. 1997. Repeated elicitation of contact hypersensitivity induces a shift in cutaneous cytokine milieu from a T helper cell type 1 to a T helper cell type 2 profile. *J Immunol*. 159: 2484–2491.
- Klotman ME and Chang TL. 2006. Defensins in innate antiviral immunity. *Nat Rev*. 6: 447-456.
- Koch PJ, DeViragh PA, Scharer E, Bundman D, Longley MA, Bickenbach J, Kawachi Y, Suga Y, Zhou Z, Huber M, Hohl D, Kartasova T, Jarnik M, Steven AC and Roop DR. 2000. Lessons from Loricrin-deficient Mice : Compensatory Mechanisms Maintaining Skin Barrier Function in the Absence of a Major Cornified Envelope Protein. *JCell Biol*. 151(2): 389–400.

- Koczulla R, VonDegenfeld G, Kupatt C, Krötz F, Zahler S, Gloe T, Issbrücker K, Unterberger P, Zaiou M, Lebherz C, Welsch U, Hiemstra PS, Vogelmeier C, Gallo RL, Claus M and Bals R. 2003. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37 / hCAP-18. *J. Clin. Invest.* 111 (11): 1665–1672.
- Kondo S, Yazawa H and Jimbow K. 2001. Reduction of Serum Interleukin-5 Levels Reflect Clinical Improvement in Patients with Atopic Dermatitis. *J of Dermatol.* 28: 237–243.
- Korhonen H. 2009. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *JFunct Foods.* 1: 177-187.
- Kristian SA, Datta V, Weidenmaier C, Kansal R, Fedtke I, Peschel A, Gallo RL, Nizet V. 2005. D-alanylation of teichoic acids promotes group a streptococcus antimicrobial peptide resistance, neutrophil survival, and epithelial cell invasion. *J Bacteriol.* 187:6719–6725.
- Kubo A, Nagao K and Amagai M. 2012. Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. *J Clin Invest.* 122 (2): 440–447.
- Kwon KH, Lee CG, So JS, Chae CS, Hwang JS, Sahoo A, Nam JH, Rhee JH, Hwang KC and Im SH. Generation of regulatory dendritic cells and CD4⁺Foxp3⁺ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. *PNAS Immunol.* 107 (5): 2159-2164.
- Lai Y and Gallo RL. 2009. AMPed up immunity : how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 30 (3): 131- 141.
- Lee BW and Detzel PR. 2015. Treatment of Childhood Atopic Dermatitis and Economic Burden of Illness in Asia Pacific Countries. *Ann Nutr Metab.* 66 (1S): 18–24.

- Lee GR and Flavell RA. 2004. Transgenic mice which overproduce Th2 cytokines develop spontaneous atopic dermatitis and asthma. *Int Immunol.* 16 (8): 1155–1160.
- Leung DYM. 1995. Atopic dermatitis: the skin as a window into the pathogenesis of chronic allergic diseases. *J. Allergy Clin Immunol.* 96: 302 – 318.
- Leung DYM and Bieber T. 2003. Atopic Dermatitis. *Lancet.* 361: 151–60.
- Leung DYM. 2013. New Insights into Atopic Dermatitis: Role of Skin Barrier and Immune Dysregulation. *Aller Int.* 62: 151-161.
- Li EWY and Mine Y. 2004. Immunoenhancing Effects of Bovine Glycomacropeptide and Its Derivatives on the Proliferative Response and Phagocytic Activities of Human Macrophagelike Cells, U937. *J. Agric. Food Chem.* 52 (9): 2704-2708.
- Li T, Chen B, Du M, Song J, Cheng X, Wang X and Mao X. 2017. Casein Glycomacropeptide Hydrolysates Exert Cytoprotective Effect against Cellular Oxidative Stress by Up-Regulating HO-1 Expression in HepG2 Cells. *Nutrients.* 9: 31-46.
- Lieske B and Konrad G. 1994. A new approach to estimate surface hydrophobicity of proteins. *Milchwissenschaft.* 49 (12): 663-666.
- Lin AN. 2010. Innovative use of topical calcineurin inhibitors. *Dermatol Clin.* 28(3): 535–545.
- Lin SC, Chuang YH, Yang YH, Chiang BL. 2011. Decrease in interleukin-21 in children suffering with severe atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol.* 22: 869-875.
- Lin YT, Wang CT, Chao PS, Lee JH, Wang LC, Yu HH, Yang YH, Chiang BL. 2011. Skin-homing CD4+ Foxp3+ T cells exert Th2-like function after staphylococcal superantigen stimulation in atopic dermatitis patients. *Clin Exp Allergy.* 41: 516.

- Liu FT, Goodarzi H and Chen HY. 2011. IgE, mast cells, and eosinophils in atopic dermatitis. *Clin RevAllergy Immunol.* 41(3): 298–310.
- Liu Q, Tang Z, Surdenikova L, Kim S, Patel KN, Kim A Ru F, Guan Y, Weng HJ, Geng Y, Udem BJ, Kollarik M, Chen ZF, Anderson DJ and Dong X. 2009. Sensory neuronspecific GPCR Mrgprs are itch receptors mediating chloroquine-induced pruritus. *Cell.* 139:1353–65.
- Lönnerdal B. 2016. Bioactive Proteins in Human Milk: Health, Nutrition, and Implications for Infant Formulas. *J Pediatrics.* 173S: 4-9.
- López – Posadas R, Requena P, González R, Suárez MD, Zarzuelo A, Sánchez de Medina F, Martínez Agustín O. 2010. Bovine glycomacropptide has intestinal antiinflammatory effects in rats with dextran sulfate – induced colitis. *J Nutr* 140: 2014 – 2019.
- Macpherson G y Austyn J, 2012. En: Cuevas – Castillejos H y Cuevas Castillejos JE. 2012. Alergia e hipersensibilidad: conceptos básicos para el pediatra. *Rev Mex Pediatr* 79 (4): 192 – 200.
- Marenholz I, Nickel R, Ruschendorf F, Schulz F, Esparza-Gordillo J, Kerscher T, Gruber C, Lau S, Worm M, Keil T, Kurek M, Zaluga E, Wahn U, Lee YA. 2006. Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march. *J Allergy Clin Immunol* 118: 866-871.
- Mark BJ and Slavin RG. 2006. Allergic contact dermatitis. *Med Clin N Am.* 90: 169-185.
- Martín-Diana AB, Gómez-Guillén MC, Montero P and Fontecha J. 2006. Viscoelastic properties of caseinmacropptide isolated from cow, ewe and goat cheese whey. *J Sci Food Agric* 86:1340–1349.
- Matzinger P. 2007. Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nature.* 8(1): 11–13.

- McAleer MA and Irvine AD. 2013. The multifunctional role of filagrin in allergic skin disease. *J Allergy Clin Immunol.* 131 (2):280-291.
- McFadden JP, Dearman RJ, White JML, Basketter DA and Kimber I. 2011. The Hapten-Atopy hypothesis II: The Cutaneous Hapten Paradox. *Clin Exp Allergy.* 1: 327–337.
- McKenna K, Beignosn AS. Plasmocytoid. 2005. Dendritic Cells: linking innate and adaptive immunity *J. Virology.* 79(1): 17-27.
- Medzhitov R. 2001. Toll-Like Receptors and Innate Immunity. *Nature Rev Immunol.* 1: 135-145.
- Meisel H and FitzGerald RJ. 2003. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr Pharm Des* 9(16): 1289-95.
- Mesquita KC, Igreja ACSM and Costa IMC. 2013. Atopic dermatitis and vitamin D: facts and controversies. *An Bras Dermatol.* 88 (6): 945-53.
- Metz M, Grundmann S and Ständer S. 2011. Pruritus: an overview of current concepts. *Veterinary. Dermatol.* 22, 121-131.
- Mikkelsen TL, Rasmussen E, Olsen A, Barkholt V and Frøkiaer H. 2006. Immunogenicity of kappa-casein and glycomacropeptide. *JDairy Sci.* 89 (3): 824–30.
- Ming Z, Jia Y, Pang G and Chen Q. 2015. Amelioration effect of bovine casein glycomacropeptide on ulcerative colitis in mice. *Food Agricl Immunol.* 26 (5): 717-728.
- Misery L, Rahhali N, Duhamel A and Taieb C. 2013. Epidemiology of Dandruff, Scalp Pruritus and Associated Symptoms. *Acta Derm Venereol.* 93: 80–81.

- Mohanty DP, Mohapatra S, Misra S and Sahu PS. 2009. Milk derived bioactive peptide and their impact on human health – A review. *Saudi J Biol Sci.* 23: 577-583.
- Molfino NA, Gossage D, Kolbeck R, Parker JM and Geba GP. 2012. Molecular and clinical rationale for therapeutic targeting of interleukin-5 and its receptor. *ClinExp Allergy.* 42 (5): 712–737.
- Molin S, Merl J, Regauner DM, Flaig M, Ltulé V, Herzinger T, Ruzicka T and Hauck SM. 2015. The hand eczema proteome: imbalance of epidermal barrier proteins. *Br J Dermatol.* 172:994–1001.
- Mollé D and Leonil J. 2005. Quantitative determination of bovine κ -casein macropeptide in dairy products by Liquid chromatography / Electrospray coupled to mass spectrometry (LC-ESI / MS) and Liquid chromatography / Electrospray coupled to tandem mass spectrometry (LC-ESI / MS / MS). *Int Dairy J.* 15: 419–428.
- Moreno AS, McPhee R, Arruda KL and Howell MD. 2016. Targeting the T Helper 2 Inflammatory Axis in Atopic Dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 171: 71–80.
- Nakajima K, Tamura N, Kobayashi K, Yoshida T, Hara-Hudo Y, Ikeda M, Sugita Y and Hattori M. 2005. Prevention of Intestinal Infection by Glycomacropeptide. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69 (12): 2294–230.
- Nakajima S, Igyarto BZ, Honda T, Egawa G, Otsuka A, Hara-Chimuka M, Watanabe N, Ziegler SF, Tomura M, Inaba K, Miyachi Y, Kaplan DH, Kabashima K. 2012. Langerhans cells are critical in epicutaneous sensitization with protein antigen via thymic stromal lymphoprotein receptor signaling. *J Allergy Clin Immunol.* 129: 1048 – 55.
- Nakano T and Ozimek L. 2000. Purification of glycomacropeptide from dialyzed and non-dialyzed sweet whey by anion-exchange chromatography at different pH values. *Biotech Lett.* 22: 1081–1086.

- Namkung JH, Lee JE, Kim E, Park GT, Yang HS, Jang HY, Shin ES, Cho EY, Yang JM. 2011. An association between IL-9 and IL-9 receptor gene polymorphisms and atopic dermatitis in a Korean population. *J Dermatol Sci.* 62: 16-21.
- Navarrete-Franco G. 2003. Histología de la piel. *Rev Fac Med UNAM.* 46 (4): 130-133.
- Neelima, Sharma R, Rajput YS and Mann B. 2013. Chemical and functional properties of glycomacropeptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk: A review. *Dairy SciTech.* 93 (1): 21–43.
- Neeser JR, Golliard M, Woltz A, Rouvet M, Dillman ML and Guggenheim B. 1994. In vitro modulation of oral bacterial adhesion to saliva-coated hydroxyapatite beads by milk casein derivatives. *Oral Microbiol Immunol.* 9: 193-201.
- Nemoto O, Furue M, Nakagawa H, Shiramoto M, Hanada R, Matsuki S, Imaya S, Kato M, Hasebe I, Taira K, Yamamoto M, Mihara R, Kabashijma K, Ruzicka R, Hanifin J and Kumagai Y. 2016. The first trial of CIM331, a humanized antihuman interleukin-31 receptor A antibody, in healthy volunteers and patients with atopic dermatitis to evaluate safety, tolerability and pharmacokinetics of a single dose in a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Dermatol.* 174: 296–304.
- Ney DM, Gleason ST and VanCalcar SC. 2009. Nutritional management of PKU with glycomacropeptide from cheese whey. *J Inherit Metab Dis* 32: 32–39.
- Nguyen TX, Cole AM and Lehrer RI. 2003. Evolution of primate θ -defensins: A serpentine path to a sweet tooth. *Peptides.* 24(11): 1647–1654.
- Nguyen TX. 2012. Interleukin-36 cytokines enhance the production of host defense peptides psoriasin and LL-37 by human keratinocytes through activation of MAPKs and NF- κ B. *JDermatol Sci.* 68: 63–70.

- Nijnik A and Hancock REW. 2009. The roles of cathelicidin LL-37 in immune defences and novel clinical applications. *Curr Opin Hematol.* 16: 41–47.
- Nishifuji K and Yoon JS. 2013. The stratum corneum: the rampart of the mammalian body. *Vet Dermatol.* 24: 60–e16.
- Niyonsaba F, Nagaoka I and Ogawa H. 2006. Human Defensins and Cathelicidins in the Skin : Beyond Direct Antimicrobial Properties. *Crit Rev Immunol.* 26 (6): 545–575.
- Niyonsaba F, Nagaoka I, Ogawa H and Okumura K. 2009. Multifunctional Antimicrobial Proteins and Peptides : Natural Activators of Immune Systems. *Curr Pharm Design.* 15: 2393-2413.
- Niyonsaba F, Ushio H, Hara M, Yokoi H, Tominaga M, Takamori K, Kajiwara N, Saito H, Nagaoka I, Ogawa H, Okumura K. 2010. Antimicrobial peptides human betadefensins and cathelicidin LL-37 induce the secretion of a pruritogenic cytokine IL-31 by human mast cells. *J Immunol* 2010; 184: 3526.
- Niyonsaba F, Kiatsurayanon C, Chieosilapatham P and Ogawa H. 2017. Friends or Foes? Host defense (antimicrobial) peptides and proteins in human skin diseases. *Exp Dermatol.* 2: 1–10.
- Nojima H, Carstens E. 2003. 5-hydroxytryptamine (5-HT) 2 receptor involvement in acute 5-HT-evoked scratching but not in allergic pruritus induced by dinitrofluorobenzene in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 306: 245–252.
- Novak N. 2012. An update on the role of human dendritic cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 129(4): 879–886.
- Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. 2000. Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med.* 28 (Suppl):3- 12.

- Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL and Leung DY. 2002. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med.* 347:1151–60.
- Ou LS, Goleva E, Hall C and Leung DY. 2004. Tregulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. *J Allergy Clin Immunol.* 113: 756.
- Palomares O, Martín-Fonseca M, Lauener R, Traidl-Hoffmann C, Cavkaytar O, Akdis M and Akdis CA. 2014. Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF- β . *Genes and Immun.* 1–10
- Pappas A, Liakou A and Zouboulis CC. 2016. Nutrition and skin. *Rev End Met Dis.* doi.org/10.1007/s11154-016-9374-z.
- Pawankar R, Holgate ST, Canonica GW, Lockey RF. 2011. WAO white book on allergy. Milwaukee, WI, USA: Word Allergy Organization
- Peng W and Novak N 2015. Pathogenesis of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy.* 45(3): 566–574.
- Pérez-Bosque A, Miró L, Maijó M, Polo J, Campbell JM, Russell L, Crenshaw JD, Weaver E and Moreto M. 2016. Oral Serum-Derived Bovine Immunoglobulin / Protein Isolate Has Immunomodulatory Effects on the Colon of Mice that Spontaneously Develop Colitis. *PLoS ONE* 11(5): e0154823.
- Perretti M and Ahluwalia A. 2000. The Microcirculation and Inflammation : Site of Action for Glucocorticoids. *Microcirculation.* 7 (3): 147-161.
- Peters EM, Raap U, Welker P, Tanaka A, Matsuda H, Pavlovic-Masnicosa S, Hendrix S y Pincelli C. 2007. Neurotrophins act as neuroendocrine regulators of skin homeostasis in health and disease. *Horm Metab Res* 39(2):110-24.

- Peters BM, Shirliff ME and Jabra-Rizk MA. 2010. Antimicrobial Peptides : Primeval Molecules or Future Drugs ? PLoS Pathog. 6(10): 4–7.
- Phelan M, Aherne-Bruce SA, O’Sullivan D, FitzGerald RJ and O’Brien NM. 2009. Potential bioactive effects of casein hydrolysates on human cultured cells. Int Dairy J. 19: 279–285.
- Piktel E, Niemirowicz K, Wnorowska U, Watek M, Wollny T, Gluszek K, Gozdz S, Levental I and Bucki R. 2016. The Role of Cathelicidin LL-37 in Cancer Development. Arch. Immunol. Ther. Exp. 64: 33-46.
- Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. 2008. The skin: An indispensable barrier. Exp Dermatol. 17:1063-72.
- Proksch E, Folster – Holts R, Jensen JM. 2006. Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. J Dermatol Sci. 43: 159 – 69.
- Raap U, Werfel T, Goltz C, Deneka N, Langer K, Bruder M, Kapp A, Schmid-Ott G, Wedi B. 2006. Circulating levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with disease severity in the intrinsic type of atopic dermatitis. Allergy 61: 1416–1418.
- Rak GD, Osborne LC, Siracusa MC, Kim BS, Wang K, Bayat A, Artis D and Volk SW. 2016. IL-33-Dependent Group 2 Innate Lymphoid Cells Promote Cutaneous Wound Healing. J Invest Dermatol. 136(2): 487–496.
- Ramírez CE, Ramírez CE, González IF, Ramírez N, Vélez K. 2010. Fisiopatología del paciente quemado. Salud UIS 42: 55-65.
- Ramírez - Hernández. 2014. Uso correcto de los esteroides tópicos en atención primaria. Rev Méd CR y CA. Costa Rica y Centroamerica 71 (613): 801 – 806.

- Rather IA, Bajpai VK, Kumar S, Lim J, Paek WK, Mackowiak PA and Park Y. 2016. Probiotics and Atopic Dermatitis: An Overview. *Front. Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2016.00507.
- Rawlings AV and Harding CR. 2004. Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther.* 17(1):43-48.
- Requena P, Daddaoua A, Martínez-Plata E, González M, Zarzuelo A, Suárez MD, Sánchez F and Martínez-Augustin O. 2008. Bovine glycomacropeptide ameliorates experimental rat ileitis by mechanisms involving downregulation of interleukin 17. *Br J Pharm.* 154 (4): 825–32.
- Requena P, González R, López-Posadas R, Abadía-Molina A, Suárez MD, Zarzuelo A, Sánchez F and Martínez-Augustin O. 2010. The intestinal antiinflammatory agent glycomacropeptide has immunomodulatory actions on rat splenocytes. *Biochem Pharm.* 79 (12): 1797–1804.
- Ricci G, Calamelli E and Cipriani F. 2014. Immune Alterations in IgE and Non IgE-Associated Atopic Dermatitis. *Dermatol J.* 8 (1): 60–67.
- Rivas-Santiago B, Hernandez-Pando R, Carranza C, Juárez E, León-Contreras J, Aguilar-León D, Torres M and Sada E. 2008. Expression of Cathelicidin LL-37 during Mycobacterium tuberculosis Infection in Human Alveolar Macrophages, Monocytes, Neutrophils, and Epithelial Cells. *Infec Immun.* 76 (3): 935–941.
- Roediger B, Kyle R, Yip KH, Sumaria N, Guy TV, Kim BS, Mitchell AJ, Szun T, Jain R, Forbes E, Chen X, Tong P, Bolton H, Artis D, Paul W, Fazekas B, Grimbaldeston M, LeGros G and Weninger W. 2013. Cutaneous immunosurveillance and regulation of inflammation by group 2 innate lymphoid cells. *Nature Immunol.* doi.org/10.1038/ni.2584

- Roldán NR, Jiménez M, Cervantes-García D, Marín E and Salinas E. 2016. Glycomacropeptide administration attenuates airway inflammation and remodeling associated to allergic asthma in rat. *Inflam Res.* 65 (4): 273–283.
- Rosenberg HF, Dyer KD and Foster PS. 2012. Eosinophils : changing perspectives in health and disease. *Nature Rev Immunol.* doi.org/10.1038/nri3341.
- Roth SA, Simanski M, Rademacher F and Schro L. 2014. The Pattern Recognition Receptor NOD2 Mediates Staphylococcus aureus – Induced IL-17C Expression in Keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 134: 374–380.
- Rousseaux-Prevost R, Bazin H and Capron A. 1977. IgE in experimental schistosomiasis. I. Serum IgE levels after infection by *Schistosoma mansoni* in various strains of rats. *Immunol.* 33 (4): 501–505.
- Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K and Geginat J. 2010. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21 (5): 331–344.
- Saito H. 2009. Role of environment and immunity in the development of childhood allergic and immunologic disorders. *J Toxicol Sci.* 34 (S2): 313–319.
- Saito H and Inui K. 1993. Dipeptide transporters in apical and basolateral membranes of the human intestinal cell line CaCo-2. *Am J Phys.* 265 (82): G289-G294.
- Saito T, Vamaji A and Itoh T. 1991. A New Isolation Method of Caseinoglycopeptide from Sweet Cheese Whey. *J Dairy Sci.* 74: 2831-2837.
- Sakamoto S, Nagamitsu R, Yusakul G and Miyamoto T. 2017. Ultrasensitive immunoassay for monocrotaline using monoclonal antibody produced by N, N'-carbonyldiimidazole mediated hapten-carrier protein conjugates. *Talanta.* 168 (3): 67–72.

- Salazar F and Ghaemmaghami AM. 2013. Allergen recognition by innate immune cells: critical role of dendritic and epithelial cells. *Front Immunol.* doi: 10.3389/fimmu.2013.00356.
- Salcedo J, Lacomba R, Alegría A, Barbera R, Matencio E and Lagarda MJ. 2011. Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determining sialic acid in infant formulas. *Food Chem.* 127 (4): 1905–1910.
- Salimi M, Barlow JL, Saunders SP, Xue L, Gutowska-Owsiak D, Wang X, Huang LC, Johnson D, Scanlon ST, McKenzie ANJ, Fallon PG and Ogg GS. 2013. A role for IL-25 and IL-33 – driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J Exp Med.* 210 (13): 2939–2950.
- Salzman NH, Ghosh D and Huttner KM. 2003. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* 422: 3–7.
- Sánchez RDP, Sanz JM, Martín AP, Martín ER, Soto MADM and García MS. 2005. Balance entre citocinas pro y antiinflamatorias en estados sépticos. *Med Int.* 29 (3): 151–158.
- Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH. 2009. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J. Cell Sci.* 122: 1285 – 1294.
- Sato K, Sugibayashi K and Morimoto Y. 1991. Species differences in percutaneous absorption of nicorandil. *J Pharm Sci.* 80 (2): 104–107.
- Savinko T, Matikainen S, Saarialho-Kere U, Lehto M, Wang G, Lehtimäki S, Karisola P, Reunala T, Wolff H, Lauerma A and Alenius H. 2012. IL-33 and ST2 in Atopic Dermatitis: Expression Profiles and Modulation by Triggering Factors. *J Invest Derm.* 132: 1392–1400.

- Sawin EA, DeWolfe TJ, Aktas B, Stroup BM, Murali SG, Steele JL and Ney DM. 2015. Glycomacropeptide is a prebiotic that reduces *Desulfovibrio* bacteria, increases cecal short-chain fatty acids, and is anti-inflammatory in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 309: G590 –G601.
- Schauber J and Gallo RL. 2008. The vitamin D pathway: a new target for control of the skin's immune response? *Exp Dermatol.* 17: 633–639.
- Schenten D and Medzhitov R. 2011. The Control of Adaptive Immune Responses by the Innate Immune System. *Ad Immunol.* doi.org/10.1016/B978-0-12-387664-5.00003-0.
- Schneider L, Tilles S, Lio P, Bogumiewicz M, Beck L, LeBovidge J and Novak N. 2013. *J Allergy Clin Immunol.* 131: 295 – 299.
- Selsted ME and Ouellette AJ. 2005. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nature Immunol.* doi: 10.1038/ni1206.
- Seltmann J, Roesner LM, VonHesler FW, Wittmann M and Werfel T. 2015. IL-33 impacts on the skin barrier by down-regulating the expression of filaggrin. *J Allergy Clin Immunol.* 135 (6): 1659-1661.
- Sendagorta-Cudós y De Lucas – Laguna. 2009. Tratamiento de la dermatitis atópica. *Rev Pediatr Aten Primaria.* 11S (15): s49-s67.
- Serré G, Mils V, Haftek M, Vincent C, Croute F, Reano A, Ouhayoun JP, Bettinger S and Soleilhavoup JP. 1991. Identification of Late Differentiation Antigens of Human Cornified Epithelia, Expressed in Re-organized Desmosomes and Bound to Cross-Linked Evelope. *J Invest Dermatol.* 97 (6): 1061-1072.
- Sevilla LM, Nachat R, Groot KR, Watt FM. 2007. *J Cell Biol.* 179 (7): 1599–1612.
- Shaw TE, Currie GP, Koudelka CW, Simpson EL. 2011. Eczema Prevalence in the United States: Data from the 2003 National Survey of Children's Health *J Invest Dermatol.* 131: 67–73.

- Shen Y, Dai L, Li X, Liang R, Guan G, Zhang Z, Cao W, Liu Z, Mei S, Liang W, Qin S, Xu J and Chen H. 2014. Epidermal Stem Cells Cultured on Collagen-Modified Chitin Membrane Induce In Situ Tissue Regeneration of Full-Thickness Skin Defects in Mice. *Plos One*. doi.org/10.1371/journal.pone.0087557.
- Shiohara T, Hayakawa J and Mizukawa Y. 2004. Animal models for atopic dermatitis: Are they relevant to human disease? *J Dermatol Sci*. 36 (1): 1–9.
- Shishido SN, Varahan S, Yuan K, Li X and Fleming SD. 2012. Humoral innate immune response and disease. *Clin Immunol*. 144 (2): 142–158.
- Silva-Hernández ER, Nakano T and Ozimek L. 2002. Isolation and Analysis of K-Casein Glycomacropeptide from Goat Sweet Whey. *J. Agric. Food Chem*. 50: 2034–2038.
- Silverberg JI, Hanifin J and Simpson EL. 2013. Climatic Factors Are Associated with Childhood Eczema Prevalence in the United States. *J Invest Dermatol*. 133 (7): 1752–1759.
- Simental-Lara F and Ponce-Olvera RM. 2006. Neuropeptidos en dermatología. *Derm Rev Mex*.50: 206-217.
- Simon D, Braathen LR and Simon HU. 2004. Review article Eosinophils and atopic dermatitis. *Allergy*. 59 (8): 561–570.
- Singleton H, Popple A, Gellatly N, Maxwell G, Williams J, Friedmann PS, Kimber I Dearman RJ. 2015. Anti-hapten antibodies in response to skin sensitization. *Cont Derm*. 74: 197–204.
- Smith FJD, Irvine AD, Terron-kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao Y, Liao H, Evans AT, Goudie DR, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Munro CS, Sergeant A, O’Regan G, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Presland RB,

- Fleckman P and McLean WHI. 2006. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nature Gen.* 38 (3): 337–342.
- Smoak KA and Cidlowski JA. 2004. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech AgDev.* 125: 697–706.
- Sohn MH, Song JS, Kim KW, Kim ES, Kim KE and Lee JM. 2007. Association of Interleukin-10 Gene Promoter Polymorphism in Children with Atopic Dermatitis. *J Pediatr* 150: 106-108.
- Song JJ, Wang Q, Du M, Li T, Chen B and Mao X. 2016. Casein glycomacropeptide-derived peptide IPPKKNQDKTE ameliorates high glucose-induced insulin resistance in HepG2 cells via activation of AMPK signaling. *Mol. Nutr. Food Res.* 00: 1–12.
- Soto-Ortiz, Brito-Luna MJ and Guevara-Gutierrez E. 2012. Prurito de origen sistémico. *Dermatol Rev Mex.* 56 (4): 246-257.
- Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, DiSanto JP, Eberl G, Koyasu S, Locksley RM, McKenzie ANJ, Mebius RE, Powrie F and Vivier E. 2013. Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nature Rev Immunol.* doi.org/10.1038/nri3365.
- Staines - Boones AT, Piña - Osuna AK, Amaya - Guerra M, García - Campos JA, Reyes - Delgado K. 2013. Dermatitis atópica resistente en tratamiento con omalizumab. *Dermatol Rev Mex.* 57:192-195.
- Ständer S and Steinhoff. 2002. Pathophysiology of pruritus in atopic dermatitis: an overview. *Exp Dermatol.* 11(9): 12–24.
- Sudweeks JD, Todd JA, Blankenhorn EP, Wardell BB, Woodward SR, Meeker ND, Estes SS and Teuscher C. 1993. Locus controlling *Bordetella pertussis*-induced histamine sensitization (*Bphs*), an autoimmune disease-susceptibility

gene, maps distal to T-cell receptor β -chain gene on mouse chromosome 6. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3700-3704.

Sun X, Chen S, Li S, Yan H, Fan Y and Mi H. 2005. Deletion of two C-terminal Gln residues of 12 – 26-residue fragment of melittin improves its antimicrobial activity. Peptides 26: 369–375.

Svedberg J, Hass J, Leimenstoll G, Paul F and Teschemacher H. 1985. Demonstration of β -Casomorphin Immunoreactive Materials in In Vitro Digests of Bovine Milk and in Small Intestine Contents after Bovine Milk Ingestion in Adult Humans. Peptides. 6: 825-830.

Szegedi K, Lutter R, Res PC, Bos JD, Luiten RM, Kezic S and Middelkamp-Hup MA. 2015. Cytokine profiles in interstitial fluid from chronic atopic dermatitis skin. J Eur Acad Dermatol Venereol. doi.org/10.1111/jdv.13160.

Szymlek-Gay EA, Lo B, Abrams SA and Kvistgaard AS. 2012. α -Lactalbumin and Casein-Glycomacropeptide Do Not Affect Iron Absorption from Formula in Healthy Term Infants. J. Nutr. 142: 1226–1231.

Takahashi T and Gallo RL. 2017. The critical and multifunctional roles of antimicrobial peptides in dermatology. Dermatol Clin. 35 (1): 39–50.

Takeshita K, Yamasaki T, Akira S, Gantner F and Bacon K. B. 2004. Essential role of MHC II-independent CD4+ T cells, IL-4 and STAT6 in contact hypersensitivity induced by fluorescein isothiocyanate in the mouse. Int. Immunol. 16 (5): 685-695.

Tamaka, K., Seike, M., Hagiwara, T., Sato, A., & Ohtsu, H. (2015). Histamine suppresses regulatory T cells mediated by TGF- β in murine chronic allergic contact dermatitis. Exp Dermatol. 2: 280–284.

Tang W and Bhushan B. 2010. Adhesion, friction and wear characterization of skin and skin cream using atomic force microscope. Biointerfaces 76: 1–15.

- Tay SS, Roedinger B, Tong PL, Tiko S and Weninger W. 2014. The skin resident immune network. *Curr Derm Rep* 3: 13-22.
- Thaçi D, Simpson EL, Beck LA, Bieber T, Blauvelt A, Papp K, Soong W, Worm M, Sxepietowski JC, Sofen H, Kawashima M, Wu R, Weinstein SP, Graham NHN, Pirozzi G, Teper A, Sutherland ER, Mastey V, Stahl N, Yancopoulos GD and Ardeleanu M. 2016. Efficacy and safety of dupilumab in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis inadequately controlled by topical treatments: A randomised, placebo-controlled, dose-ranging phase 2b trial. *Lancet*. 387 (10013): 40–52.
- Thomä-Worringer C, Sørensen J, López-Fandiño R. 2006. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *Int Dairy J*. 16: 1324–33.
- Thomas CL and Fernandez-Peñas P. 2016. The microbiome and atopic eczema: More than skin deep. *Australasian J Dermatol*. doi.org/10.1111/ajd.12435.
- Thyssen JP, Mcfadden JP and Kimber I. 2014. The multiple factors affecting the association between atopic dermatitis and contact sensitization. *Allergy*. 69: 28–36.
- Thyssen JP and Kezic S. 2014. Current perspectives Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 134(4): 792–799.
- Tian Q, Wang TT, Tang X, Han MZ, Leng XJ and Mao XY. 2015. Developing a potential prebiotic of yogurt: growth of Bifidobacterium and yogurt cultures with addition of glycomacropeptide hydrolysate. *International J Food Sci Tech*. 50: 120–127.
- Tiemessen MM, Mitchell TJ, Hendry L, Whittaker SJ, Leonie ST and John S. 2009. Lack of Suppressive CD4 + CD25 + FOXP3 + T Cells in Advanced Stages of Primary Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Medicine*. 126 (10): 2217–2223.

- Timby N, Domello E, Hernell O and Lo B. 2014. Neurodevelopment, nutrition, and growth until 12 mo of age in infants fed a low-energy, low-protein formula supplemented with bovine milk fat globule membranes: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 99: 860–868.
- Tokura Y. 2010. Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. *J Dermatol Sci:* 58(1): 1–7.
- Tollefson MM and Bruckner AL. 2014. Atopic Dermatitis: Skin-Directed Management. *Pediatrics.* 134(6): e1735–e1744.
- Turvey SE, Brodie DH. 2010. Chapter 2: Innate Immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125 (2 Suppl 2): S24 – S32.
- Umbach M, Teschemacher H, Praetorius K, Hirschhäuser R and Bostedt H. 1985. Demonstration of a β -casomorphin immunoreactive material in the plasma of newborn calves after milk intake. *Reg Peptides.* 12: 223-230.
- Umetsu DT, Akbari O and Dekruyff RH. 2003. Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 112: 480–487.
- Urmacher C. 1990. Histology of normal skin. *Am. J Surg Pathol.* 14 (7): 671-678.
- Van Calcar SC, MacLeod EL, Gleason ST, Etzel MR, Clayton MK, Wolff JA, Ney DN. 2009. Improved nutritional management of phenylketonuria by using a diet containing glycomacropeptide compared with amino acids. *Am J Clin Nutr.* 89:1068–77.
- Vandamme D, Landuyt B, Luyten W and Schoofs L. 2012. A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cell Immunol.* 280 (1): 22–35.

- Vasilopoulos Y, Cork MJ, Murphy R, Williams HC, Robinson DA, Duff GW. 2004. Genetic association between an AACC insertion in the 3'UTR of the stratum corneum chymotrypic enzyme gene and atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 123: 62-66
- Vignali DAA. 2008. How many mechanisms do regulatory T cells need? *Eur J Immunol.* 38 (4): 908 – 911.
- Wada Y and Lönnnerdal B. 2014. Bioactive peptides derived from human milk proteins — mechanisms of action. *J Nutr Biochem.* doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.10.012.
- Wahlgren CF. 1999. Itch and Atopic Dermatitis: An Overview. *J Dermatol.* 26: 770-779.
- Wang AX and Landen NX. 2015. Critical Review New Insights into T Cells and Their Signature Cytokines in Atopic Dermatitis. *Int Biochem Mol Biol.* doi.org/10.1002/iub.1405.
- Wang YH and Liu YJ. 2009. Thymic stromal lymphopoietin, OX40-ligand, and interleukin-25 in allergic responses. *Clin Exp Allergy.* 39: 798–806.
- Wang T and Tsai T. 2014. Cutaneous irritancy of water. *Rev Environ Health* 29 (3): 217–220.
- Wegmann M. 2011. Targeting Eosinophil Biology in Asthma Therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 45: 667–674.
- Weller CL, Collington SJ, Williams T and Lamb JR. 2011. Mast cells in health and disease. *Clin Sci.* 120: 473–484.
- Werfel T. 2009. The role of leukocytes, keratinocytes, and allergen-specific IgE in the development of atopic dermatitis. *J Inv Dermatol.* 129 (8): 1878–1891.

- Wiesner J and Vilcinskas A. 2010. Antimicrobial peptides: The ancient arm of the human immune system. *Virulence*. 1 (5): 440-464.
- Williams AF and Barclay AN. 1988. The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Ann. Rev. Immunol.* 6: 381-405.
- Wilson SS, Wiens ME and Smith JG. 2013. Antiviral Mechanisms of Human Defensins. *J Mol Biol.* 425 (24): 1-26.
- Wolf M and Kocher T. 2012. Antimicrobial activities of chemokines : not just a side-effect? *Front Immunol.* 3 (7): 1–12.
- Wu LC and Zarrin A. 2014. The production and regulation of IgE by the immune system. *Nature Rev Immunol.* 14 (4): 247–59.
- Xin A, Zhao Y, Yu H, Shi H, Diao H and Zhang Y. 2015. Characterization of β - defensin 42 expressed in principal cells at the initial segment of the rat epididymis. *Acta Biochim Biophys Sin.* doi.org/10.1093/abbs/gmv089.
- Xue L, Salimi M, Panse I, Mjosberg JM, McKenzie ANJ, Spits H, Klenerman P and Ogg G. 2014. Prostaglandin D2 activates group 2 innate lymphoid cells through chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells. *J Allergy Clin Immunol.* 133: 1184-1194.
- Yamashita H., Ito T., Kato H., Asai S., Tanaka H., Nagai H., Inagaki N. 2010. Comparison of the efficacy of tacrolimus and cyclosporine A in a murine model of dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis. *Eur. J. Pharmacol.* 645: 171–176.
- Yang D, Biragyn A, Kwak LW and Oppenheim JJ. 2002. Mammalian defensins in immunity : more than just microbicidal. *Trends Immunol.* 23 (6): 291–296.

- Yuan XY, Ma HM, Li RZ, Wang RY, Liu W and Guo JY. 2011. Topical application of aloperine improves 2, 4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Eur J Pharm.* 658 (2–3): 263–269.
- Zanetti M. 2004. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* 75 (1): 39 – 48.
- Zasloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 415 (1): 389–395.
- Zhang L and Gallo RL. 2016. Antimicrobial peptides. *Curr Biol.* 26(1): R14–R19.
- Zheng T, Oh MH, Oh SY, Schroeder JT, Glick AB and Zhu Z. 2009. Transgenic Expression of Interleukin-13 in the Skin Induces a Pruritic Dermatitis and Skin Remodeling. *J Invest Dermatol.* 129(3): 742–751.
- Zhu S, Qian Y. 2012. IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond).* 122: 487.
- Ziegler SF and Liu YJ. 2006. Thymic stromal lymphopoietin in normal and pathogenic T cell development and function. *Nature Immunol.* 7 (7): 709–714.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ANEXO A. Asociación de citocinas y cambios asociados a la DA.

Correlaciones	r Pearson	r²	P
IL-4 vs mastocitos	0.9459	0.8947	p<0.0001
IL-4 vs IgE	0.8591	0.7381	p<0.0001
IL-13 vs mastocitos	0.9153	0.8378	p<0.0001
IL-13 vs IgE	0.8791	0.7729	p<0.0001
IL-5 vs eosinófilos	0.9502	0.9029	p<0.0001
IFN-γ vs grosor epidermis	0.9567	0.9153	p<0.0001

La tabla muestra la asociación existente entre el nivel de expresión de diferentes citocinas y el marcador histológico o nivel de IgE total en suero. Aunque las variables fueron determinadas en protocolos distintos, la reproducibilidad del modelo permitió establecer la asociación entre variables.

Research Article

Glycomacropeptide Attenuates Inflammation, Pruritus, and Th2 Response Associated with Atopic Dermatitis Induced by 2,4-Dinitrochlorobenzene in Rat

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Fabiola Carolina Muñoz,¹ Maritza Montserrat Cervantes,¹ Daniel Cervantes-García,¹ Mariela Jiménez,¹ Javier Ventura-Juárez,² and Eva Salinas¹

¹Department of Microbiology, Basic Science Center, Autonomous University of Aguascalientes, Av. Universidad No. 940, 20131 Aguascalientes, AGS, Mexico

²Department of Morphology, Basic Science Center, Autonomous University of Aguascalientes, Av. Universidad No. 940, 20131 Aguascalientes, AGS, Mexico

Correspondence should be addressed to Eva Salinas; emsalin@correo.uaa.mx

Received 6 December 2016; Accepted 12 January 2017; Published 7 February 2017

Academic Editor: Daniel Ortuño-Sahagún

Copyright © 2017 Fabiola Carolina Muñoz et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Atopic dermatitis (AD) is one of the most common skin diseases, whose incidence is increasing in industrialized countries. The epicutaneous application of a hapten, such as 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB), evokes an experimental murine AD-like reaction. Glycomacropeptide (GMP) is a dairy bioactive peptide derived from hydrolysis of κ -casein by chymosin action. It has anti-inflammatory, prebiotic, and immunomodulatory effects. The present study was aimed to investigate the effect of GMP administration on DNCB-induced AD in rats. The severity of inflammatory process, pruritus, production of cytokines, and total immunoglobulin E (IgE) content were measured, and the histopathological features were analyzed. GMP reduced the intensity of inflammatory process and edema of DNCB-induced dermatitis, with a significant decrease in eosinophils recruitment and mast cells hyperplasia. In addition GMP suppressed the serum levels of total IgE and IL-4, IL-5, and IL-13 expression in AD-lesions. Besides, the levels of IL-10 were significantly increased. Remarkably, GMP administration before AD-induction abolished pruritus in dermatitis-like reactions in the rats. Taken together, these results indicate that GMP has an inhibitory effect on AD by downregulating Th2 dominant immune response, suggesting GMP as a potential effective alternative therapy for the prevention and management of AD.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

1. Introduction

Atopic dermatitis (AD) is a chronic and relapsing skin disease that is characterized by skin inflammation and pruritus. It is one of the most common skin diseases, affecting about 15–30% of children and 2–10% of adults worldwide, with an increasing prevalence rate in industrialized countries [1]. Although it is not a life-threatening disease, AD has a significant impact on patients' quality of life and on economy of health services. Besides, AD is often the first manifestation of allergic disease, as most patients with AD will further develop another atopic disorder, such as allergic rhinitis or asthma [2].

The precise etiology of AD is not yet determined, but one possibility is a deregulation of adaptive and innate immune response raised by environmental and genetic factors [3]. In AD patients, genetic conditions, external stimuli, or scratching episodes disrupt barrier skin that facilitates allergen penetration and activation of keratinocytes to produce thymic stromal lymphopoietin that triggers dendritic cells to induce a Th2-cell mediated response [4]. In the acute phase of disease, infiltrated CD4⁺ T cells in skin lesions predominantly secrete IL-4, IL-5, and IL-13. These Th2 cytokines orchestrate a skin inflammation characterized by eosinophil recruitment and mast cells hyperplasia. Besides, IL-4 induces immunoglobulin (Ig)E isotype switching in B

cells, increasing serum IgE levels which is associated with the pathogenesis of the disease [5]. In the chronic phase of the AD, Th1 cells appear and secrete interferon-gamma (IFN- γ) that is mainly associated with epidermal hyperplasia [1]. Therefore, the imbalance in the rate of Th1 and Th2 cells, or in Treg cells that maintain immune homeostasis locally, has special consideration in AD [6].

Animal models for human diseases are very important to analyze the mechanisms involved in the onset and development of pathologies and to establish treatment strategies for the disease [7]. Mice model has been widely used for the detailed study of AD and for the development of rapid trials of possible therapies for the disease [8]. Dermatitis model induced by skin repeated application of haptens causes histopathological, immunological, and clinical features similar to human AD [7, 9]. Although most of AD-models by hapten repeated application are developed in mice, thickness of the cornea layer and chemical permeability of skin in mouse are greater than rat and human, so rat skin suffers AD-like injuries less severe than mouse and more similar to human [10–12].

Many kinds of bioactive peptides that might prevent lifestyle-related diseases are released from food proteins after enzymatic digestion. Glycomacropeptide (GMP) is an active biopeptide derived from milk κ -casein that is released to the whey during cheese-making process by the action of chymosin [13]. It is composed of 64 amino acids extensively glycosylated with units of N-acetylneuraminic (sialic) acid that confers several nutraceutical and biological properties [14]. GMP has an excellent safe record and is not immunogenic [15]. As component of the whey, it is included in infant food formulas as a source of amino acids; besides, it is added to nutritional formulas for phenylketonuria patients due to the lack of phenylalanine [16]. Recently, GMP has deserved much interest for its proposed prebiotic, anti-inflammatory, and immunoregulatory properties. It has anti-inflammatory activity in rat models of colitis and ileitis induced by trinitrobenzene-sulphonic acid [17–19] and prevents extensive damage in colon in a model of colonic damage induced by dimethyl hydrazine [20]. Both GMP effects are mediated by the regulation of lymphocytes differentiation. Recent studies carried out in our laboratory show the prophylactic effect of orally administered GMP on the development of immune response associated with allergic sensitization, protecting animals from the severity of urticarial reaction and systemic anaphylaxis induced by allergens. This effect is related to changes in gut microbiota composition, upregulation of TGF- β and downregulation of IL-13 production by splenocytes, reduction in allergen-specific IgE production, and mast cells inhibition [21, 22]. GMP has also immunoregulatory activity in allergic asthma models, as it effectively suppresses blood and lung eosinophilia, goblet cell hyperplasia, and collagen deposition in airways. Beneficial effect of GMP in asthma is associated with downregulation of IL-5 and IL-13 and upregulation of IL-10 expression in asthmatic lung tissue [23].

The aim of this study was to evaluate whether oral GMP administration, previously or once pathology was established, can influence the development of AD. Firstly, we characterized a rat model of dermatitis by systemic

sensitization followed by hapten repeated application. We further examined the effect of GMP in skin inflammation, pruritus, as well as Th2-immune response associated with AD to determine its potential prophylactic and therapeutic activity.

2. Material and Methods

2.1. Animals. Male Wistar rats (150–180 g) obtained from the Laboratory Animal Service of the Autonomous University of Aguascalientes were used throughout the study. Rats were housed under controlled conditions of temperature (22–24°C) and illumination (12 h light cycle) and fed with Rodent Laboratory Chow 5001 (Purina, Mexico City, Mexico) and tap water ad libitum. All experiments were carried out with strict adherence to ethical guidelines approved by the Institutional Normative Welfare Standards.

2.2. Protocol for Induction of Experimental Atopic Dermatitis. Ear cutaneous reaction was induced by repeated applications of 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB; Sigma, St. Louis, MO, USA) after systemic sensitization, as previously described [24]. Briefly, animals were sensitized at day 0, with an intramuscular injection of 1 mg of dinitrophenyl-bovine serum albumin (DNP-BSA) precipitated in 7.8 mg of aluminum hydroxide gel (Al(OH)₃; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) in 1 mL of saline solution. Simultaneously, and as an adjuvant, 0.5 mL of *Bordetella pertussis* vaccine (Zuvirac, Mexico City, Mexico) containing 10–15 $\times 10^9$ heat-killed bacilli/mL was injected subcutaneously. On days 14, 16, 18, 20, 22, and 36, animals were resensitized with a topical application of 60 μ L of 1.5% w/v DNCB prepared in acetone-olive oil (A-OO) solution (4:1) to both sides of the right ear lobe of the rats. Control group was only injected with adjuvants and topically applied with A-OO solution (Figure 1).

2.3. Experimental Design. For characterization of dermatitis model, rats were randomly assigned to two different groups (5 rats per group): control and DNCB sensitized. For analysis of GMP effect, rats were randomly assigned to five different groups (8 rats per group): control, not sensitized and water administered before AD-induction; DNCB-P, DNCB sensitized and water administered before AD-induction; GMP-P, DNCB sensitized and GMP administered before AD-induction; DNCB-T, DNCB sensitized and water administered after AD-induction; and GMP-T, DNCB sensitized and GMP administered after AD-induction. GMP (Lacprodan® cGMP-10; a gift from Arla Foods Amba, Viby, Denmark) was orally administered to animals at 500 mg/kg/day dissolved in tap water. Oral intake of GMP was started from 3 days before sensitization to day 36 as prophylaxis (GMP-P) and from day 23 to day 36 when employed in a therapeutic manner, that is, once AD was established (GMP-T). Control, DNCB-P, and DNCB-T groups were administered orally with tap water during corresponding times (Figure 1). An esophageal catheter was used to deliver GMP solution or water. All animals were sacrificed with an overdose of ether at day 37, and blood and ear samples were obtained.

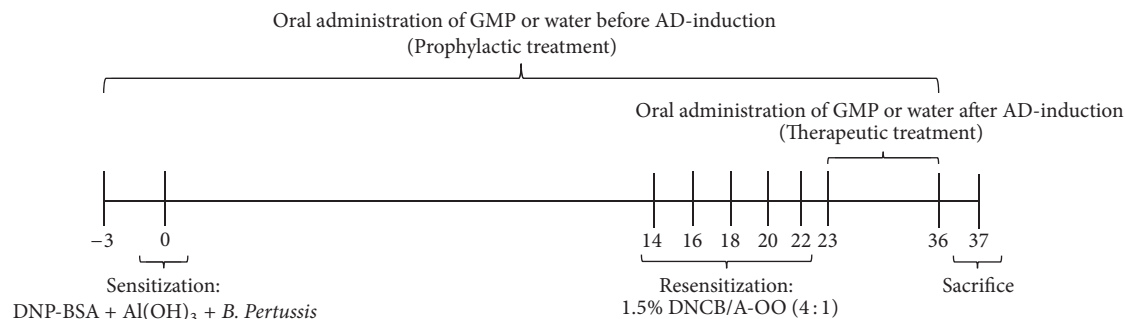


FIGURE 1: Schematic diagram of experimental dermatitis induction protocol and GMP administration. Rats were sensitized on day 0 with injection of DNP-BSA mixed with Al(OH)₃ gel and simultaneously with *B. pertussis* vaccine. Animals were resensitized with topical application of DNCB in A-OO on days 14, 16, 18, 20, 22, and 36. Control group was injected with the adjuvants but without DNP-BSA and applied topically with A-OO mixture. GMP or water was administered, daily and orally, from 3 days before AD-induction or from day 23 after AD-induction, and until day 36 to analyze the prophylactic or therapeutic effect, respectively. Animals were sacrificed at day 37.

2.4. Evaluation of Ear Cutaneous Inflammatory Reaction and Edema. Cutaneous reaction was evaluated by ear swelling induced by the challenge with DNCB. Ear thickness was measured using a dial thickness gauge (Milomex, Ltd., Bedfordshire, UK) at 0, 1, 6, and 24 h after DNCB application on day 36. Ear swelling was calculated based in the increase of ear thickness as RT-LT, where RT and LT represent the thickness of the right and left ear, respectively, at the corresponding time point. At day 37 animals were sacrificed, the ears were excised from the base, and identical portions of the middle of the ears were removed using a metallic punch. The tissue samples were individually weighted on an analytical balance (Precisa XT220A, Dietikon, Switzerland). Edema was calculated based on the increase of ear weight as RW-LW, where RW and LW represent the weight of the fragment of the right and left ear, respectively.

2.5. Evaluation of Scratching Behavior. The total number of scratching events was counted during 10 minutes immediately after the application of DNCB on days 16, 22, and 36. For that purpose, rats were placed into an acrylic cage divided into eight compartments. Their behavior was recorded using a digital video camera (Samsung HMX-W350, New Jersey, USA). Videos were watched by two observers and the number of scratching events was counted. One scratching event or episode was defined as a series of one or more scratching movements by the hind paw directed toward the application site and ended when the rat either licked its hind paw or placed it back on the floor [25].

2.6. Histological Analysis. Upper portions of the right ears of each rat were fixed in 10% neutral formalin, embedded in paraffin, and sectioned into 5 μm slices. Slices were stained with hematoxylin and eosin for evaluation of eosinophils infiltration and with toluidine blue for evaluation of mast cells number. After microscopic fields were photographed, the numbers of stained eosinophils and mast cells were counted in random areas (40,000 μm^2) with an AxioPlan Carl Zeiss microscope (Oberkochen, Germany) at 400x magnification. Three slides were stained per rat and three

fields were examined per slide. Morphometric assessment was performed using AxioVision Rel 4.8 software by two observers who were not aware of the group of rats from which the samples originated.

2.7. Determination of Total IgE. Serum samples prepared from blood obtained on day 37 were stored at -70°C until used to IgE determination. Total IgE level in serum was quantified using a rat IgE ELISA kit (Abcam, Cambridge, UK) according to the manufacturer's instructions.

2.8. RNA Purification and Semiquantitative or Real-Time Quantitative PCR (qRT-PCR). Total RNA was isolated from the lower ear tissue using the SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA). Purified RNA was quantified with a NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) with the A260/280 ratio. Only samples with ratio >1.8 were employed for cDNA synthesis. Reverse transcriptions of 2 μg of RNA were performed with the RETROscript[®] Reverse Transcription kit (Thermo Scientific). Semiquantitative PCR was performed with 1 μL of 1:10 diluted cDNA product, 5 μL of PCR Master Mix 2x (Thermo Scientific), and 1 μL of forward and reverse primers at 5 μM each (listed on Table 1); all reactions were completed with nuclease-free water to 10 μL . PCR conditions were as follows: initial denaturing at 95°C for 3 min, with 25, 30, or 35 cycles of 95°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, and 72°C for 10 sec, and later for all reactions a final extension of 72°C for 3 min was included. Amplicons were separated in 2% agarose gels containing GelRed[™] Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, CA, USA) as recommended by the manufacturer, in TBE 1x (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8). Gels were visualized under UV light in a MiniBis Pro documentation system (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, ISR). For RT-PCR, 2 μL of diluted cDNA reaction was used as template for the detection of IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, and β -actin with the GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega) in an Eco Real-Time PCR System (Illumina, San Diego, CA, USA). Relative quantification was determined with $\Delta\Delta\text{Ct}$ method using β -actin as housekeeping gene for normalization.

TABLE 1: Oligonucleotides for gene expression quantification.

Gene	Oligonucleotides	Accession number
IL-4	Fw: CACCTTGCTGTCACCCTGTT Rv: ACATCTCGGTGCATGGAGTC	NM_201270.1
IL-5	Fw: CAGTGGTAAAAGAGACCTTG Rv: GTATGTCTAGCCCCTGAAAAG	NM_021834.1
IL-13	Fw: ATCGAGGAGCTGAGCAACAT Rv: ATCCGAGGCCTTTTGGTTAC	NM_053828.1
IFN- γ	Fw: GCCTAGAAAAGTCTGAAGAAC Rv: GAGATAATCTGGCTCTCAAG	NM_138880.2
IL-10	Fw: CACCTTGCTGTCACCCTGTT Rv: ACATCTCGGTGCATGGAGTC	NM_012854.2
β -Actin	Fw: GTCGTACCACTGGCATTGTG Rv: GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA	NM_031144.3

2.9. Data Analysis. Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed by Student's *t*-test. Ear thickness data were analyzed by multicomparative Bonferroni test. Significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Characterization of Dermatitis Evoked by Repeated Challenges with DNCB after Systemic Sensitization. First, rats were systemically sensitized with DNP-BSA and later challenged 6 times by painting the right ear with DNCB/A-OO solution. As shown in Figures 2(a)-2(b), repeated impregnation with DNCB solution caused potent inflammatory changes in the ear skin, such as the thickening of both dermis and epidermis, edema, and the accumulation of eosinophils and mast cells. The number of eosinophils and mast cells in dermis of rats from DNCB group increased by 12.6- and 2.3-fold (Figure 2(c)). The ear thickness, measured as an indicator of skin inflammation [11], increased after each application of DNCB. On day 36, the ear thickness picket at 1 h after DNCB painting and maintained significantly greater than control rats at 6 and 24 h (Figure 2(d)). On day 37, edema in DNCB group was 98-fold higher than that in control rats (Figure 2(e)). Scratching toward the ear receiving DNCB application was observed from day 16. Scratching occurred immediately after the application of DNCB, with its frequency decreasing as time passed, and no scratching was observed at 1 h and thereafter. The scratching events counted for the first 10 min, as shown in Figure 2(f), significantly increased at day 16 and were almost equal at day 22, with a slight decrease at day 36. Total RNA was extracted from the skin lesions excised 24 h after the sixth DNCB challenge and the expression of inflammatory cytokines was examined. As shown in Figure 2(g), the IFN- γ , IL-5, and IL-13 mRNA expression in skin of control rats was very weak, but it was potentiated in DNCB group. Furthermore, although the expression of IL-4 mRNAs in skin was undetectable in control rats, DNCB-treatment induced their expression in dermatitis lesion.

3.2. Oral GMP Administration Diminishes Inflammatory Process in Dermatitis. First we investigated whether oral intake of GMP might modify the development of the inflammatory response associated with dermatitis. So, ear thickness was measured after DNCB-repeated applications. On day 36, before the sixth DNCB application (0 h), DNCB-P and DNCB-T animals reported an increase of 0.15 and 0.23 mm over control animals. But animals administered with GMP reduced in 95.6 and 54.55% the thickness induced by the previous five DNCB applications when used in a prophylactic or therapeutic manner, respectively. One hour after the last DNCB application, ear thickness presented a peak of 0.41 and 0.48 mm in the ears of DNCB-P and DNCB-T animals, which was sustained at 6 h and presented a slight decrease at 24 h. However, when animals were GMP administered before AD-induction the inflammatory process was reduced in 99.4, 93.98, and 85.89% at 1, 6, and 24 h after challenge, and if they received GMP after AD-induction the ear inflammation was diminished in 47.16, 49.41, and 34.06% (Figure 3(a)).

Another way to assess changes in the inflammatory process is to evaluate the ear edema as the increment in ear weight. As shown in Figure 3(b), when animals were repeatedly challenged with DNCB the ear edema was 6.64 (DNCB-P) and 8.05 (DNCB-T) higher than in control animals. However, when animals were GMP administered before AD-induction there was a decrease of 97.03% on ear DNCB-induced edema. Besides, animals that received GMP once dermatitis was established showed a decrease of 39.87% on edema when compared to untreated group (DNCB-T).

3.3. Scratching Behavior Is Inhibited by GMP-Prophylaxis. Pruritus is one of the major symptoms of AD and impacts quality of life of patients in a significant manner [26]. Control animals did not show any scratching event in the right ear during 10 min immediately after the application of A-OO mixture (data not shown). The chronological profile of scratching behavior in DNCB challenged rats, treated or not with GMP, is shown in Figure 4. In DNCB-P and DNCB-T rats the number of scratching events remained almost constant during 10 min after DNCB topical application at days

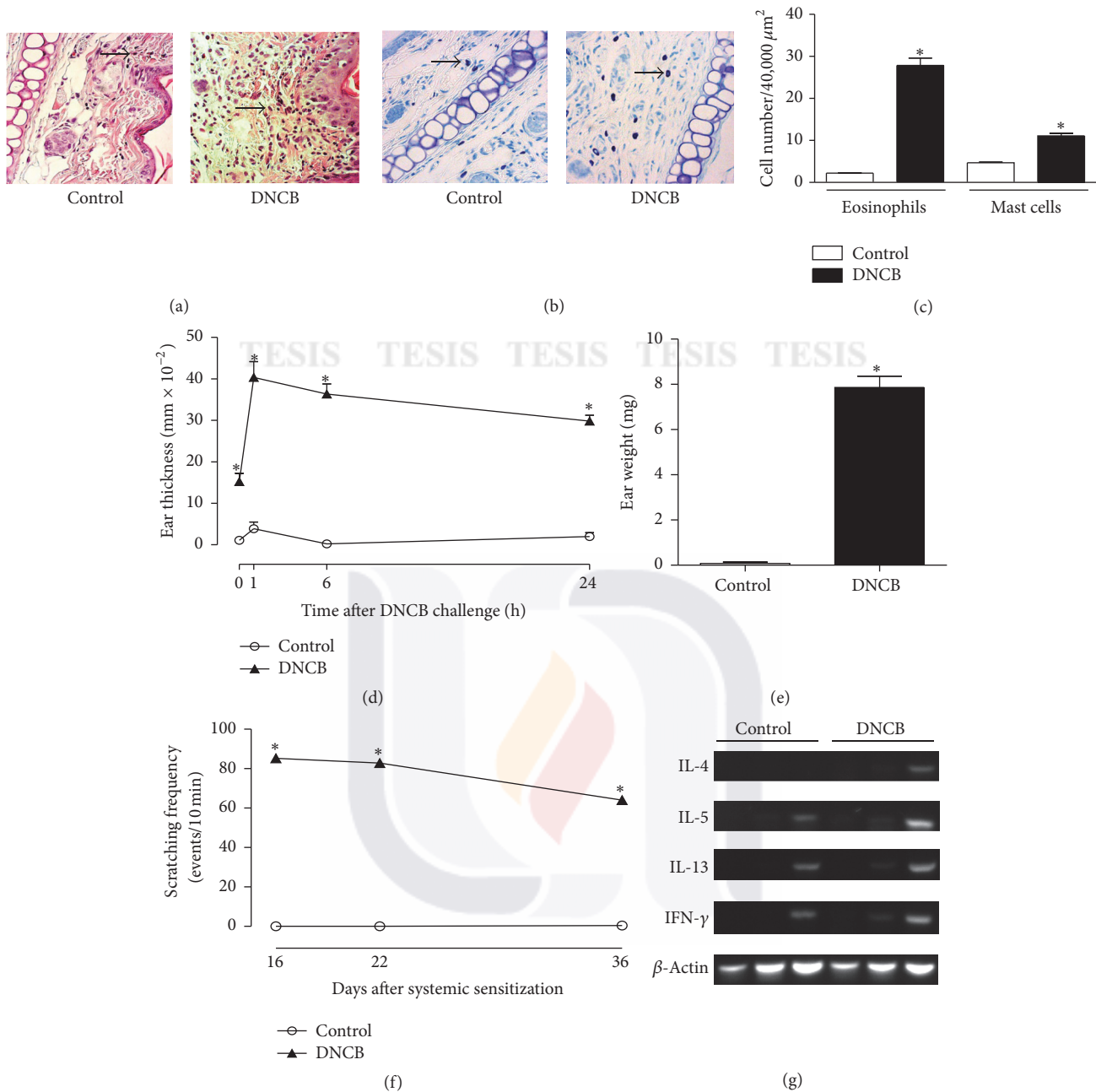


FIGURE 2: Characteristics of dermatitis-like reaction in rats challenged with DNCB after systemic sensitization. Histopathological features of the ears of control and DNCB challenged rats, 24 h after the sixth challenge, stained with (a) hematoxylin and eosin and (b) toluidine blue. Arrows indicated (a) eosinophils and (b) mast cells. (c) Eosinophils and mast cells were counted in dermis with a microscope at a magnification of 400x. (d) Ear thickness was measured at 0, 1, 6, and 24 h after last DNCB challenge. (e) To measure ear edema, equal areas from ears were punched and weighed 24 h after last challenge. (f) Scratching frequency was measured during the first 10 min after DNCB application and reported at days 16, 22, and 36. (g) Inflammatory cytokine mRNA expression in the skin lesion 24 h after the last DNCB challenge. Values represent mean \pm SEM; $N = 5$ rats. * $p < 0.001$ versus control at each time point.

16, 22, and 36, with an average of 36.87 and 41.71 scratching events. Oral GMP administration before AD-induction resulted in a significant and dramatic inhibition of more than 99% in the number of scratching episodes of DNCB-applied animals during the same days, pruritus being almost completely abolished. In contrast, there were no differences

in scratching behavior between GMP-T and DNCB-T groups, indicating that GMP has no effect on pruritus when it was administered once dermatitis was established.

3.4. GMP Administration Reduces the Infiltration of Inflammatory Cells into DNCB-Induced Skin Lesions. Cellular changes

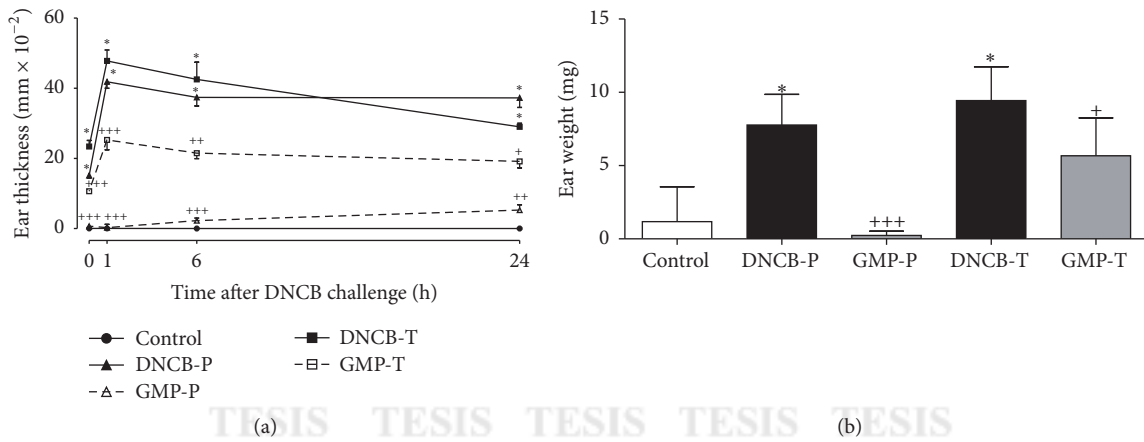


FIGURE 3: Effect of GMP administration on inflammatory process. (a) Ear thickness value is represented by the difference between right and left ear, at day 36. (b) Edema is represented by the difference between right ear weight and left ear weight at day 37. Data are presented as mean \pm SEM, $N = 8$. Control, not sensitized and water administered before AD-induction; DNCB-P, DNCB sensitized and water administered before AD-induction; GMP-P, DNCB sensitized and GMP administered before AD-induction; DNCB-T, DNCB sensitized and water administered after AD-induction; and GMP-T, DNCB sensitized and GMP administered after AD-induction; * $p < 0.0001$ versus control; $^+p < 0.02$; $^{++}p < 0.002$; $^{+++}p < 0.0001$ versus the respective DNCB without GMP administration at each time point.

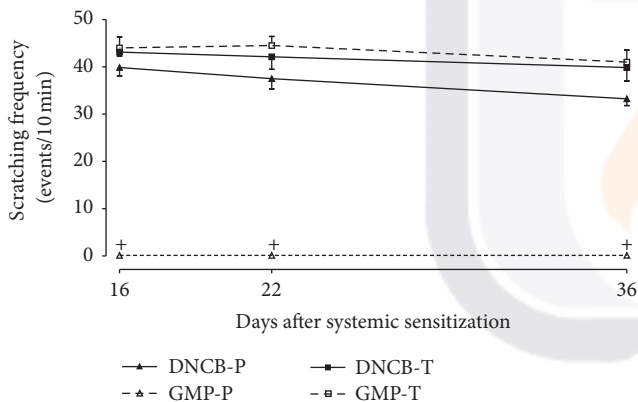


FIGURE 4: Effect of GMP administration on scratching frequency. Events of scratching were measured after DNCB challenge during 10 minutes. Data are presented as mean \pm SEM, $N = 8$. DNCB-P, DNCB sensitized and water administered before AD-induction; GMP-P, DNCB sensitized and GMP administered before AD-induction; DNCB-T, DNCB sensitized and water administered after AD-induction; and GMP-T, DNCB sensitized and GMP administered after AD-induction; $^+p < 0.0001$ versus DNCB-P at each time point. GMP-T versus DNCB-T was ns.

in dermatitis skin include marked infiltration of eosinophils and mast cells hyperplasia [27]. Histological analysis revealed that topical DNCB elicited the infiltration of inflammatory cells into ear skin lesion but GMP administration attenuated the amount of infiltrated inflammatory cells (Figures 5(a)-5(b)). Morphometric assessment showed that the number of eosinophils in ears with DNCB applications was 13.12 and 12.89 times higher than in control group, for DNCB-P and DNCB-T rats. Whereas in animals administrated with GMP, amount of eosinophils in dermis was reduced in 94.47%

when GMP was used as prophylaxis or 78.71% when it was administered in a therapeutic manner (Figure 5(c)). On the other hand, the amount of mast cells in the dermis of DNCB untreated animals was 2-fold compared to control animals. However, mast cells number was remarkably lowered in 61.51% by GMP administration before AD-induction and in 39.59% by GMP administration after AD-induction (Figure 5(d)).

3.5. Influence of GMP on Serum Levels of IgE. It is known that dermatitis is characterized by high levels of serum total IgE [28]. Therefore, we investigated whether GMP suppresses IgE in serum. After the sixth DNCB application, serum samples were collected and total IgE levels were measured by ELISA. In rats receiving topical DNCB total IgE levels were 3.7-fold higher than in control group. Prophylaxis with GMP significantly reduced in 86.53% total serum IgE levels as compared with nontreated animals (DNCB-P). When GMP was administered in a therapeutic manner the decrease in IgE level was 63.68% (Figure 6).

3.6. Effect of GMP Administration on IL-4, IL-5, IL-13, and IL-10 Expression in Dermatitis Skin Lesion. Inflammation in AD is mediated by an initial Th2 phase, which is orchestrated by IL-4, IL-5, and IL-13 cytokines and is related to IgE production and eosinophilia [1]. To address the question whether GMP administration might modulate this Th2 inflammatory response in dermatitis, we examined mRNA changes of IL-4, IL-5, and IL-13 by qRT-PCR in injured skin tissue. We found that IL-4, IL-5, and IL-13 mRNA were 11.24-, 3.93-, and 12.50-fold higher, on average, in DNCB groups. Interestingly, GMP administration before AD-induction decreased in 83.56, 96.5, and 88.38% the expression of IL-4, IL-5, and IL-13 in dermatitis skin. When GMP was administered after AD-induction the decrease of these Th2-inflammatory cytokines, although

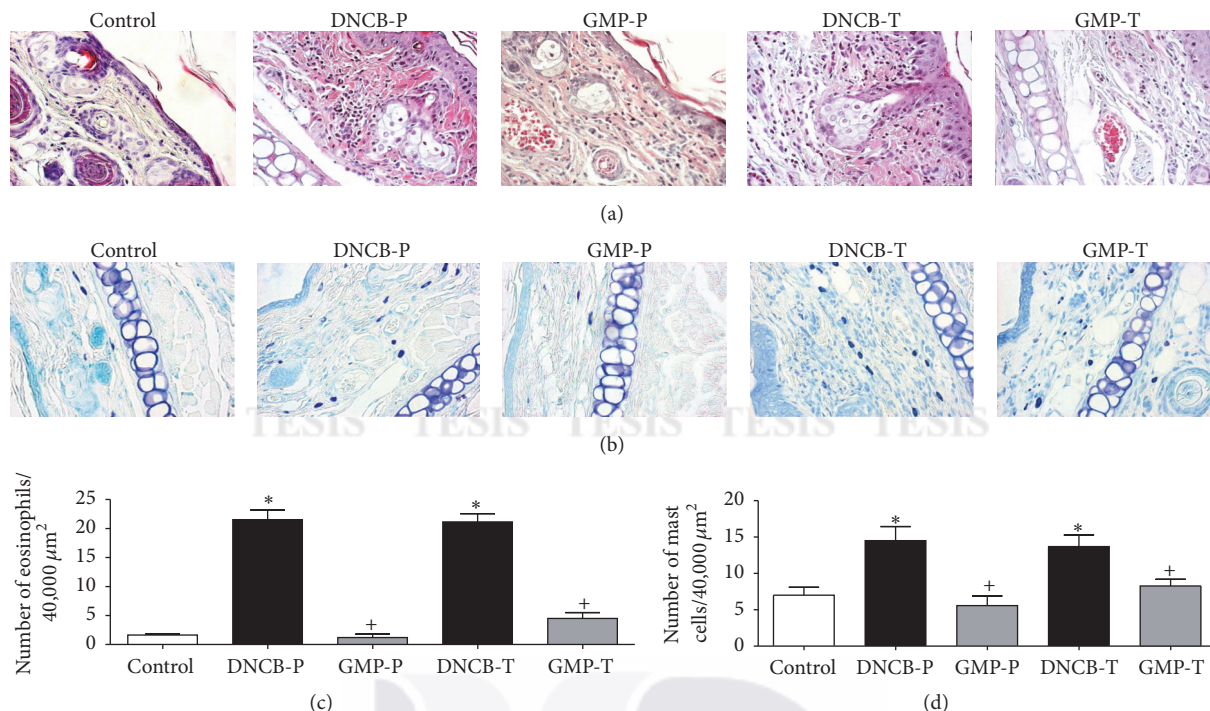


FIGURE 5: Effect of GMP on inflammatory cell infiltration. Sections of right ears were stained with (a) hematoxylin and eosin to identify eosinophils and (b) blue toluidine for mast cells. Quantitative analysis of (c) eosinophils and (d) mast cells per 40,000 μm² of dermis was developed with a microscope at magnification of 400x. Data are presented as mean ± SEM, N = 8. Control, not sensitized and water administered before AD-induction; DNCB-P, DNCB sensitized and water administered before AD-induction; GMP-P, DNCB sensitized and GMP administered before AD-induction; DNCB-T, DNCB sensitized and water administered after AD-induction; and GMP-T, DNCB sensitized and GMP administered after AD-induction; *p < 0.0001 versus control; ⁺p < 0.0001 versus the respective DNCB without GMP administration.

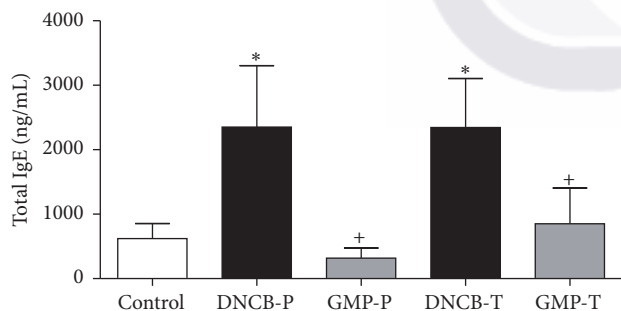


FIGURE 6: Effect of GMP on total serum IgE. Serum was collected 24 h after last challenge with DNCB. IgE level was measured by ELISA. Data are presented as mean ± SEM, N = 8; control, not sensitized and water administered before AD-induction; DNCB-P, DNCB sensitized and water administered before AD-induction; GMP-P, DNCB sensitized and GMP administered before AD-induction; DNCB-T, DNCB sensitized and water administered after AD-induction; and GMP-T, DNCB sensitized and GMP administered after AD-induction; *p < 0.001 versus control; ⁺p < 0.001 versus the respective DNCB without GMP administration.

not so marked, was still significant in order of 57.05, 65.89, and 63.3% lower than nontreated animals (Figures 7(a)–7(c)).

Besides, we analyzed mRNA changes on IL-10, one of the most important anti-inflammatory cytokines which

downregulates the immune system minimizing tissue damage during inflammation [29]. As shown in Figure 7(d), the expression of IL-10 was significantly higher in DNCB challenged than in control animals, but it was clearly potentiated by GMP administration. IL-10 expression was 4.68-fold higher in DNCB challenged animals when receiving GMP as prophylaxis and 2.44-fold higher when it was administered in a therapeutic manner.

4. Discussion

AD is one of the most common skin inflammatory disorders [30] and its early onset in childhood often triggers the atopic march, which leads to the consequent development of asthma and allergic rhinitis [31]. The anti-inflammatory therapy of AD includes topical corticosteroids and calcineurin inhibitors; however resolution is often temporary and long-term usage can be associated with significant adverse effects [32, 33]. Due to the deleterious effect of AD on the quality of life of patients and the significant economic impact in health systems, new therapies that prevent or act on the immunological mechanisms involved in AD and with minimal side effects are required.

In this study we investigated whether GMP attenuates the severity of AD-like lesions induced by DNCB in rat. We chose rat as animal model because thickness of the corneal

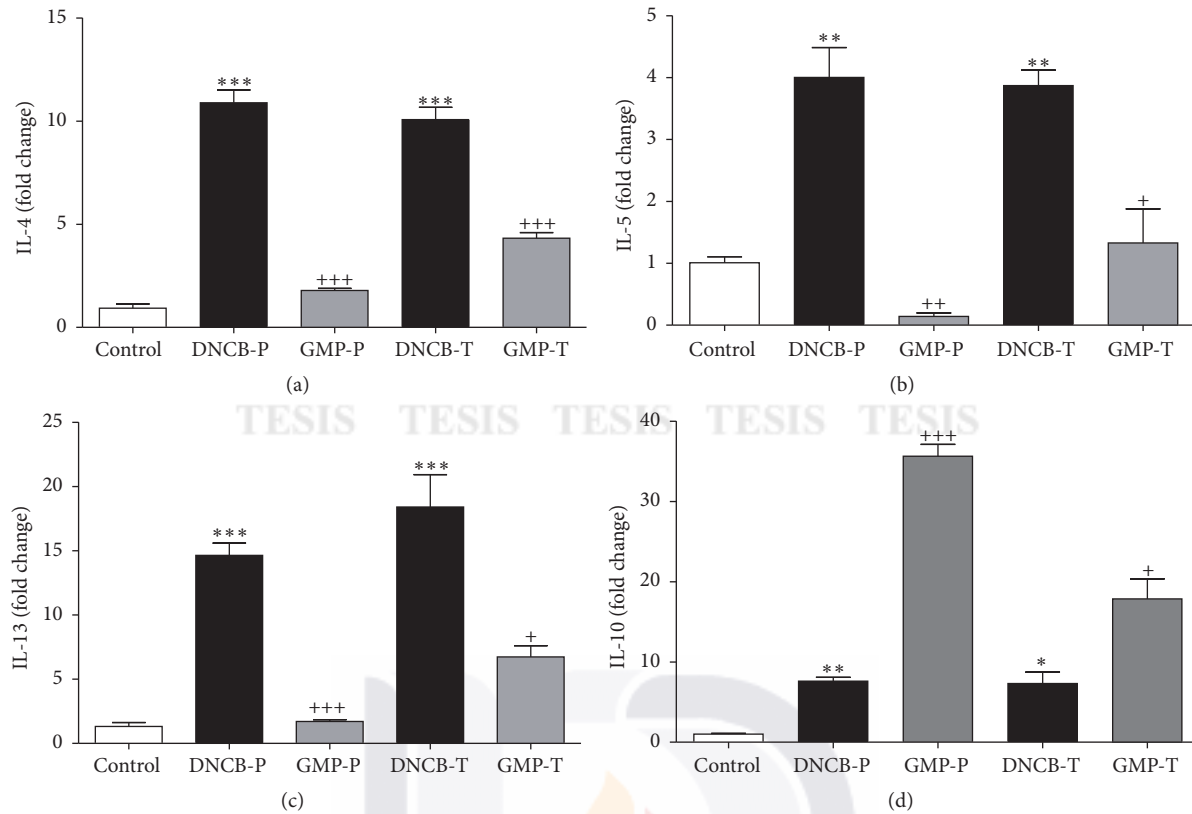


FIGURE 7: Effect of GMP on mRNA expression for IL-4, IL-5, IL-13, and IL-10 in ear tissue. Changes in (a) IL-4, (b) IL-5, (c) IL-13, and (d) IL-10 mRNA expression relative to β -actin were measured. Skin tissue was obtained at day 37 from control and DNCB sensitized rats, administered or not with GMP. Three rats from each experimental group were analyzed. Skin samples from each rat were analyzed in triplicate for qPCR. Each value represents the mean \pm SE. Control, not sensitized and water administered before AD-induction; DNCB-P, DNCB sensitized and water administered before AD-induction; GMP-P, DNCB sensitized and GMP administered before AD-induction; DNCB-T, DNCB sensitized and water administered after AD-induction; and GMP-T, DNCB sensitized and GMP administered after AD-induction; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, and *** $p < 0.0001$ versus control; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, and +++ $p < 0.0001$ versus the respective DNCB without GMP administration.

layer and chemical permeability of skin rat is more similar to human than mice [10–12]. So, we firstly characterized an experimental model of AD in rat based on a reported protocol of epicutaneous DNCB sensitization in mice [24]. The rat model demonstrates immunological dysregulation, such as IgE hyperproduction in serum and elevated IL-4, IL-5, IL-13, and IFN- γ expression in skin injuries. It also shows hypertrophy of epidermis, intracellular edema, and infiltration of inflammatory cells, such as eosinophils and mast cells, which are histopathological features of AD [1]. Besides, DNCB applications induce a scratching behavior toward the affected area that denotes the appearance of pruritus, one of the most characteristic AD symptoms [26]. So, in our rat model AD-like lesions have histopathological, immunological, and clinical features of human lesions.

GMP is a bioactive peptide that has been demonstrated to prevent allergic sensitization and attenuate the severity of urticarial reaction, anaphylaxis, and asthmatic airway inflammation and remodeling [21, 23]. It is already incorporated in nutritional products and is safe and not immunogenic [15–17]. In the present study, we demonstrated that oral

administration of GMP in a prophylactic or therapeutic manner induces a significant reduction in the development of AD by strongly reducing skin inflammation, eosinophils, and mast cells number in dermis and total IgE levels. Besides, GMP administration targets the Th2-inflammatory response, as it decreases IL-4, IL-5, and IL-13 but increases IL-10 expression in AD-like skin lesions. Prophylaxis with GMP also impacts on pruritus, as it suppresses scratching episodes associated with disease. So, we demonstrate that oral intake of GMP before or after AD establishment modulates immune response and pathophysiology in experimental AD.

The epidermis of AD patients is characterized by significant skin barrier disruption which activates keratinocytes to develop an extreme Th2-dominant response that strengthens IgE production [34]. Thus, IgE level in the serum is correlated with the severity of AD [5]. In our experimental model of AD, high levels of total IgE were quantified in serum. GMP administration before or after AD-induction significantly reduces serum total IgE levels. When GMP was administered before AD-induction IgE levels were lower than in control animals, suggesting that in this condition GMP

administration can suppress serum total IgE. It is known that IgE released from B cells binds to mast cells. Allergens induce mast cells degranulation through IgE-FcεRI complex and the release of several biological mediators involved in skin inflammation [35]. So, a lessened level of IgE is in line with the reduction of edema and skin inflammation of AD-lesions observed in animals with GMP administration. Previously, it has been demonstrated that GMP inhibits mast cells activation by allergens [22] and we observed a reduced number of mast cells in dermis of GMP-treated animals, so the reduction in edema and skin inflammation as a consequence of GMP administration might also be mediated by alterations in mast cells number and function.

One of the central causes of the AD is the dysregulated Th1 and Th2 response that induces the characteristic Th2-dominant skin allergic inflammation [36]. In this Th2 response, the involvement of IL-4, IL-5, and IL-13 is crucial in humans [37]. In transgenic mice that overproduce IL-4, IL-5, and IL-13, investigators have demonstrated a positive correlation between the onset and progression of AD-like disease and the expression of these Th2 cytokines [38]. In our experimental model of AD the expression of IL-4, IL-5, and IL-13 was increased in skin lesions. It is known that IL-5 plays an important role in eosinophil differentiation, activation, proliferation, and chemotaxis [39, 40]. The number of eosinophils and levels of IL-5 have previously been shown to be elevated in injured skin of patients with AD [5, 41]. We show that GMP administration before or after AD-induction induces a significant reduction in IL-5 expression in AD-lesions, which is correlated with the decrease in the number of eosinophils infiltrated in dermis. On the other hand, transgenic mice overexpressing epidermal IL-4 or IL-13 spontaneously developed signs and symptoms associated with AD, including elevated IgE levels [42, 43]. So, reduced levels of IL-4 and IL-13 in skin of animals treated with GMP in a prophylactic or therapeutic manner are in concordance with the decrease in total IgE. The downregulation of the Th2-dominant skin inflammation by GMP administration may be associated with the increased expression of IL-10, a known regulatory cytokine. It has been reported that IL-10 inhibits both the proliferation and the cytokine synthesis of CD4+ Th2 cells [44]. Recently, the role of IL-10 in the control of AD development and maintenance has been highlighted by the fact that polymorphisms in the IL-10 gene could represent a genetic marker for AD in childhood [45]. As Th2 cytokines destabilize cutaneous barrier function [46, 47] and IFN-γ is crucial in dermal thickening and in the progression to chronic AD skin lesions [1], the study of the effect of GMP administration on the recovery of skin barrier integrity and on levels of IFN-γ expression is the aim of our current research.

Pruritus is a clinical manifestation of AD [26] that causes a great deterioration in patient's quality of life [48]. Besides, scratching worsens the dermatitis, increasing lesions in skin and thereby aggravating pruritus [49]. Thus, proper treatment of pruritus is the critical part of therapeutic approach to AD. Our rats with dermatitis showed an intense pruritus after DNCB application, but prophylaxis with GMP totally abolished the scratching episodes of the rats. A wide range

of itch-inducing stimuli generated within the skin are able to trigger pruritus. Among them, histamine is recently considered relevant, as combined H1R/H4R antagonists therapy is successfully addressing pruritus in AD [50]. The decrease in IgE levels and mast cells number observed in animals administered with GMP before AD-induction, together with the reported inhibitory action of GMP on mast cells activation by allergen [22], might cause a decrease in histamine levels in skin, impacting on itching. Besides, it has been reported that transgenic mice expressing IL-13 in skin develops intense pruritus [43]. Dupilumab, a monoclonal antibody that binds to IL-4Rα and blocks both IL-4 and IL-13 signaling pathways, induces a reduction in the pruritus score of patients with moderate to severe AD [51, 52]. These data indicate a role of IL-4 and IL-13 in triggering pruritus. Thus, antipruritic action of GMP-prophylaxis might be also mediated by the reduction of IL-4 and IL-13 expression in skin. However, due to the wide range of stimuli able to trigger pruritus in AD we cannot exclude a possible effect of GMP on other itching-inducing element.

GMP exerted a clearly superior therapeutic effect when it was given before AD-induction than when administered once AD-lesions were established. This is a common observation with GMP, because when it is used as anti-inflammatory therapy in experimental colitis its effect is greater when used as prophylaxis [17]. We recently demonstrated that GMP administration before allergen sensitization induces a significant increase in the amount of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Bacteroides* in the gut of sensitized animals [22]. In this regard, data about the effect of probiotics in the prevention and treatment of AD remain elusive, with negative and positive results, but evidencing that their positive effects depend on factors such as the type of probiotic strain, method of administration, onset time, duration of exposure, and dosage [53]. Particularly *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* as therapy in AD show a promissory effect on prevention of pediatric AD, while there is less convincing information about their effects when used in a therapeutic manner [54], which is in concordance with our results. It is important to highlight that even after AD-induction most of the beneficial effects of GMP were retained, with exception of antipruritic effect. This may be due to the lesser reduction in IgE levels, mast cells number, and IL-4 and IL-13 expression in animals administered with GMP once AD was established. The remaining levels of these immune elements might be sufficient to maintain pruritus in the animals. However, we must consider that patients with AD may benefit from anti-inflammatory and Th2-downregulation properties of GMP used in a therapeutic manner.

In conclusion, the present study shows that GMP possesses prophylactic and therapeutic effects in the development of AD. GMP effectively suppresses skin inflammation, eosinophils recruitment, and mast cells hyperplasia in dermis, as well as total IgE in serum. Beneficial effect of GMP is associated with downregulation of IL-4, IL-5, and IL-13 expression together with upregulation of IL-10. Prophylactic administration of GMP also abolished pruritus. This study provides the first experimental basis for the potential use of GMP in the prevention and therapy of AD.

Disclosure

Cervantes-García is a CONACYT research fellow in Autonomous University of Aguascalientes.

Competing Interests

The authors confirm that there are no competing interests.

Authors' Contributions

All authors read the paper and participated in revising it for intellectual content and style. The authors participated as follows: for experimental design: Eva Salinas and Daniel Cervantes-García; for acquisition of data: Fabiola Carolina Muñoz, Maritza Montserrat Cervantes, Daniel Cervantes-García, and Mariela Jiménez; for analysis and interpretation of data: Eva Salinas, Daniel Cervantes-García, Fabiola Carolina Muñoz, and Javier Ventura-Juárez; for drafting of the paper: Eva Salinas, Daniel Cervantes-García, Fabiola Carolina Muñoz, and Mariela Jiménez.

Acknowledgments

This work was supported by the Autonomous University of Aguascalientes, Grant PIBB 15-9N, and CONACYT, Grant 240921. The authors wish to thank Claudia Berenice Barrón for excellent technical assistance and MVZ José Luis Ponce and MVZ Jesús Humberto Estrada Calderón for providing the animals for the study.

References

- [1] T. Bieber, "Atopic dermatitis," *Annals of Dermatology*, vol. 22, no. 2, pp. 125–137, 2010.
- [2] L. Schneider, S. Tilles, P. Lio et al., "Atopic dermatitis: a practice parameter update 2012," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 131, no. 2, pp. 295–299.e27, 2013.
- [3] T. Bieber, "Atopic dermatitis," *New England Journal of Medicine*, vol. 358, no. 14, pp. 1430–1494, 2008.
- [4] K. Kabashima, "New concept of the pathogenesis of atopic dermatitis: interplay among the barrier, allergy, and pruritus as a trinity," *Journal of Dermatological Science*, vol. 70, no. 1, pp. 3–11, 2013.
- [5] F.-T. Liu, H. Goodarzi, and H.-Y. Chen, "IgE, mast cells, and eosinophils in atopic dermatitis," *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, vol. 41, no. 3, pp. 298–310, 2011.
- [6] M. Auriemma, G. Vianale, P. Amerio, and M. Reale, "Cytokines and T cells in atopic dermatitis," *European Cytokine Network*, vol. 24, no. 1, pp. 37–44, 2013.
- [7] N. Inagaki and H. Nagai, "Analysis of the mechanism for the development of allergic skin inflammation and the application for its treatment: mouse models for the development of remedies for human allergic dermatitis," *Journal of Pharmacological Sciences*, vol. 110, no. 3, pp. 251–259, 2009.
- [8] T. Shiohara, J. Hayakawa, and Y. Mizukawa, "Animal models for atopic dermatitis: are they relevant to human disease?" *Journal of Dermatological Science*, vol. 36, no. 1, pp. 1–9, 2004.
- [9] H. Kitagaki, S. Fujisawa, K. Watanabe, K. Hayakawa, and T. Shiohara, "Immediate-type hypersensitivity response followed by a late reaction is induced by repeated epicutaneous application of contact sensitizing agents in mice," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 105, no. 6, pp. 749–755, 1995.
- [10] D. P. Arfsten, C. M. Garrett, W. W. Jederberg, E. R. Wilfong, and J. N. McDougal, "Characterization of the skin penetration of a hydrocarbon-based weapons maintenance oil," *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, vol. 3, no. 9, pp. 457–464, 2006.
- [11] Y. Fujii, H. Takeuchi, S. Sakuma, T. Sengoku, and S. Takakura, "Characterization of a 2,4-dinitrochlorobenzene-induced chronic dermatitis model in rats," *Skin Pharmacology and Physiology*, vol. 22, no. 5, pp. 240–247, 2009.
- [12] K. Sato, K. Sugibayashi, and Y. Morimoto, "Species differences in percutaneous absorption of nicorandil," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 80, no. 2, pp. 104–107, 1991.
- [13] E. P. Brody, "Biological activities of bovine glycomacropeptide," *British Journal of Nutrition*, vol. 84, no. 1, pp. S39–S46, 2000.
- [14] Neelima, R. Sharma, Y. S. Rajput, and B. Mann, "Chemical and functional properties of glycomacropeptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk: a review," *Dairy Science and Technology*, vol. 93, no. 1, pp. 21–43, 2013.
- [15] T. L. Mikkelsen, E. Rasmussen, A. Olsen, V. Barkholt, and H. Frøkiær, "Immunogenicity of κ -casein and glycomacropeptide," *Journal of Dairy Science*, vol. 89, no. 3, pp. 824–830, 2006.
- [16] M. H. Abd El-Salam, "Separation of casein glycomacropeptide from whey: methods of potential industrial application," *International Journal of Dairy Science*, vol. 1, no. 1, pp. 93–99, 2006.
- [17] A. Daddaoua, V. Puerta, A. Zarzuelo, M. D. Suárez, F. Sánchez De Medina, and O. Martínez-Augustin, "Bovine glycomacropeptide is anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis," *Journal of Nutrition*, vol. 135, no. 5, pp. 1164–1170, 2005.
- [18] P. Requena, A. Daddaoua, E. Martínez-Plata et al., "Bovine glycomacropeptide ameliorates experimental rat ileitis by mechanisms involving downregulation of interleukin 17," *British Journal of Pharmacology*, vol. 154, no. 4, pp. 825–832, 2008.
- [19] P. Requena, R. González, R. López-Posadas et al., "The intestinal anti-inflammatory agent glycomacropeptide has immunomodulatory actions on rat splenocytes," *Biochemical Pharmacology*, vol. 79, no. 12, pp. 1797–1804, 2010.
- [20] Q. S. Chen, J. F. Wang, and Y. L. Yan, "Effects of casein Glycomacropeptide on dimethyl hydrazine-induced alteration of cytokine network in rats," *Journal of Food Science*, vol. 35, pp. 192–198, 2014.
- [21] M. Jiménez, N. A. Chávez, and E. Salinas, "Pretreatment with glycomacropeptide reduces allergen sensitization, alleviates immediate cutaneous hypersensitivity and protects from anaphylaxis," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 170, no. 1, pp. 18–27, 2012.
- [22] M. Jiménez, D. Cervantes-García, Y. H. Muñoz, A. García, L. M. Jr. Haro, and E. Salinas, "Novel mechanisms underlying the therapeutic effect of glycomacropeptide on allergy: change in gut microbiota, upregulation of TGF- β , and inhibition of mast cells," *International Archives of Allergy and Immunology*, vol. 171, no. 3-4, pp. 217–226, 2016.
- [23] N. R. Roldán, M. Jiménez, D. Cervantes-García, E. Marín, and E. Salinas, "Glycomacropeptide administration attenuates airway inflammation and remodeling associated to allergic asthma in rat," *Inflammation Research*, vol. 65, no. 4, pp. 273–283, 2016.
- [24] H. Yamashita, T. Ito, H. Kato et al., "Comparison of the efficacy of tacrolimus and cyclosporine A in a murine model of dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis," *European Journal of Pharmacology*, vol. 645, no. 1–3, pp. 171–176, 2010.

- [25] H. Nojima and E. Carstens, "5-hydroxytryptamine (5-HT)₂ receptor involvement in acute 5-HT-evoked scratching but not in allergic pruritus induced by dinitrofluorobenzene in rats," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 306, no. 1, pp. 245–252, 2003.
- [26] K. Kim, "Neuroimmunological mechanism of pruritus in atopic dermatitis focused on the role of serotonin," *Biomolecules and Therapeutics*, vol. 20, no. 6, pp. 506–512, 2012.
- [27] N. Inagaki, N. Shiraishi, K. Igeta et al., "Inhibition of scratching behavior associated with allergic dermatitis in mice by tacrolimus, but not by dexamethasone," *European Journal of Pharmacology*, vol. 546, no. 1–3, pp. 189–196, 2006.
- [28] A. S. Moreno, R. McPhee, L. K. Arruda, and M. D. Howell, "Targeting the T helper 2 inflammatory axis in atopic dermatitis," *International Archives of Allergy and Immunology*, vol. 171, no. 2, pp. 71–80, 2016.
- [29] R. Sabat, G. Grütz, K. Warszawska et al., "Biology of interleukin-10," *Cytokine and Growth Factor Reviews*, vol. 21, no. 5, pp. 331–344, 2010.
- [30] R. J. Hay, N. E. Johns, H. C. Williams et al., "The global burden of skin disease in 2010: an analysis of the prevalence and impact of skin conditions," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 134, no. 6, pp. 1527–1534, 2014.
- [31] S. C. Dharmage, A. J. Lowe, M. C. Matheson, J. A. Burgess, K. J. Allen, and M. J. Abramson, "Atopic dermatitis and the atopic march revisited," *Allergy*, vol. 69, no. 1, pp. 17–27, 2014.
- [32] J. D. Ference and A. R. Last, "Choosing topical corticosteroids," *American Family Physician*, vol. 79, no. 2, pp. 135–140, 2009.
- [33] M. M. Tollefson, A. L. Bruckner, B. A. Cohen et al., "Atopic dermatitis: skin-directed management," *Pediatrics*, vol. 134, no. 6, pp. e1735–e1744, 2014.
- [34] M. Boguniewicz and D. Y. M. Leung, "Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation," *Immunological Reviews*, vol. 242, no. 1, pp. 233–246, 2011.
- [35] K. Amin, "The role of mast cells in allergic inflammation," *Respiratory Medicine*, vol. 106, no. 1, pp. 9–14, 2012.
- [36] M. Grewe, C. A. F. M. Bruijnzeel-Koomen, E. Schöpf et al., "A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis," *Immunology Today*, vol. 19, no. 8, pp. 359–361, 1998.
- [37] E. B. Brandt and U. Sivaprasad, "Th2 cytokines and atopic dermatitis," *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, vol. 2, no. 3, 2011.
- [38] G. R. Lee and R. A. Flavell, "Transgenic mice which overproduce Th2 cytokines develop spontaneous atopic dermatitis and asthma," *International Immunology*, vol. 16, no. 8, pp. 1155–1160, 2004.
- [39] D. Simon, L. R. Braathen, and H.-U. Simon, "Eosinophils and atopic dermatitis," *Allergy*, vol. 59, no. 6, pp. 561–570, 2004.
- [40] N. A. Molfino, D. Gossage, R. Kolbeck, J. M. Parker, and G. P. Geba, "Molecular and clinical rationale for therapeutic targeting of interleukin-5 and its receptor," *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 42, no. 5, pp. 712–737, 2012.
- [41] C.-W. Jeong, K.-S. Ahn, N.-K. Rho et al., "Differential *in vivo* cytokine mRNA expression in lesional skin of intrinsic vs. extrinsic atopic dermatitis patients using semiquantitative RT-PCR," *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 33, no. 12, pp. 1717–1724, 2003.
- [42] L. S. Chan, N. Robinson, and L. Xu, "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," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 117, no. 4, pp. 977–983, 2001.
- [43] T. Zheng, M. H. Oh, S. Y. Oh, J. T. Schroeder, A. B. Glick, and Z. Zhu, "Transgenic expression of interleukin-13 in the skin induces a pruritic dermatitis and skin remodeling," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 129, no. 3, pp. 742–751, 2009.
- [44] G. Del Prete, M. De Carli, F. Almerigogna, M. G. Giudizi, R. Biagiotti, and S. Romagnani, "Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production," *Journal of Immunology*, vol. 150, no. 2, pp. 353–360, 1993.
- [45] M. H. Sohn, J. S. Song, K.-W. Kim, E.-S. Kim, K.-E. Kim, and J. M. Lee, "Association of interleukin-10 gene promoter polymorphism in children with atopic dermatitis," *The Journal of Pediatrics*, vol. 150, no. 1, pp. 106–108, 2007.
- [46] P. Y. Ong, T. Ohtake, C. Brandt et al., "Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis," *New England Journal of Medicine*, vol. 347, no. 15, pp. 1151–1160, 2002.
- [47] M. Suárez-Fariñas, S. J. Tintle, A. Shemer et al., "Nonlesional atopic dermatitis skin is characterized by broad terminal differentiation defects and variable immune abnormalities," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 127, no. 4, pp. 954–964, 2011.
- [48] A. Buske-Kirschbaum, A. Geiben, and D. Hellhammer, "Psychobiological aspects of atopic dermatitis: an overview," *Psychotherapy and Psychosomatics*, vol. 70, no. 1, pp. 6–16, 2001.
- [49] C.-F. Wahlgren, "Itch and atopic dermatitis: an overview," *Journal of Dermatology*, vol. 26, no. 11, pp. 770–779, 1999.
- [50] M. Albrecht and A. M. Dittrich, "Expression and function of histamine and its receptors in atopic dermatitis," *Molecular and Cellular Pediatrics*, vol. 2, article no. 16, 2015.
- [51] L. A. Beck, D. Thaçi, J. D. Hamilton et al., "Dupilumab treatment in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis," *New England Journal of Medicine*, vol. 371, no. 2, pp. 130–139, 2014.
- [52] D. Thaçi, E. L. Simpson, L. A. Beck et al., "Efficacy and safety of dupilumab in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis inadequately controlled by topical treatments: a randomised, placebo-controlled, dose-ranging phase 2b trial," *The Lancet*, vol. 387, no. 10013, pp. 40–52, 2016.
- [53] I. A. Rather, V. K. Bajpai, S. Kumar, J. Lim, W. K. Paek, and Y.-H. Park, "Probiotics and atopic dermatitis: an overview," *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, article 507, 2016.
- [54] K. L. B. Nole, E. Yim, and J. E. Keri, "Probiotics and prebiotics in dermatology," *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 71, no. 4, pp. 814–821, 2014.