



Editorial

Un modelo más de asma... pero un modelo útil

Again an asthma model... but a useful one

Rosa Torres^{a,b,*}, César Picado^{b,c,d} y Fernando de Mora^b^a Departamento de Farmacología, de Terapéutica y de Toxicología, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España^b Laboratorio de Inmunología Respiratoria Clínica y Experimental, IDIBAPS, Hospital Clínic, Barcelona, España^c Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERes), Barcelona, España^d Departamento de Medicina, Alergia Respiratoria y Pneumología, Hospital Clínic, Universidad de Barcelona, Barcelona, España

El artículo de del equipo del Dr. Ramos-Barbón¹ publicado en este número de ARCHIVOS DE BRONCONEUMOLOGÍA no pasa inadvertido para los que creemos “ciegamente” en el valor añadido de la investigación in vivo en modelos de asma alérgica inducida en el ratón. A pesar de lo que dicen los detractores², parece obvio que en los últimos 10–15 años los ratones sensibilizados a diversos antígenos nos han ayudado a entender la enfermedad³. En realidad ser detractor o no depende muchas veces de cómo se manejen las expectativas. Los que entienden que la inducción de “sensibilidad respiratoria” en ratones reproduce en cierta medida el proceso asmático en pacientes y que, obviamente, como todos los modelos, tiene ciertas limitaciones, suelen admitir su interés⁴. Algunos, como nosotros, con entusiasmo⁵. Luego están aquellos investigadores muy puristas a los que sólo les valdría un “ratón asmático”, y ciertamente eso, que de facto superaría la condición de mero modelo experimental, no se ha logrado. Por fortuna, pues, se han publicado numerosos artículos en revistas de prestigio en los que se proponen modelos experimentales en el ratón para el estudio del asma alérgica.

Volviendo al artículo objeto de este comentario, sus autores practican pues un deporte de alto riesgo: el de atreverse a ofrecer a la comunidad científica un modelo más de asma inducida en el ratón. Inducida además por exposición a ovoalbúmina, un antígeno ya universalmente utilizado. Este “atrevimiento” no está exento de cierta intriga: ¿qué aportan los autores? ¿Cuál es la novedad? En nuestra opinión, esa novedad está algo escondida, se encuentra sobre todo en los entresijos del texto, no se hace visible con claridad. Una crítica respetuosa sería, pues, que los autores quizá no han plasmado con la suficiente claridad la magnitud del esfuerzo realizado y, por lo tanto, no han subrayado abiertamente el valor añadido del modelo que ellos proponen. En este breve comentario editorial se intentará desgranar y analizar 4 aspectos de los datos publicados: a) el proceso de inducción del modelo; b) el método y el objeto de evaluación de la respuesta; c) los

resultados obtenidos, y d) la interpretación y discusión de esos resultados. Vayamos por partes.

Sensibilización y provocación: reproducir el asma grave

En cuanto al proceso de inducción, el artículo propone un modelo de asma grave en ratón mediante la sensibilización previa intraperitoneal y posterior provocación intranasal durante 12 semanas, 3 veces por semana, con ovoalbúmina. Los autores han superado una barrera ancestral con la exposición repetida a ovoalbúmina: el desarrollo de tolerancia inmunológica. Ya esto de por sí tiene mérito y quizá, como dicen los autores, sea atribuible a la vía de exposición sistémica en la fase de sensibilización, pero es de ley recordar que un equipo de la Fundación Jiménez Díaz indujo remodelación exponiendo a los animales, también de forma intensiva (12 semanas, 3 días por semana), al antígeno exclusivamente por vía respiratoria tanto durante la sensibilización como durante la provocación⁶. Una de las claves de su éxito pudo radicar en el uso de ratones A/J, puesto que se ha visto que el desarrollo de remodelación depende en gran medida de la cepa (más difícilmente alcanzable en BALB/c). Otros grupos habían logrado antes inducir un proceso crónico e irreversible similar al que se observa en pacientes, como los propios autores señalan^{7,8}, y además mediante procedimientos de inducción similares (la vía de exposición, el antígeno, la cepa de ratón, el sexo, etc.). Creemos, sin embargo, que hubiera sido pertinente que los autores del artículo incluyeran y cotejaran sus datos con los de un trabajo relativamente reciente del equipo del Prof. Galli⁹, como se comentará más adelante. Tiene mérito el esfuerzo de los investigadores del trabajo que se comenta y tiene lógica científica, no es una mera cuestión aritmética: esa intensa exposición por vía respiratoria acerca notablemente el procedimiento de inducción al proceso natural/spontáneo por el cual se establece el asma grave/crónica en los pacientes. Es probable que esa intensa estimulación antigénica explique algunos de sus particulares resultados (véase más adelante). Es importante remarcar este aspecto del protocolo porque otros investigadores han innovado en cuestiones más aparentes y, por supuesto, muy importantes de la inducción de

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: rosa.torres@uab.cat (R. Torres).

sensibilidad respiratoria para aproximarse más a la enfermedad espontánea en pacientes^{10,11}, pero la "simple" intensificación de la exposición al antígeno cobra sin duda trascendencia.

Evaluación de la respuesta de las vías aéreas

No carece de interés la decisión de lo que se va a evaluar (o las variables que se van a medir) una vez inducido un modelo en busca de datos de impacto biomédico. En el artículo que nos ocupa se busca algún signo distintivo en las evaluaciones que realizan de la respuesta a la ovoalbúmina. Los autores hacen mucho hincapié en el "desarrollo y evaluación integrada de inflamación y remodelación" como un elemento de especial interés. Sin duda tiene interés hacer mediciones paralelas del proceso inflamatorio y de la remodelación, dadas las numerosas incógnitas sobre los mecanismos subyacentes. En nuestro conocimiento hay otros trabajos ya citados en la misma línea^{6,8,9}, precisamente con modelos crónicos inducidos por ovoalbúmina, aunque en el caso del artículo objeto de este comentario las mediciones son más precisas porque se realizan mediante morfología cuantitativa, mientras que en los casos anteriores se utilizan escalas semicuantitativas (mayoritariamente el clásico sistema de puntuación o *scoring*). Esta evaluación cuantitativa integrada "da mucho juego" y sin duda añade valor al trabajo. Por ejemplo, permitiría establecer correlaciones estadísticas entre las diferentes variables de los distintos procesos (inflamación y remodelación). Si bien esas correlaciones no establecerían relaciones biológicas definitivas entre las variables, sin duda pueden dar pistas o apuntar hacia posibles vínculos funcionales, es decir, mecanismos de enfermedad. Algo que debería confirmarse con ulteriores estudios experimentales. Se echa de menos, por lo tanto, algún análisis en ese sentido, pero seguramente quedan muchas cosas por venir. ¿Hay, por ejemplo, correlación estadística entre el grado de eosinofilia y el aumento del colágeno? O quizá más interesante aún: ¿la hay entre el número de mastocitos y la masa muscular?

En el capítulo de los fenómenos objeto de evaluación resulta igualmente interesante la distinción entre vías respiratorias según su calibre (pequeñas, medianas y grandes), y por lo tanto según su situación anatómica. Esto es algo poco habitual en este tipo de estudios, pero tiene un claro impacto y en cierta manera incide indirectamente en el debate sobre la teoría de la vía respiratoria única (*united airways theory*). Se comenta brevemente en el siguiente apartado.

Sobre los resultados

No deja de tener su importancia valorar cómo se induce el modelo y qué se evalúa, pero eso carece de interés si de dicho modelo no se derivan datos relevantes. Se muestran muchos resultados que eran de obligada presentación en un artículo de estas características (células caliciformes, masa muscular, etc.), pero se pretende llamar la atención del lector del artículo solamente sobre 2 observaciones: a) el número de mastocitos y eosinófilos, y b) los efectos en las vías respiratorias de distinto calibre.

Evaluar el número de mastocitos no es habitual salvo para equipos de investigación especializados en esa población celular^{9,12}. Sin embargo, los autores lo miden y demuestran que estas células tienen un alto grado de actividad en el modelo que proponen. Éste es un dato de especial relevancia dado el resurgir del interés de esta población celular en enfermedades alérgicas. Se les atribuye un papel cada vez más relevante. Contar los mastocitos que infiltran el tejido, como hacen los autores, es una forma muy acertada de medir la actividad de esas células,

pero los firmantes de este editorial creen que sólo se cerrará el círculo cuando se evalúe de facto la producción de mediadores específicamente mastocitarios, como podría ser la proteasa-1 de mastocitos de ratón (mMCP-1) u otros^{13,14}. En el nuevo modelo propuesto se detectan 10 veces más mastocitos en los ratones sensibilizados que en los no sensibilizados (de 0,28 a 2,8/cm²), es decir, que se produce un cambio en el orden de magnitud. Esto requiere especial atención dado que en otros casos, como por ejemplo reflejan Yu et al⁹, aumentan hasta 4 veces. Ciertamente el modelo y el método de recuento son distintos, pero sorprende la diferencia, que por lo general es incluso menor. No es descartable que el protocolo intensivo de exposición explique el notable incremento del número de estas células. Si bien no se observa una redistribución de los mastocitos hacia la musculatura lisa, como hubiera sido deseable dados los recientes trabajos en pacientes¹⁴, convendría extenderse en un futuro en la evaluación histológica y funcional de esta población celular en el modelo. En cuanto a los eosinófilos, sorprende que supongan un 50% del total de células infiltradas en el pulmón. Lo habitual es entre un 10 y un 30%. Puede ser bueno este grado de infiltración eosinofílica desde un punto de vista farmacológico-metodológico, puesto que permitirá estudiar el efecto modulador de moléculas sobre la inflamación eosinofílica. Algo muy criticado en modelos de ratón es que los eosinófilos que infiltran las vías aéreas no están activados. ¿Lo están en este caso? No cabe duda de que, siendo mastocitos y eosinófilos 2 poblaciones propias de este tipo de procesos, el hecho de haber logrado un reclutamiento particularmente intenso confiere al modelo especial interés si se enfoca desde el punto de vista del estudio de la actividad de estas células específicas.

El segundo aspecto de los datos del modelo que reviste interés es la afectación de las vías respiratorias pequeñas, medianas y grandes. En todas ellas hay remodelación (Mtc y Mmex), lo cual refleja, por un lado, el alcance, en su sentido literal, del antígeno que accede a las zonas más distales (de calibre menor), y por otro, como se ha dicho, aboga indirectamente en favor de la teoría de la vía respiratoria única, la cual postula que el problema no es de vías altas o bajas, sino que es común al conjunto del árbol traqueobronquial¹⁵. Aquí no se ha estudiado la mucosa nasal pero, dados los resultados en el resto de las vías, parece probable que esté afectada.

Limitaciones del estudio

Respecto a las carencias o limitaciones del artículo, algunas ya se han señalado en las líneas anteriores y otras se comentan a continuación. Tratándose de un nuevo modelo, se echan de menos datos sobre la función respiratoria, muy especialmente sobre la hiperreactividad bronquial que puedan sufrir los animales. Es verdad que hay que tener acceso a equipos que permitan medirla, pero también lo es que un modelo de estas características pierde valor si no se acompaña de disfunción respiratoria, es decir, si todo el proceso estudiado no redundan en cambios "clínicos". Presumimos que seguramente los hay, y nos gustará comprobarlo en futuras publicaciones. También se echa en falta la demostración de que se trata de una típica respuesta de linfocitos T *helper*-2 con incremento de la expresión de citocinas como las interleucinas-4, 5 o 13, y/o presencia de inmunoglobulinas E específicas de ovoalbúmina. Por otro lado, ha habido debate sobre la conveniencia o no de utilizar, como hacen los autores, coadyuvantes como el hidróxido de aluminio, sobre lo acertado de sensibilizar por vía intraperitoneal en vez de intranasal, y sobre las ventajas e inconvenientes de utilizar ovoalbúmina en lugar de auténticos aeroalérgenos (como ácaros del polvo doméstico), etc. Respecto a la utilización de ovoalbúmina, ¿se justifica su uso, a pesar de no ser causante de asma en personas, por el hecho de que se dispone

de ratones con receptores de células T específicos para la ovoalbúmina? Desde luego, a largo plazo alguien deberá plantearse generar ratones similares pero cuyos linfocitos T reconozcan aeroalérgenos.

Conclusiones

Quizá estos comentarios estén más bien guiados por la impaciencia o la voluntad de profundizar, de conocer más sobre lo que ocurre y cómo ocurre en el asma alérgica a través de estos u otros modelos. Por otro lado, algunas de las ideas que se lanzan, y que pueden parecer una crítica, quizá reflejen en el fondo la mayor virtud del trabajo: lo que aquí se presenta urge a saber más. ¿No es ésa la esencia de la investigación? Seguramente se ofrecerán algunos de esos datos en un futuro próximo. Conviene por lo tanto ahondar en el modelo. Reviste especial interés la intensidad del proceso de inducción y la magnitud de la respuesta que produce ante el estudio de moléculas moduladoras (inhibitorias) en estudios farmacológicos preclínicos. A este respecto, se sabe que a menudo las diferencias que se observan quedan al límite de la significación estadística. Una solución es aumentar el número de animales (la "n"), lo cual tiene limitaciones económicas, éticas e incluso de carga de trabajo; otra es disponer de un modelo con un proceso patológico más acusado, un modelo más susceptible de ser modulado de manera "estadísticamente visible". Este trabajo va bien encaminado.

Bibliografía

1. Fraga-Iriso R, Núñez-Naveira L, Brienza NS, Centeno-Cortés A, López-Peláez E, Vereá H, et al. Desarrollo de un modelo murino de inflamación y remodelación de vías respiratorias en asma experimental. Arch Bronconeumol. 2009.
2. Wenzel S, Holgate ST. The mouse trap: it still yields few answers in asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2006;174:1173-6.
3. Lloyd CM. Building better mouse models of asthma. Curr Allergy Asthma Rep. 2007;7:231-6.
4. Cortijo Gimeno J. Modelos experimentales de asma. Aportaciones y limitaciones. Arch Bronconeumol. 2003;39:54-6.
5. Torres R, Picado C, De Mora F. Descubriendo el asma de origen alérgico a través del ratón. Un repaso a la patogenia de los modelos de asma alérgica en el ratón y su similitud con el asma alérgica humana. Arch Bronconeumol. 2005;41:141-52.
6. López E, Del Pozo V, Miguel T, Sastre B, Seoane C, Civantos E, et al. Inhibition of chronic airway inflammation and remodeling by galectin-3 gene therapy in a murine model. J Immunol. 2006;176:1943-50.
7. Temelkovski J, Hogan SP, Shepherd DP, Foster PS, Kumar RK. An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolised allergen. Thorax. 1998;53:849-56.
8. McMillan SJ, Lloyd CM. Prolonged allergen challenge in mice leads to persistent airway remodelling. Clin Exp Allergy. 2004;34:497-507.
9. Yu M, Tsai M, Tam SY, Jones C, Zehnder J, Galli SJ. Mast cells can promote the development of multiple features of chronic asthma in mice. J Clin Invest. 2006;116:1633-41.
10. Johnson JR, Wiley RE, Fattouh R, Swirski FK, Gajewska BU, Coyle AJ, et al. Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling. Am J Respir Crit Care Med. 2004;169:378-85.
11. Conejero L, Higaki Y, Baeza ML, Fernández M, Varela-Nieto I, Zubeldia JM. Pollen-induced airway inflammation, hyper-responsiveness and apoptosis in a murine model of allergy. Clin Exp Allergy. 2007;37:331-8.
12. Torres R, Pérez M, Marco A, Picado C, De Mora F. Un inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2 empeora la función respiratoria y fomenta la actividad de los mastocitos en ratones sensibilizados a la ovalbúmina. Arch Bronconeumol. 2009;45:162-7.
13. Herrerías A, Torres R, Serra M, Marco A, Roca-Ferrer J, Picado C, et al. Subcutaneous prostaglandin E(2) restrains airway mast cell activity in vivo and reduces lung eosinophilia and Th(2) cytokine overproduction in house dust mite-sensitive mice. Int Arch Allergy Immunol. 2009;149:323-32.
14. Siddiqui S, Hollins F, Saha S, Brightling CE. Inflammatory cell microlocalisation and airway dysfunction: cause and effect?. Eur Respir J. 2007;30:1043-56.
15. Dixon AE. Rhinosinusitis and asthma: the missing link. Curr Opin Pulm Med. 2009;15:19-24.