

Palabras clave:

ovoalbúmina, dermatitis atópica, dermatitis atópica canina, dermatitis atópica modelo animal, respuesta inmune Th2

Keywords:

ovalbumin, atopic dermatitis, canine atopic dermatitis, atopic dermatitis animal model, T helper 2 immune response

Establecimiento de un modelo experimental de dermatitis atópica inducida por ovoalbúmina en caninos



Establecimiento de un modelo experimental de dermatitis atópica inducida por ovoalbúmina en caninos

<https://axoncomunicacion.net/establecimiento-de-un-modelo-experimental-de-dermatitis-atopica-inducida-por-ovoalbumina-en-caninos/>



Ha-Young Shin^{1,2}. Hyung Jun Jin^{1,3}. Hyun-Jin Tae². Hong-Geun Oh⁴. Jeong Ho Hwang^{1,3*}

1. *Animal Model Research Group, Korea Institute of Toxicology, Jeongeup, Republic of Korea*

2. *Companion Animal New Drug Development Center, Korea Institute of Toxicology, Jeongeup, Republic of Korea*

3. *College of Veterinary Medicine and Biosafety Research Institute, Jeonbuk National University, Iksan, Jeollabuk-do, Republic of Korea*

4. *R&D Division, HUVET Co., Ltd., Iksan-si, Republic of Korea*



Introducción: Se requiere un modelo estándar fiable para evaluar la eficacia de nuevos fármacos para animales de compañía, especialmente perros. La dermatitis atópica canina (DAC), también conocida como enfermedad dermatológica alérgica inflamatoria, es un problema común. Actualmente, el modelo animal de ácaros del polvo domésticos se utiliza en la investigación de la DAC pero este modelo presenta una variación individual significativa y es difícil de estandarizar. En este estudio, usamos ovoalbúmina como antígeno para sensibilizar y estimular a los perros, estableciendo así un modelo estable que imita la respuesta de linfocitos T-helper 2 (Th2) visto en la CAD. Nuestro objetivo fue crear un modelo de CAD que pudiera emplearse para evaluar la eficacia de nuevos fármacos e imitar la respuesta alérgica dominante Th2 observada en la patogénesis de la dermatitis atópica de los perros.

Métodos: para el estudio se usaron 6 Beagles. Se aplicó suero salino en dos animales y ovoalbúmina en cuatro, en la parte dorsal de la piel.

Resultados: el grupo tratado con ovoalbúmina mostró signos clínicos de DAC como prurito y eritema. Además, los niveles plasmáticos de inmunoglobulina E y quimioquina CCL17 de los marcadores de CAD fueron mayores en el grupo tratado con ovoalbúmina que en el grupo de control. El grosor cutáneo de la epidermis aumentó significativamente en el grupo tratado con ovoalbúmina, observándose infiltración de células inflamatorias en la región de la dermis engrosada. En conclusión, la aplicación en la piel canina con una concentración óptima de ovoalbúmina indujo síntomas típicos de CAD, y los análisis histológicos y moleculares confirmaron una mayor respuesta inmune relacionada con Th2.

Conclusiones: Por lo tanto, hemos establecido con éxito una respuesta adecuada Th2 dominante imitando la CAD, que facilitará la investigación específica de la dermatitis atópica en perros.



Introducción

La dermatitis atópica canina (CAD) es una enfermedad cutánea inflamatoria de la piel común que implica disfunción de la barrera epidérmica y prurito recurrente en perros (1). La dermatitis atópica (DA) es una enfermedad hereditaria, aunque es posible que se desarrolle espontáneamente en cualquier individuo. Los factores ambientales, como la exposición a alérgenos, juega un papel importante en la activación de esta patología (2).

El tratamiento de la DA en humanos y perros implica utilizar medicación que puede suprimir la respuesta celular inmune de Th2 (3-6) y mantener el control de la enfermedad a largo plazo (7-10).

Al igual que en humanos, las lesiones cutáneas de la CAD se caracterizan por la infiltración de la dermis por células CD4+T y eosinófilos, conocida como respuesta Th2. La respuesta Th2 es una respuesta inmune exagerada provocada por alérgenos (11). El sistema inmune de los perros genéticamente predispuestos reconoce los alérgenos y activa las células Th2. Estas células Th2 activadas migran al sitio de estimulación a través de CCL17, una quimioquina que mueve las células inflamatorias y estas células estimulan las células B (12). Las células Th2 liberan citoquinas de señalización específicas, incluidas la interleucina-4 (IL-4), la interleucina-13 (IL-13) y la interleucina-31 (IL-31). Las citoquinas liberadas promueven una respuesta inflamatoria en la piel, lo que lleva a síntomas característicos de la DAC como prurito, eritema y edema. La diferenciación inflamatoria de células T y la respuesta inmune Th2 en la piel está regulada por mediadores inflamatorios, como COX-2 (13, 14), pero el papel de COX-2 en la respuesta inmune de la DAC no está claro. Además, el hallazgo de que la inhibición de la expresión COX-2 de un modelo atópico alérgico en ratones promueve una respuesta Th2 (15) fue un indicador para la construcción del modelo de CAD dominante Th2.

IL-4 e IL-13 median en la hipersensibilidad del anticuerpo de la inmunoglobulina E (IgE) que está implicada en las reacciones alérgicas. Los anticuerpos IgE se unen a los mastocitos, que son abundantes en la piel. Tras la exposición posterior al mismo alérgeno, las IgE desencadenan la degranulación de los mastocitos. Debido a la degranulación, se libera histamina y otros mediadores que producen prurito y la posterior inflamación. Sin embargo, las citoquinas Th2 varían mucho dependiendo de la muestra y el tiempo de medición. En el caso de CCL17, las quimiocinas relacionadas con Th2 pueden medirse de una manera relativamente estable y, por lo tanto, están siendo estudiadas activamente como objetivos que puedan determinar la severidad de las enfermedades alérgicas como DA.

Para proteger a los animales y garantizar una selección óptima del tratamiento es esencial confirmar la eficacia y la seguridad de los nuevos medicamentos desarrollados para el tratamiento de enfermedades, incluida la atopia, en los animales diana (16).

La sensibilización epicutánea con alérgenos, como los ácaros del polvo doméstico (APDs), se ha utilizado ampliamente para establecer modelos de CAD o para estudiar la alergia de contacto (17,18). Sin embargo, los animales inducidos por APDs muestran importan-

tes variaciones individuales y estandarizar los protocolos es difícil (19,20). Por lo tanto, no se dispone de modelos animales fiables para experimentación, estudios no clínicos o estudios clínicos de fase II.

En este estudio, usamos ovoalbúmina como antígeno para la sensibilización y estimulación para estudiar la eficacia y actividad inmunológica. Deducimos la concentración óptima de ovoalbúmina necesaria para establecer un modelo y, de ese modo, establecemos un modelo de DAC que imita la respuesta DA Th2 dominante. Este modelo será una valiosa herramienta para seguir investigando en este campo.

Material y métodos

Animales

En el experimento se usaron seis beagles macho (*Canis lupus familiaris*). Los grupos de control (CG), T1 y T2 se componían de dos animales cada uno. Todos los perros eran machos de 7 meses con un peso medio de 7,95 kg (rango, 7,2-8,7), y se obtuvieron de Raon Bio (Yongin, Corea del Sur). Antes de empezar el experimento, al periodo de aclimatación de 7 días le siguió una cuarentena veterinaria. En este estudio se incluyeron animales sanos que no desarrollaron dermatitis o enfermedades alérgicas durante la cuarentena. A todos se les alojó en jaulas individuales (120 x 180 x 150 cm³). Durante el periodo experimental, la temperatura y la humedad de la habitación se mantuvieron a 24°C (\pm 2°) y 40-60% respectivamente. La intensidad de la luz fluorescente se mantuvo en 150-300 lx, la tasa de renovación del aire fue de 10-15 veces/hora y se mantuvo un ciclo de luz de 12h. Los animales fueron alimentados con pienso seco para perros (sin huevo) y se les permitió beber agua limpia de grifo a voluntad. No se les bañó durante el periodo de estudio para evitar cambios en los parámetros de la condición cutánea. Toda la experimentación animal se realizó bajo las directrices del Comité Institucional del Cuidado y Uso de Animales de Huvet (número de aprobación IACUC: HV 2022-011).

Diseño del estudio

En este estudio, al grupo control (GC) se le expuso epicutáneamente a suero salino normal y a los grupos T1 y T2 se les expuso epicutáneamente a 1 y 5 mg/kg de ovoalbúmina, respectivamente.

El estudio consistió en dos fases. En la fase 1, los beagles fueron sensibilizados epicutáneamente a la ovoalbúmina durante dos semanas. En ese momento, los perros se consideraron sensibilizados a la ovoalbúmina a pesar de que la mayoría de ellos (3 de 4) no presentaban lesiones cutáneas. En la fase 2, los beables fueron expuestos a ovoalbúmina durante 2 semanas.

La ovoalbúmina se aplicó con apósitos transparente Tegaderm® (3M, St. Paul, MN, Estados Unidos). Decidimos colocar la ovoalbúmina en la zona dorsal, que no es una zona típica de desarrollo de la DAC porque los animales eran propensos a eliminar el Tegaderm® cuando se movían. Para crear el modelo de la DAC, se cortó el pelo y se desinfectó la zona dorsal con alcohol isopropílico al 70%. A los grupos tratados con ovoalbúmina se le sensibilizó con 1 y 5 mg/kg





de ovoalbúmina disuelta en suero salino fisiológico todos los días durante 2 semanas. A los animales del GC se les administró suero salino fisiológico. Se obtuvieron imágenes macroscópicas los días 0, 2, 7 y 14.

Evaluación clínica de las lesiones cutáneas

Se evaluó la gravedad de los síntomas usando una versión simplificada del sistema de puntuación Draize utilizado en estudios toxicológicos y dermatológicos para evaluar la irritación cutánea, con las puntuaciones más altas que indicaban inflamación, lesión e hinchazón severas causadas por la ovoalbúmina. El sistema de puntuación de irritación dérmica Draize (SPID) se puntúa dos veces en semana (21), donde 0 indica que no hay eritema, escaras o edema, 1 indica eritema, escaras y edema apenas perceptible, 2 indica eritema, escaras y edema claramente perceptibles, 3 indica eritema, escaras y edema de moderados a severos y 4 indica severo eritema, escaras ligeramente profundas y edema severo que se extiende más allá del área expuesta.

Recolección de muestras y analíticas

Para analizar el hemograma completo y la química sanguínea, se recogió sangre entera en un tubo con anticoagulante EDTA (ácido dietilendiamino tetraacético) y en un tubo separador de suero, respectivamente. Se realizó un hemograma completo (BC-2800 Vet; Mindray, Shenzhen, China) usando sangre entera. Las muestras en el tubo separador de suero se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm y el sobrenadante se recogió y utilizó como suero para las analíticas (DRI-CHEM NX700; Fujifilm, Tokio, Japón).

Histopatología

En el día 15, todos los animales fueron anestesiados para obtener muestras de piel de la región dorsal. Se recogieron cuatro biopsias utilizando punch de 8 mm en el área dorsal de cada uno de los seis perros después de una evaluación clínica y monitorización del estado de la piel. Para el examen histopatológico, el 50% de las muestras se fijaron en solución de formalina al 10% con tampón neutro; para el análisis de citoquinas, el 50% de las muestras conservadas en solución RNAlater® (AM7021, Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Los tejidos de la piel se conservaron en formol tamponado neutro al 10% durante la noche e incorporados en parafina. Entonces, las muestras tisulares se seccionaron a intervalos de 5 μ m. Las secciones se desparafinaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina para examinar las anomalías estructurales de la piel. La tinción tricrómica de Masson se realizó según las instrucciones del fabricante (Cat. No. IFU-2; ScyTek, Logan, UT, Estados Unidos). Los portaobjetos desparafinados se incubaron en solución de hematoxilina férrica de Weigert, fucsina ácida - escarlata de Briebrich, ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico, azul de anilina y una solución de ácido acético al 1%. El colágeno en los tejidos conectivos se tiñó de azul, el citoplasma se tiñó de rojo o rosa, y los núcleos se tiñeron de rojo oscuro o púrpura. Los resultados de la tinción fueron examinados por un histopatólogo.

Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa con transcripción inversa

Para medir la cantidad de ácido ribonucleico (RNA) en las muestras, el RNA se extrajo de las biopsias de tejidos usando el RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) y se transcribió inversamente utilizando el QuantiNova Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Se prepararon mezclas de 20 μ L de volumen para qRT-PCR, que contenían 2 Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, Estados Unidos), y las reacciones se realizaron utilizando un QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Se utilizó gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control endógeno para la normalización. Las reacciones cuantitativas en cadena fueron realizadas usando cebadores que abarcan secuencias intrónicas (mencionadas en la **tabla 1**). El factor multiplicador de inducción se cuantificó utilizando el método 2- $\Delta\Delta$ CT.

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

Para analizar las citoquinas en las muestras sanguíneas, se recolectó sangre entera en tubos de EDTA y se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm y el sobrenadante se recogió como plasma. Todos los pasos se realizaron en rangos de temperatura entre 2 y 8 °C. Los niveles de IgE canina, IL-4 e IL-31 se midieron usando kits ELISA (Cat. No. CI0014 and CI0041 for IL-4 e IL31, respectivamente; Neobiolab, Cambridge, MA, USA; Cat. No. Ab157700 para IgE; Abcam, Cambridge, UK), de acuerdo con los protocolos del fabricante.

Tabla 1. Primers caninos usados para cuantificar la PCR real-time.

Símbolo del gen	Secuencia de Primers (desde 5' hasta 3')	Longitud	ID Banco de genes
CCL17	F: GCCATCGTGTGGTTGTA R: CTCCCTCCAGGTTCTTTGT	103	XM_038657714.1
IL-4	F: TCACCAGCACCTTTGTCCACGG R: TGCACGAGTCGTTTCTCGCTGT	96	AF187322.1
IL-13	F: TGCAGCAGCTCTAGAATCTCTG R: CAGCATCCTCTGGGTCCTT	69	NM_001003384.1
IL-31	F: CCTGTTCCCTGCTCTGCTCTA R: TGAGACACAGCAGCAAGGTA	188	NM_001165914.1
COX-2	F: AAGCTTCGATTGACCAGAGCAG R: TCACCATAAAGGGCCTCCAAC	145	NM_001003354.1
PTGES	F: GTCCTGGCGCTGGTGAGT R: ATGACAGCCACCACGTACATCT	89	NM_001122854.1
Filaggrin	F: GATGACCCAGACACTGCTGA R: TGGTTTTGCTCTGATGCTTG	158	XM_038423227.1
GAPDH	F: TTAAGTCTGGCAAAGTGGATATTGT R: GAATCATACTGGAACATGTACACCA	85	XM_038448970.1



Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Se utilizó la media \pm desviación estándar (DE) para representar los datos en todos los gráficos. Para el análisis de tejidos, se realizaron al menos tres experimentos independientes por triplicado. Para el análisis de plasma, se tomó una muestra de sangre de la vena cefálica de dos animales por grupo, y todas las pruebas se realizaron técnicamente por triplicado. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba t de Student. La significación estadística se fijó en un valor de p inferior a 0,05.

Resultados

Perros sensibilizados a la ovoalbúmina con síntomas clínicos similares a las reacciones típicas de la DAC

Los síntomas clínicos de la atopia en perros incluyen eritema, edema y escoriaciones cutáneas. Examinamos visualmente las manifestaciones clínicas típicas de la atopia, incluyendo eritema, edema y escoriaciones en el grupo tratado con ovoalbúmina. Los síntomas se evaluaron y calificaron usando el criterio DDISS. Comparando con el grupo control, el grupo tratado con ovoalbúmina exhibió puntuaciones más altas, observándose un aumento notable en grupo T1 comparado con el grupo T2. Además, la

Los síntomas clínicos de la atopia en perros incluyen eritema, edema y excoriaciones cutáneas. Examinamos visualmente las manifestaciones clínicas típicas de la atopia, incluidos eritema, edema y excoriaciones, en el grupo tratado con ovoalbúmina. Los síntomas se evaluaron y calificaron utilizando los criterios DDISS. En comparación con los del grupo VC, el grupo tratado con ovoalbúmina exhibió puntuaciones más altas, observándose un aumento notable en el grupo T1 en comparación con el grupo T2. Por otra parte, la puntuación de gravedad de la dermatitis en el grupo T1 (**Figuras 1A, B**).

Histopatología de perros sensibilizados a ovoalbúmina similar a la DAC típica

Histopatológicamente, la DAC se caracteriza por una epidermis engrosada como resultado de una mayor proliferación de queratinocitos, junto con la infiltración de células inflamatorias, incluidos linfocitos y eosinófilos. En nuestro estudio, observamos una infiltración comparable de células inmunes, incluidos linfocitos, eosinófilos y neutrófilos, en el grupo tratado con ovoalbúmina (**Figuras 2A, C**).

Además, observamos infiltración de células inflamatorias y anomalías estructurales que incluyen inflamación dérmica linfocítica (inflamación perivascular) con epiteliotropismo focal en la capa dérmica del estrato córneo del grupo tratado con ovoalbúmina (**Figuras 2A, B**). El examen histológico mediante hematoxilina y eosina y tinción con tricrómico de Masson reveló un aumento notable y estadísticamente significativo en el espesor de la epidermis en el grupo tratado con ovoalbúmina en comparación con el grupo control (**Figura 2C**). Estos hallazgos indican que las características histopatológicas de la DA inducida por ovoalbúmina reflejan fielmente las observadas comúnmente en pacientes con DA.

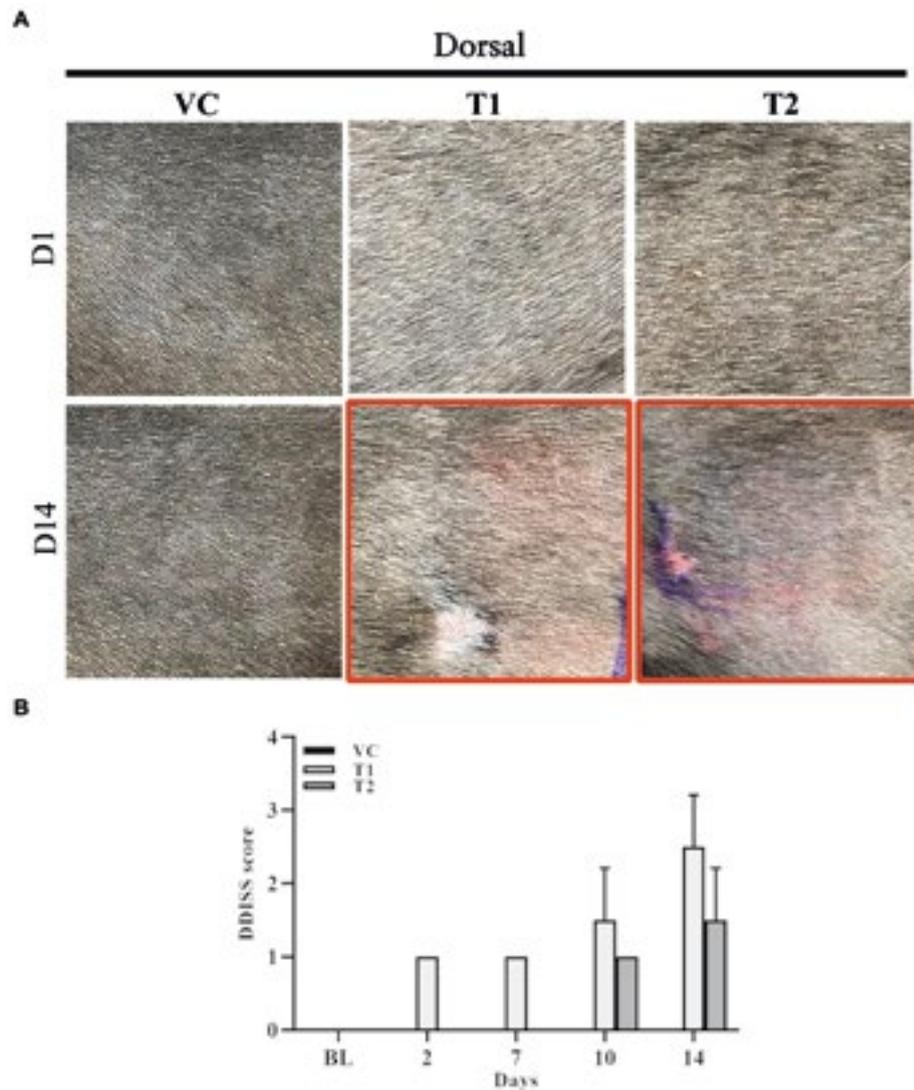


Figura 1. Cambios macroscópicos durante la estimulación con ovoalbúmina. (A) Imagen macroscópica adquirida el día 1 (fila superior) y 14 (fila inferior) (observación macroscópica) durante la estimulación con ovoalbúmina en todos los grupos (GC, T1 y T2). (B) Nivel de irritación de la piel puntuado utilizando el sistema de puntuación de irritación dérmica Draize (DDISS) en la estimulación con ovoalbúmina. El grupo tratado con ovoalbúmina exhibió síntomas clínicos más pronunciados de formación de eritema en comparación con el grupo de control (GC). Las puntuaciones fueron más altas en el grupo T1 (1 mg/mL) en comparación con el grupo T2 (5 mg/mL). Los valores representan la media \pm DE. GC, grupo control; T1, grupo de tratamiento 1 (tratamiento con ovoalbúmina de baja concentración); T2, grupo de tratamiento 2 (tratamiento con ovoalbúmina de alta concentración) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

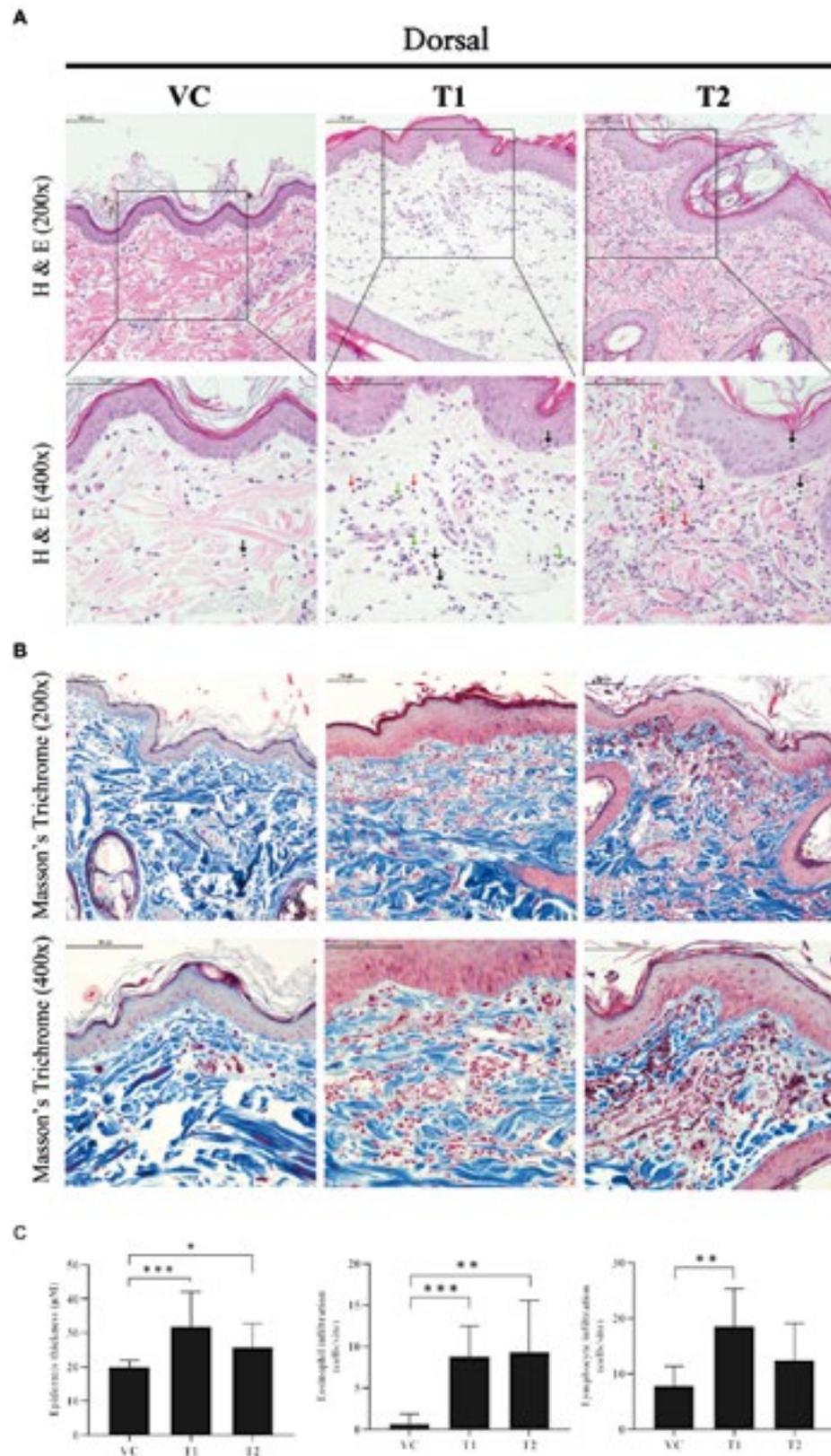


Figura 2. Cambios en la histopatología tras la estimulación con ovoalbúmina. (A) Imagen que muestra el análisis histopatológico de la tinción con hematoxilina y eosina en tejidos cutáneos. Las filas superiores son 200x y la inferior 400x. Barra de escala = 100 µm. Flecha negra: Linfocito; Flecha verde: Neutrófilo; Flecha roja: Eosinófilo. Estrella amarilla y flecha: anomalías estructurales de la inflamación dérmica linfocítica (inflamación perivascular) con epiteliotropismo focal. (B) Imagen que muestra el análisis histopatológico de la tinción con tricrómico de Masson en tejidos cutáneos. Las filas superiores son 200x y la inferior 400x. Barra de escala = 100 µm. (C) Grosor epidérmico y número de células inmunitarias infiltrantes (eosinófilos, linfocitos). Los valores representan la media ± DE. GC, grupo; T1, grupo de tratamiento 1 (tratamiento con ovoalbúmina de baja concentración); T2, grupo de tratamiento 2 (tratamiento con ovoalbúmina de alta concentración) *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,005.

Los perros sensibilizados a la ovoalbúmina desregulan la filagrina pero sobregulan la expresión de COX-2 y aumenta la producción de prostaglandina (PGE) de forma similar a la típica DAC

En nuestro modelo de DAC, examinamos la expresión de factores clave implicados en la barrera cutánea llamados filagrina y COX-2. Nuestro análisis de mRNA de la piel expuesta a ovoalbúmina reveló un descenso significativo, dosis dependiente, en la expresión de los niveles de filagrina en el grupo tratado con ovoalbúmina comparado con el grupo control (**Figura 3A**).

Además, el tratamiento con ovoalbúmina indujo un incremento significativo en la expresión COX-2 y un incremento asociado en la producción de PGE2.

Estos hallazgos indican que la ovoalbúmina causa en la barrera cutánea un daño e inflamación de forma similar a la DAC de una forma concentración-dependiente (**Figuras 3 B,C**).

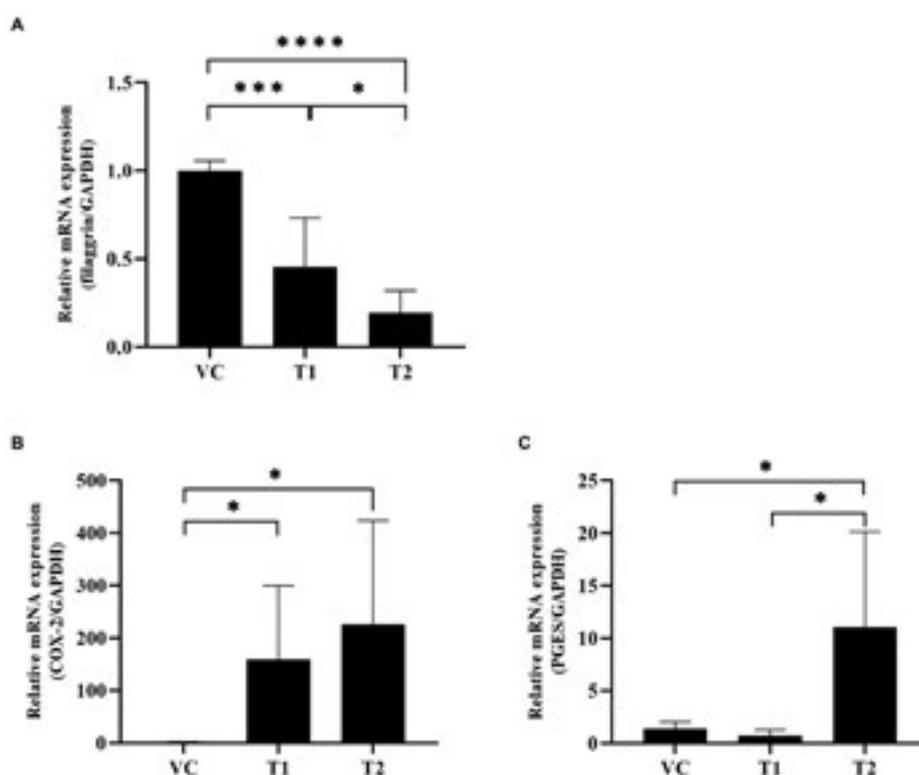


Figura 3. Cambios en los niveles de expresión de ARNm de los factores relacionados con la inflamación y de las proteínas de la barrera cutánea tras la estimulación con ovoalbúmina. Los niveles de ARNm de citoquinas relacionadas con la inflamación temprana se cuantificaron mediante PCR- transcripción inversa. (A) El nivel de expresión del ARNm de la filagrina disminuyó significativamente tras la estimulación con ovoalbúmina. (B) El nivel de expresión del ARNm de la COX-2 aumentó significativamente tras la estimulación con ovoalbúmina. (C) El nivel de expresión del ARNm de PGES aumentó significativamente tras la estimulación con ovoalbúmina en el grupo T2, no en el grupo T1. Todos los valores representan la media \pm DE. GC, grupo control; T1, grupo de tratamiento 1 (tratamiento con ovoalbúmina de baja concentración); T2, grupo de tratamiento 2 (tratamiento con ovoalbúmina de alta concentración) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$. GC: grupo control; PGES: prostaglandinas.





Los perros sensibilizados a ovoalbúmina desarrollan una respuesta Th-2 dominante similar a la DAC típica

CCL17, comúnmente conocida como quimiocina regulada y activada del timo (TARC), es una quimioquina importante expresada en pacientes con DA. CCL17 estimula la migración de las células CCL4+Th2 al sitio de exposición a alérgenos (22). En la DAC, la sobrerregulación de la expresión de citoquinas relacionadas con las células Th2 se observa no solo en la piel, sino también en las células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs) y muestras de plasma. Por el contrario, IgE genera anticuerpos alérgenos específicos que se unen a los mastocitos y desencadenan la liberación de moléculas inflamatorias.

En consecuencia, identificamos dos factores que desempeñan una función en la etapa inicial de la respuesta a la DA. Nuestros hallazgos demostraron una importante sobrerregulación de la expresión de quimioquinas CCL17 a nivel de ARNm en el grupo tratado con ovoalbúmina en comparación con el grupo control. Además, evaluamos los niveles de IgE para confirmar la producción de anticuerpos IgE totales séricos en la DA inducida por ovoalbúmina. Curiosamente, tanto la expresión de CCL17 como los niveles de IgE fueron más altos en el grupo de dosis baja que en el grupo de dosis alta (**Figura 4A**). Además, analizamos las citoquinas secretadas por las células T atraídas al sitio del tratamiento con ovoalbúmina. Este análisis se realizó utilizando muestras de piel y plasma, que confirmaron la presencia de células Th2 reclutadas en la piel. También observamos la secreción predominante de citoquinas asociadas con células Th2, incluyendo IL-4, IL-13 e IL-31, en la piel. Los niveles de ARNm de estas citoquinas mostraron un aumento significativo en el grupo tratado con ovoalbúmina en comparación con el grupo control (**Figura 4B**). No se detectó expresión Th1 en el grupo tratado con ovoalbúmina. Además, se observó una elevación significativa en los niveles de IL-4 e IL-31 en muestras plasmáticas del grupo tratado con OVA. Esta observación fue más pronunciada en el grupo de dosis baja que en el grupo de dosis alta (**figura 4C**).

Discusión

En este estudio, se buscó establecer un modelo de DAC de respuesta dominante Th2 utilizando ovoalbúmina en perros beagle sanos sin antecedentes de predisposición genética para desarrollar DAC. En las etapas de sensibilización e inducción, utilizando Tegaderm, la ovoalbúmina se aplicó diariamente a los perros sin bañar. Los síntomas clínicos de la atopia se analizaron dos veces a la semana mediante puntuación visual. Posteriormente, se realizaron análisis histológicos e inmunológicos después del período de aplicación de la ovoalbúmina para evaluar el modelo DA utilizando piel expuesta a la ovoalbúmina.

La dermatitis atópica es una afección cutánea común, inflamatoria que afecta a seres humanos y perros a nivel mundial (23, 24). El tratamiento para la dermatitis atópica humana y la DAC tiene como objetivo aliviar síntomas como el prurito y la inflamación a través de diversas intervenciones farmacológicas. Sin embargo, la eficacia no

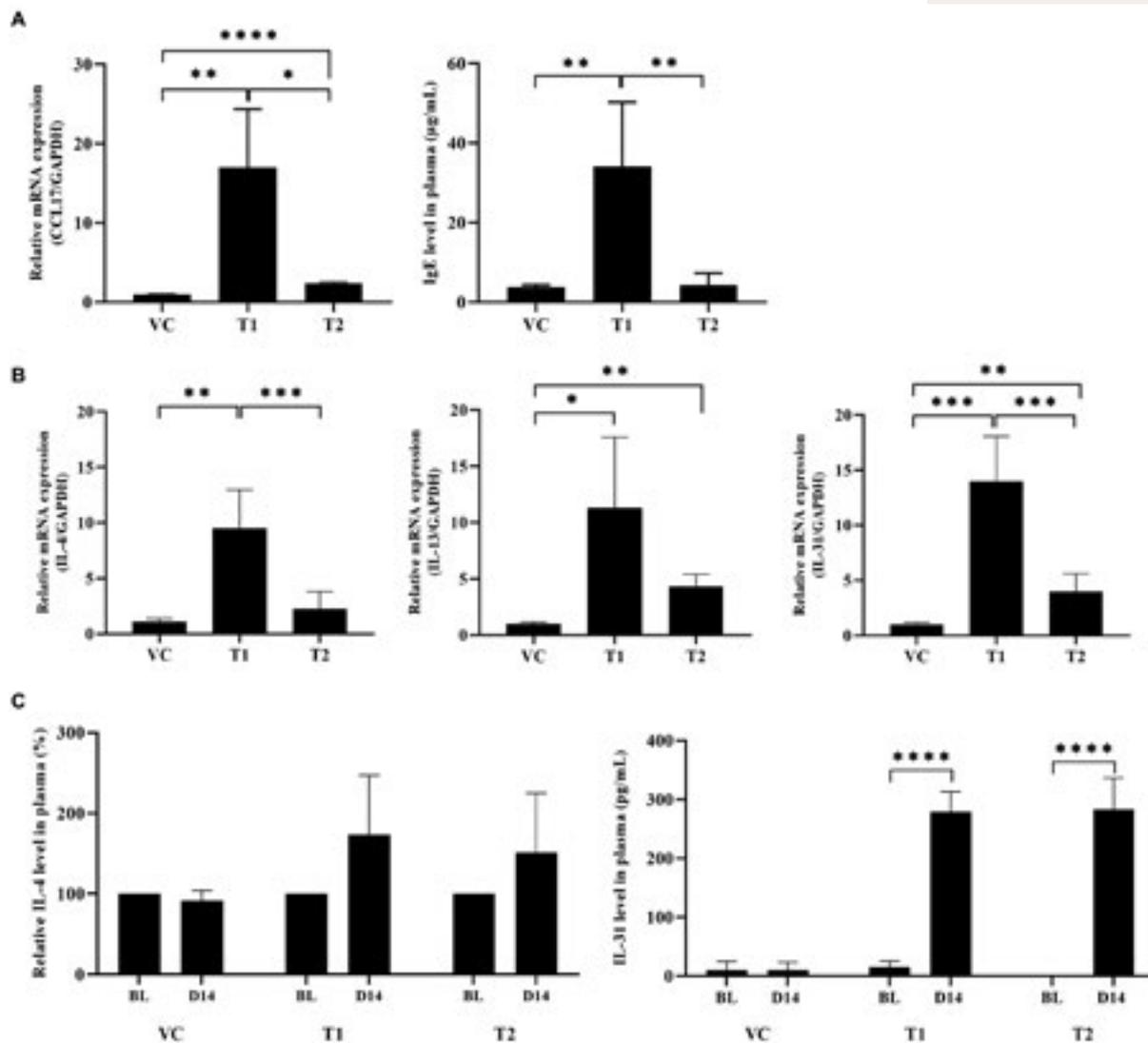


Figure 4. La ovoalbúmina induce una respuesta Th2 dominante similar a la DAC típica en perros sensibilizados a la ovoalbúmina. (A) Los niveles de proteína IgE total y ARNm de CCL17 aumentaron en el grupo tratado con ovoalbúmina en comparación con el grupo control. (B) Los niveles de expresión de ARNm de citocinas relacionadas con Th2 en muestras de piel de DAC inducida por ovoalbúmina se midieron mediante qRT-PCR. (C) Los niveles de expresión proteica de las citocinas relacionadas con Th2 en muestras de plasma obtenidas de individuos con DA se evaluaron mediante ELISA. Todos los valores representan la media \pm DE. GC, grupo control; T1, grupo de tratamiento 1 (tratamiento con ovoalbúmina de baja concentración); T2, grupo de tratamiento 2 (tratamiento con ovoalbúmina de alta concentración) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$. GC, grupo control.

ha sido muy estudiada en perros, por lo tanto, se necesita investigación específica adicional y tener un modelo fiable de DAC para fines de investigación.

En la mayoría de perros con DAC se ha observado un incremento de los niveles circulantes de IgE contra alérgenos ambientales. Por lo tanto, es una práctica común detectar niveles de IgE específicos para alérgenos comunes en la mayoría de los perros diagnosticados con DA. El método principal utilizado para inducir síntomas similares a la DA en perros con fines de investigación es la aplicación de HDMs (20, 25). En algunos estudios se ha examinado a los perros para detectar IgE alta antes de inducir DA (19, 25). En otros se utilizaron perros beagle sanos sin predisposición genética a niveles elevados de IgE; sin embargo, la evaluación se basó en IgE como



único índice de evaluación. Las quimiocinas como CCL17, que están elevadas en la DA alérgica, facilitan el reclutamiento de células Th2 en los sitios de inflamación, y la citoquina Th2 (IL4) estimula la síntesis de IgE (26). En consecuencia, dado que los niveles de IgE en la dermatitis atópica se correlacionan con una respuesta inmune Th2, es importante examinar las quimioquinas o citoquinas que se regulan junto con los niveles de IgE.

Por lo tanto, el establecimiento de modelos estandarizados de atopia inducida por HDM para fines de investigación es un desafío. Los niveles incrementados de IgE sirven como marcadores de alérgenos en el DA, pero, aunque, un nivel elevado de IgE es un indicador importante no se puede confiar únicamente para el diagnóstico definitivo de DA (1). Tanto en ratones como en minicerdos, los síntomas similares a la DA pueden inducirse a través de la aplicación dérmica de ovoalbúmina (27-29). En modelos de ratones con DA inducidos por ovoalbúmina, la inducción de atopia a través de la sensibilización percutánea compromete la función de barrera cutánea, permitiendo que los alérgenos penetren en la piel. Posteriormente, la sensibilización transdérmica repetida desencadena una respuesta Th2, lo que resulta en la manifestación de síntomas cutáneos. En consecuencia, hemos establecido un modelo de DAC utilizando la ovoalbúmina como sensibilizador transdérmico.

Por otra parte, nuestros hallazgos sugieren que valores elevados de IgE acompañados de quimioquina CCL17 y respuesta dominante Th2, juegan un papel significativo en la exacerbación de la DA inducida por ovoalbúmina.

La dermatitis atópica en perros se acompaña de eritema macular, erupción cutánea y prurito (30, 31). Cualquier compromiso en la función de barrera cutánea contribuye a una progresión acelerada de la DA. Cuando la piel encuentra alérgenos, hay un aumento de mediadores inflamatorios como las PGEs y COX-2. En cuanto al desequilibrio Th1/Th2, la aplicación tópica, in vitro, de PgE_2 suprime la producción de citoquina IL-12, que es esencial para liberar IFN γ , una citoquina Th1 (32). La inhibición de la IL-12 promueve una respuesta inmune Th2 (33), lo que conduce a un rápido desarrollo de irritación cutánea (34). Curiosamente, investigaciones previas demostraron que la inhibición selectiva de la expresión de COX-2 en un modelo de atopia alérgica en ratones favoreció una respuesta Th2, exacerbando los síntomas de DA (15). En nuestro estudio, el grupo con baja exposición a la ovoalbúmina (grupo T1) mostró disminución de la expresión de COX-2 y PgE en comparación con el grupo con mayor exposición (grupo T2). Esto sugiere que reducir la exposición a ovoalbúmina puede llevar a una disminución de los mecanismos reguladores COX-2/PgE aumentando las expresiones específicas de citoquinas Th2.

Por consiguiente, proponemos que las concentraciones óptimas para inducir un modelo de DAC con dominancia Th2, es 1 mg/ml. Sin embargo, esta hipótesis requiere ser verificada en futuros estudios con mayor número de perros.

La DA puede asociarse a una deficiencia de filagrina, una proteína clave implicada en la formación de las capas más externas de la piel (estrato corneo) en algunos individuos. La respuesta inmunita-

ria polarizada Th2 inducida por la DA aguda conduce a una disminución secundaria de la filaggrina. Por lo tanto, la disminución de la filaggrina puede exacerbar la enfermedad inflamatoria dérmica y debe confirmarse en asociación con la citoquina Th2 en la DA (35-37). Nuestros hallazgos demostraron que el patrón de cambio en los niveles de expresión de la filaggrina fue similar al observado en estudios previos (38, 39) En el grupo tratado con ovoalbúmina, se observó una disminución, dependiente de la concentración, en los niveles de expresión del ARNm de filaggrina. Esto indica que la aplicación de ovoalbúmina perjudica la función de barrera cutánea de forma similar a los efectos observados en pacientes con atopía.

Durante las fases iniciales de la penetración de los alérgenos causada por deficiencias en la barrera cutánea, la quimioquina CCL17 es liberada por células cutáneas como los queratinocitos, células dendríticas y las células endoteliales. Posteriormente, CCL17 se expresa por células CCR4+-Th2 en las últimas etapas de la penetración de alérgenos. En un estudio realizado por Kakinuma et al., los individuos con DA presentaron niveles séricos elevados de CCL17 en comparación con los pacientes con psoriasis. Este hallazgo destaca el papel significativo de CCL17, una quimioquina esencial en la progresión y desarrollo de DA (40). En nuestro estudio, observamos un sustancial incremento en los niveles de expresión de ARNm de CCL17 en el grupo de DA inducida por ovoalbúmina en comparación con el grupo control. Curiosamente, este incremento fue particular en el grupo en el que se utilizaron dosis bajas. Esto sugiere que los niveles de CCL17 incrementados por ovoalbúmina conducen a una respuesta inmune dominante Th2 en la fase aguda y que 1 mg/ml era una concentración apropiada para inducir una respuesta inmune dominante Th2.

Los hallazgos histopatológicos de nuestro estudio muestran la infiltración por células inmunitarias (linfocitos, eosinófilos y neutrófilos) en todos los grupos analizados. Especialmente se observó un incremento significativo en el número de infiltrados de eosinófilos y de linfocitos en el grupo tratado con ovoalbúmina (**Figura 2B**). La infiltración de células inflamatorias en las lesiones cutáneas por DA se caracteriza típicamente por la presencia de varias subpoblaciones de células T y células linfoides innatas tipo 2 (41). Nakatani et al. reportaron una elevada incidencia de infiltración de células CCR4+-CD4+-T en pacientes con DA crónica en comparación con los pacientes con psoriasis (42). Adicionalmente, Murra et al. publicaron que la administración de un antagonista de CCR4 en un modelo de DAC produjo la supresión efectiva de los síntomas clínicos asociados con DAC (43).

Nuestra investigación reveló una consistente correlación entre el aumento de la infiltración de eosinófilos y la inflamación cutánea linfocítica (inflamación perivascular) de células inmunes en la DA inducida por la ovoalbúmina, niveles elevados de expresión del ARNm CCL17 y una mayor presencia de citoquinas Th2 de respuesta dominante.

La DA se caracteriza principalmente por el predominio de la respuesta inmune Th2, lo que lleva a la sobrerregulación de las citoquinas, como IL-4, IL-5 e IL-13 (44-46). La aplicación tópica de ovoalbú-





mina en modelos de ratón da como resultado la sobrerregulación de las quimioquinas relacionadas con Th2, como CCL17 y CCL22, promoviendo la infiltración de células Th2 e intensificando la respuesta inflamatoria alérgica (47). La evaluación de los tejidos plasmáticos y cutáneos del grupo tratado con ovoalbúmina reveló una elevación significativa en los niveles de proteína IL-4 y de ARNm, así como en los niveles de ARNm IL-13. Curiosamente, nuestros hallazgos revelaron que los niveles de expresión eran notablemente altos en el grupo de dosis bajas.

La citoquina inflamatoria IL-31 es producida por la célula Th2 y participa directamente en la activación de las neuronas sensoriales y en la activación del prurito cutáneo (48, 49). En los individuos con DA, hubo un aumento notable en los niveles de IL-31 en comparación con los individuos sanos. Además, la inyección de IL-31 en perros indujo prurito (50). Nuestros hallazgos revelaron un aumento sustancial en los niveles de expresión de la proteína IL-31 y el ARNm en el grupo tratado con ovoalbúmina. Por lo tanto, determinamos la concentración óptima de ovoalbúmina necesaria para inducir la atopia. También observamos que los síntomas de la DA inducida con la concentración óptima de ovoalbúmina se parecían mucho a los síntomas clínicos observados en pacientes con DA, y este hallazgo valida la relevancia e importancia de nuestro modelo para realizar estudios sobre DA.

Este estudio tiene tres limitaciones principales. La primera limitación es que todos los grupos comprenden dos perros, lo que puede introducir un sesgo que podría afectar el análisis estadístico. Sin embargo, esta limitación se resolvió con cuatro biopsias de la región dorsal tratada con ovalbumina tomadas de cada perro y estimadas con al menos tres réplicas del análisis. En segundo lugar, CADESI-04, una escala de evaluación clínica para atopia canina, no era aplicable a nuestro estudio. Nuestro modelo de DAC, con ovoalbúmina aplicada localmente a la espalda en lugar de DA sensibilizada sistémicamente, es un modelo para estudios en los que se observa una respuesta inmune Th2-dominante en la espalda con manifestaciones clínicas similares a la dermatitis atópica. Sin embargo, el dorso no es un sitio común de dermatitis atópica y, por lo tanto, no se incluye en la métrica CADESI-04. Necesitábamos una métrica para evaluar los síntomas clínicos y aplicamos el DDISS, que utilizamos en nuestro estudio previo del modelo de DA en minicerdos (29). La gráfica que presentamos puntúa las manifestaciones clínicas atópicas de eritema y edema. En nuestro estudio, la formación de escaras se calificó como 0 para todos los animales. En el futuro, aplicaremos indicadores que puedan reflejar las manifestaciones clínicas de la dermatitis atópica (eritema, edema, excoriación, alopecia) como una puntuación de respuesta cutánea modificada o una puntuación CADESI modificada, donde se evalúa el tipo de lesión y la gravedad de la piel relevantes para este modelo. Una tercera limitación es que el prurito, en este modelo, se basó en la observación visual casual por parte del veterinario. Aunque hay escalas disponibles para determinar el prurito clínico, están diseñadas para dueños de perros (51). El prurito es un síntoma esporádico y no pudimos controlarlo en nuestro estudio. Por lo tanto, las escalas de prurito deberían desarrollarse más para futuros investigadores.

Cuando la piel canina fue tratada con una concentración óptima de ovoalbúmina, observamos cambios clínicos, histopatológicos y no clínicos que se parecían a los observados de manera natural en la DAC. Además, observamos una respuesta inmune mejorada relacionada con Th2. En resumen, establecimos un modelo animal que puede usarse para la investigación básica de la respuesta dominante Th2 en el ámbito de la DAC, lo que proporciona un medio para una evaluación precisa de la seguridad de nuevos fármacos para el tratamiento de la DAC.

Otra información

Declaración de disponibilidad de datos

Las contribuciones originales presentadas en el estudio se incluyen en el artículo/material complementario; más consultas pueden dirigirse al autor correspondiente.

Declaración de Ética

El estudio con animales fue revisado y aprobado. Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las pautas del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Huvet (número de aprobación IACUC: HV 2022-011).

Contribuciones de autor

H-YS: Análisis formal, Metodología, Visualización, Escritura – borrador original, Escritura – revisión y edición. HJ: Metodología, Investigación. H-JT: Metodología, Validación, Redacción – revisión y edición. H-GO: Supervisión, Redacción – borrador original. JH: Conceptualización, Adquisición de financiación, Supervisión, Recursos, Redacción – revisión y edición.

Fondos

El autor(es) declara haber recibido apoyo financiero para la investigación, autoría y/o publicación de este artículo. Este trabajo fue apoyado por la subvención del Consejo Nacional de Investigación de Ciencia y Tecnología (NST) del gobierno de Corea (MSIT) (número de subvención: CRC21022).

Conflicto de intereses

H-GO fue empleado por la División de I+D de HUVET Co., Ltd.

El resto de autores declaran que la investigación se realizó en ausencia de relaciones comerciales o financieras que pudieran interpretarse como un potencial conflicto de intereses.

Nota del editor

Todas las afirmaciones expresadas en este artículo son exclusivas de los autores y no necesariamente representan las de sus organizaciones afiliadas, ni las del editor, los redactores y los revisores. El editor no garantiza ni respalda ningún producto que pueda evaluarse en este artículo, ni ninguna afirmación que pueda hacer su fabricante.





Referencias

1. Hensel, P , Santoro, D , Favrot, C , Hill, P , and Griffin, C . Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Vet Res.* (2015) 11:196. doi: 10. 1186/s12917-015-0515-5
2. Murrison, LB , Brandt, EB , Myers, JB , and Hershey, GKK . Environmental exposures and mechanisms in allergy and asthma development. *J Clin Invest.* (2019) 129:1504–15. doi: 10. 1172/JCI124612
3. Ruzicka, T , Hanifin, JM , Furue, M , Pulka, G , Mlynarczyk, I , Wollenberg, A, et al. Anti-Interleukin-31 receptor antibody for atopic dermatitis. *N Engl J Med.* (2017) 376:826–35. doi: 10. 1056/NEJMoa1606490
4. Arcique, MA , and Bajwa, J . Atopic dermatitis in humans and dogs. *Can Vet J.* (2020) 61:82–4.
5. Beck, LA , Thaci, D , Hamilton, JD , Graham, NM , Bieber, T , Rocklin, R, et al. Dupilumab treatment in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis. *N Engl J Med.* (2014) 371:130–9. doi: 10. 1056/NEJMoa1314768
6. Guttman-Yassky, E , Bissonnette, R , Ungar, B , Suarez-Farinas, M , Ardeleanu, M , Esaki, H, et al. Dupilumab progressively improves systemic and cutaneous abnormalities in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* (2019) 143:155–72. doi: 10. 1016/j. jaci. 2018. 08. 022
7. Pearson, J , Leon, R , Starr, H , Kim, SJ , Fogle, JE , and Banovic, F . Establishment of an intradermal canine IL-31-induced pruritus model to evaluate therapeutic candidates in atopic dermatitis. *Vet Sci.* (2023) 10:329. doi: 10. 3390/vetsci10050329
8. Fleck, TJ , Norris, LR , Mahabir, S , Walters, RR , Martinon, O , Dunham, SA, et al. Onset and duration of action of lokivetmab in a canine model of IL-31 induced pruritus. *Vet Dermatol.* (2021) 32:681–e182. doi: 10. 1111/vde. 12943
9. Bruet, V , Mosca, M , Briand, A , Bourdeau, P , Pin, D , Cochet-Faivre, N, et al. Clinical guidelines for the use of antipruritic drugs in the control of the Most frequent pruritic skin diseases in dogs. *Vet Sci.* (2022) 9:149. doi: 10. 3390/vetsci9040149
10. Nuttall, T , Reece, D , and Roberts, E . Life-long diseases need life-long treatment: long-term safety of ciclosporin in canine atopic dermatitis. *Vet Rec.* (2014) 174:3–12. doi: 10. 1136/vr. 102471
11. Nuttall, TJ , Knight, PA , McAleese, SM , Lamb, JR , and Hill, PB . T-helper 1, T-helper 2 and immunosuppressive cytokines in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol.* (2002) 87:379–84. doi: 10. 1016/S0165-2427(02)00076-4
12. Saeki, H , and Tamaki, K . Thymus and activation regulated chemokine (TARC)/CCL17 and skin diseases. *J Dermatol Sci.* (2006) 43:75–84. doi: 10. 1016/j. jdermsci. 2006. 06. 002
13. Seibert, K , Masferrer, J , Zhang, Y , Gregory, S , Olson, G , Hauser, S, et al. Mediation of inflammation by cyclooxygenase-2. *Agents Actions Suppl.* (1995) 46:41–50.
14. Lee, JL , Mukhtar, H , Bickers, DR , Kopelovich, L , and Athar, M . Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications. *Toxicol Appl Pharmacol.* (2003) 192:294–306. doi: 10. 1016/S0041-008X(03)00301-6
15. Laouini, D , Elkhal, A , Yalcindag, A , Kawamoto, S , Oettgen, H , and Geha, RS . COX-2 inhibition enhances the TH2 immune response to epicutaneous sensitization. *J Allergy Clin Immunol.* (2005) 116:390–6. doi: 10. 1016/j. jaci. 2005. 03. 042
16. Van Brussel, L , Moyaert, H , Escalada, M , Mahabir, SP , and Stegemann, MR. A masked, randomised clinical trial evaluating the efficacy and safety of lokivetmab compared to saline control in client-owned dogs with allergic dermatitis. *Vet Dermatol.* (2021) 32:477–e131. doi: 10. 1111/vde. 12984
17. Kim, SW , and Kim, JH . Establishing an experimental model for canine atopic dermatitis through epicutaneous application of *Dermatophagoides farinae*. *Front Vet Sci.* (2022) 9:1015915. doi: 10. 3389/fvets. 2022. 1015915

18. Simpson, A , Maeda, S , and Marsella, R . Temporal dynamic changes of phenotypic expression of peripheral CD4 cells during environmental allergen challenge in an experimental model of canine atopic dermatitis: a pilot study. *J Vet Med Sci.* (2009) 71:1177–81. doi: 10. 1292/jvms. 71. 1177
19. Marsella, R , Nicklin, C , and Lopez, J . Studies on the role of routes of allergen exposure in high IgE-producing beagle dogs sensitized to house dust mites. *Vet Dermatol.* (2006) 17:306–12. doi: 10. 1111/j. 1365-3164. 2006. 00541. x
20. Pucheu-Haston, CM , Jackson, HA , Olivry, T , Dunston, SM , and Hammerberg, B . Epicutaneous sensitization with *Dermatophagoides farinae* induces generalized allergic dermatitis and elevated mite-specific immunoglobulin E levels in a canine model of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy.* (2008) 38:667–79. doi: 10. 1111/j. 1365-2222. 2008. 02949. x
21. Draize, JH . Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J Pharmacol Exp Ther.* (1944) 82:377–90.
22. Jang, M , Kim, H , Kim, Y , Choi, J , Jeon, J , Hwang, Y, et al. The crucial role of IL-22 and its receptor in thymus and activation regulated chemokine production and T-cell migration by house dust mite extract. *Exp Dermatol.* (2016) 25:598–603. doi: 10. 1111/exd. 12988
23. Leung, DY , and Bieber, T . Atopic dermatitis. *Lancet.* (2003) 361:151–60. doi: 10. 1016/S0140-6736(03)12193-9
24. Gedon, NKY , and Mueller, RS . Atopic dermatitis in cats and dogs: a difficult disease for animals and owners. *Clin Transl Allergy.* (2018) 8:41. doi: 10. 1186/s13601-018-0228-5
25. Marsella, R , Olivry, T , Nicklin, C , and Lopez, J . Pilot investigation of a model for canine atopic dermatitis: environmental house dust mite challenge of high-IgE-producing beagles, mite hypersensitive dogs with atopic dermatitis and normal dogs. *Vet Dermatol.* (2006) 17:24–35. doi: 10. 1111/j. 1365-3164. 2005. 00496. x
26. Hayashida, S , Uchi, H , Moroi, Y , and Furue, M . Decrease in circulating Th17 cells correlates with increased levels of CCL17, IgE and eosinophils in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* (2011) 61:180–6. doi: 10. 1016/j. jdermsci. 2010. 10. 013
27. Nakajima, S , Nomura, T , Common, J , and Kabashima, K . Insights into atopic dermatitis gained from genetically defined mouse models. *J Allergy Clin Immunol.* (2019) 143:13–25. doi: 10. 1016/j. jaci. 2018. 11. 014
28. Alosaimi, NS , Sattar Ahmad, MAA , Alkreathy, HM , Ali, AS , and Khan, LM . Pharmacological basis of the putative therapeutic effect of topical vitamin D3 on the experimental model of atopic dermatitis in mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* (2022) 26:6827–36. doi: 10. 26355/eurrev_202209_29785
29. Kim, YK , Lee, JY , Hwang, JH , and Suh, HN . A pilot study to establish an ovalbumin-induced atopic dermatitis Minipig model. *J Vet Res.* (2021) 65:307–13. doi: 10. 2478/jvetres-2021-0045
30. Olivry, T , and Baumer, W . Atopic itch in dogs: pharmacology and modeling. *Handb Exp Pharmacol.* (2015) 226:357–69. doi: 10. 1007/978-3-662-44605-8_19
31. Marsella, R , and Olivry, T . Animal models of atopic dermatitis. *Clin Dermatol.* (2003) 21:122–33. doi: 10. 1016/S0738-081X(02)00369-3
32. Kalinski, P , Hilkens, CM , Snijders, A , Snijdwint, FG , and Kapsenberg, ML . IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J Immunol.* (1997) 159:28–35. doi: 10. 4049/jimmunol. 159. 1. 28
33. Li, H , Edin, ML , Gruzdev, A , Cheng, J , Bradbury, JA , Graves, JP, et al. Regulation of T helper cell subsets by cyclooxygenases and their metabolites. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* (2013) 104-105:74–83. doi: 10. 1016/j. prostaglandins. 2012. 11. 002
34. Welss, T , Basketter, DA , and Schroder, KR . In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol In Vitro.* (2004) 18:231–43. doi: 10. 1016/j. tiv. 2003. 09. 009
35. Honzke, S , Wallmeyer, L , Ostrowski, A , Radbruch, M , Mundhenk, L , Schafer-Korting, M, et al. Influence of Th2 cytokines on the Cornified envelope, tight junction proteins, and ss-Defensins in Filaggrin-deficient skin equivalents. *J Invest Dermatol.* (2016) 136:631–9. doi: 10. 1016/j. jid. 2015. 11. 007





36. Howell, MD , Fairchild, HR , Kim, BE , Bin, L , Boguniewicz, M , Redzic, JS, et al. Th2 cytokines act on S100/A11 to downregulate keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol.* (2008) 128:2248–58. doi: 10. 1038/jid. 2008. 74
37. Combarros, D , Cadiergues, MC , and Simon, M . Update on canine filaggrin: a review. *Vet Q.* (2020) 40:162–8. doi: 10. 1080/01652176. 2020. 1758357
38. O'Regan, GM , Sandilands, A , McLean, WHI , and Irvine, AD . Filaggrin in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* (2008) 122:689–93. doi: 10. 1016/j. jaci. 2008. 08. 002
39. Santoro, D , Marsella, R , Ahrens, K , Graves, TK , and Bunick, D . Altered mRNA and protein expression of filaggrin in the skin of a canine animal model for atopic dermatitis. *Vet Dermatol.* (2013) 24:329–36, e73, e73. doi: 10. 1111/vde. 12031
40. Kakinuma, T , Nakamura, K , Wakugawa, M , Mitsui, H , Tada, Y , Saeki, H, et al. Thymus and activation-regulated chemokine in atopic dermatitis: serum thymus and activation-regulated chemokine level is closely related with disease activity. *J Allergy Clin Immunol.* (2001) 107:535–41. doi: 10. 1067/mai. 2001. 113237
41. Kader, HA , Azeem, M , Jwayed, SA , Al-Shehhi, A , Tabassum, A , Ayoub, MA, et al. Current insights into immunology and novel therapeutics of atopic dermatitis. *Cell.* (2021) 10:1392. doi: 10. 3390/cells10061392
42. Nakatani, T , Kaburagi, Y , Shimada, Y , Inaoki, M , Takehara, K , Mukaida, N, et al. CCR4 memory CD4+ T lymphocytes are increased in peripheral blood and lesional skin from patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* (2001) 107:353–8. doi: 10. 1067/mai. 2001. 112601
43. Murray, C , Ahrens, K , Devalaraja, M , Dymond, M , Fagura, M , Hargreaves, A, et al. Use of a canine model of atopic dermatitis to investigate the efficacy of a CCR4 antagonist in allergen-induced skin inflammation in a randomized study. *J Invest Dermatol.* (2016) 136:665–71. doi: 10. 1016/j. jid. 2015. 11. 001
44. Gittler, JK , Shemer, A , Suarez-Farinas, M , Fuentes-Duculan, J , Gulewicz, KJ , Wang, CQ, et al. Progressive activation of T (H)2/T (H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* (2012) 130:1344–54. doi: 10. 1016/j. jaci. 2012. 07. 012
45. Tsoi, LC , Rodriguez, E , Stolz, D , Wehkamp, U , Sun, J , Gerdes, S, et al. Progression of acute-to-chronic atopic dermatitis is associated with quantitative rather than qualitative changes in cytokine responses. *J Allergy Clin Immunol.* (2020) 145:1406–15. doi: 10. 1016/j. jaci. 2019. 11. 047
46. Langan, SM , Irvine, AD , and Weidinger, S . Atopic dermatitis. *Lancet.* (2020) 396:345–60. doi: 10. 1016/S0140-6736(20)31286-1
47. Matsuo, K , Hatanaka, S , Kimura, Y , Hara, Y , Nishiwaki, K , Quan, YS, et al. A CCR4 antagonist ameliorates atopic dermatitis-like skin lesions induced by dibutyl phthalate and a hydrogel patch containing ovalbumin. *Biomed Pharmacother.* (2019) 109:1437–44. doi: 10. 1016/j. biopha. 2018. 10. 194
48. Cevikbas, F , Wang, X , Akiyama, T , Kempkes, C , Savinko, T , Antal, A, et al. A sensory neuron-expressed IL-31 receptor mediates T helper cell-dependent itch: involvement of TRPV1 and TRPA1. *J Allergy Clin Immunol.* (2014) 133:448–460. e7. doi: 10. 1016/j. jaci. 2013. 10. 048
49. Oetjen, LK , Mack, MR , Feng, J , Whelan, TM , Niu, H , Guo, CJ, et al. Sensory neurons co-opt classical immune Signaling pathways to mediate chronic itch. *Cell.* (2017) 171:217–228. e13. doi: 10. 1016/j. cell. 2017. 08. 006
50. Gonzales, AJ , Fleck, TJ , Humphrey, WR , Galvan, BA , Aleo, MM , Mahabir, SP, et al. IL-31-induced pruritus in dogs: a novel experimental model to evaluate anti-pruritic effects of canine therapeutics. *Vet Dermatol.* (2016) 27:34–e10. doi: 10. 1111/vde. 12280
51. Young, AJ , Torres, SMF , Koch, SN , Eisenschenk, MNC , and Rendahl, AK . Canine pruritus visual Analog scale: how does it capture owners' perception of their pet's itching level? *Vet Dermatol.* (2019) 30:377–e111. doi: 10. 1111/vde. 12761