

Un modelo para la mejora de la función cutánea en el perro

Piel artificial canina

Clásicamente la investigación en dermatología veterinaria se ha centrado en estudios *in vivo*. Estos estudios, a pesar de que aportan mucha información, requieren de experimentación animal con todas las limitaciones éticas que ello implica. Por esta razón, los modelos celulares se consideran una buena alternativa para la investigación en dermatología, cuando el bienestar de los animales implicados es una prioridad. Por ello Affinity Petcare y Univet han unido sus esfuerzos para desarrollar un modelo de piel artificial canina.

Affinity Petcare, empresa puntera en el sector de la alimentación de animales de compañía en España y tercer fabricante de alimento seco en el ámbito europeo, en su firme compromiso de mejorar la salud y el bienestar de los animales de compañía ha puesto en marcha un programa de investigación en dermatología con el fin de definir los nutrientes capaces de mejorar el estado de la piel desde el interior.

Affinity ha confiado en los científicos de Univet, primer laboratorio español dedicado exclusivamente al diagnóstico y tratamiento de las enfermedades de la piel en los animales de compañía, el desarrollo de un modelo de piel artificial canina, que permita cumplir con los objetivos descritos previamente.

Los investigadores que integran el Departamento de I+D de Univet cuentan con una experiencia de más de 15 años en investigación básica en alergia e inflamación, gracias a la cual han desarrollado modelos experimentales celulares y funcionales para dar soporte a las necesidades de compañías biotecnológicas, farmacéuticas y veterinarias nacionales y extranjeras.

Los resultados de este ambicioso proyecto de Affinity desarrollado en Univet, se han publicado recientemente en la revista internacional *Experimental Dermatology* (Serra M., Brazis P., Puigdemont A., Fondevila D., Romano V., Torre C., Ferrer L. Development and characterization of a canine skin equivalent. *Exp Dermatol*, 2007; 16: 135-142). Donde se define el modelo que se resume a continuación.

Objetivo del estudio

El objetivo de este proyecto fue de desarrollar un modelo de piel artificial canina.

Este complejo modelo celular debía incorporar los componentes básicos de la piel canina, para permitir investigar la biología y patología de la piel de esta especie con la máxima fiabilidad.

Hasta la fecha sólo se han descrito dos modelos de piel artificial canina, que han sido desarrollados para caracterizar enfermedades muy concretas (el defecto de queratinización recesiva del Norfolk Terrier, y la epidermolisis bullosa distrófica), pero en ninguno de estos dos estudios se ha evaluado la similitud de la piel artificial utilizada con la piel normal canina. Por ello, nuestro objetivo fue desarrollar un modelo de piel artificial que fuera lo más similar posible, desde un punto de vista morfológico y fisiológico, a la piel normal canina.

El objetivo fue desarrollar un modelo de piel artificial que fuera lo más similar posible, desde un punto de vista morfológico y fisiológico, a la piel normal canina.

El desarrollo del modelo

La estructura básica de la piel (*figura 1*) consiste en una capa externa, la epidermis, y una interna, la dermis, separadas por una membrana, conocida como membrana basal, que se compone de proteínas y lípidos, y que es una de las estructuras más importantes para preservar la pérdida de agua y mantener la homeostasis epidérmica, así como sustentar firmemente la epidermis a la dermis.

La epidermis junto con la membrana basal forman la barrera epidérmica, que gracias a su composición lipídica, actúa de importante frente selectivo, limitando

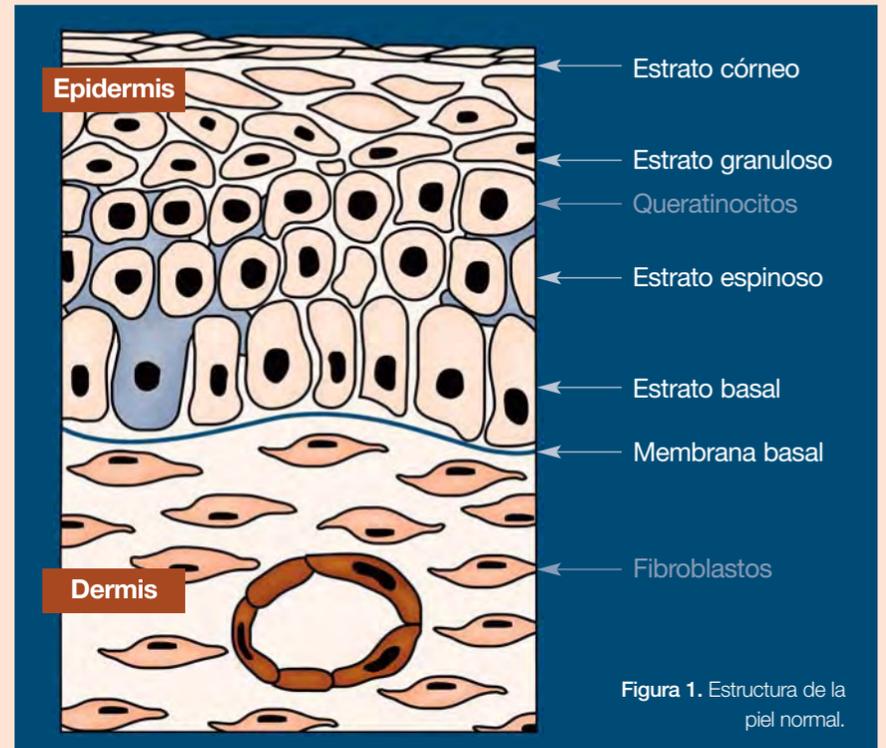


Figura 1. Estructura de la piel normal.

la penetración de sustancias extrañas y/o patógenos, y manteniendo el estado óptimo de hidratación de la piel.

Para el desarrollo del modelo, se aislaron, mediante técnicas de digestión enzimática, queratinocitos epidérmicos (*figura 2*) y fibroblastos dérmicos (*figura 3*) de muestras de biopsias cutáneas frescas obtenidas de cirugías de rutina (castraciones, ovariectomías, etc.), practicadas a perros sin patologías cutáneas conocidas.

Creación de la dermis artificial

A partir de proteínas sintéticas, se obtuvo una matriz de colágeno, como base para cultivar en ella las células. Los fibroblastos aislados se añadieron a la matriz de colágeno, formando el equivalente

dérmico del modelo. Esta "dermis artificial" constituye el sustrato que dará soporte físico a la "epidermis artificial" y difundirá los nutrientes necesarios para la proliferación y diferenciación de los queratinocitos hacia una epidermis estratificada.

Desarrollo del compartimento epidérmico

Los queratinocitos aislados de piel fresca, fueron mantenidos en presencia de vitaminas y factores de crecimiento, y se añadieron a la superficie de la dermis artificial. Para su cultivo, fueron mantenidos expuestos al aire simulando las condiciones fisiológicas (*figura 6*).

Una vez constituido el modelo con un compartimento dérmico y un compartimento epidérmico, la piel artificial fue mantenida en cultivo durante 4, 7, 14 y 21 días, para ir estudiando su maduración y su estructura.

Para ello, las muestras de piel artificial fueron embebidas en formol y procesadas de la misma forma que una biopsia cutánea normal, para ser analizadas mediante técnicas histológicas, inmunohistoquímicas y de microscopía electrónica.

Resultados obtenidos

El modelo de piel artificial, se analizó semanalmente para observar la evolución y la maduración de su estructura histológica (*figura 4*).

- **Fase inicial:** a los 4 días de cultivo las células proliferaban, pero se veían muy desorganizadas todavía, sin una evidencia clara de epidermis estructurada en multicapa. Sin embargo, a los 7 días de cultivo ya se observó el inicio de la estratificación característica de la epidermis.

- **Organización celular:** a los 15 días de cultivo, los queratinocitos ya se diferenciaban en una epidermis con los estratos basal, espinoso, granuloso y córneo bien definidos.

- **Maduración:** no fue hasta los 21 días de cultivo, cuando se obtuvo una piel artificial muy similar en estructura a la piel canina normal, con una capa de queratina muy compacta en la superficie, característica del estrato córneo.

Mediante técnicas de inmunohistoquímica, se observó la expresión de proteínas específicas de diferenciación de los queratinocitos epidérmicos (queratina 10) y de los fibroblastos dérmicos (vimentina). ▶

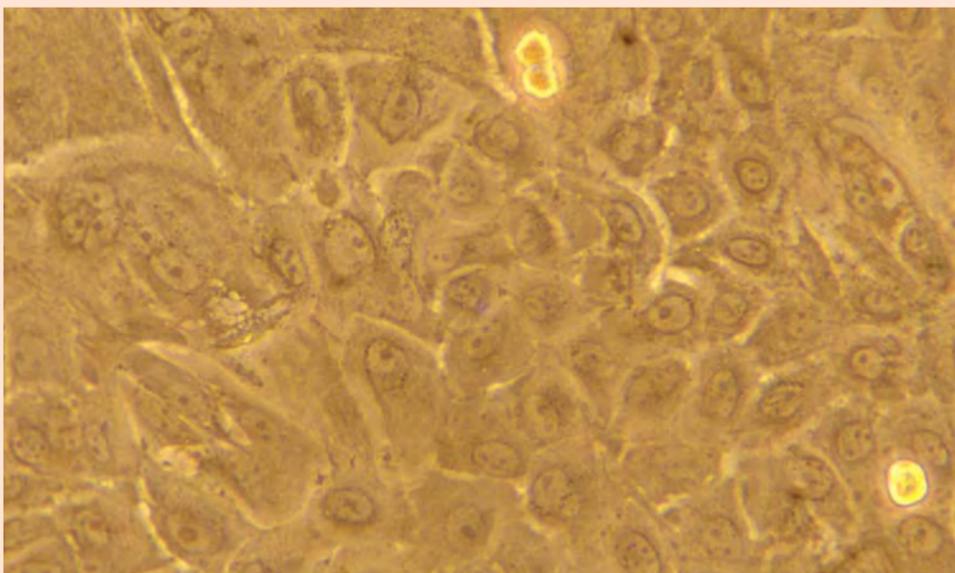


Figura 2. Queratinocitos caninos a los nueve días de cultivo (400x).

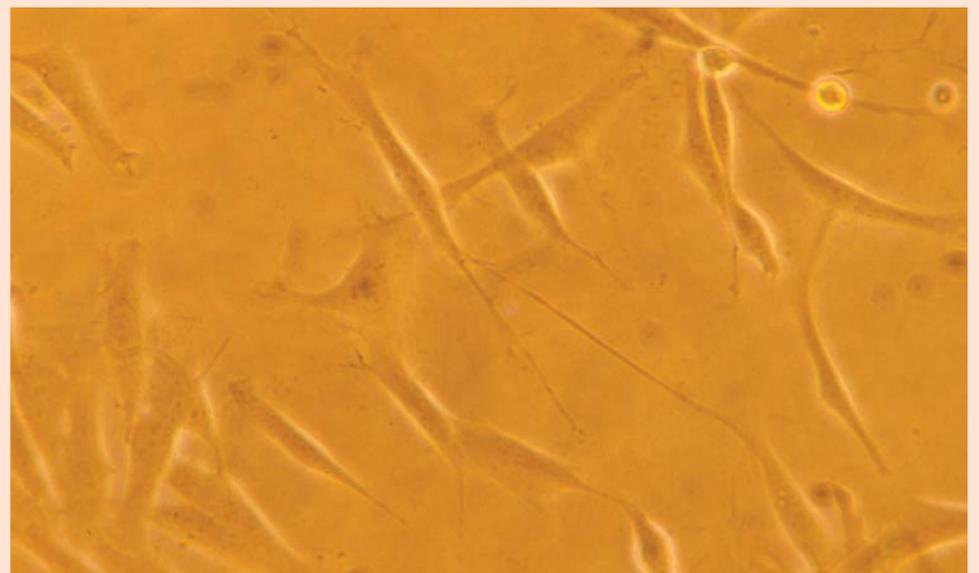


Figura 3. Fibroblastos caninos a los 3 días de cultivo (400x).

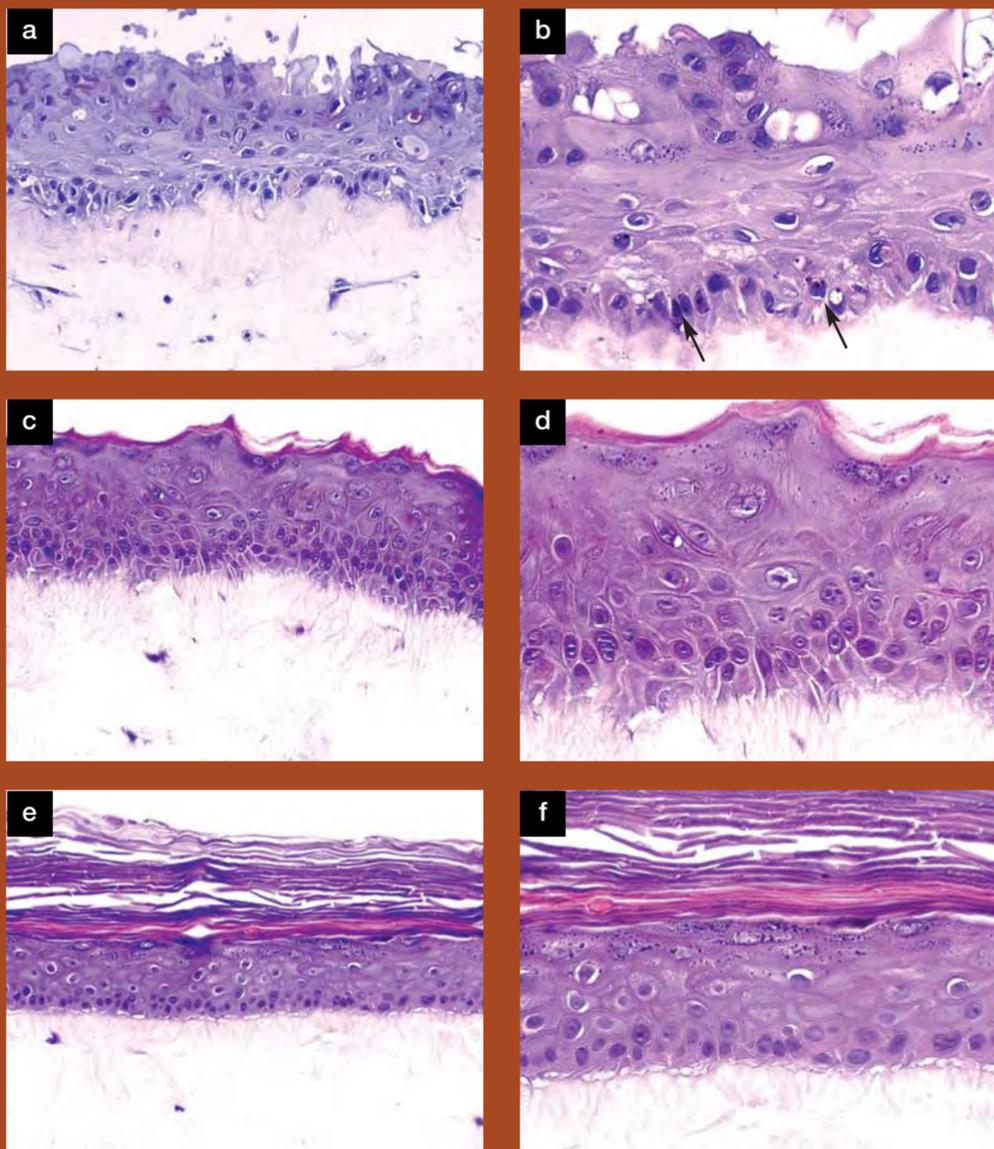


Figura 4. Análisis morfológico de muestras de piel artificial canina a diferentes tiempos de cultivo: (a, b) día 4 de cultivo, se observa melanina; (b, flechas) entre los queratinocitos basales; (c, d) día 7 de cultivo; (e, f) día 14 de cultivo. (a, c, e) 200x, regla de escala: 50 mm; (b, d, f) 400x, regla de escala: 25 mm.

► Estas proteínas seguían el mismo patrón de expresión que en la piel canina normal.

Mediante microscopía electrónica, se detectó la formación de la membrana basal madura, que separaba la dermis de la epidermis, similar a la de la piel normal canina. Mediante técnicas inmunohistoquímicas se analizó la composición de esta membrana, y se detectaron dos proteínas características de la membrana basal madura de la piel (colágeno IV y laminina 5) (figura 5).

En resumen, todas las características del modelo de piel artificial, confirmaban su similitud con la piel canina normal.

¿Cuál es la aplicación del modelo de piel artificial canina?

La utilización de este modelo permite estudiar los efectos sobre la estructura cutánea de los nutrientes, fármacos o aditivos que llegan a la piel, no sólo por vía tópica sino por vía sistémica.

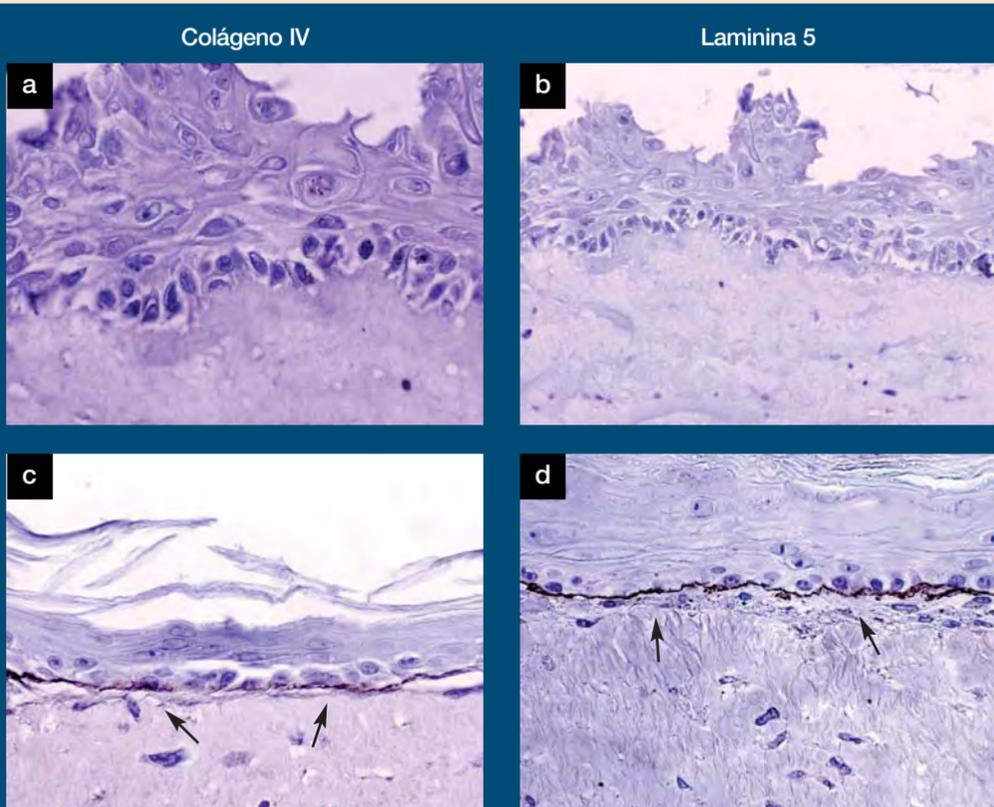


Figura 5. Análisis inmunohistoquímico de los componentes de membrana basal: expresión de colágeno tipo IV y laminina 5. (a, b) día 4 de cultivo: no hay expresión de ninguna de las dos proteínas; (c, d) día 14 de cultivo: ambas proteínas se localizan en la unión dermo-epidérmica (flechas); (a, c, d) 400x, regla de escala: 25 mm; (b) 200x, regla de escala: 50 mm.

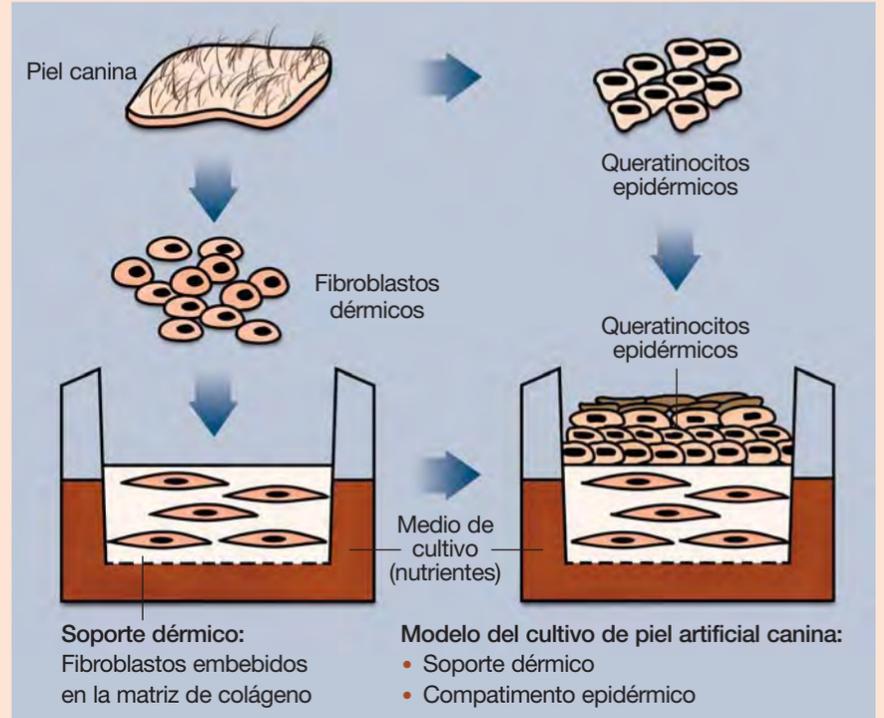


Figura 6. Esquema de la metodología para la obtención de un modelo de piel artificial canina.

El refuerzo de la barrera epidérmica

El estrato córneo, la parte más externa de la epidermis, actúa como “barrera” semipermeable que controla el movimiento del agua a través de la piel y evita la deshidratación del organismo, permitiendo la vida a los animales terrestres. El estrato córneo está formado por corneocitos embebidos en una matriz de lípidos, cuya composición es marcadamente diferente del contenido lipídico de la grasa corporal. Estos lípidos, mayoritariamente ceramidas, son sintetizados por células de la epidermis, y son excretados hacia el estrato córneo.

En ciertas enfermedades como la dermatitis atópica, se han observado defectos en el metabolismo lipídico o en los componentes proteicos del estrato córneo que alteran sustancialmente la función “barrera” de la epidermis, provocando diferentes alteraciones en la piel.

En la defensa frente a infecciones

Tan importante como las anteriores es la función de la piel como barrera a las agresiones biológicas o tóxicas.

La pioderma es una de las infecciones más comunes en la práctica veterinaria y en la mayoría de los casos se aísla *Staphylococcus intermedius* como agente causante. Para la colonización bacteriana del epitelio es necesaria la adherencia del organismo causal a las células exteriores del mismo. Esta adherencia o fijación depende de la interacción molecular entre adhesinas de la superficie de la bacteria y los receptores moleculares de las células de la superficie de la piel. El modelo de piel canina desarrollado hace posible el estudio de los mecanismos moleculares responsables de esta adhesión y colonización bacteriana, así como la posible prevención y terapéutica de estas infecciones.

La utilización de este modelo permite estudiar los efectos sobre la estructura cutánea de los nutrientes, fármacos o aditivos que llegan a la piel, no sólo por vía tópica sino por vía sistémica.

El modelo de piel artificial canina llevado a cabo permite variar las condiciones del medio nutritivo en que se desarrolla la piel, mimetizando la situación *in vivo* en la que los nutrientes aportados por vía oral llegarán a la piel por vía sanguínea. Así el modelo permite el estudio de la administración de determinados lípidos, péptidos activos y sustancias moduladoras que demuestren su capacidad de modificar y beneficiar la función básica de la piel como “barrera” física.

En el estudio de la cicatrización

La piel como el mayor órgano del cuerpo y limitante con el exterior, está sujeta a constantes agresiones que pueden provocar la pérdida de su integridad. Por tanto los mecanismos de reparación forman parte de la funcionalidad de la piel.

La reparación de la piel o cicatrización de las heridas depende principalmente de dos mecanismos celulares: por un lado la migración y proliferación de los queratinocitos próximos a la herida (proceso de epitelización) y por otro la contracción del tejido conectivo base (fibroblastos) de la herida que permite acercar los bordes y cerrar la herida. El modelo de piel *in vitro* se presenta como una herramienta muy útil para el conocimiento de los mecanismos de cicatrización y la optimización de la misma a través de la modificación del entorno nutritivo de la piel dañada.

Conclusión

Podemos concluir que el modelo de piel sintética canina desarrollado permite variar las condiciones del medio nutritivo en que la piel se desarrolla, mimetizando el aporte de nutrientes que, por vía oral, llegan a la piel vía sanguínea en un organismo vivo. Así, permite el estudio del aporte de determinados lípidos, biopéptidos activos, aminoácidos, vitaminas y otras sustancias que son capaces de modificar y beneficiar a las funciones básicas de la piel como la barrera física, la adhesión bacteriana, la respuesta inflamatoria e inmunológica, así como su capacidad de regeneración tras una herida.

Por ello, tras la caracterización de este modelo de piel artificial canina, actualmente los técnicos del departamento de investigación de Affinity, siguen trabajando junto con los técnicos de Univet, en la aplicación del modelo para definir los nutrientes capaces de mejorar la funcionalidad de la piel. □

Montse Serra Muxi¹, Celina Torre²

¹ Departamento de I+D
Univet Servicio de Diagnóstico Veterinario S.L.

² Departamento I+D
Affinity Petcare S.A.

Imágenes cedidas por las autoras