

## RESEÑA ANALÍTICA

# Modelos experimentales de anafilaxia

**Yazmín Ravelo Calzado, Vivian Molina Cuevas, María de Lourdes Arruzazabala Valmaña y Daisy Carbajal Quintana.**

Dpto. Farmacología, Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Calle 198 entre avenidas 19 y 21, Reparto Atabey, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: cpn@cnic.edu.cu

Recibido: 23 de julio de 2008. Aceptado: 6 de octubre de 2008.

Palabras clave: anafilaxia, modelos experimentales, antígeno, mediadores inflamatorios.  
Key words: anaphylaxis, experimental models, antigen, inflammatory mediators.

**RESUMEN.** Los modelos experimentales constituyen una herramienta clave en la búsqueda de nuevas opciones para el tratamiento y profilaxis de diversas condiciones patológicas. La anafilaxia, síndrome clínico con manifestaciones multisistémicas como urticaria, asma, vasodilatación sistémica, hipotensión y shock, entre otras, no resulta una excepción. El objetivo del presente trabajo consistió en presentar algunos de los modelos experimentales utilizados en la evaluación de sustancias con potenciales efectos antianafilácticos, específicamente aquellos en los que la anafilaxia se produce como consecuencia de un mecanismo inmunológico mediado por inmunoglobulina E (IgE), que da lugar a la liberación de mediadores inflamatorios (histamina, prostaglandinas, leucotrienos, factor de activación plaquetario, tromboxano  $A_2$ ) a partir de mastocitos y basófilos. Para ello, se resumen diferentes modelos de anafilaxia experimentales *in vivo* e *in vitro*, y se agrupan según el método de inducción de anafilaxia, mostrando así, mecanismos moleculares comunes, pero también especificidades distintivas en cuanto a la especie utilizada, el tipo de antígeno que desencadena la reacción y su tipo (sistémica o local), entre otros aspectos. Se enfatiza la importancia de la adecuada selección de modelos experimentales que garanticen la mayor reproducibilidad y fiabilidad de los resultados, para lo cual se precisan algunos criterios para dicha selección, teniendo en mente que ningún modelo satisface todos los criterios involucrados en la etiopatogenia de una determinada patología.

**ABSTRACT.** Experimental models are a key tool in the search of new options for the treatment and/or prophylaxis of several pathological conditions. Anaphylaxis, a clinical syndrome accompanied by multi-systemic manifestations like rash, asthma, systemic vasodilatation, hypotension and shock, among others, does not result an exception. The aim of this work was to show some of the experimental models used in the evaluation of substances with potential anti-anaphylactic effects, specifically those in which anaphylaxis results from an immunoglobulin E (IgE)-mediated mechanism that leads to the release of inflammatory mediators (histamine, prostaglandins, leukotrienes, platelet activating factor, thromboxane  $A_2$ ) from mast cells and basophils. For that, *in vivo* and *in vitro* experimental models of anaphylaxis are summarized and grouped according to the method of induction of anaphylaxis, thus sharing similar molecular mechanisms, but also differential specificities regarding the animal species, the type of antigen that triggers the anaphylactic reaction and the type of reaction (systemic or local), among other aspects. The relevance of the adequate selection of experimental models that guarantee the best reproducibility and reliability of the results is emphasized and some selection criteria are discussed taking in mind that no experimental model can satisfy all aspects involved in the pathogenesis of a specific pathology.

## INTRODUCCIÓN

Los modelos experimentales desempeñan un papel relevante dentro de las Ciencias Biomédicas en el esclarecimiento de la etiopatogenia y de las bases moleculares involucradas en cualquier patología, en el desarrollo de marcadores de diagnóstico y en la evaluación de la eficacia y seguridad de diferentes alternativas de tratamiento, incluso en terapias farmacológicas de interés potencial. En tal sentido, gran parte del conocimiento actual sobre anafilaxia, una de las formas de alteración de la inmunidad de mayor riesgo potencial para la vida humana que se asocia a reacciones de hipersensibilidad inmediata o alérgicas Tipo 1 (Clasificación de Gell y Coombs),<sup>1</sup> ha sido obtenido a partir de modelos experimentales.

La anafilaxia es un síndrome de aparición brusca y afectación plurisistémica<sup>2-4</sup> cuya incidencia global no se

conoce con toda precisión, si bien se sabe que el número de casos de anafilaxia va en aumento<sup>3</sup> y que puede llegar a afectar hasta el 20 % de la población caucásica en algún momento de su vida.<sup>5</sup> La anafilaxia constituye una reacción inflamatoria de instauración generalmente inmediata, a veces lenta, causada por la liberación masiva de mediadores inflamatorios (histamina, prostaglandinas, serotonina, factor activador de plaquetas, leucotrienos) de leucocitos basófilos y mastocitos, como consecuencia de la unión de anticuerpos tipo inmunoglobulina E (IgE) frente a determinados antígenos.<sup>6-8</sup> Tales mediadores son causantes de manifestaciones clínicas que según la vía de acceso y el grado de difusión intracorporal del alérgeno (sustancia extraña), pueden adoptar una forma localizada como la rinitis o el asma,<sup>9</sup> o generalizada como el eritema, diaforesis, palidez o cianosis, vasodilatación

sistémica, hipotensión, shock, etc.<sup>10</sup> En Cuba, una de sus manifestaciones clínicas más frecuentes es el asma bronquial, cuya prevalencia fue del 8,8 % en el año 2006.<sup>11</sup>

La unión Ag.-Ac. (antígeno y anticuerpo tipo IgE) es uno de los mecanismos fisiopatológicos más importantes que se involucran en el desarrollo de la anafilaxia, por lo cual los modelos que desarrollan las reacciones de hipersensibilidad tipo I asociadas a esta interacción han cobrado vital importancia en la evaluación preclínica de sustancias con efectos antianafilácticos.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo consistió en mostrar y comentar algunos de los modelos utilizados en la evaluación de sustancias con efectos antianafilácticos potenciales.

### **Modelos experimentales utilizados en la evaluación de fármacos con posibles efectos antianafilácticos** **Modelos *in vivo***

**Anafilaxia cutánea pasiva (ACP).** La ACP constituye el modelo experimental más comúnmente empleado para la evaluación de fármacos con posibles efectos antialérgicos. Su fundamento consiste en la reacción cutánea dependiente de inmunoglobulina E (IgE) que se produce luego de la interacción Ag.-Ac. en ratas o ratones que han sido previamente sensibilizados, ya que la piel de la rata constituye un sitio útil para el estudio de la ACP.<sup>12</sup>

Para el desarrollo de este modelo se han utilizado varias alternativas que siguen un mismo principio: preparación del antisuero (sustancia endógena rica en anticuerpos específicos contra un determinado antígeno), administración a los animales del estudio, posterior inyección del antígeno que desencadenará la reacción anafiláctica y cuantificación de dicha reacción. Cuando el antisuero es obtenido de la misma especie animal que la de los animales a utilizar durante el estudio la ACP es homóloga, si es de diferente especie se denomina ACP heteróloga. Algunos ejemplos de este modelo *in vivo* se muestran a continuación:

#### **A. Anafilaxia cutánea pasiva inducida por ovoalbúmina en ratas**

Preparación de antisuero de ovoalbúmina. Se prepara una disolución de albúmina de huevo con la composición siguiente: albúmina de huevo 0,1 % (10 mL), NaHCO<sub>3</sub> 8,4 % (4,5 mL), KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 10 % (10 mL) y disolución reguladora de fosfato salino (SRFS) pH = 7,4 (20 mL) y se administran 0,2 mL a ratones albinos suizos machos (18 a 22 g de peso) por vía intraperitoneal (ip.). Se utilizaron 20 ratones en el procedimiento. Los animales se inmunizan en dos ocasiones en un intervalo de siete días. Catorce días después de la última administración, los ratones se sacrifican y se procede a la extracción de sangre de la vena femoral, la que se centrifuga a 2 500 r/min por 10 min para obtener el antisuero.

Posteriormente, se lleva a cabo la ACP heteróloga en ratas Wistar.<sup>13-15</sup> Para ello, ratas Wistar machos (300 a 350 g de peso) se rasuran en el área dorsal y una hora después por vía intradérmica se les inyecta 0,1 mL del antisuero de albúmina de huevo obtenido de ratones diluido en cloruro de sodio 0,9 % (1 : 20) en seis sitios del lomo. Pasadas 24 h, se provoca la reacción anafiláctica mediante la administración intravenosa (iv.) de 1 mL de una disolución al 0,1 % de albúmina de huevo en el colorante azul de Evans al 1 %. Las ratas se sacrifican 1 h después de provocada la reacción de anafilaxia y se cortan las porciones de piel que contienen azul de Evans, se colocan en

tubos de ensayo con 4 mL de formamida y se incuban a 37 °C durante 48 h. Se mide la densidad óptica del colorante extravasado a una  $\lambda = 623$  nm y a partir de una curva de calibración, estos valores se expresan en microgramos de azul de Evans extravasado/sitio. El ketotifeno 3 mg/kg administrado por vía oral a las ratas es la sustancia de referencia comúnmente utilizada, cuya última administración se realiza 1 h antes de provocar la reacción.<sup>13-15</sup>

Otras alternativas utilizan para el desarrollo de la reacción una disolución de ovoalbúmina (2,5 mg/mL) y azul de Evans (10 mg/mL) a una dosis de 0,2 mL/100 g de peso. Treinta minutos después, las ratas se sacrifican y se mide el diámetro de la mancha azul bajo la piel. El título de ACP se expresa como la máxima dilución de antisuero que provoca una reacción de más de 5 mm de diámetro en la piel.<sup>16</sup>

#### **B. Anafilaxia cutánea pasiva inducida por el compuesto 48/80 en ratones**

Tras la inyección intradérmica del compuesto 48/80 (0,5 µg/20 µL suero fisiológico)<sup>17</sup> se administra una disolución de azul de Evans al 2 % por vía iv. en la vena lateral de la cola de ratones machos ICR de seis semanas de edad (25 a 30 g).<sup>18</sup> Treinta minutos después, los ratones son anestesiados y sacrificados, el tejido alrededor de la inyección es extraído, pesado e incubado en 1 mL de formamida a 55 °C durante 24 h para llevar a cabo la extravasación del colorante azul de Evans.<sup>19</sup> Una vez concluida esta etapa, se mide la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 620 nm en un espectrofotómetro. Las concentraciones de azul de Evans se cuantifican por interpolación, usando una curva patrón de concentraciones de colorante en un intervalo de 0,01 a 30 µg/mL.<sup>18</sup>

Otra forma de inducir la ACP consiste en administrar intradérmicamente el compuesto 48/80 (0,5 µg/20 µL suero fisiológico) en el lomo de ratones hembras ICR de seis a diez semanas de edad. Posteriormente, se inyectan 1,25 mg de azul de Evans por vía iv. a cada animal y transcurridos 30 min estos se sacrifican. Las muestras de piel tomadas se incuban con 0,7 mL de KOH 0,1 mol/L durante 24 h, al término de las cuales, se añaden 9,3 mL de una mezcla de ácido fosfórico 0,2 mol/L y acetona (5 : 13). El precipitado obtenido luego de una agitación vigorosa se filtra y se mide la cantidad de colorante extravasado colorimétricamente a una  $\lambda = 620$  nm.<sup>20</sup>

**Anafilaxia sistémica (AS).** La AS representa, al igual que la ACP, otro modelo de reacción alérgica aguda en la cuales los mastocitos parecen desempeñar un papel esencial.<sup>21</sup>

#### **A. Shock anafiláctico sistémico inducido por compuesto 48/80 en ratones**

Este modelo *in vivo* utiliza ratones ICR machos de seis semanas de edad<sup>22</sup> o hembras de seis a diez semanas de edad.<sup>13</sup> Para la inducción de la reacción anafiláctica a cada ratón se le inyecta el compuesto 48/80 (8 mg/kg, ip.).<sup>9</sup> Las sustancias de referencia como el cromoglicato disódico (0,01 a 1 g/kg) disueltas en disolución salina, así como la sustancia a evaluar se administran por vía ip. 30 min antes de la inyección del compuesto 48/80,<sup>13</sup> ó 24, 12 ó 1 h antes si la vía es oral.<sup>15</sup> A partir de la inducción del shock anafiláctico (inyección del compuesto 48/80) se chequea la mortalidad durante 1 h (a los 10, 20 y 60 min) la cual constituye el indicador de que la reacción sistémica ha ocurrido.<sup>7,13,15</sup>

## B. Shock anafiláctico retardado *in vivo* inducido por albúmina de huevo en cobayos

Para la evaluación del shock anafiláctico retardado, se sensibilizan cobayos albinos machos (300 a 400 g) mediante tres inyecciones ip. de disolución de albúmina de huevo al 5 % que se efectúan en el primer, tercer y quinto días del experimento, respectivamente. Pasados 21 d, se administra la sustancia a evaluar. Dos horas más tarde, los animales se preparan para la inducción de la anafilaxia. Para ello, se anestesia localmente la zona ventral del cuello con procaína 2 % (2 mL/kg) y se aísla la vena yugular, a través de la cual se inyecta una disolución de mepiramina (100 µg/kg) y a los 5 min la albúmina de huevo (10 mg/kg). Finalmente, se registra el tiempo de supervivencia.<sup>23</sup>

## Modelos *in vivo* de espasmo bronquial

### A. Espasmo bronquial *in vivo* inducido por histamina en cobayos

La evaluación del espasmo bronquial inducido por la administración de histamina ha sido realizada en cobayos Hartley machos de 400 a 450 g de peso corporal. Para ello, se conforman varios grupos de tratamiento y se administran durante siete días. Posteriormente, todos los animales se anestesian con 40 mg/kg de pentobarbital sódico por vía ip., se realiza la traqueotomía y se ventilan con una bomba de respiración a 60 respiraciones/min con un volumen constante de 5 a 6 mL, se canaliza la vena yugular y se administran 15 mg/kg de pentobarbital sódico vía iv. para producir el paro respiratorio. A continuación, se realizan tres inyecciones iv. de histamina (15 mg/kg) con un intervalo entre ellas de seis minutos tanto a los grupos tratados como a un grupo control (no recibe tratamiento) y la presión intratraqueal después de cada administración se determina con un transductor de presión que registre un intervalo de presión de 0 a 100 cm H<sub>2</sub>O acoplado a un registrador.<sup>13-15,24</sup>

El resultado se considera positivo cuando la broncoconstricción, mediada por la administración de histamina, en los animales tratados disminuye significativamente con relación a la de los animales controles.<sup>13-15,25</sup>

La difenhidramina 60 mg/kg administrada en dosis única por vía oral constituye la sustancia de referencia comúnmente utilizada, cuya administración es llevada a cabo 1 h antes de provocada la reacción.<sup>13-15,25</sup>

### B. Modelo de broncoconstricción inducida por albúmina de huevo en cobayos

Para el desarrollo de este modelo, se sensibilizan cobayos albinos machos (300 a 400 g) mediante una inyección subcutánea (sc.) de albúmina de huevo (10 mg), a los que 15 d después se les administra la sustancia a evaluar. Dos horas más tarde, los cobayos se anestesian con pentobarbital sódico (50 mg/kg, ip.) y se preparan para el registro de la presión endotraqueal según la clásica prueba de Konzett y Rossler (1940).<sup>24</sup>

Para ello, una cánula es insertada en la tráquea del animal para ser ventilado artificialmente mediante una bomba de respiración a razón de 55 respiraciones/min con un volumen de 3 a 4 mL. La presión traqueal es registrada entonces mediante un transductor de presión que registre un intervalo de presión de 0 a 100 cm H<sub>2</sub>O, conectado a un registrador.

Después de la preparación quirúrgica, los animales se inyectan por vía iv. con indometacina (1 mg/kg), mepiramina (2,5 mg/kg), atropina (1 mg/kg) y propanolol (0,05 mg/kg) y 5 min más tarde, se les induce la broncoconstricción anafiláctica por inyección iv. de albúmina de huevo (0,5 mg/kg).<sup>23</sup>

## Modelo de conducta de rascado (*scratching behavior*) en ratones

Para el desarrollo de este modelo se utilizan ratones machos Balb/c o ICR hembras de 20 a 25 g de peso.<sup>17,26-28</sup>

El experimento de conducta en ratones machos Balb/c se desarrolla de acuerdo con el método de Sugimoto y cols.<sup>26</sup> Para ello y con el objetivo de lograr su aclimatación, los ratones se colocan dentro de cajas de acrílico (22 cm x 22 cm x 24 cm). Transcurridos 10 min, el compuesto 48/80 (50 µg/50 µL) (disuelto en disolución salina) se inyecta intradérmicamente en la parte rostral del lomo previamente rasurado. Inmediatamente después, los ratones se colocan nuevamente en las cajas (1 ratón/caja), mientras sus conductas se observan y se graban usando una cámara de video durante una hora. El rascado de la piel en el sitio de la inyección y la comparación con el rascado en otros sitios constituye la respuesta a cuantificar. Un incidente de rascado en este modelo en ratones se caracteriza por varios rascados en un segundo, por lo cual se cuantifica la cantidad de incidentes de rascado que tiene lugar durante 60 min.

El experimento de conducta en ratones hembras ICR se desarrolla según el método de Takubo y cols.<sup>28</sup> para lo cual el compuesto 48/80 (10 µg/sitio) o la histamina (100 nmol/sitio) se inyectan intradérmicamente en la parte rostral del lomo del ratón e inmediatamente después, cada ratón se coloca en una cámara de observación (11 cm de diámetro y 18 de alto), circundada por un enrollado y se observa su conducta posterior durante una hora.

Al menos 12 h antes de la medición de la conducta y bajo anestesia, en ambas patas traseras se implanta subcutáneamente un pequeño magneto (longitud: 3 mm, diámetro: 1 mm). La corriente eléctrica inducida en el enrollado de la cámara de observación por el movimiento del magneto se amplifica y se registra utilizando un equipo, MicroAct (Neuroscience, Tokyo, Japan).<sup>29</sup>

Las sustancias evaluadas por cualesquiera de las alternativas antes mencionadas se administran por vía oral<sup>27</sup> o ip.<sup>17</sup> 1 h antes de comenzar la observación conductual.

## Modelo de edema de la oreja

El modelo de edema de la oreja constituye uno de los ensayos tradicionales predictivos de sensibilización dérmica en humanos que utiliza modelos experimentales con ratones.<sup>30</sup>

Los ratones machos ICR de seis semanas de edad (25 a 30 g de peso corporal) han sido ampliamente utilizados en este modelo,<sup>18,22,31,32</sup> el cual es útil en la evaluación de la actividad antianafiláctica de diversas sustancias.

Para ello con una microjeringuilla con una aguja hipodérmica 28-gauge se administra una inyección intradérmica del compuesto 48/80 (100 µg/sitio) disuelto en suero fisiológico dentro de la parte dorsal de la oreja del ratón minutos antes de cuantificar la reacción. La respuesta del edema de la oreja se define como el aumento de su engrosamiento por encima de los valores controles basales y se determina 40 min después de la inyección del compuesto (100 µg/sitio) o el vehículo y se mide con un micrómetro digital. Para este procedimiento, el animal debe ser moderadamente anestesiado. Los valores obtenidos se consideran como el efecto del compuesto 48/80 más que el efecto de la inyección del vehículo (edema físico), ya que a los 40 min la respuesta edema - oreja evocada por la disolución salina retorna casi al engrosamiento basal.<sup>31</sup>

El compuesto 48/80 disuelto en disolución salina (5 mg/mL) puede ser inyectado también (100 µg/sitio)

en la zona ventral del lado izquierdo de la oreja del ratón usando una aguja hipodérmica, mientras la zona ventral del lado derecho de la oreja inyectada con disolución salina constituye el control negativo (sham) de comparación.

La anestesia moderada que se requiere para la medición del engrosamiento de la oreja puede ser inducida por la inyección ip. de una mezcla (1 : 1) de 50 µL de ketamina (1 mg/mL) e hidrocloreto de xilazina (23,32 mg/mL). La respuesta del edema de la oreja puede ser determinada 1 h después de la inyección del compuesto 48/80, para lo cual los animales se mantienen inmóviles.<sup>32</sup> Las sustancias de prueba se administran 24, 12 y 1 h antes de las inyecciones del compuesto 48/80.<sup>18,22,31</sup>

## Modelos *in vitro*

### Modelo de liberación *in vitro* de histamina

#### A. Liberación de histamina inducida por el compuesto 48/80 en mastocitos peritoneales de ratas

El ensayo de liberación de histamina de las células de mastocitos peritoneales de ratas incluye varios pasos. Primeramente, se hace un aislamiento y preparación de dichas células, para lo cual ratas machos Wistar de siete semanas de edad<sup>17,31</sup> son anestesiadas con éter e inyectadas en la cavidad peritoneal con 20 mL de una disolución reguladora Tyrode B (137 mmol/L de NaCl, 5,3 mmol/L de glucosa, 12 mmol/L de NaHCO<sub>3</sub>, 2,7 mmol/L de KCl, 0,3 mmol/L de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7,4) con 0,1 % de gelatina (Sigma, USA). Inmediatamente, el abdomen de la rata se masajea suavemente durante 90 s. Pasado este tiempo, se abre cuidadosamente la cavidad peritoneal y el fluido que contiene se aspira con una pipeta Pasteur. Luego, las células peritoneales se sedimentan a 150 g durante 10 min a temperatura ambiente y se resuspenden en 1 mL de disolución reguladora Tyrode B.<sup>33</sup>

Una vez resuspendidas, las células de mastocitos se separan de los componentes principales de las células peritoneales de las ratas (macrófagos, pequeños linfocitos, entre otros) de acuerdo con el método descrito por Yurt y cols.<sup>34</sup> Para ello, se añaden 2 mL de metrizamida al 22,5 % (1,120 g/mL de densidad) a las células peritoneales suspendidas en 1 mL de disolución reguladora Tyrode B, las cuales se centrifugan a 400 g durante 15 min a temperatura ambiente. Las células remanentes en la interfase disolución reguladora - metrizamida se aspiran y se desechan, mientras las células en el precipitado se lavan y se resuspenden en 1 mL de disolución reguladora Tyrode A {10 mmol/L de ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico (HEPES), 130 mmol/L de NaCl, 5 mmol/L de KCl, 1,4 mmol/L de CaCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 5,6 mmol/L de glucosa pH = 7,4} con 0,1 % de seroalbúmina bovina. Las preparaciones de las células de mastocitos obtenidas son aproximadamente 95 % puras según el ensayo de tinción de azul de toluidina y más del 97 % viable según la exclusión de azul de Trepan.<sup>35</sup>

Las suspensiones de células de mastocitos purificadas (2 · 10<sup>5</sup> células/mL) se pre-incuban a 37 °C durante 10 min para su estabilización antes de añadir el compuesto 48/80 (5 mg/L).<sup>30</sup> La sustancia de prueba y el cromoglicato disódico (sustancia de referencia) se añaden respectivamente a los 10 min y 30 s previos, de añadir el compuesto 48/80.<sup>36</sup> Las células son incubadas con el compuesto 48/80 durante 20 min. La reacción se detiene por enfriamiento de los tubos con hielo y las células se separan de la histamina liberada por centrifugación a 400 g durante 5 min a 4 °C. La histamina residual en las células se libera por lisis de las células con ácido perclórico y centrifugación ulterior a 400 g durante 5 min a 4 °C.<sup>31</sup> El contenido de histamina se determina mediante el mé-

todo espectrofluorométrico OPA (o-ftaldialdehído).<sup>37</sup> La intensidad fluorescente se mide a 438 nm y el porcentaje de inhibición de la histamina liberada se calcula usando la ecuación siguiente:

$$\text{Inhibición} = (A - B) \cdot 100/A \quad (\%)$$

donde:

- A cantidad de histamina liberada en ausencia de la sustancia de prueba.
- B cantidad liberada desde las células tratadas con la sustancia de prueba.<sup>18,22,31,38</sup>

Otras alternativas emplean 10 mL de disolución reguladora Tyrode A (10 mmol/L de HEPES, 136 mmol/L de NaCl, 5 mmol/L de KCl, 2 mmol/L de CaCl<sub>2</sub>, 2,75 mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 5,6 mmol/L de glucosa, 11 mmol/L de NaHCO<sub>3</sub>, 0,56 mmol/L de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0,1 % de suero bovino) con 0,1 % de gelatina para el aislamiento de células de mastocitos peritoneales en ratas machos Sprague Dawley.<sup>38</sup>

#### B. Medición de la recaptación de Ca<sup>45</sup> en las células de mastocitos peritoneales de ratas

La medición de la recaptación de calcio constituye un indicador de la presencia de una reacción dependiente de los mastocitos. La recaptación de calcio en las células de mastocitos se mide de acuerdo con el método de Chai y cols.<sup>39</sup> para lo cual las células de mastocitos peritoneales de ratas (CMPR) se resuspenden en disolución reguladora Tyrode - HEPES que contiene Ca<sup>45</sup> (1,5 mCi/mL; 1 Ci = 3,7 · 10<sup>10</sup> Bq) y se incuban a 4 °C durante 10 min. Las suspensiones de las células de mastocitos se pre-incuban con la sustancia de prueba (10 a 1 000 mg/mL) a 37 °C durante 10 min y después se incuban con el compuesto 48/80 (0,25 mg/mL) a 37 °C por 20 min. La reacción se detiene por adición de 1 mmol/L de cloruro de lantano. Las CMPR se centrifugan tres veces a 150 g por 10 min a 4 °C y se lisan con 10 % de Tritón X - 100 y agitación vigorosa. La radioactividad de la disolución se mide en un B - contador de centelleo.

## Modelos de reacción Schultz-Dale

#### A. Modelo Schultz-Dale inducido por histamina o acetilcolina sobre el íleon aislado de cobayos

Para la evaluación de la curva acumulativa de histamina en íleon aislado de cobayos se llevan a cabo varios pasos. En este ensayo se utilizan cobayos machos, de 400 a 450 g de peso que se anestesian y sacrifican. Posteriormente, el íleon se aísla y se prepara según la técnica de Sainz y cols.,<sup>40,41</sup> para lo cual se emplea un baño de órganos de 20 mL con disolución de Krebs a 37 °C, burbujeada con una mezcla de O<sub>2</sub> (95 %) y CO<sub>2</sub> (5 %).

Una vez colocadas las porciones de íleon y fijado un extremo de ellas al baño, el otro extremo se fija a un transductor isotónico acoplado a un registrador, se fija la tensión inicial y se añade la sustancia a evaluar en las concentraciones siguientes: 0,3; 1 y 3 mg/mL. Minutos más tarde, las preparaciones se estimulan con diferentes concentraciones de histamina (10<sup>-8</sup> - 10<sup>-5</sup> mol/L).

La amplitud de las contracciones de las preparaciones de íleon constituye la respuesta a cuantificar. Para ello, cada operación se repite cinco veces.

El procedimiento anterior es válido también para la evaluación de la curva cuando la reacción es inducida por acetilcolina. Las concentraciones a evaluar de la nueva sustancia pueden incluir 0,1; 0,3; 1, 3 y 10 mg/mL.<sup>15</sup>

#### B. Reacción Schultz-Dale inducida por albúmina de huevo en preparaciones de tráqueas aisladas de cobayos

Esta técnica *in vitro* consiste en provocar la sensibilización de curieles con albúmina de huevo y la liberación

de mediadores mediante dosis desencadenantes del antígeno en preparaciones aisladas de tráqueas, de las que se registran posteriormente sus contracciones. Para ello, curieles de ambos sexos (250 a 300 g) se sensibilizan mediante inyección ip. de 0,1 mL de albúmina de huevo al 5 % en tres dosis, repetidas en días alternos. Veintiún días después de la sensibilización, los curieles se sacrifican, se extraen las tráqueas, se cortan helicoidalmente y se colocan en un baño de órgano de 10 mL con disolución de Krebs a 37 °C burbujeado con carbógeno. Los tejidos se estabilizan durante una hora. Luego un extremo de la tráquea se fija al baño y el otro a un transductor fuerza-desplazamiento acoplado a un polígrafo, mientras la tensión inicial se fija a 1 g. Se realizan curvas dosis-respuesta acumulativas a la albúmina de huevo según la técnica de Van Rossum.<sup>42</sup> Por otra parte, las sustancias a evaluar pueden administrarse a los animales durante el proceso de sensibilización o incubándolas durante una hora con la preparación aislada antes de realizar la curva acumulativa a la albúmina de huevo.

### Consideraciones finales

Aunque no existen reglas absolutas para seleccionar el mejor modelo animal a utilizar para evaluar el efecto de sustancias con potencial antianafiláctico, ciertas consideraciones favorecerían dicha selección: 1) seleccionar el modelo a) con mayor analogía a la situación que se pretende simular, de modo que los resultados sean extrapolables a sistemas afines; b) que cumpliendo los requisitos anteriores, presente menor costo y mayor facilidad de manipulación experimental; c) que no introduzca variables que interfieran en las que serán evaluadas; d) que minimice un impacto negativo sobre el medio ambiente; 2) seleccionar la especie de mejor homogeneidad genética, de modo que se obtengan resultados reproducibles; 3) cuidar los aspectos éticos relacionados con el uso de animales, de forma que garanticen el menor sufrimiento de ellos y el uso de la menor cantidad posible, siempre que se logre el objetivo propuesto con el nivel adecuado de certidumbre estadística y biológica. De todo lo anterior, se desprende que el modelo ha de presentar un conjunto de características biológicas que garanticen la racionalidad de su selección con respecto al objetivo de la investigación.

### CONCLUSIONES

Los modelos experimentales son capaces de brindar información sobre las propiedades de cualquier sistema a investigar, así como de ayudar a predecir la eficacia y seguridad de un determinado tratamiento en diversos estados patológicos. De esta forma, la adecuada selección y uso de un modelo experimental para la investigación y la interpretación de sus resultados constituyen puntos críticos para la evaluación correcta de una nueva terapia.

Actualmente, en la evaluación preclínica de sustancias con potencial antianafiláctico se utilizan diversos modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* que pueden subdividirse de acuerdo con el método de inducción de la reacción anafiláctica, pero se diferencian en cuanto al tipo de antígeno, especie animal utilizada y al carácter de la reacción (sistémica o local), si bien la mayoría involucra un mecanismo inmunológico mediado por cambios de los niveles IgE que se producen como resultado de la interacción antígeno-anticuerpo. La APC es el modelo estándar para evaluar sustancias con posibles efectos antianafilácticos, si bien no reproduce todos los factores involucrados en la etiopatogenia de la anafilaxia, por lo cual también se utilizan otros modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Coombs RRA and Gell PGH. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. In: Gell PHG, Coombs RRA, Lachmann PJ, editors. Clinical aspects of immunology. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1975:p.761-781.
2. Acero S, Tabar AI, García BE, Echechipía S y Olaguibel JM. Anafilaxia: diagnóstico etiológico. *Alergol Immunol Clin*. 1999;14:133-137.
3. Castells MC, Horan RF, Ewan PW, Church MK y Sheffer AL. Anafilaxia. En: Holgate ST, Church MK, Lichtenstein LM, editores. *Alergología* Harcourt, 2001:p.63-174.
4. Kemp SF and Lockey RF. Anaphylaxis: a review of causes and mechanism. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110:341-348.
5. Lieberman P, Kemp S, Oppenheimer J, Lang D, Bernstein I, Nicklas R, et al. The diagnosis and management of anaphylaxis: an updated practice parameter. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(3 Suppl):483-523.
6. McGrath KG. Anaphylaxis. In: Patterson R, Grammer LC, Greenberger PA, Zeiss CR, editors. *Allergic diseases: diagnosis and management*. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: JB Lippincott, 1993:p.587-610.
7. Pelikan E. The changes in the nasal secretions of Eosinophils during the immediate nasal response to allergic challenge. *J Allergy Clin Immunol*. 1983;7(2):657.
8. Kay AB. Mast cells and their mediators in the pathogenesis of asthma. *Eur J Respir Dis*. 1983;64(Supl131).
9. Li GZ, Chai OH, Lee MS, Han EH, Kim HT and Song CH. Inhibitory effects of *Houttuynia cordata* water extracts on anaphylactic reaction and mast cell activation. *Biol Pharm Bull*. 2005;28(10):1864-8.
10. Wasserman SI. Anaphylaxis. In: Kaplan AP, editors. *Allergy*, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia, Pennsylvania: WB. Saunders Company, 1997:p.565-572.
11. Anuario Estadístico Tienes 2006. [Consultado: 7 de julio de 2008.] Disponible: <http://www.sld.cu/sitios/dne/>.
12. Shin BK, Lee EH and Kim HM. Suppression of L-histidine decarboxylase mRNA expression by methyleugenol. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;232:188-91.
13. Núñez YF, Lagarto AP, Tillán JC, Lastra HV, Agüero SF, Guerra IS y cols. Efecto del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus citriodora* Hook, sobre la anafilaxia pasiva cutánea, espasmo bronquial y toxicidad aguda oral. *Rev Mexicana Ciencias Farmacéuticas*. 2003; 34(4):2-7.
14. Núñez YF, Barzaga PF, Carrillo CD, Lastra HV, Chávez IH, Fernández DM y cols. Efecto del extracto acuoso liofilizado de *Ocimum tenuiflorum* L. sobre la anafilaxia pasiva cutánea, espasmo y tonicidad bronquial. *Rev Cubana Planta Med*. 2004;9(3).
15. Núñez YF, Tillán JC, Carrillo CD, Vega YH, Guerra MO y Rivero RM. Efecto del extracto acuoso liofilizado de *Boerhaavia erecta* L. sobre la anafilaxia pasiva cutánea, espasmo y tonicidad bronquial y la musculatura lisa intestinal. *Acta Farm Bonaerense*. 2004;23(4):510-4.
16. Sunada Y, Nakamura S and Kamei Ch. Effects of *Lactobacillus acidophilus* Strain L-55 on Experimental Allergic Rhinitis in BALB/c Mice. *Biol Pharm Bull*. 2007;30(11):2163-2166.
17. Jiang S, Nakano Y, Yatsuzuka R, Ono R and Kamei Ch. Inhibitory Effects of *Moutan Cortex* on Immediate Allergic Reactions. *Biol Pharm Bull*. 2007;30(9):1707-1710.
18. Choi YH, Yan GH, Chai OH, Lim JM, Sung SY, Zhang X, et al. Inhibition of Anaphylaxis-Like Reaction and Mast Cell Activation by Water Extract from the Fruiting Body of *Phellinus linteus*. *Biol Pharm Bull*. 2006;29(7):1360-1365.
19. Chai OH, Lee MS, Han EH, Kim HT and Song CH. Inhibitory effects of *Morus alba* on compound 48/80-induced anaphylactic reactions and anti-chicken gamma globulin IgE-mediated mast cell activation. *Biol Pharm Bull*. 2005;28(10):1852-1858.
20. Inagaki N, Nagao M, Igeta K, Kawasaki H, Kim JF and Nagai H. Scratching behavior in various strains of mice. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2001;14(2):87-96.
21. Neel NF, Creasy BM, Rankin JN, Pierce EM, McCoy ME., Danner RH, et al. Absence of interleukin-3 does not affect the severity of local and systemic anaphylaxis but does

- enhance eosinophil infiltration in a mouse model of allergic peritonitis. *Immunol Lett.* 2004;95(1):37-44.
22. Choi YH, Yan GH, Chai OH, Choi YH, Zhang X, Lim JM, *et al.* Inhibitory Effects of *Agaricus blazei* on Mast Cell-Mediated Anaphylaxis-Like Reactions. *Biol Pharm Bull.* 2006;29(7):1366-1371.
23. Carbajal D, Arruzazabala ML, Molina V y Valdés S. Efecto del D-002 en modelos experimentales de anafilaxia. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 2001;32(2):93-96.
24. Konzett H and Rosler R. Bronchodilator activity Konzett test. *Archives of Experimental Pathology and Pharmacology.* 1940;195:71-5.
25. Carbajal D, Casacó A, Arruzazabala L, González R and Fuentes V. Pharmacological screening of plant decoctions commonly used in Cuba folk medicine. *J Ethnopharmacol.* 1991;33(1-2):21-4.
26. Sugimoto Y, Umakoshi K, Nojiri N and Kamei C. Effects of histamine H1 receptor antagonists on compound 48/80-induced scratching behavior in mice. *Eur J Pharmacol.* 1998;351(1):1-5.
27. Han SJ, Bae EA, Trinh HT, Yang JH, Youn UJ, Bae KH and Kim DH. *Magnolol* and *Honokiol*: Inhibitors against Mouse Passive Cutaneous Anaphylaxis Reaction and Scratching Behaviors. *Biol Pharm Bull.* 2007;30(11):2201-2203.
28. Takubo M, Ueda Y, Yatsuzuka R, Jiang S, Fujii Y and Kamei C. Characteristics of scratching behavior induced by some chemical mediators in hairless mice. *J Pharmacol Sci.* 2006;100(4):285-288.
29. Inagaki N, Igeta K, Shiraishi N, Kim JF, Nagao M, Nakamura N and Nagai H. Evaluation and characterization of mouse scratching behavior by a new apparatus, MicroAct. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2003;16(3):165-175.
30. Kim HM and Yang DJ. Effect of *Kumhwang-San* on anaphylactic reaction in a murine model. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1999;21:163-74.
31. Jeong HJ, Moon PD, Um JY, Park J, Leem KH, Kim ChJ, Kim HM and Hong SH. Effect of *Gamiseunggal-Tang* on immediate type allergic reaction in mice. *Indian J Med Res.* 2007; 125:542-549.
32. Yi JM, Hong SH, Lee HJ, Won JH, Kim JM, Jeong DM, *et al.* *Ixeris dentata* green sap inhibits both compound 48/80-induced anaphylaxis-like response and IgE-mediated anaphylactic response in murine model. *Biol Pharm Bull.* 2002;25(1):5-9.
33. Jeong HJ, Na HJ, Hong SH and Kim HM. Inhibition of the stem cell factor-induced migration of mast cells by dexamethasone. *Endocrinology.* 2003;144:4080-6.
34. Yurt RW, Leid RW and Austen KF. Native heparin from rat peritoneal mast cells. *J Biol Chem.* 1977;252(39):518-21.
35. Mascotti K, McCullough J and Burger SR. HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Transfusion.* 2000;40(6):693-696.
36. Jiang S, Tsumuro T, Takubo M, Fujii Y and Kamei C. Antipruritic and antierythema effects of ascomycete *Bulgaria inquinans* extract in ICR Mice. *Biol Pharm Bull.* 2005;28(12):2197-2200.
37. Jeong HJ, Lee SA, Moon PD, Na HJ, Park RK, Um J, *et al.* Alginic acid has anti-anaphylactic effects and inhibits inflammatory cytokine expression via suppression of nuclear factor - Kappa b activation. *Clin Exp Allergy.* 2006;36:785-94.
38. Kim EK, Kim EY, Moon PD, Um JY, Kim HM, Lee HS, *et al.* *Lithospermi radix* Extract inhibits histamine release and production and inflammatory cytokine in mast cell. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007;71(12):2886-2892.
39. Chai OH, Kim EK, Lee YH, Kim JG, Baik BJ, Lee MS, *et al.* Histamine release induced by dendroaspis natriuretic peptide from rat mast cells. *Peptides.* 2001;22(9):1421-1426.
40. Sainz F, Miyares C y García M. Técnicas de farmacología experimental. La Habana, Cuba: Editorial Ciencia y Técnica. 1972:pp.131-5.
41. Nuñez FY, Tillán CJ, Carrillo DC, Guerra OM y Rivero MR. Evaluación del extracto acuoso liofilizado de *Boerhavia erecta* L. sobre la transmisión colinérgica e histaminérgica. *Rev Cubana Plant Med.* 2004;9(2).
42. Van Rossum JH. Cumulative dose response curve II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. *Archs Int Pharmacodyn Ther.* 1963;143:299.